



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNAM
POSGRADO** 

**POSGRADO DE LA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE IFN- γ SOBRE LA ACTIVACIÓN DE
NF- κ B EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS TRATADAS
CON TNF- α ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

P R E S E N T A :

C.D. CÉSAR AUGUSTO ESQUIVEL CHIRINO

TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

México, D. F.

Noviembre 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

A CONACYT

Por la beca recibida con registro de
estudiante N° 194961

Así como los proyectos
DGAPA-PAPITT IN205703
CONACYT45519-M

Dedicatorias

Gracias a mis padres:

Por darme todo su amor y confianza, y saber que siempre cuento con su apoyo incondicional en todo momento, por apoyarme siempre para cumplir mis metas y anhelos. Por todos los consejos, por darme fuerzas cuando mas lo he necesitado para realizar mis proyectos, y enseñarme como se puede ser fuerte ante las adversidades.

A mi pequeña hermana Hannia Lilly, por la alegría, las risas y el amor otorgados.

A mi hermano Edgar † porque en donde quiera que estés compartes este momento conmigo.

A mis abuelos por todas las muestras de amor que me han dado, en especial a mi abuelo por ser ejemplo de fortaleza, esfuerzo y trabajo.

A mis tíos (Irma, Alejandra, Carmen, Enrique), por el cariño y amor.

Agradecimientos

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por haberme aceptado en su grupo y enseñado el verdadero mundo de la investigación. Por todos los conocimientos aportados, enseñanzas, críticas desde su forma de ver la ciencia encaminadas a fortalecer mi formación académica, por el esfuerzo y confianza otorgada en todo momento para realizar este proyecto.

Al Maestro y amigo José Luis Ventura Gallegos por el apoyo incondicional, asesoría técnica, tiempo, regaños, comentarios y sugerencias, que contribuyeron sustancialmente para realizar este trabajo, sin los cuales hubiera sido difícil completarlo.

A mis compañeros y amigos del Lab de bioquímica en Nutrición: Susana Frías (Srita. Frías) por los consejos, la asesoría, a Gabriela Galicia por sus consejos, por la amistad. A mi colega la Mtra. Dely Montes por sus comentarios, críticas, consejos, al Q.F.B Ambar Lopéz Macay por el buen humor que te caracteriza, por regalarme HUVECs cuando más las necesitaba, al famosísimo Sr. Sandoval por haberme apoyado en la última parte de este trabajo, por contribuir al buen humor del lab, al Biólogo Hermaya por la amistad, por las platicas, discusiones por prestarme la compu de estudiantes del lab, a Fernando Sánchez (Pollo) por las asesorías, discusiones de mis experimentos. A Irma Mitre, por su asesoría técnica, los consejos, los puntos de vistas discutidos. A la Dra. María de Jesús Ibarra por los comentarios, asesorías para este trabajo. Al Dr. Sigifredo Pedraza por sus comentarios, asesorías técnica en las citometrías de flujo, a la Q.F.B Carmita.

Al Dr. Higinio Arzate, a la Dra. Elba Leyva por ver que este proyecto se terminara, por el apoyo recibido que contribuyo para mi formación, por los comentarios, regaños.

A la Dra. Rebeca López Marure, al Dr. Javier Cabiedes por los comentarios, críticas y asesorías aportadas en este trabajo.

A los Doctores de NIH (USA) Silvio Gutkind, Silvia Montaner, por darme la oportunidad de aprender con ellos, y ver su forma de concebir la ciencia, su apoyo me permitió crecer en lo personal y en lo académico.

A la Dra. Luz del Carmen González por contar con su apoyo.

A Doña Manue Gallaga, por ver que no me malpasara, por organizar y tener siempre el material listo usado en este proyecto.

A mis amigos con quienes siempre puedo contar de manera incondicional.

Gracias a todos los que en algún momento se han cruzado en mi camino aportando conocimientos, compartiendo enseñanzas.

ÍNDICE

Página

1.-Abreviaturas	i)
2.-Resumen	ii)
3.-Introducción	1
4.-Antecedentes	2
Endotelio sus funciones generales	2
Fenotipo constitutivo del endotelio	5
Fenotipo activado del endotelio	5
Participación en la respuesta inflamatoria	8
Principales moléculas que participan en la inflamación	12
Óxido Nítrico	12
Quimiocinas	12
Familia de moléculas de adhesión	13
Integrinas	13
Selectinas	14
Selectina L	14
Selectina P	14
Selectina E	15
Familia de Inmunoglobulinas	16
VCAM-1	16
ICAM-1	17
Citocinas	18
Funciones de las citocinas	19
Principales tipos de respuesta mediados por citocinas	20
Receptores de citocinas	20
Efecto de citocinas en las células endoteliales	21
Factor de Necrosis Tumoral	23
TNF como mediador de patologías	24
Vía de señalización de TNF	25
Interferones	27
Tipo I	28
Receptor para Interferón Tipo I	30
Tipo II	31
Receptor para Interferón Tipo II	31
Sistema de Jak Cinasas involucradas en la vía de IFN-γ	32
Señales Transductoras Activadoras de la Transcripción (STATs)	32

Factor nuclear kappa B (NF-κB)	34
La familia REL	34
Activación de NF- κ B	34
La transducción de las señales que activan a NF- κ B	36
La familia de IκBs	37
I κ B- α	38
I κ B- β	38
I κ B- ϵ	39
5.- Planteamiento del Problema	41
6.- Justificación	42
7.- Hipótesis	43
8.- Objetivo General	43
9.- Objetivos específicos	43
10.- Materiales y métodos	45
Obtención de células endoteliales humanas	45
Inmunoensayos Western Blot	46
Citometría de Flujo	47
Análisis estadístico	48
11.- Resultados	
• Expresión de selectina-E en células HUVEC a diferentes concentraciones de TNF e IFN- γ .	49
• Expresión de ICAM-1 en células HUVEC a diferentes concentraciones de TNF e IFN- γ .	51
• Cinética de degradación de I κ Bs α , β y ϵ en células HUVEC tratadas con 10 ng/ mL de TNF.	52
• Cinética de degradación de I κ Bs α , β y ϵ en células HUVEC tratadas con TNF e IFN- γ .	54
• Curso Temporal de la expresión de selectina-E en células HUVEC tratadas con TNF e IFN- γ por citofluorometría.	56
• Curso Temporal de la expresión de ICAM-1 en células endoteliales tratadas con TNF e IFN- γ y/o la combinación de ambos por citofluorometría.	58
• Curso Temporal de la expresión de selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales tratadas con TNF e IFN- γ y/o la combinación de ambos por inmunoensayo western blot.	60
12.-Discusión	62
13.-Conclusiones	66
14.-Perspectivas	67
15.-Referencias	68

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.- Esquema de los tipos de fenotipo endotelial en reposo y activado	7
Figura 2.- Etapas de la migración leucocitaria a través de los vasos sanguíneos.	10
Figura 3.- Vía de Señalización de TNF	26
Figura 4.- Vía de la señalización del Interferón alfa (IFN- α)	29
Figura 5.- Vía de la señalización del Interferón gamma (IFN- γ)	31
Figura 6.- Estímulos que activan al factor de transcripción NF- κ B	36
Figura 7.- Vía de señalización del factor nuclear NF- κ B.	40

RESULTADOS

Figura 8.- Citofluorometría para la expresión de selectina-E, en células HUVEC tratadas con diferentes concentraciones de TNF e IFN- γ .	49
Figura 9.- Gráfica del Índice promedio de fluorescencia de selectina-E, en células HUVEC tratadas con diferentes concentraciones de TNF e IFN- γ .	50
Figura 10.- Citofluorometría para la expresión de ICAM-1, en células HUVEC tratadas con diferentes concentraciones de TNF e IFN- γ .	51
Figura 11.- Gráfica del Índice promedio de fluorescencia de ICAM-1, en células HUVEC tratadas con diferentes concentraciones de TNF e IFN- γ .	51
Figura 12.- Cinética de la degradación de I κ Bs α , β , y ε en células HUVEC tratadas con 10 ng/mL de TNF.	52
Figura 13.- Gráfica de las densitometrías de la cinética de degradación de I κ Bs α , β , y ε . en células HUVEC tratadas con 10 ng/mL.	53
Figura 14.- Cinética de la degradación de I κ Bs α , β , y ε en células HUVEC tratadas de 5 a 60 min con 0.1 ng/mL de TNF, 100 U/mL de IFN- γ y/o la combinación de ambos.	54
Figura 15.- Gráfica de las densitometrías de la cinética de degradación de I κ Bs α , β , y ε en células HUVEC tratadas de 5 a 60 min con 0.1 ng/mL de TNF, 100 U/mL de IFN- γ y/o la combinación de ambos.	55

Figura 16.- Citofluorometría para la expresión de selectina-E, en células HUVEC tratadas con TNF e IFN- γ .	56
Figura 17.- Gráfica del Índice promedio de fluorescencia de selectina-E, en células HUVEC tratadas con TNF e IFN- γ .	57
Figura 18.- Citofluorometría para la expresión de ICAM-1, en células HUVEC tratadas con TNF e IFN- γ .	58
Figura 19.- Gráfica del Índice promedio de fluorescencia de ICAM-1, en células HUVEC tratadas con TNF e IFN- γ .	58
Figura 20.- Inmunoensayo western blot para la expresión de Selectina-E, VCAM-1, e ICAM-1 en células HUVEC tratadas con TNF e IFN- γ .	60
Figura 21.- Gráfica de las densitometrías de la expresión de selectina-E, VCAM-1, e ICAM-1 en células HUVEC tratadas con TNF e IFN- γ .	61
Figura 22.- Modelo de activación de NF- κ B por TNF en combinación con IFN- γ .	66

1.- ABREVIATURAS

CEs	Células endoteliales
CAMs	Moléculas de Adhesión celular
CCL21	Quimiocina (motivo C-C) ligando 21
CCR7	Quimiocina (motivo C-C) receptor 7
CTLs	Linfocitos T Citotóxicos
CXCL12	Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12
CXCR4	Quimiocina (motivo C-X-C) receptor 4, también llamada fusina
FasL	Ligando Fas (Miembro 6 de la superfamilia TNF)
HUVECs	Células endoteliales de vena umbilical humana (cultivos primarios)
IFN-γ	Interferón gamma
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular-1
ON	Óxido nítrico
IL	IL Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa
LPS	Lipopolisacárido
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa B
PAF	Factor activador de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas-1
RANTES	Quimiocina (motivo C-C) ligando 5 o CCL5
STATs	Señales transductoras activadoras de la transcripción
STAT1	Señal transductora y activadora de la transcripción 1
TNF	Factor de Necrosis Tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de Adhesión de Células Vasculares-1
VEGF	Factor de crecimiento del Endotelio Vascular

2.-RESUMEN

Muchas de las enfermedades que afectan a la cavidad bucal como son la enfermedad periodontal, patologías pulpares, procesos infecciosos, la mucositis oral, etc., se caracterizan por presentar inicialmente procesos inflamatorios en defensa ante estímulos físicos, químicos y bacterianos. En esta activación de la respuesta inmune innata el endotelio vascular juega un papel importante para lo cual ha diseñado una estrategia molecular que le permite responder ante estos estímulos.

El factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferón gamma (IFN- γ) se requieren para una efectiva respuesta inmune a infecciones bacterianas. Existen evidencias de que estas dos citocinas actúan en combinación en muchas respuestas biológicas como en la expresión de citocinas (IL-1 β , IL-6) lo que ha llevado a postular que el IFN- γ podría ser uno de los factores del micro-ambiente inflamatorio que potencian la respuesta al TNF. Debido a esto, el objetivo de esta investigación fue: Analizar el efecto del IFN- γ sobre la activación de NF- κ B en células endoteliales humanas derivadas de cordón umbilical (HUVEC) tratadas con TNF.

Las células HUVEC se trataron con TNF e IFN- γ para analizar por "western blot" y citometría de flujo la expresión de las moléculas de adhesión selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1. También se evaluaron las cinéticas de degradación de las diferentes isoformas de los inhibidores I κ B α , β y ϵ .

En nuestros resultados observamos que TNF incrementa la expresión de selectina-E y de ICAM-1 a concentraciones de 0.1 ng/mL, a las 6 horas de tratamiento.

Evaluando la cinética de degradación de I κ B- α se observó que con 0.1 ng/mL de TNF la degradación se inicia a partir de los 20 min, pero en presencia de TNF más IFN- γ se induce una temprana degradación a los 20 min. En presencia de la combinación de TNF más IFN- γ se induce una degradación temprana de I κ B- β a los 20 min. En el caso de I κ B- ϵ la cinética de degradación es más lenta que la de α y β en respuesta a 0.1 ng/mL de TNF sin embargo, en presencia de TNF más IFN- γ a los 60 min I κ B- ϵ muestra un incremento en la degradación.

La expresión de las selectina-E, VCAM-1, e ICAM-1 se incrementó en presencia de TNF y de IFN- γ a partir de 2 horas, continuando este efecto a las 4 y 6 horas.

Las conclusiones de este trabajo es que la combinación de TNF e IFN- γ es más eficiente que el TNF, sólo en la activación de NF- κ B medida como la degradación de las diferentes isoformas de I κ Bs. Sin embargo, este efecto no se reflejó con la misma magnitud en los incrementos de expresión de selectina-E, ICAM-1, VCAM-1. IFN- γ no incrementa la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales y no induce la activación del sistema NF- κ B.

3.-INTRODUCCIÓN

En las etapas tempranas de una infección se activa la respuesta inmunitaria innata iniciando una reacción inflamatoria caracterizada por el reclutamiento local masivo de células del sistema inmune hacia la zona infectada. Esta respuesta constituye la primera línea de defensa en el organismo ante estímulos externos.

La respuesta inflamatoria se inicia por la activación de receptores de la familia Toll (TLRs) que reconocen gran variedad de antígenos asociados a virus, bacterias, hongos y parásitos, como son RNA de doble cadena, lipopolisacáridos y lipoglicanos entre otros.

Monocitos residentes secretan masivamente productos pro-inflamatorios que son los responsables directos del reclutamiento de neutrófilos y polimorfonucleares hacia el sitio del daño. Estas células circulantes se infiltran al tejido infectado tras la adhesión de las células circulantes a la pared vascular de las venas postcapilares que circundan el tejido dañado.

Debido a que las células endoteliales en condiciones normales, presentan una superficie no trombogénica y no adherente, en respuesta a citocinas pro-inflamatorias como TNF e IL-1 β secretadas por los monocitos residentes las células endoteliales adquieren la capacidad de adherir neutrófilos y polimorfonucleares. De esta forma se da un cambio fenotípico desde un estado de reposo a un estado activado en el que ocurre la transcripción de diversos grupos de genes que codifican moléculas como: i) la selectina P, que favorece la adhesión de plaquetas, necesaria para dar inicio a la trombogénesis, ii) quimiocinas como RANTES, que participan en la quimiotaxis, iii) citocinas inflamatorias encargadas de amplificar la respuesta de activación, iv) moléculas de adhesión que interactúan directamente con ligandos membranales de las células blanco como selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1, v) iNOS , la sintasa inducible de óxido nítrico (NO) que favorece la vasodilatación local.

Casi todos los genes cuya expresión se enciende durante la activación endotelial dependen en gran medida de una forma activa del factor de transcripción NF- κ B. Las citocinas pro-inflamatorias como TNF o IL-1 β , a través de sus cascadas de señalización, activan eficientemente a NF- κ B. Hay un gran intento en poder modular el sistema NF- κ B ya que en los casos de procesos de infecciones agudas sería útil fomentar la reacción inflamatoria, mientras que en los casos de inflamaciones crónicas resultaría útil interferir con este proceso.

4.-ANTECEDENTES

ENDOTELIO

El endotelio está constituido por células endoteliales (CEs) que recubren la luz de los vasos sanguíneos, linfáticos y cavidades cardiacas, las cuales poseen una estructura típica ya que su morfología se asemeja a un empedrado; siendo la excepción el endotelio alto de las vénulas de órganos linfoides, las cuales muestran una especializada morfología cúbica.

Constituye una estructura en el organismo humano que controla el paso de células y moléculas al interior de los tejidos vecinos. Una gran variedad de estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que también desempeña un papel importante en la homeostasis local del sistema vascular y del sistema inmune (1,2,3,4,5).

Gracias a que se ha incrementado el conocimiento sobre su estructura, así como de sus propiedades funcionales; el endotelio puede ser una membrana pasiva o transformarse en un complejo tejido con funciones especializadas y adaptables a las necesidades específicas según la localización y condiciones del entorno. Esta adaptación se da gracias a la presencia de receptores específicos de membrana a mediadores solubles que incluyen receptores a lipopolisacáridos (TLR-4), a citocinas proinflamatorias como a los receptores de TNF o a interleucinas.

La célula endotelial activada sintetiza, almacena y libera en forma controlada una gran variedad de moléculas que participan activamente en la respuesta inflamatoria y en el fenómeno inmunológico. De tal manera que la disfunción endotelial está involucrada en muchas patologías como en la artritis reumatoide, mucositis oral, sarcoma de Kaposi, patologías pulpaes y en enfermedad periodontal (8,9).

Por su localización entre el torrente sanguíneo y los tejidos, el endotelio vascular puede llevar a cabo funciones moduladoras activas del intenso tráfico molecular y celular que ocurre. Por otro lado lo ubica como blanco primario de las señales de comunicación que son liberadas a la circulación y se considera actualmente como un órgano vital para el organismo (10,11).

La monocapa de células endoteliales es en realidad un epitelio modificado, apoyado por una lámina basal y con interacciones intercelulares. La membrana basal está compuesta en su mayoría por colágena de tipo IV, elastina, laminina y fibronectina. Las células endoteliales desempeñan un papel importante en el mantenimiento de esta membrana, ya que sintetizan y producen un número importante de estos componentes proteicos de la matriz extracelular, como colágenas de tipo I, III, IV y V. Las células endoteliales participan en la remodelación de la membrana basal y en su extensión durante los procesos de angiogénesis (12,13,15).

Este tipo de células se caracterizan por la presencia de los cuerpos de Weibel-Palade, estructuras en forma de bastones que contienen a la proteína von Willebrand (específica del endotelio), el factor VIII de la cascada de coagulación, la selectina-P y algunas quimiocinas como interleucina-8 (IL-8). En respuesta a citocinas inflamatorias los cuerpos de Weibel-Palade se fusionan a la membrana liberando su contenido y dejando en la membrana proteínas transmembranales como la selectina- P.

La organización estructural de estas células es crucial para sus funciones en el tráfico de células y moléculas. A nivel microscópico ciertos órganos como la médula ósea tienen una cubierta endotelial fenestrada, mientras que a nivel molecular las uniones celulares tienen diferente estructura de organización. Se han descrito 4 tipos de uniones celulares formando parte de la monocapa endotelial; uniones estrechas (tight junctions), de adherencia (gap junctions), comunicantes y desmosomas.

En procesos como la inflamación y la coagulación, las células circulantes que deben infiltrarse en los tejidos necesitan migrar a través de las uniones intercelulares. Una de las características típicas de las uniones endoteliales es su organización dinámica, ya que las células endoteliales son capaces de cambiar rápidamente la arquitectura de sus uniones para permitir el paso de las células sanguíneas circulantes. Este fenómeno, en la mayoría de los casos es rápidamente reversible, donde el endotelio es capaz de desorganizar y reorganizar sus uniones intercelulares en minutos.

Las uniones inter-endoteliales presentan distintos grados de complejidad a lo largo del árbol vascular, respondiendo a los diferentes requerimientos funcionales. Se encuentran en gran número y altamente organizadas en largas arterias o en la vasculatura que irriga el cerebro; donde el control de la permeabilidad debe ser estricto.

Mientras que, poseen una organización primitiva en las vénulas postcapilares, donde la extravasación y el intercambio de componentes del plasma requieren de cierta eficacia (6,14,15).

Las células endoteliales son intrínsecamente no trombogénicas y las plaquetas sin activar y otros componentes celulares de la sangre no son capaces de adherirse *in vivo* a la superficie de las células endoteliales en reposo.

La adhesión plaquetaria es uno de los marcadores de activación endotelial más comunes, así como la adhesión de neutrófilos y polimorfonucleares.(14,16)

Actualmente, el mejor modelo para el estudio de células endoteliales lo constituyen las células endoteliales derivadas de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Estas células fueron obtenidas y cultivadas exitosamente por primera vez por David Jaffe en 1973. Las células que se obtienen por este método han sido empleadas para diversos estudios bioquímicos, moleculares y celulares han permitido caracterizar diversas funciones. Estos estudios se han centrado principalmente en su participación en el proceso inflamatorio y fenómeno inmunológico (6,7,16).

FENOTIPO CONSTITUTIVO DEL ENDOTELIO

El endotelio en un adulto normal presenta un metabolismo basal muy lento, caracterizado por un bajo consumo de glucosa y una reducida síntesis de proteínas por lo que se consideran en estado quiescente o de reposo. Bajo esta condición el recambio de las células endoteliales es muy lento. Las células endoteliales quiescentes o en reposo forman una población heterogénea que varía no sólo entre órganos sino dentro de vasos de distintos calibres dentro de un mismo órgano.

La heterogeneidad en la estructura de estas células ejemplifica su capacidad de adaptación al microambiente (18,19). De manera intrínseca, las células endoteliales en reposo constituyen una superficie no trombogénica y no adherente, en la cual se expresan o liberan en forma limitada algunas CAMs, receptores para factores de crecimiento y óxido nítrico.

Aunque en bajos niveles, se encuentran activados genes que codifican para el factor von Willebrand (vWF), las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y PECAM-1, así como el factor de crecimiento vascular endotelial VEGF y el receptor de LDL. Las células endoteliales primarias en reposo exhiben ciertas características específicas que las definen como tipo celular. (Figura 1)

FENOTIPO ACTIVADO DEL ENDOTELIO

De todos los procesos en los que participa el endotelio, probablemente el mejor caracterizado es la activación endotelial mediada por estímulos pro-inflamatorios en condiciones *in vivo* e *in vitro* como el lipopolisacárido (LPS) bacteriano, el factor de necrosis tumoral TNF, la interleucina-1 β (IL-1 β) o los interferones (18,19,20). En respuesta a estos estímulos, prácticamente todos los subtipos de células endoteliales, presentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos además de activarse la expresión génica. La célula endotelial modula localmente el tono vascular liberando óxido nítrico, esto gracias a dos isoformas de la sintasa de óxido nítrico, la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). Estos cambios definen el fenotipo endotelial activado, que le permite adaptarse a los nuevos requerimientos locales.

Las células endoteliales se consideran activadas si se encuentran proliferando o si funcionan como superficies trombogénicas, se tornan adhesivas para las células sanguíneas. Por su localización estratégica entre la sangre y los tejidos, las células endoteliales están sometidas a una exposición constante a mediadores circulantes y pueden por ello responder rápidamente a sustancias agonistas tales como la histamina y la trombina liberados por plaquetas. Esta reprogramación funcional de las células endoteliales ha sido referida también como parte de la activación endotelial (60,61,67). Es importante notar que todos los cambios que se presentan en las células endoteliales activados son reversibles (20,21,22,23). (Figura 1)

Las células endoteliales no sólo son activadas por citocinas y quimiocinas, sino que también pueden sintetizarlas y secretarlas cuando cambian al fenotipo activado. TNF, IL-1 β e IL-6 son citocinas inflamatorias producidas por el endotelio. Estas pueden actuar tanto de forma autócrina como de forma parácrina lo que permite la amplificación y difusión de la respuesta inflamatoria (60).

Las quimiocinas endoteliales incluyen miembros de las familias CXC (IL-8, IP10) y CC (MCP-1, MCP-3 y RANTES). Algunas de estas quimiocinas permiten una respuesta quimiotáctica localizada, necesaria en la migración de CEs que tiene lugar durante la angiogénesis (17,20,62).

La expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) disminuye localmente durante la reacción inflamatoria. La expresión de factores de coagulación, receptores para factores de crecimiento, y CAMs es parte también del fenotipo activado del endotelio. Es relevante mencionar que la célula endotelial también sufre cambios en el arreglo del citoesqueleto, lo cual la capacita para la trans migración leucocítica que sigue a la adhesión. Estudios inmunocitoquímicos señalan que existe una reorganización de los filamentos de actina, especialmente aquellos asociados a las uniones célula-célula (22,57,60,61).

La evidencia experimental sugiere que durante la extravasación las células endoteliales establecen uniones estrechas con los neutrófilos y polimorfonucleares manteniendo así un sello impermeable. La activación endotelial está involucrada en procesos como la inflamación crónica y aguda, regulación del tono vascular, cascada de coagulación, trombosis y angiogénesis. En dichos procesos, la célula endotelial tiene la capacidad de producir moléculas de distinta naturaleza, cuya síntesis y expresión dependerá del estímulo y entorno al que estén expuestas (15,18,62,65).

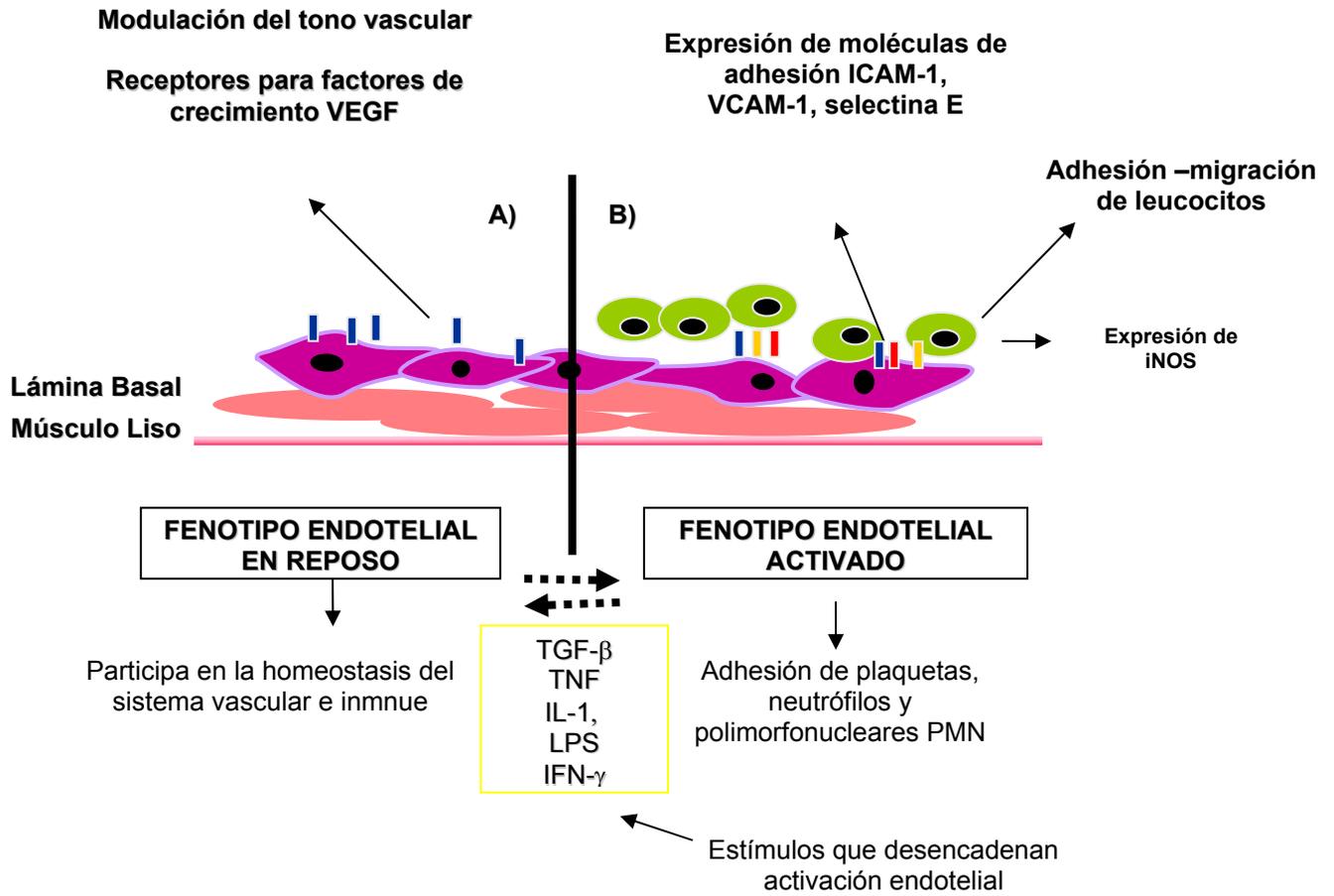


Figura 1.- Esquema de los tipos de fenotipo endotelial en reposo y activado.
 A) Endotelio en Reposo, B) Activación Endotelial.

PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Durante la reacción inflamatoria las células circulantes que deben infiltrarse en interior de los tejidos. Una de las características típicas de las uniones intercelulares entre las células endoteliales es su organización dinámica. Las células endoteliales deben ser capaces de cambiar rápidamente la estabilidad y la arquitectura de sus uniones para permitir el paso de neutrófilos y polimorfonucleares. Este fenómeno en la mayoría de los casos es rápidamente reversible, permitiendo desorganizar y reorganizar las uniones intercelulares en minutos.

La inflamación es un proceso fisiológico que inicia como respuesta al daño causado por agentes patógenos, químicos, infecciosos o traumatismo, radiación o reacciones de tipo antígeno anticuerpo. El proceso inflamatorio involucra una serie de eventos que incluyen la dilatación de capilares y vénulas, los cuales, a su vez, sufren un incremento en la permeabilidad que conducen a la liberación de fluidos y proteínas plasmáticas al espacio intersticial, la manifestación macroscópica de este fenómeno es el edema.

En las etapas tempranas de la inflamación, los neutrófilos son las primeras células en migrar al sitio inflamatorio siguiendo gradientes quimiotácticos de quimiocinas producidas por macrófagos y mastocitos reclutados en el tejido.

Mientras la inflamación progresa, varios tipos de leucocitos, linfocitos y otras células inflamatorias son activadas y atraídas hacia el sitio inflamado por una red de señales que involucran un gran número de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas (63,64,65,66,70).

Para fijarse al endotelio activado y extravasarse hacia los tejidos, los neutrófilos deben reconocer a las células endoteliales activadas y adherirse a ellas con la firmeza suficiente para evitar que el flujo sanguíneo los arrastre. Monocitos y eosinófilos se extravasan por un proceso semejante, pero las diferentes etapas del proceso se han descrito con mayor detalle en el caso de los neutrófilos.

El proceso de extravasación de los neutrófilos puede dividirse en cuatro etapas secuenciales:

- 1) *Rodamiento*
- 2) *Activación por el estímulo quimioatrayente*
- 3) *Paro y adherencia firme*
- 4) *Migración transendotelial*

En la primera etapa los neutrófilos se adhieren al endotelio por interacciones de baja afinidad entre la selectina E y glicoproteínas sialiladas. Estas selectinas, principalmente E y P, se fijan a moléculas de adherencia similares a mucina que se presentan sobre la membrana del neutrófilo, o a un lactosaminoglicano. Ambos tipos de ligandos de selectina E presenta un extremo sialilado conocido como sialilo de Lewis. La selectina E es una glicoproteína de membrana que sobresale por encima del glicocalix endotelial. Al hacer contacto con su contrareceptor sialilo en neutrófilos los hacen bajar y los acercan a la membrana apical de las células endoteliales.

Esta interacción enclava al neutrófilo por poco tiempo sobre la célula endotelial, pero la fuerza de fricción de la sangre circulante acaba por empujarlo. Las moléculas de selectina situadas sobre otra célula endotelial hacen lo mismo con el neutrófilo. Este proceso se repite de modo que el neutrófilo rueda pasa una y otra vez sobre la superficie endotelial, el proceso que se le conoce como "rolling" o rodamiento (67,68,69).

Conforme el neutrófilo rueda, es activado por diversos estímulos quimioatrayentes; entre los cuales se encuentran quimiocinas como IL-8 y la proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP-1), factores como el PAF (factor activador de plaquetas), productos del desdoblamiento del complemento (C5a, C3a y C5b67) y diversos péptidos producidos por el desdoblamiento de proteínas bacterianas durante una infección.

La fijación de estos quimioatrayentes a los receptores situados sobre la membrana del neutrófilo desencadena una señal activadora mediada por proteínas G. Esta señal induce un cambio conformacional en las moléculas de integrina de la membrana del neutrófilo, lo que aumenta su afinidad por las moléculas de adherencia expresadas en la superficie endotelial. La interacción subsecuente entre las integrinas del neutrófilo y las CAMs endoteliales de la superfamilia de inmunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1) estabiliza las interacciones célula-célula, lo que permite una adherencia firme entre ambos tipos de células. (66,68,70,)

Posteriormente, el neutrófilo migra a través de la pared vascular hacia los tejidos. Las etapas de la migración transendotelial y la manera en que ésta se dirige aún no han sido completamente esclarecidas; pero es posible que estén mediadas por factores quimioatrayentes y por las interacciones subsecuentes entre integrinas y CAMs. Los neutrófilos son los primeros en infiltrarse al tejido dañado, estos son seguidos por monocitos y linfocitos que son atraídos hacia los agentes patógenos por quimiotaxis, lo cual favorece su fagocitosis (23,24, 34,35,71). (Figura 2)

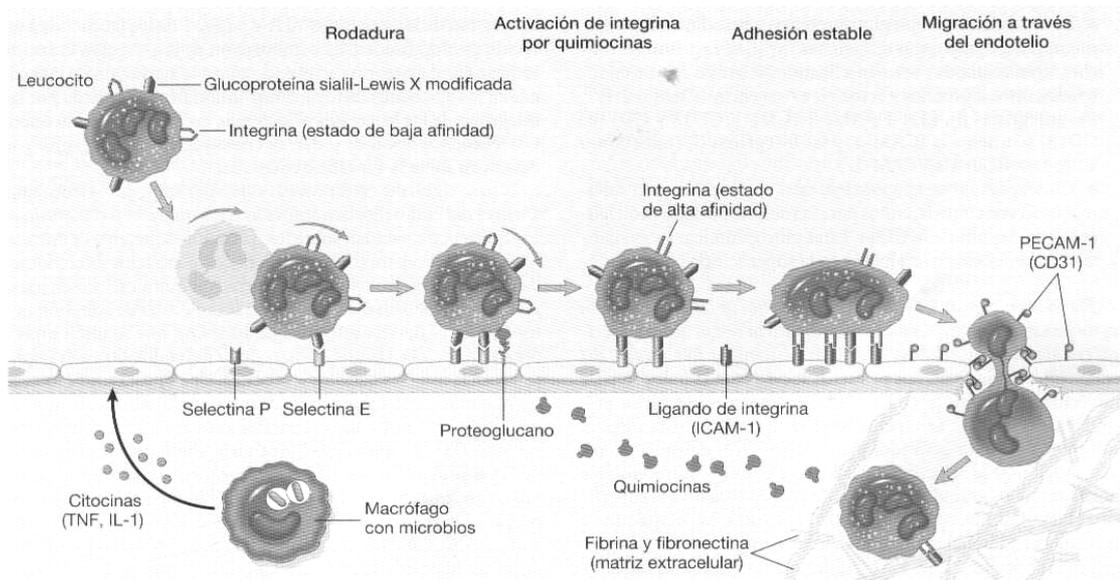


Figura 2.- Etapas de la migración leucocitaria a través de los vasos sanguíneos. Los leucocitos primero ruedan, después se activan y se adhieren al endotelio, seguido de esto transmigran a través del endotelio perforan la membrana basal y migran hacia quimioatrayentes emanados de la fuente de la lesión. (Tomado de Patología Estructural y Funcional Robbins, Kumar, 2006 Editorial Elsevier, España).

Se ha reportado que el IFN- γ y el TNF aumentan la expresión de moléculas de adhesión como: ICAM-1, VCAM-1, selectina-E, citocinas y factores quimiotácticos, resultando en un incremento de la adhesión y motilidad de los neutrófilos y polimorfonucleares (17,18,21,23). IFN- γ aumenta la capacidad de las células endoteliales para producir IL-1 en respuesta a LPS, e incrementa la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo en presencia de TNF. Este fenómeno es relevante considerando que la cantidad de TNF que se requiere *in vitro* es muy superior a la constante de disociación de su receptor, mientras que, en presencia del IFN- γ , se requiere de concentraciones mucho más bajas (99,100,102,104).

El estudio de las células endoteliales humanas derivadas de la vena de cordón umbilical (HUVEC), permite estudiar este proceso de activación en respuesta a una diversidad de estímulos bajo condiciones experimentales controladas (6,7,13).

PRINCIPALES MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA INFLAMACIÓN

Para comprender las interacciones celulares que juegan un papel relevante en la inflamación. Es necesario entender la contribución de moléculas específicas y sus rutas de señalización

ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa multifuncional así como un radical libre altamente reactivo. Es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, NADPH y oxígeno por la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS), de la cual existen tres isoformas: neuronal, inducible y endotelial (nNOS, iNOS y eNOS) respectivamente. Como una molécula de señalización, el óxido nítrico NO regula diversos procesos fisiopatológicos relacionados con la función vascular, neurológica y citotóxica. El NO es el principal mediador de la vasodilatación al promover la relajación del músculo liso de los vasos mediada por una guanilato ciclasa. Las células endoteliales expresan 2 isoformas de NOS. La eNOS responde a cambios locales de presión y ayuda a mantener el tono vascular local. La iNOS, una isoforma inducible es el principal mediador de la inflamación asociado a la reacción inflamatoria.

QUIMIOCINAS

Las funciones de las quimiocinas se han detallado en los leucocitos, ya que utilizan estas proteínas para diferenciarse en los vasos sanguíneos inflamados y como guía hacia sitios específicos de inflamación. Representan un amplio grupo de pequeñas proteínas quimioatrayentes de (8-11 kDa) clasificadas en cuatro familias (C, CC, CXC y CX3C).

Las quimiocinas interactúan con receptores de superficie acoplados a proteínas G. *In vivo*, la activación de integrinas dependiente de quimiocinas resulta en una unión firme de leucocitos en la superficie luminal de los vasos sanguíneos, que permite la diapedésis de estas células hacia los tejidos inflamados.

Las quimiocinas son mediadores tempranos en la reacción inflamatoria, inmunidad innata y trombosis. Los inductores de quimiocinas incluyen citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-4, IL-13, IL-17, TNF, trombina, fibrina, histamina e incluso la hipoxia.

(72,73)

Un evento importante que ocurre durante la activación endotelial es la síntesis y secreción de citocinas inflamatorias por parte del endotelio como TNF, IL-1 β , IL-6, que le permite la amplificación y difusión de la respuesta (22,30,60,100). Más adelante se discute al TNF y a su vía de transducción con más detalle.

FAMILIAS DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Durante la inflamación y el control de la homeostasis existen moléculas que tienen una participación importante en estos procesos, a las cuales se les denominan moléculas de adhesión intercelular (CAMs). Las CAMs median las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, y también se les ha reconocido su intervención como reguladores en la transducción de señales asociada a las uniones célula-célula o célula-matriz extracelular (66,84).

INTEGRINAS

Se denominan moléculas receptoras de adhesión y son esenciales para el anclaje y control de la migración celular, progresión del ciclo celular y en la muerte celular programada. Participan regulando respuestas en sinergia con otras vías de transducción de señales.

Son proteínas transmembranales formadas por 18 subunidades alfa y 8 subunidades beta, las cuales dimerizan no covalentemente para formar al menos 24 diferentes heterodímeros, cada heterotrímero presenta distintas propiedades de unión a ligando y señalización.

Las integrinas funcionan también como receptores de señalización bidireccional, induciendo cambios en la actividad proteica o en la expresión de genes y modulan la afinidad adhesiva de la superficie celular en respuesta a cambios fisiológicos en la célula (72). Tienen la capacidad de transducir señales intracelulares que promueven la migración celular. Aunque las integrinas no poseen una actividad enzimática intrínseca, pueden iniciar vías de señalización relacionadas con cinasas y proteínas adaptadoras en los complejos de adhesión focal, facilitando el desplazamiento celular a través del tejido. Estos cambios en la motilidad celular se dan mediante la combinación en la estabilidad del citoesqueleto de actina y gracias a la activación de enzimas degradadoras de matriz extracelular. (71,73,77,78)

SELECTINAS

Constituyen una familia de moléculas de adhesión celular que se unen a carbohidratos con residuos de fucosa y ácido sialico, actualmente se conoce tres selectinas asociadas a la superficie celular: selectina-L (CD62L), selectina-P (CD62P) y selectina-E (CD62E). La expresión de cada una de las selectinas, se encuentra limitada a distintos tipos celulares.

SELECTINA L

La selectina-L es propia de las células hematopoyéticas, se expresa constitutivamente en la mayoría de los linfocitos B, timocitos y linfocitos T. Es expresada durante la diferenciación mieloide y está presente en la mayoría de neutrófilos y monocitos maduros.

SELECTINA P

La selectina-P se encuentra permanentemente en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y gránulos de las plaquetas, pero se moviliza rápidamente a la superficie celular al activarse la respuesta inflamatoria. Esta expresión superficial ocurre y se revierte en pocos minutos. La inducción de la expresión de selectina-P requiere la síntesis de novo tanto de RNAm como de la misma proteína.

Las formas solubles de las selectinas pueden ser detectadas en plasma y en algunos casos sus niveles de selectinas han sido asociados a enfermedades.

En forma general las selectinas participan en los pasos iniciales del reclutamiento leucocitario a los sitios de inflamación. Estas interacciones inician en los vasos sanguíneos pocos minutos después del daño tisular. Numerosos estudios indican que estas interacciones tempranas están mediadas por selectinas (79).

SELECTINA-E

La selectina-E, también llamada ELAM-1 o CD62E es uno de los tres miembros identificados en la familia de las selectinas. Su dominio extracelular N-terminal de tipo lectina, es capaz de unirse a los carbohidratos de sus ligandos.

Su peso molecular aproximado es de 64 Kd, aunque se han caracterizado formas de 107-115 Kd según el grado de glicosilación que haya adquirido la molécula en su forma madura. Su expresión de novo en células endoteliales activadas por IL-1b, LPS o TNF es necesario para la activación de células inmunes mediante mediadores inflamatorios.

Esta expresión es máxima entre las 2 y 4 horas posteriores a la activación. Transcurridas de 24 a 48 horas el dominio extracelular es liberado a la circulación como forma soluble de la selectina-E. Este proceso resulta de la activación de proteasas de membrana.

Esta molécula posee efectos quimiotácticos sobre neutrófilos y una función activadora sobre las integrinas de la familia $\beta 2$. Es mediadora de la adhesión laxa y rodamiento ("rolling") de leucocitos y neutrófilos sobre el endotelio vascular.

Existen dos vías que pueden ser responsables de la expresión de selectina-E. La vía mejor conocida depende de la activación del sistema NF- κ B por citocinas pro-inflamatorias. Se ha determinado que la secuencia consenso que reconoce el factor nuclear κ B es idéntico a un sitio funcional en el promotor de c-JUN. (79-83)

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN QUE PERTENECEN A LA FAMILIA DE INMUNOGLOBULINAS

Son moléculas de adhesión independientes de calcio que se componen de 4-6 unidades repetidas semejantes a inmunoglobulinas en el dominio de unión a su ligando y hasta 5 unidades repetidas semejantes a fibronectina en sus dominios extracelular, transmembranal e intracelular.

Existen cerca de cien miembros en esta superfamilia, algunos de ellos como (ICAM-1, 2, 3; LFA-2, 3; NCAM, PECAM-1 y VCAM-1) participan en la adhesión celular (76).

VCAM-1

La molécula de adhesión de células vasculares-1, también conocida como CD106, fue caracterizada inicialmente como molécula de superficie de células endoteliales derivadas de microvasculatura, ahora se sabe que se encuentra también presente en células dendríticas, macrófagos, fibroblastos de médula ósea, mioblastos, etc.

Dentro de sus funciones biológicas favorece la adhesión de linfocitos, monocitos, células NK, eosinófilos y basófilos al endotelio a través de su interacción con su contrareceptor leucocitario VLA-4.

Promueve que componentes celulares no neutrofilicos circulantes se adhieren firmemente a la monocapa endotelial. En cultivos de células endoteliales, la forma predominante es la 7D VCAM-1.

En su estructura encontramos un núcleo o "core" proteico de aproximadamente 81 kD con sitios de N-glicosilación. La forma madura, ya glicosilada tiene un peso molecular aproximado de 110 kD.

Aunque no es constitutiva en el endotelio, puede ser regulada positivamente *in vitro* en respuesta a TNF , IL-1 β , IFN- γ e IL-4, LPS. La expresión máxima se ha reportado entre 6 y 12 horas posteriores al estímulo su expresión declina una vez transcurridas 48 horas.

La forma soluble se encuentra presente en el suero de individuos sanos, pero sus niveles están aumentados en diversas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, lupus eritematoso y artritis reumatoide. Se ha reportado también una concentración incrementada de VCAM-1 en suero de pacientes con diversos tipos de cáncer (64,68,70)

ICAM-1

Denominada también CD54, es una proteína de cadena sencilla con un peso molecular entre 80 y 114 kD. Posee cinco dominios extracelulares semejantes a Ig capaz de ligar contrareceptores de la familia de las integrinas. Se expresa de forma constitutiva en el endotelio vascular, en el epitelio tímico, en fibroblastos y en macrófagos principalmente.

Puede ser regulada positivamente en el endotelio y fibroblastos por la presencia de IL-1 β , TNF e IFN- γ . Participa en diferentes etapas de la adhesión firme leucocito-endotelio y en la migración transendotelial. Actúa en la activación de linfocitos T y su mayor expresión se presenta a las 6-8 horas posteriores al estímulo y su expresión declina a las 48 horas.

Su forma soluble se encuentra elevada respecto a sus valores normales en diversas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico o la diabetes dependiente de insulina.

A la ICAM-1 se le considera como un posible mediador de la adhesión homotípica entre células tumorales (65,66,70)

CITOCINAS

Actualmente, se sabe que tanto la homeostasis y la evolución de la reacción inflamatoria están estrechamente relacionadas con el endotelio vascular. Las citocinas son mediadores solubles de esta compleja red de interacciones entre los leucocitos y las células vasculares.

Estas moléculas son sintetizadas por diferentes tipos celulares participan regulando diversas actividades, como los mecanismos de defensa del huésped, la reparación de tejidos, proliferación y diferenciación celular, algunos incluso modulan el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Frecuentemente se asocian al desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes o a patologías caracterizadas por inflamación crónica, cuando se encuentra alterada su regulación (24).

Los efectos que regulan las citocinas están determinados por el receptor al que se unen y a las células blanco sobre las que actúan. Su producción responde a estímulos inductores que promueven la síntesis y liberación de estas moléculas. Muchas citocinas son producidas como precursores, que deben ser procesados proteolíticamente para generar las formas maduras. El radio de acción de las citocinas es usualmente corto ya que actúan de forma autocrina o paracrina, por tanto los niveles detectados en sangre, rara vez son un reflejo de sus concentraciones fisiológicas (25,26).

Si bien es claro que las citocinas *in vivo*, no se encuentran actuando solas, los estudios *in vitro* sólo han revelado una pequeña fracción de las interacciones funcionales que deben ocurrir *in vivo*. Dado que muchos de estos factores se liberan al microambiente del proceso inflamatorio en forma simultánea no ha sido posible dilucidar todas las combinaciones de los factores que actúan durante la respuesta inflamatoria cuando se han realizado estudios en las concentraciones en suero.

Las citocinas actúan cuando se unen a receptores específicos ubicados sobre la membrana de la célula blanco, en una diversidad de tipos celulares. Para señalizar los receptores activados requieren de la asociación de proteínas acopladoras o de andamiaje. El receptor activado transduccionalmente forma un complejo multiproteico que altera las funciones celulares a través de cascadas de cinasas que promueven respuestas celulares rápidas y transitorias y/o llevando señales al núcleo, donde se modifica el patrón de expresión de genes responsables de respuestas celulares de mayor duración (26,27,28,74).

Existen dos características generales en las funciones de las citocinas: primero, una citocina frecuentemente causa la secreción de una segunda citocina por su célula blanco y así sucesivamente. Este fenómeno se ha descrito como cascada de citocinas. Segundo, las citocinas individuales frecuentemente modulan la acción de otras citocinas en la misma célula blanco.

Tales interacciones pueden ser mutuamente inhibitorias, aditivas, sinérgicas o resultar en efectos novedosos que no ocurrirían por causa de la citocina individual. Entre las citocinas que tienen acciones específicas sobre las células endoteliales cobran relevancia las interleucinas (IL-) 1, 2, 4, 6 y 8, el factor de necrosis tumoral TNF, el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

FUNCIONES DE LAS CITOCINAS

Considerando las diversas citocinas, éstas pueden exhibir una o varias de las siguientes cualidades:

Pleiotropía .- La capacidad que tiene una citocina para actuar una gran variedad de tipos celulares por ejemplo, TNF media la reacción inflamatoria, apoptosis de células tumorales y modula la respuesta a insulina.

Redundancia.-Se refiere a que varias citocinas pueden ejercer el mismo efecto. Por ejemplo, la IL-1b y el TNF a pesar de ser dos citocinas diferentes con receptores independientes inducen respuestas inflamatorias muy similares.

Sinergismo.- Dos o más citocinas producen un efecto que se potencia mutuamente. Por ejemplo, el IFN-g amplifica los efectos del TNF durante la respuesta.

Antagonismo.-Los efectos de una citocina inhiben o neutralizan las acciones de otras. Por ejemplo, el TGF-b secretado tardíamente por los macrófagos durante la reacción inflamatoria antagoniza los efectos de TNF, secretado en etapas tempranas.

PRINCIPALES TIPOS DE RESPUESTA MEDIADOS POR LA ACCIÓN DE LAS CITOCINAS:

- 1.-Activación de los mecanismos de inmunidad natural:
 - a. Activación de los macrófagos y otros fagocitos
 - b. Activación de las células NK
 - c. Activación de los eosinófilos
- 2.-Activación y proliferación de células B, hasta su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.
- 3.-Intervención en la respuesta celular específica.
- 4.-Intervención en la reacción de inflamación, tanto aguda como crónica.
- 5.-Control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea.

RECEPTORES DE CITOCINAS

Hay diversos tipos de receptores de membrana para citocinas, pero se pueden agrupar en cinco familias:

Familia de receptores de citocinas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que poseen varios dominios extracelulares de tipo Ig.

Familia de clase I de receptores de citocinas (familia de receptores de hematopoyetinas). (Veremos más detalles de esta familia un poco más adelante).

La mayor parte de los receptores de citocinas del sistema inmune pertenecen a la familia de clase I (de receptores de hematopoyetinas).

La mayor parte de los receptores de clase I están constituidos dos proteínas de membrana.

Familia de receptores de TNF: sus miembros se caracterizan por un dominio extracelular rico en cisteínas.

Familia de receptores de quimiocinas: son proteínas integrales de membrana, con 7 hélices alfa, los cuales interaccionan por el lado que da al citoplasma con proteínas de señalización triméricas que unen GTP.

Familia de clase II de receptores de citocinas (familia de receptores de interferones). Ejemplos de ligandos son los interferones no inmunes (IFN- α e IFN- β y el IFN- γ). (34,35)

EFFECTO DE LAS CITOCINAS EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

El panorama de respuestas emitidas por el endotelio a las diferentes citocinas es extremadamente vasto y variado, ya que las distintas citocinas actúan de forma característica sobre diversas funciones que pueden agruparse en programas de activación/diferenciación.

En particular a regulación de la expresión de las moléculas de adhesión en los diferentes pasos del proceso de reclutamiento ha sido objeto de muchas investigaciones.

El sistema vascular por si mismo que es sensible a los efectos tóxicos de niveles elevados de TNF que se manifiesta por vasodilatación generalizada. Las células endoteliales también son activadas por TNF- α para expresar proteínas en su superficie celular, las cuales se encuentran mediando la localización y reclutamiento de leucocitos (30).

El IFN- γ y el TNF aumentan la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E, resultando en un incremento de la adhesión de los leucocitos que expresan la integrina LFA-1, facilita la formación del trombo por inducción de actividad coagulante, inducen el aumento de la producción de mediadores como PGI₂ y óxido nítrico (NO), esto ocurre por alteraciones en la permeabilidad y hemodinámica en la respuesta inflamatoria. (103,104)

La secreción de quimiocinas en estas células se encuentran bajo el control de citocinas como: TNF e IFN- γ . También se ha encontrado RANTES en el medio de cultivos endoteliales humanos tratados con TNF, IFN- γ e IL-1 β (102).

El TNF fue la primer citocina que demostró actuar en células endoteliales induciendo la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (29). La adición de IFN- γ incrementa la actividad del TNF.

Ya que las citocinas inflamatorias en particular el TNF y la IL-1 β , son uno de los principales productos de secreción de macrófagos activados *in vivo* y su blanco primario son las células endoteliales. Ambas citocinas se unen a receptores membranales celulares independientes e inducen vías de transducción que convergen en la activación del factor de transcripción NF- κ B. Este factor se transloca hacia el núcleo mediante la ubiquitinación y degradación de su inhibidor, la proteína I κ -B. Una vez en el núcleo, el NF- κ B promueve la expresión de genes, muchos de ellos involucrados en el proceso inflamatorio (101).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)

A finales del siglo XVIII el Dr. William Coley fue el primero en reconocer la importancia de la regresión espontánea de tumores en algunos pacientes que presentaban infecciones. Estas observaciones fueron realizadas 100 años antes de que el Dr. Lloyd Old identificara al factor de necrosis tumoral TNF un factor derivado de macrófagos capaz de inducir necrosis tumoral en ratones (29).

En 1944 a partir de cultivos de bacterias gram-negativas se purificó el producto bacteriano responsable de la necrosis hemorrágica de tumores, se le denominó endotoxina y fue caracterizado como un lipopolisacárido. En la década de los 70s se reconoció que no es la endotoxina, si no un producto endógeno, presente en el suero de animales que son inoculados con esta, lo que produce la regresión tumoral (31).

La principal aportación de Old fue demostrar que la actividad necrotizante de tumores era un factor derivado del hospedero y proponer que la fuente principal del factor eran los macrófagos que lo liberan al suero, de aquí se derivó su denominación como factor de necrosis tumoral.

En 1985 Aggarwal purificó, por primera vez, a partir de medios condicionados de macrófagos activados con endotoxina, una molécula con actividad citotóxica sobre la línea celular L929, al que se denominó TNF. (32)

Bruce Beutler aisló una proteína de 17 kDa, a la que denominó caquectina. La secuencia de la caquectina resultó ser idéntica a la reportada para el TNF. La clonación del gen y la posterior purificación de la proteína ocasionaron un enorme acopio de información alrededor de esta citocina reconocida como el mediador central de la reacción inflamatoria y de la respuesta inmune innata (33,75).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF) es una citocina pro-inflamatoria derivada principalmente de fagocitos mononucleares y su blanco principal son las células endoteliales.

Se ha documentado que el TNF es capaz de inducir la activación de estas células cambiando los niveles de expresión de algunas proteínas de membrana, lo que a su vez puede ocasionar cambios en su morfología y motilidad.

La expresión de proteínas por parte de las células endoteliales puede regular otros parámetros de la respuesta inflamatoria tales como la vasoregulación (por ejemplo, por acción de COX-2), adhesión leucocitaria (por efecto de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1), activación de leucocitos (quimiocinas tales como IL-8 y MCP-1) y coagulación.

TNF COMO MEDIADOR DE PATOLOGÍAS

La variedad de eventos en los que está involucrado TNF, depende de las rutas transductoras que puede desatar en sus células blanco. El efecto mejor estudiado del TNF al liberarse en forma sistémica es la inducción del choque séptico, que se origina cuando niveles elevados de TNF son liberados a la circulación, provocando activación endotelial masiva, asociada al desarrollo del síndrome de daño orgánico múltiple que suele conducir a la muerte.

El efecto tóxico de la sepsis lleva al organismo a un estado de colapso circulatorio. Comienza con inestabilidad vascular, que se traduce en vasodilatación, taquicardia, debilidad capilar, coagulopatías, fiebre, incremento del gasto calórico y puede llevar a la muerte (33,36).

El TNF también participa en la remodelación tisular y en la reabsorción de hueso, induciendo importantes cambios en la actividad de metaloproteasas de matriz extracelular y colagenasas. En modelos animales inoculados subcutáneamente causa, en pocas horas formación de edema y migración de neutrófilos. La administración local conlleva a hemorragia, necrosis e inflamación localizada. La lista de enfermedades en las que participa es extensa, pero pueden generalizarse en enfermedades autoinmunes, infecciones bacterianas y en procesos crónicos de inflamación (34,37).

El TNF se expresa como una proteína transmembranal de 233 residuos de aminoácidos por la acción de una proteasa de membrana, la forma madura se libera al medio donde adquiere una estructura de homotrímero.

Una vez liberado al espacio extracelular, puede unirse a dos tipos de receptores transmembranales específicos que han sido descritos hasta el momento en todos los tipos celulares denominados tipo I y tipo II. Líneas celulares de macrófagos y monocitos son las principales fuentes de TNF *in vivo*. La producción de TNF ha sido ampliamente estudiada en monocitos y macrófagos, es claro que la producción de TNF por células no hematopoiéticas puede influenciar la patogénesis de un estado inflamatorio (34,38).

El principal estímulo para la producción de TNF en monocitos y macrófagos es el LPS aunque también lo activan agentes virales, moléculas asociadas con infecciones, componentes de la membrana de parásitos, activadores químicos no específicos como los ésteres de forbol (PMA). La producción de TNF incluso puede ser activada durante la respuesta celular a estrés severo inducido por hipoxia (35,36).

El receptor de TNF de tipo I o p55 y el receptor tipo II o p75 son receptores de alta afinidad e inician la transducción de la señal al reclutar distintas proteínas acopladoras y efectoras.

VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL TNF

Una vez que se inicia la unión del trímero de TNF a su receptor tipo I (TNFRI) induce la unión de distintas proteínas empezando por las proteínas acopladoras al dominio de muerte asociado a TNF, (TRADD), la proteína de interacción con el receptor RIP y el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) que forman un complejo que activa a la cinasa de proteínas inductora de NF- κ B (NIK). A nivel de la proteína acopladora TRAF2 ocurre una bifurcación de la vía y pueden activarse otras cascadas de transducción que llevan a la activación de la cinasa de proteínas p38 /JNK/SAPK (30,37,74). (Figura 3)

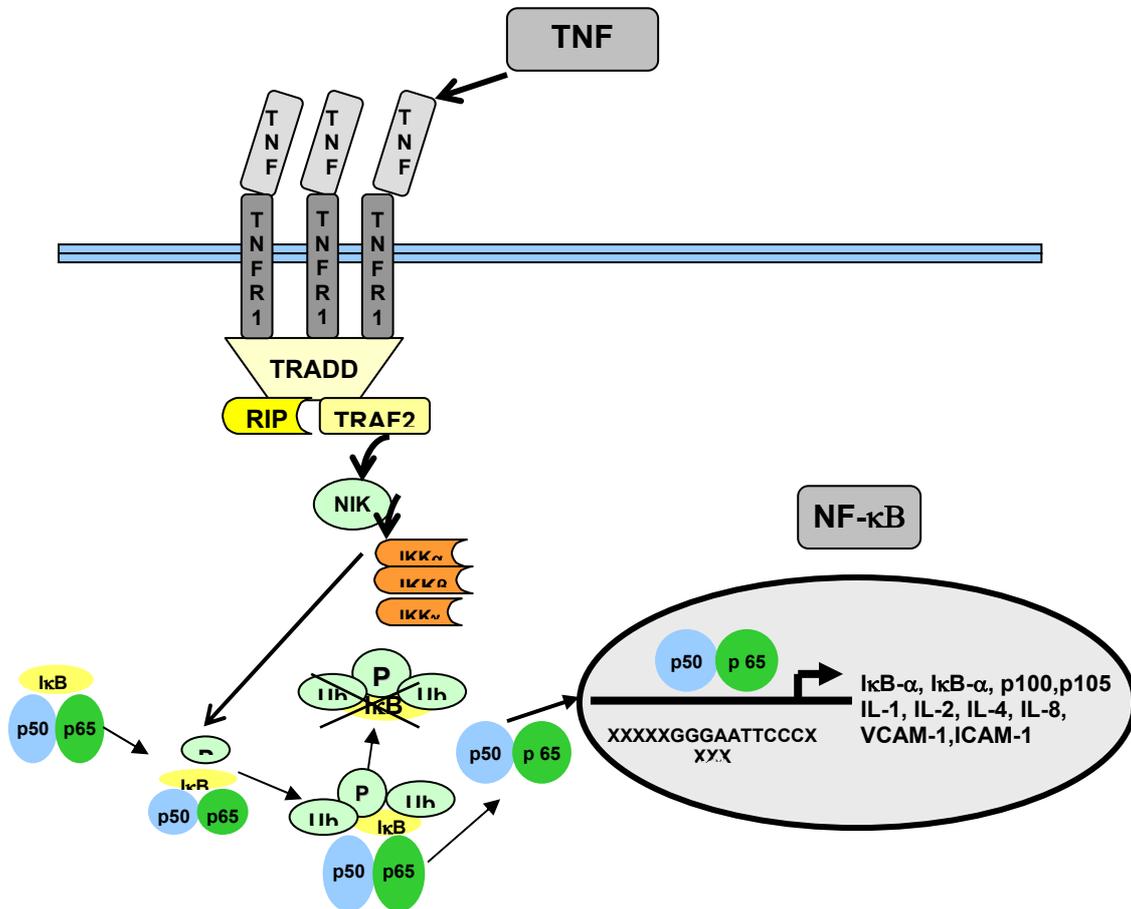


Figura 3. Vía de Señalización de TNF. Una vez que el TNF se une a su receptor en forma de homotrímero inicia el reclutamiento de proteínas de señalización intracelular, como es el receptor RIP, el dominio de muerte asociado a TNF TRADD, y el receptor de TNF asociado al factor 2 TRAF2. Después de reclutar estas proteínas activan a una cinasa denominada cinasa cinasa cinasa IκB (IKKK) la cual fosforila y activa a IKK la cual es un heterotrímero formado por 2 subunidades de la cinasa IκB-α y la IκB-β. IκB-α fosforila a IκB en 2 residuos de serina, lo que lleva a la proteína para realizar la poliubiquitinización y degradación de la proteína en el proteasoma, permitiendo que el factor de transcripción se transloque hacia el núcleo y realice la transcripción de genes.

INTERFERONES

Los interferones (IFNs) pertenecen a la familia de citocinas, presentan una diversidad de acciones biológicas; i) participan en los mecanismos naturales de defensa ante infecciones virales ii) presentan actividad antitumoral iii) tienen efectos moduladores en la respuesta inmune.

Su nombre se deriva de su capacidad de interferir con la replicación viral. Fueron descubiertos en 1957 por Isaacs y Linderman, quienes observaron en los fluidos provenientes de embriones de pollo infectados con el virus de influenza, la presencia de una sustancia que induce resistencia a la infección viral. Posteriormente, las partículas virales son inactivadas por neutralización de anticuerpos secretados por células plasmáticas (42).

Son secretados principalmente en respuesta a infecciones virales pero también pueden ser producidos en respuesta a citocinas, mitógenos, así como estímulos de la respuesta inmune innata como bacterias, micoplasmas, RNAs de doble cadena tanto naturales como sintéticos.

Inicialmente los IFNs se clasificaron por el tipo de célula donde se producían y por sus características genéticas como: leucocitario o IFN- α y fibroblástico o IFN- β , se encuentran agrupados como tipo 1. En 1965 Wheelock descubrió otro tipo de interferón al que denominó interferón- γ , actualmente la clasificación se realiza de acuerdo a la estructura genética y proteica (43,44).

Las acciones antivirales y celulares de los interferones son mediadas por receptores específicos de superficie celular de tipo específico, y la interacción del ligando con el receptor activa a nivel citoplasmático mecanismos de señalización de la vía Jak-Stats que sirven como vías de señalización hacia el núcleo donde activan la transcripción de genes de determinan los efectos pleiotrópicos de los interferones (39,40,44).

El análisis del sistema de IFNs los ha identificado como la primera línea de defensa contra infecciones virales que induce genes antivirales.

Los interferones ejercen sus acciones biológicas a través de dos tipos de receptores diferentes. En el caso de los interferones del tipo I (IFN- α e IFN- β) se unen al receptor a interferón (IFNAR1 e IFNAR2), mientras que los interferones del tipo II, IFN- γ se une al receptor para interferón gamma de tipo II, (IFNGR1 e IFNGR2).

Clínicamente, son utilizados para combatir infecciones virales, algunos tipos específicos de cáncer hepático asociado a la hepatitis C y enfermedades como esclerosis múltiple (42,45)

TIPOS DE INTERFERONES

Se han encontrado dos tipos de interferones en humanos y se han clasificado como tipo I y tipo II.

TIPO I

La familia de los interferones de tipo I incluyen tres diferentes subtipos: IFN- α , IFN- β , IFN- τ , IFN- δ , IFN- ω , IFN- ϵ , pero las formas que predominan son IFN- α , IFN- β , genética y estructuralmente todos los interferones de tipo I son muy similares y utilizan el mismo tipo de receptor.

Este tipo de interferones activas muchas vías de señalización en células hematopoyéticas, que corresponde a sus efectos biológicos pleiotrópicas.

RECEPTOR PARA INTERFERONES TIPO I

La respuesta para los interferones de tipo I, se inicia con la unión de su receptor específico de superficie celular el cual presenta un dominio extracelular para la unión del ligando y también presenta un dominio intracelular de cinasa el cual es activado después de que la unión del ligando induce su dimerización.(Figura 4)

Como se menciono anteriormente el receptor presenta dos cadenas, IFNAR1, IFNAR2c, ambas son necesarias para la mayoría de sus funciones. La ausencia de cualquiera de las 2 hace que no haya señalización. Cada subunidad del receptor se une constitutivamente a un miembro de la familia de las cinasas Janus (Jak), la subunidad IFNAR1 se une con la cinasa de 2 residuos de tirosina (TYK2) y la subunidad IFNAR2c se une con la cinasa (Jak1).

La unión del ligando induce la fosforilación de las cinasas Jak1 y TYK2 misma que lleva a la fosforilación de las señales transductoras activadoras de la transcripción (Stats), particularmente de Stat1 y Stat2. (Figura 4).

Una vez activadas Stat1 y Stat2 fosforiladas pueden formar heterodímeros, lo que permite que se disocien del receptor, para poder translocarse hacia el núcleo donde se unen a la proteína p48 que se une al elemento de respuesta de genes estimulados por interferón localizados en la región promotora de los genes estimulados (ISGs). (45,46,47,49)

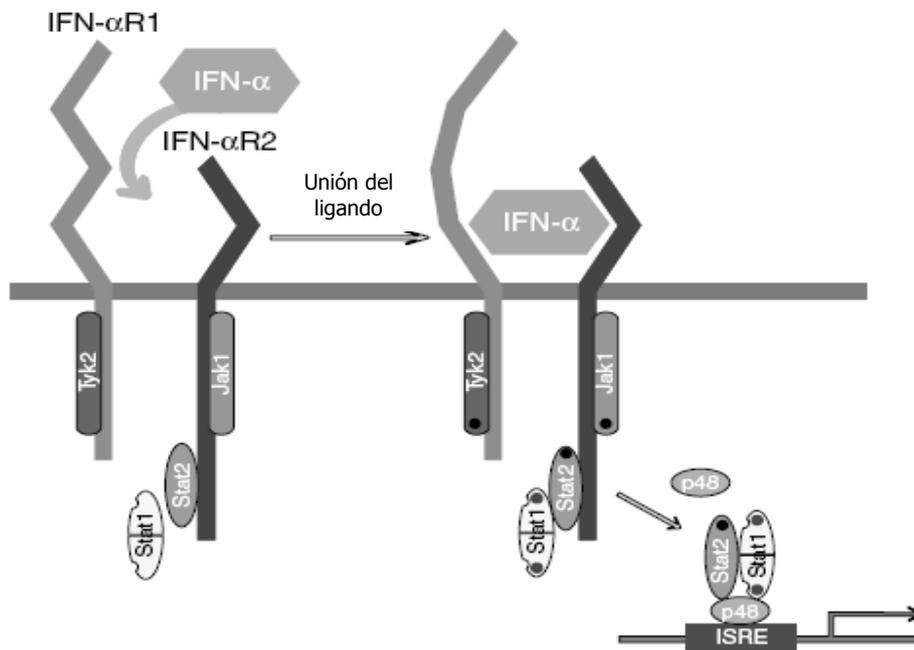


Figura 4.-Vía de la señalización del Interferón alfa (IFN-α). El receptor para IFN-α consiste en 2 cadenas (IFN-αR1 e IFN-αR2c). El ligando es un monómero que se une a las 2 cadenas, después de la entrada de IFN-α al complejo Stat1 se une a Stat2. Ambos son fosforilados y se asocian con la proteínas p48, después este complejo se transloca al núcleo para activar los genes que contienen los elementos de respuesta a estimulación con IFN (ISRE).

TIPO II

Los interferones tipo II incrementan las actividades de otras células inmunitarias, en esta familia solo se encuentra el interferón gama el cual puede estimular a macrófagos para que destruyan células tumorales y células que han sido infectadas por virus. (45,46,47,48)

INTERFERON GAMMA (IFN- γ)

Ha sido caracterizado como una glucoproteína homodimérica, puede promover la activación de macrófagos, monocitos y células endoteliales, regula la activación del sistema inmune innato y coordina la interacción linfocito-endotelio (50).

La síntesis de IFN- γ es regulada primariamente a nivel transcripcional, aunque actualmente los mecanismos precisos se desconocen (50,53). Una combinación de elementos positivos y negativos presentes en la región reguladora y en los intrones del gen de IFN- γ contribuyen a la regulación de su expresión.

Es efectivo en el tratamiento de enfermedades granulomatosas. Algunos de sus efectos son específicos ya que induce la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y las proteínas codificantes que contribuyen a la activación del sistema inmune.

El óxido nítrico producido por macrófagos activados por IFN- γ es en parte responsable de la vasodilatación local en la inflamación y posiblemente para la respuesta a la circulación hiperdinámica asociada al proceso inflamatorio (51,52).

El IFN- γ es secretado por células asesinas naturales NK ante diferentes estímulos como la IL-12, y TNF derivados del macrófago. Puede ser producido también por otros tipos de células como linfocitos T (CD8+). La forma biológicamente activa de esta citocina está formada por un homodímero unido en forma no covalente con una masa de 34 kDa que presenta una estructura glicosilada. (52,53,54).

EL RECEPTOR PARA INTERFERÓN GAMMA

Estos receptores son expresados prácticamente en todos los tipos celulares, con la excepción de los eritrocitos. Estructuralmente se encuentra formado por dos cadenas polipeptídica, IFNGR1 anteriormente denominada cadena alfa o CD119w que tiene una función importante en el reconocimiento del ligando en la incorporación de este a la célula y en la transducción de la señal y la cadena IFNGR2 anteriormente denominado factor accesorio-1 (FR1) que también participa en el proceso de la señalización.

Cada una de estas cadenas polipeptídicas se encuentran asociadas constitutivamente a un miembro de la familia de proteínas cinasas Janus (Jak). IFNGR1 se encuentra asociado a la cinasa Jak1, mientras que la cinasa Jak2 se asocia a IFNGR2. (55-59) (Figura 5)

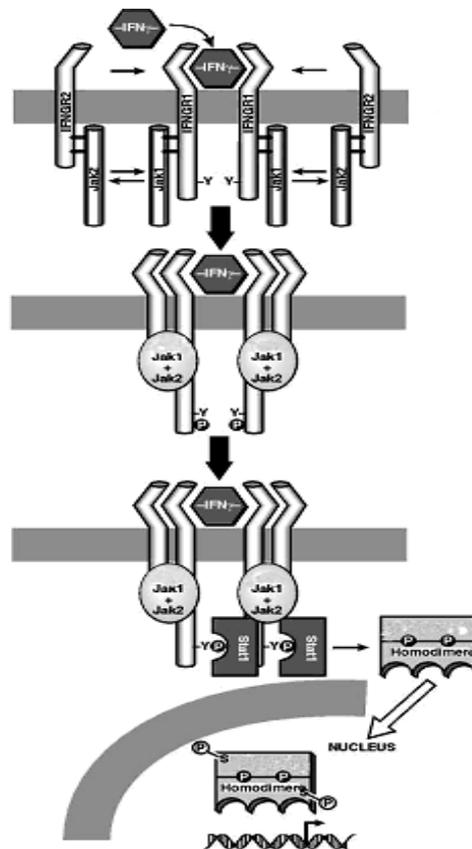


Figura 5.-Vía de Señalización del Interferón gamma (IFN- γ). El receptor a interferón gamma consiste de 2 cadenas de IFNGR1 y 2 cadenas de IFNG2. El ligando es un dímero que se une directamente a las 2 cadenas de IFNGR1 y no hace contacto directo con las subunidades IFNGR2. Seguido de esto se une a la cinasa Jak1 que permite la fosforilación en residuos de tirosina 457 de la cadena IFNG1 que sirve de anclaje para reclutar a Stat-1, que una vez fosforilado se transloca al núcleo para activar la transcripción de los genes que contienen los elementos de respuesta a estimulación con IFN (ISRE).

Por medio de experimentos con proteínas aisladas y complementación de líneas celulares humanas reveló que las cinasas Jak1 y Jak2 son selectivamente activadas por células tratadas con IFN-gamma y que se requieren para la activación dependiente del ligando de genes blanco inducibles por IFN.(101)

Experimentos bioquímicos permitieron aislar al factor de transcripción citosólico Stat-1 que en células tratadas con IFNs sufre una rápida fosforilación en residuos de tirosina convirtiéndolo en un factor transcripcionalmente activo.

Este factor de transcripción pertenece a la familia de Stats que corresponden a las proteínas transductoras de señales activadoras de la transcripción. (55-59)

SISTEMA DE JAK CINASAS Y STATs INVOLUCRADAS EN LA VIA DE IFN- γ

Las Jaks integran una familia de proteínas con actividad de cinasas de residuos de tirosina, de las que se han caracterizado hasta el momento cuatro Jak cinasas; Jak1, Jak2, Jak3 y Tk2. (55,57).

Las Jaks se asocian con dominios intracelulares de receptores para dar lugar a proteínas de la familia de las señales transductoras activadoras de la transcripción Stats.(85,86)

La activación de Jaks cinasas resulta en la fosforilación de muchas proteínas Stats, incluidas Stat1, Stat2, Stat3 y Stat5, esta fosforilación permite la formación de homodímeros y heterotrímeros que se translocan hacia el núcleo para regular la transcripción de genes por medio de la unión de secuencias específicas que están presentes en los promotores de los genes estimulados por interferón. (87-90) (Figura 5)

SEÑALES TRANSDUCTORAS ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN STATs

Las Stats están integradas por una familia de siete proteínas que hasta el momento han sido descritas (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5 y Stat6) que desempeñan un papel importante en la mediación de los efectos biológicos en una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento. Solo Stat1 y Stat2 se han identificado en la vía de los interferones y Stat-1 es la única de estas proteínas que participa en la señalización por interferón gamma.

En ausencia de estímulos esta proteína se encuentra en forma de monómeros latentes en el citosol

Estructuralmente las proteínas de la familia STATs presentan 2 dominios, uno de tipo SH2 que le permite interactuar con sitios de fosforilación de proteínas para reclutar a más Stats hacia el complejo del receptor. Estos dominios SH2 se han identificado como necesarios para establecer su unión con la cadena IFNGR1 del receptor, y presentan un dominio para la unión de otras fosfotirosinas.

Las STATs tienen pesos moleculares que se encuentran en los intervalos de 84 a 113 kDa.

El proceso de activación de estas proteínas requiere de la fosforilación de un residuo de tirosina, que se encuentra ubicado en la posición 701 (56,58,60,61).

Este proceso de fosforilación lo realizan las Jaks cinasas, que se encuentran asociadas constitutivamente a ambas subunidades para el receptor de IFN- γ , IFNGR1 e IFNGR2.

Una vez establecidas las interacciones de Stat-1, éstas forman homodímeros, generándose el factor de activación del interferón gamma denominado (GAF), que se transloca al núcleo donde se une a un segmento denominado sitio activado por el gamma (GAS) presente en el promotor de diferentes genes (59). (Figura 5)

NF-κB

En 1986, el grupo de Baltimore y colaboradores describió un factor nuclear capaz de unirse al aumentador o “enhancer” de la región reguladora del promotor de la cadena pesada κ de los genes que codifican para inmunoglobulinas. Se pensó que este factor de transcripción era exclusivo de los linfocitos por haberse encontrado en el núcleo de este tipo de células, actualmente se sabe que se expresa de manera constitutiva en prácticamente todas las células del organismo (91,92).

Este factor nuclear regula la transcripción de muchos genes que están involucrados en la respuesta inmune innata, el control de la proliferación celular y sobrevivencia. Es crucial tanto para la secreción de productos pro-inflamatorios por parte de los macrófagos, para la inducción del fenotipo endotelial activado.

El factor de transcripción NF-κB puede estar formado por homo y heterodímeros de diferentes subunidades que han sido agrupadas dentro de la familia Rel.

LA FAMILIA REL

En esta familia se agrupan genes que están altamente conservados a lo largo de la evolución. En la mosca de la fruta *Drosophila* se han descrito varias moléculas de la familia NF-κB *relish*, *dorsal* y *dif* involucradas en la regulación de la respuesta inmune. En mamíferos se han descrito las siguientes subunidades Rel: c-Rel, p65, p50 y p52.

Cada proteína Rel tiene una región conservada de 300 aminoácidos en el N-terminal llamada dominio Rel, responsable de la dimerización, la unión al DNA y la interacción con proteínas inhibitorias de IκB. El dímero más abundante y el primero descrito es el formado entre las subunidades p50 y p65, debido a que se pueden formar heterodímeros esto les confiere distintas actividades fisiológicas importantes presentando distintos potenciales de transcripción. (93,94)

NF- κ B se encuentra de manera basal en el citoplasma en un estado inactivo, secuestrado por una familia de proteínas inhibitoras del factor nuclear κ B (I κ B), solo en las células B y sus progenitoras este factor se encuentra constitutivamente en el núcleo.

Los pasos necesarios para la translocación de NF- κ B al núcleo son: i) activación de las cinasas de residuos de serina IKK α e IKK β , ii) fosforilación de dos residuos de serina en las moléculas I κ B, iii) ubiquitinización de las I κ Bs fosforiladas, iv) y la degradación del proteosoma, v) translocación del dímero NF- κ B al núcleo. (Figura 6)

Por tanto la regulación de la proteína cinasa que fosforila I κ B, es actualmente el centro de atención en la activación de NF- κ B.

Una vez en el núcleo, el factor se une a secuencias específicas (sitios de unión κ B) en la región promotora de varios genes que caracterizan el fenotipo endotelial activado, como son los genes que codifican para moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1.

La variedad de estímulos que activan NF- κ B sugiere que muchas vías de transducción están involucradas en su translocación, por lo que no queda claro si todas las vías convergen en un intermediario común, o si la fosforilación de I κ B puede proceder de distintos estímulos (95,96).

Se han caracterizado al menos seis isoformas de la proteína inhibitora I κ B. Las isoformas mejor caracterizadas son I κ B- α e I κ B- β , las cuales se encuentran en prácticamente todos los tipos celulares y son responsables de la mayor parte de la regulación de NF- κ B. La otra isoforma, que en los últimos años ha cobrado importancia es I κ B- ϵ , que participa en las respuestas bifásicas y probablemente más específicas.

ACTIVACIÓN DEL NF- κ B

Se ha identificado que en prácticamente todos los organismos en los que ha sido caracterizado, el sistema NF- κ B participa principalmente en la modulación de la respuesta inmune a distintos niveles. En *Drosophila* por ejemplo, se ha reportado que transcribe genes con actividad bactericida o fungicida. En mamíferos tiene participación importante en la inflamación, la respuesta a estrés, la diferenciación y activación de células inmunes.

Las mejor caracterizadas son aquellas que involucran citocinas inflamatorias como la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), estímulos mitogénicos como ésteres de forbol (PMA) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los relacionados con agentes infecciosos como lipopolisacárido bacteriano (LPS), agentes relacionados con daño celular como radiación (UV) o estrés oxidativo. (96,97,98) (Figura 6)

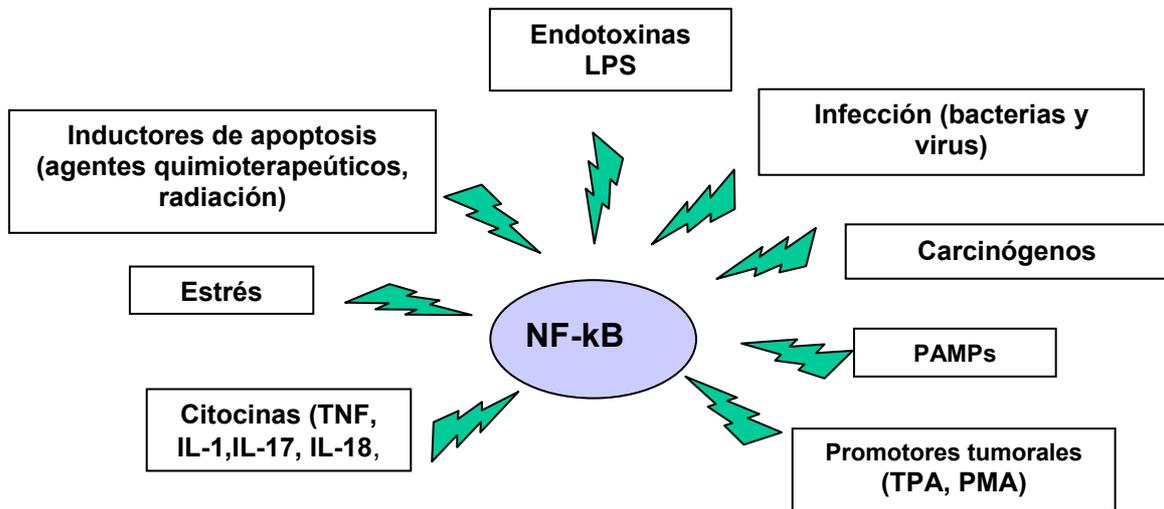


Figura 6.- Estímulos que activan al factor nuclear de transcripción NF- κ B.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES QUE ACTIVAN AL NF- κ B

La señal es llevada al núcleo celular mediante una cadena de proteínas cinasas, que en su conjunto forman una cascada de señalización que termina generalmente en la activación de uno o varios factores de transcripción y la subsecuente expresión de genes. Estímulos infecciosos como LPS, son representativos de la respuesta inmune innata que inducen la activación de NF- κ B a través de la activación de receptores de tipo toll (TLR).

La activación del sistema de monocitos-macrófagos depende del reconocimiento de estas células a antígenos específicos. El LPS activa a los macrófagos a través del receptor TLR-4 permitiendo que se active al sistema NF- κ B. (Figura 7)

La presencia *in vitro* de otros antígenos bacterianos, como peptidoglicanos, activan al sistema NF- κ B e inducen la expresión de moléculas de adhesión como selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 indispensables para la adhesión y extravasación de neutrófilos y polimorfonucleares.

La expresión de los genes que codifican para moléculas de superficie en las células endoteliales. En particular moléculas de adhesión resulta de vital importancia para el reclutamiento de neutrófilos y polimorfonucleares durante el proceso de inflamación.

Sin embargo, cuando este proceso ocurre a nivel sistémico, es decir cuando ocurre en grandes porciones de la red vascular, inicia una serie de alteraciones en el flujo sanguíneo que conllevan entrada masiva de líquido y de células en los tejidos. Así, se inician las alteraciones que pueden conducir al choque séptico, causando el daño orgánico múltiple e incluso a la muerte (92,94,98).

LA FAMILIA DE I κ B

Muchas investigaciones acerca del mecanismo del factor de transcripción NF- κ B se han enfocado no solo en el funcionamiento del factor en sí, si no en gran medida en caracterizar a los miembros de la familia de I κ Bs. Las diferencias que existen en la activación de NF- κ B están ligadas a diferencias en la regulación de la fosforilación y degradación de las proteínas I κ B que secuestran distintas poblaciones del factor.

Se han caracterizado por lo menos 6 isoformas de la proteína inhibidora I κ B. Las mejor caracterizadas son I κ B- α , I κ B- β que se encuentran en prácticamente todos los tipos celulares y que son responsables de la mayor parte de la regulación de NF- κ B, la otra isoforma que ha tomado relevancia es la I κ B- ϵ , que participa en respuestas bifásicas probablemente más específicas. A estas 3 isoformas se les denomina I κ B's pequeñas.

I κ B- α

Es la isoforma que fue descrita primero, es la mejor caracterizada, fue identificada originalmente junto con NF- κ B a partir de una purificación proteica. Presenta la cinética de degradación más rápida de estas isoformas. En casi todos los tipos celulares donde se ha estudiado, tanto TNF como PMA e IL-1- β inducen una rápida y completa degradación de I κ B- α que inicia desde los 5 minutos y alcanza su máximo a los 20 o 30 minutos. Sin embargo, esta degradación es transitoria ya que aparecen nuevamente niveles detectables de proteína a partir de 1 hora de estimulación.

Los ensayos de Northern Blot han demostrado que tras la degradación, existe un incremento significativo en la síntesis de novo de la proteína, además de una regulación positiva durante 24 horas que permite el mantenimiento de los niveles intracelulares. La transcripción de I κ B- α está sujeta entonces a un circuito auto regulatorio inductor ya que es uno de los genes que primero responden tras la entrada de NF- κ B al núcleo. I κ B- α regula además la actividad nuclear de NF- κ B.

La entrada de I κ B- α al núcleo permite mantener la respuesta de NF- κ B frente a estímulos persistentes. Es decir, una subpoblación de I κ B unido al factor de transcripción puede translocarse al núcleo y degradarse *in situ* de manera paulatina para prolongar la activación de NF- κ B. (92,98)

I κ B- β

Es una proteína de 369 aminoácidos con un peso molecular aparente de 45 KD. I κ B- β ha sido asociada con una respuesta bifásica y persistente de NF- κ B. Se ha encontrado en distintos modelos que en los tiempos en los que ocurre su degradación son en general más largos que los reportados para I κ B- α . Esto se refiere a que después de un estímulo específico, la degradación de I κ B puede ser detectada a partir de los 40 minutos. Dependiendo del modelo celular, pueden variar estos tiempos, lo importante es que bajo la misma serie de estímulos la primera isoforma en degradarse es I κ B- α . La síntesis de novo de I κ B- β es más tardía que la de I κ B- α de manera que los niveles de I κ B- β se normalizan con más lentitud. (92,98)

I κ B- ϵ

Esta isoforma también es fosforilada por muchos estímulos conocidos que activan NF- κ B, sin embargo resulta notable que la cinética de degradación que presenta es más lenta y sostenida que I κ B- α .

I κ B- ϵ también puede desplazarse al núcleo aunque de manera menos eficiente que I κ B- α . Otra diferencia importante es que esta isoforma tiene afinidad por el dímero c-Rel/p65, y se ha estudiado la participación de I κ B- ϵ en la transcripción de genes activados específicamente por c-Rel/p65 como en el caso de la molécula de adhesión VCAM-1 que se expresa durante la activación endotelial.(92,98,100)

VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B

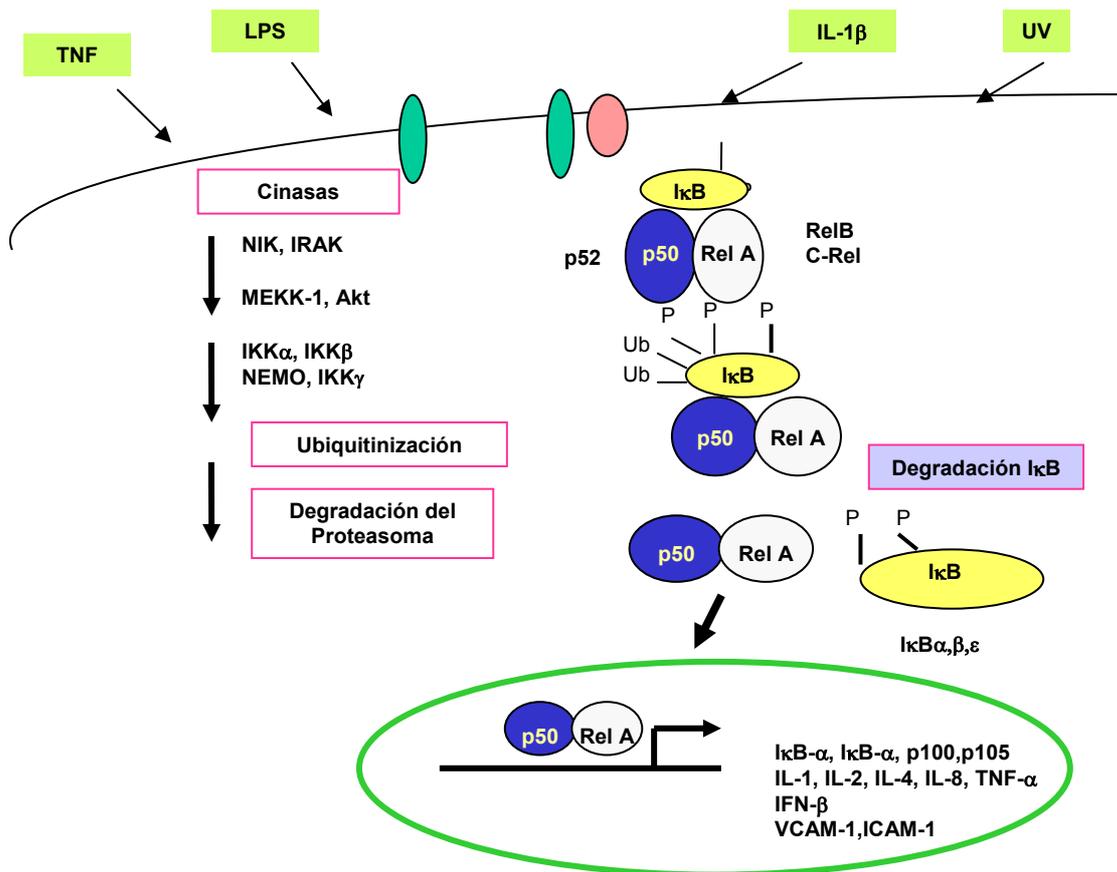


Figura 7.- Vía de señalización del factor nuclear NF- κ B. La activación del sistema NF κ B requiere una señal inductora que llega a su receptor específico. Se conocen al menos tres receptores que reconocen distintos ligandos: citocinas, factores de crecimiento y TLRs. La unión del ligando a su receptor activa a la cinasa del inhibidor I κ B (IKK). IKK fosforila entonces al inhibidor I κ B haciéndolo susceptible de la adición de moléculas de ubiquitina, función que es realizada por el complejo de ubiquitinación. Una vez que ha sido fosforilado y ubiquitinado el inhibidor I κ B que mantiene secuestrado al heterodímero NF- κ B (p65-p50) en el citoplasma, es reconocido y degradado por el proteosoma. Esto libera al heterodímero NF- κ B para que pueda ser translocado al núcleo celular, donde se une a secuencias específicas en el DNA para iniciar la transcripción de genes como los que codifican para moléculas de adhesión (CAMs).

5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La comunicación intercelular por citocinas durante una reacción inflamatoria permite integrar las respuestas de poblaciones celulares individuales para generar un patrón organizado en el tiempo y el espacio.

Es importante considerar que las concentraciones del factor de necrosis tumoral alfa (TNF) que se requieren para inducir respuestas celulares *in vitro* mediadas por el factor de transcripción NF- κ B, están 1000–10,000 veces por encima de los valores de la constante de disociación de sus receptores. Esta consideración es aún más relevante si se considera que *in vivo* las citocinas actúan a concentraciones mucho más bajas. Para resolver esta paradoja nosotros y otros grupos de investigación hemos postulado que los efectos del TNF se potencian por factores presentes en el microambiente de la reacción inflamatoria. Proponemos que estos factores deben incluir citocinas secretadas por leucocitos, células endoteliales y otros elementos celulares que participan en la reacción inflamatoria.

El estudio de los medios condicionados de monocitos (U937) estimulados con LPS, mostró la presencia de una actividad biológica capaz de potenciar los efectos de pequeñas cantidades de TNF con el que se co-secreta. Por el momento se desconoce la identidad de esta actividad biológica, y queda por definir si se trata de uno o de varios factores solubles.

Existen reportes de que el IFN- γ puede modular positivamente las respuestas celulares al TNF en diferentes tipos celulares, incluyendo las células endoteliales. Por esta razón en este estudio analizamos el posible efecto potenciador del IFN- γ sobre la activación endotelial mediada por TNF.

6.- JUSTIFICACIÓN

La activación endotelial *in vitro* mediada por citocinas, particularmente por TNF e IL-1 β ha sido caracterizada con detalle, sin embargo *in vivo*, las células endoteliales humanas no están expuestas solo a estas 2 citocinas. Se considera que las células endoteliales entran en contacto con mezclas de citocinas y de otros factores solubles y que la constitución de estas mezclas cambia conforme evoluciona la reacción inflamatoria. Existen reportes que mencionan que la presencia de IFN- γ tiene la capacidad de sinergizar y/o potenciar el efecto de TNF, en distintos procesos del sistema inmune.

In vivo, las citocinas no actúan independientemente ya que siempre se encuentran formando parte de una combinación de varias citocinas, hormonas, componentes de matriz extracelular y otros factores solubles que definen un contexto dentro del cual se genera una respuesta celular.

En la medida en que se conozcan con detalle los diferentes componentes de estas mezclas de citocinas y de sus vías de transducción, así como de los puntos de convergencia de estas vías, se tendrá un mejor entendimiento de las diferentes patologías que se asocian a un cuadro inflamatorio. Este conocimiento permitirá identificar nuevos blancos moleculares para el diseño de nuevas terapéuticas que contribuyan al tratamiento de estas.

Muchas de las enfermedades que afectan a la cavidad bucal como son la enfermedad periodontal, mucositis oral, patologías pulpares, procesos infecciosos, etc., se caracterizan por presentar inicialmente procesos inflamatorios desarrollados ante una diversidad de estímulos en donde los componentes inflamatorios desempeñan un papel central ya sea en las fases tempranas o en las fases crónico degenerativas. En años recientes se ha reconocido que el endotelio vascular posee una estrategia molecular que le permite responder directamente a citocinas y factores proinflamatorios que producen un cambio fenotípico denominado estado endotelial activado. En endotelio activado contribuye en forma importante a la reacción inflamatoria, por lo que nosotros nos hemos concentrado en estudiar los eventos iniciales en el desarrollo de la activación endotelial.

7.- HIPOTESIS

La activación de las STATs y/o las cinasas Janus (Jaks) activadas en la vía del IFN- γ potencian la respuesta endotelial al TNF sensibilizando al sistema I κ B/NF- κ B inducido por TNF, promoviendo la transcripción de genes dependientes de este factor.

8.- OBJETIVO GENERAL

La activación de NF- κ B inducida por TNF promueve la transcripción de genes dependientes de este factor alterando la destrucción de diferentes pozas de las proteínas inhibidoras de NF- κ B, durante la activación endotelial inducida por TNF.

Valorar si durante la activación endotelial inducida por el TNF el IFN- γ acelera la cinética de destrucción de las diferentes isoformas de I κ Bs, las proteínas inhibidoras de NF- κ B, y si estos cambios correlacionan con la expresión de moléculas de adhesión dependientes del sistema I κ B/NF- κ B

9.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Definir las concentraciones de TNF y de IFN- γ necesarias para promover un incremento significativo en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y selectina-E en cultivos primarios de células endoteliales humanas derivadas del cordón umbilical (HUVECs).
- Evaluar la cinética de degradación de las isoformas de I κ B alfa, beta y epsilon (α , β y ϵ) en células HUVECs tratadas con TNF (10 ng/ ml).
- Definir la magnitud de la potenciación del IFN- γ sobre la activación del sistema I κ B/NF- κ B, evaluando la cinética de degradación de las isoformas de I κ B alfa, beta y epsilon (α , β y ϵ) empleando la técnica de inmunoensayos tipo western blot en células HUVECs.
- Definir la magnitud de la potenciación del IFN- γ sobre la cantidad de la molécula de adhesión endotelial ICAM-1 y selectina E presentes en la superficie de las células HUVECs estimuladas con TFN, por medio de cursos temporales, empleando la técnica de citofluorometría.
- Definir la magnitud de la potenciación del IFN- γ sobre la expresión de las moléculas de adhesión endotelial ICAM-1, VCAM-1, selectina E, en respuesta al TFN, por medio de cursos temporales, empleando la técnica de inmunoensayos tipo western blot en extractos totales de células HUVECs.

10.- MATERIAL Y MÉTODOS

CULTIVOS CELULARES DE CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS (HUVEC)

Para realizar los experimentos se generaron cultivos primarios de células endoteliales derivadas de la vena del cordón umbilical humano, actualmente representan el mejor modelo para el estudio de células endoteliales y han sido utilizadas para diversas investigaciones que han permitido conocer el funcionamiento de estas células y principalmente su participación en el proceso inflamatorio.

Estas células endoteliales se obtuvieron de acuerdo al método descrito por David Jaffe en 1973. Los cordones se obtuvieron gracias a un protocolo aprobado por el comité de Ética del IMMS de pacientes que acuden a la clínica N° 4 de Gineco-Obstetricia “Dr. Luis Castelazo Ayala” del IMSS. De acuerdo a los datos reportados en la historia clínica las donadoras no padecían enfermedades sistémicas ni infecciosas.

Una vez colectados los cordones umbilicales fueron almacenados en PBS a un pH de 7.4 a 4°C hasta el momento de ser procesados. Las células endoteliales se obtuvieron realizando una digestión enzimática en la vena umbilical durante 15 min a 37°C con colagenasa tipo IV al 0.02% disuelta en una solución salina hipotónica suplementada con HEPES 1%. Terminando el tiempo de incubación el cordón se sometió a un masaje suave para disociar las células endoteliales. La suspensión celular se obtuvo desplazando el líquido de la vena con una jeringa llena de solución salina. La solución que contenía a las células, se colectó y centrifugó a 1500g durante 10 min, se retiró el sobrenadante y la pastilla formada se resuspendió en medio de cultivo M-199 suplementado con heparina, mitogéno endotelial, L-glutamina, 1% de antibiótico (ampicilina, streptomina)/antimicótico (amfotericina B) y 10% de SBF, posteriormente se sembraron en cajas petri y se mantuvieron en condiciones de incubación a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO₂ después 24 horas de haber sido sembradas, las HUVEC se lavaron de 2 a 3 veces con PBS y se obtuvo un cultivo semiconfluyente y las células fueron desprendidas por medio de una solución enzimática de tripsina al 0.1% (Sigma). Las células se colectaron, resuspendieron y disgregaron en el medio M-199 suplementado y se separaron de la solución con tripsina por centrifugación a 1500g durante 10 min y se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos.

ENSAYO DE TIPO WESTERN BLOT

Para realizar estos experimentos las células endoteliales fueron sembradas en placas de 6 pozos donde se cultivaron hasta llegar a un 90% de confluencia. Las células endoteliales fueron estimuladas con TNF (R&Dsystems) utilizando concentraciones desde 0.01 ng/mL hasta 10 ng/mL a diferentes tiempos. Se utilizaron 100 U/mL de IFN- γ (Sigma) y la combinación de estas citocinas.

Una vez terminado el tratamiento las células fueron lavadas dos veces con PBS y lisadas con 100 μ L de solución de lisis (Tris pH 8.0, NaCl, NP-40, NaF, aprotinina, PMSF y leupeptina); el lisado se centrifugó a 10,000g durante 10 min a 4°C para colectar el sobrenadante al cual se le cuantificó la proteína total mediante el método de Bradford.

Para realizar la electroforesis se utilizaron 10 μ g de proteína de los extractos de proteína total y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) a 115 Volts durante 2 horas . Las proteínas de los geles fueron transferidas a una membrana de polivinil PVDF (Biorad) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se retiró la membrana de la cámara de transferencia y se bloquearon los sitios inespecíficos con leche descremada en polvo (Sveltis) preparada al 5% en TBS/Tween 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS/Tween con albúmina al 1%; anti-I κ Balfa(1:2000), anti-I κ Bbeta(1:500), anti-I κ Bepsilon(1:1000), anti-ICAM-1(1:2000), anti-VCAM-1(1:1000), y anti-selectina-E (1:1000) de Santa Cruz Biotechnology. Con estas diluciones de anticuerpos primarios se incubaron las membranas durante 2 h. Posteriormente se lavaron las membranas con TBS/Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 45 min. La señal de quimioluminiscencia se obtuvo al incubar las membranas con el reactivo comercial (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate de PIERCE), y las bandas se visualizaron revelando películas de autoradiografía (Kodak MXB).

ANÁLISIS DE WESTERN BLOT (DENSITOMETRÍAS)

Para el análisis de resultados de las autoradiografías obtenidas de los experimentos western blot, se digitalizaron con el programa DigiDoc (Biorad). Para realizar el análisis de la densitometría de los patrones de las bandas se utilizó el programa Lab Image J NIH Versión 1.37V.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Este ensayo fue utilizado para determinar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y selectina E, en la superficie de las células endoteliales activadas por el factor de necrosis tumoral TNF e IFN- γ .

El ensayo se basa en el uso de anticuerpos monoclonales acoplados a biotina y su visualización por medio de streptavidina conjugada con el fluorocromo ficoeritrina.

Para realizar estos experimentos las células endoteliales se crecieron a una confluencia entre 70 y 80% en placas de cultivo de 12 pozos. Las células endoteliales se mantuvieron con los estímulos de 1 hasta 6 h en incubación a 37°C. Después de las 6 h de estímulos la monocapa endotelial de cada uno de los tratamientos, fue lavada 3 veces con PBS frío para remover los componentes de las soluciones a partir de este momento las células y las soluciones empleadas se mantuvieron en frío para evitar recambios en la membrana celular, y se les adiciono 1 mL de PBS con 2.5% de BSA, en donde se diluyó 1:800 el anticuerpo acoplado contra selectina E (BD Pharmigen) y 1:500 el anticuerpo acoplado contra ICAM-1(BD Pharmigen). La incubación con el anticuerpo primario se realizó a 4°C y en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se retiró el anticuerpo primario y se lavaron los pozos durante 3 veces con PBS. Se agregó a cada pozo, el anticuerpo secundario acoplado a Streptavidina-Ficoeritrina (Beckton Dickinson) en una dilución 1:3000 con PBS y se mantuvo la incubación en agitación durante 30 minutos a 4°C. Se retiró la streptavidina/ficoeritrina, y se realizaron dos lavados con PBS. Se incubaron las placas con 1 mL de PBS EDTA (10mM) a 4°C durante 15 min. Las células se colectaron en tubos para citometría y fueron centrifugadas a 2000g durante 5 minutos y resuspendidas en 500 μ L de PBS para realizar la lectura de las células en el citómetro (FACS Scalibur Beckton Dickinson), en el canal de fluorescencia roja para detectar la ficoeritrina (FL2-H).

ANALISIS DE CITOMETRIAS DE FLUJO

Los datos de los experimentos de citometría de flujo se obtuvieron mediante el programa del citómetro Cell Quest (Apple Macintosh). Los histogramas se realizaron con el programa WinMDI2.8, y se realizaron las gráficas con los valores de la intensidad promedio de fluorescencia (IMF%).

ESTADISTICA

Los experimentos de western blot y citometría de flujo se realizaron por triplicado y se obtuvieron las medias, desviación y el error estándar para poder realizar las gráficas. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 12.

11.-RESULTADOS

Expresión de la molécula de adhesión selectina E en células endoteliales humanas a diferentes concentraciones de TNF e IFN- γ .

Se ha reportado que las concentraciones de TNF a las cuales induce una mejor respuesta en la expresión de moléculas de adhesión y en la activación de NF- κ B es la de 10 ng/mL. Sin embargo, con el objetivo de identificar las concentraciones mínimas de TNF para inducir expresión de moléculas de adhesión y evaluar los efectos de IFN- γ las células fueron tratadas durante 6 h. La expresión de selectina-E se induce desde 0.01 ng/mL incrementándose 3.5 veces más con 0.1ng/mL de TNF (134.04) la intensidad promedio de fluorescencia (IMF) con respecto al control (37.35), observándose el máximo efecto con 10 ng/mL de TNF (212.89). Cuando se utilizaron 100 U/mL de IFN- γ selectina E se incremento 1.5 veces (56.87) con respecto al control (37.35). (Figura 8,9)

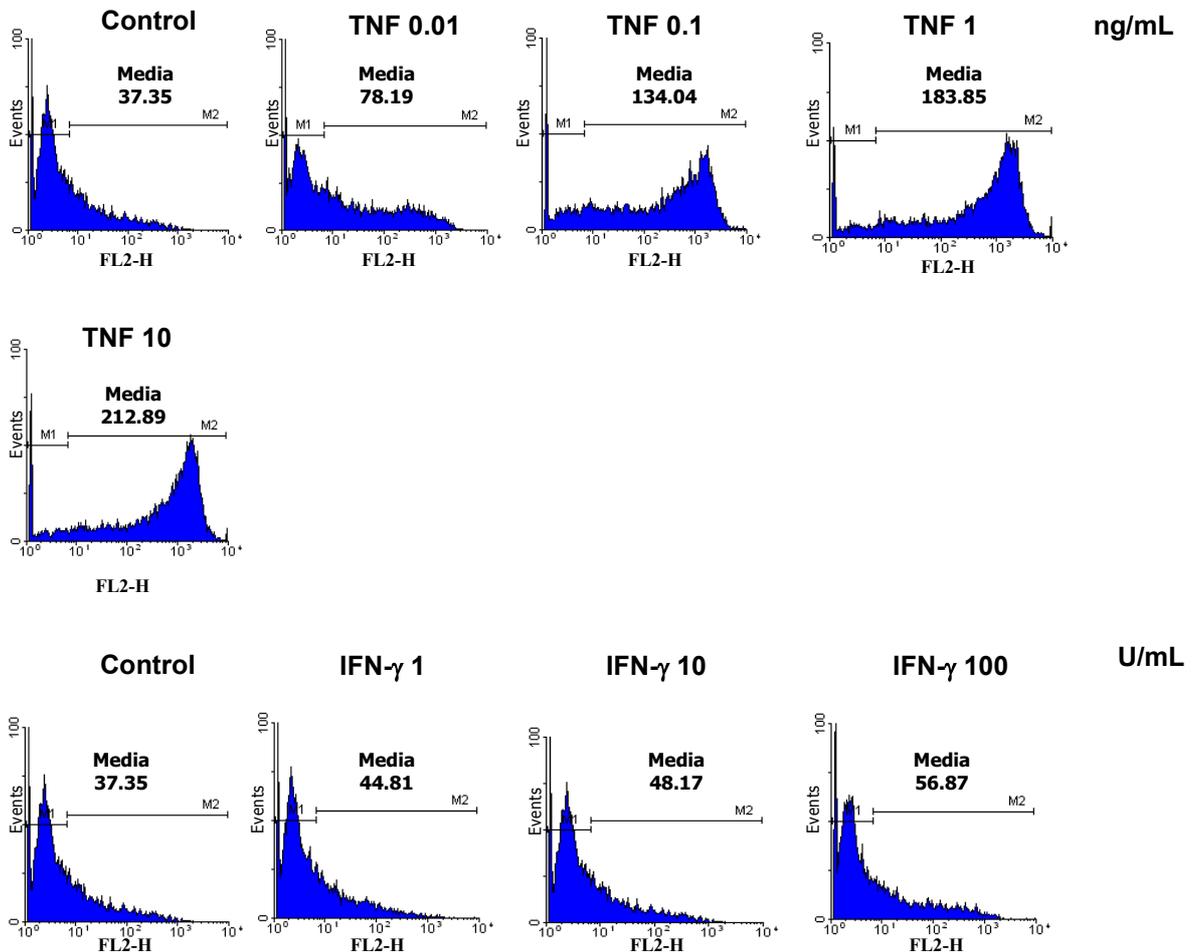


Figura 8.- Histograma del análisis de citofluorometría para evaluar la expresión de la molécula de adhesión selectina E, en la superficie de células endoteliales humanas (HUVEC). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de TNF (0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL), e IFN- γ (1, 10, 100 U/mL) durante 6 h. Las células control no recibieron ningún tratamiento. El eje Y corresponde a la intensidad de fluorescencia a 540 nm representada como FL2-H en escala logarítmica. En el eje de las X el porcentaje de eventos (células). En la gráfica se observa los valores de la media de la intensidad promedio de fluorescencia (IMF).

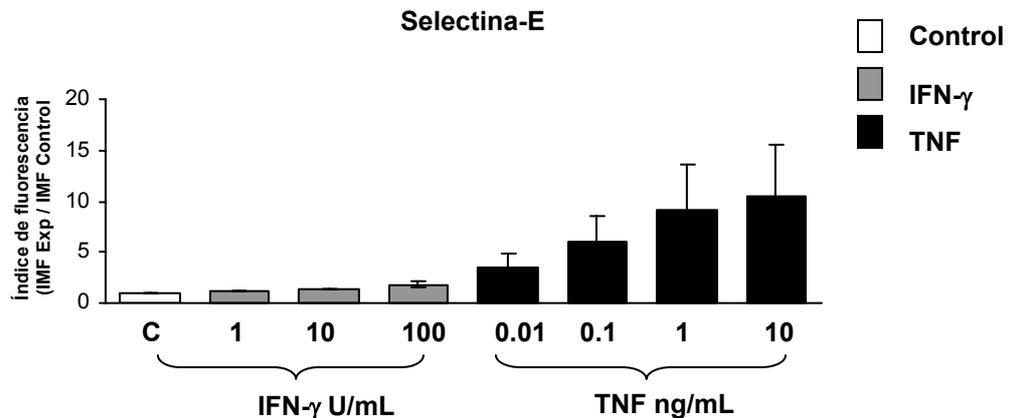


Figura 9.- Gráfica del Índice de fluorescencia de la expresión de selectina-E en la superficie de las células endoteliales humanas (HUVEC). Las células fueron tratadas con TNF (0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL), e IFN- γ (1, 10, 100 U/mL) durante 6 h. La intensidad media de fluorescencia de las condiciones experimentales se dividió entre la intensidad promedio de fluorescencia del control de cada grupo de experimentos. Se obtuvo la desviación y el error estándar, los experimentos se realizaron por triplicado.

Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en células endoteliales humanas a diferentes concentraciones de TNF e IFN- γ .

Una vez que se evaluaron los efectos de las concentraciones de TNF e IFN- γ en la expresión de selectina-E, el siguiente objetivo fue determinar los cambios en la expresión de ICAM-1.

ICAM-1 se induce desde 0.01 ng/mL de TNF incrementándose 4 veces (143.57) más la intensidad promedio de fluorescencia (IMF) con respecto al control (35.89), observándose el máximo efecto con 10 ng/mL de TNF (228.89). Cuando se utilizaron 100 U/mL de IFN- γ la expresión de selectina E se incremento 1.3 veces (57.06) con respecto al control (35.89) (Figura 10,11). Una vez que se evaluaron las concentraciones de TNF e IFN- γ sobre la expresión de selectina-E e ICAM-1 el siguiente objetivo fue determinar los efectos de TNF sobre la cinética de degradación de las tres isoformas I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ .

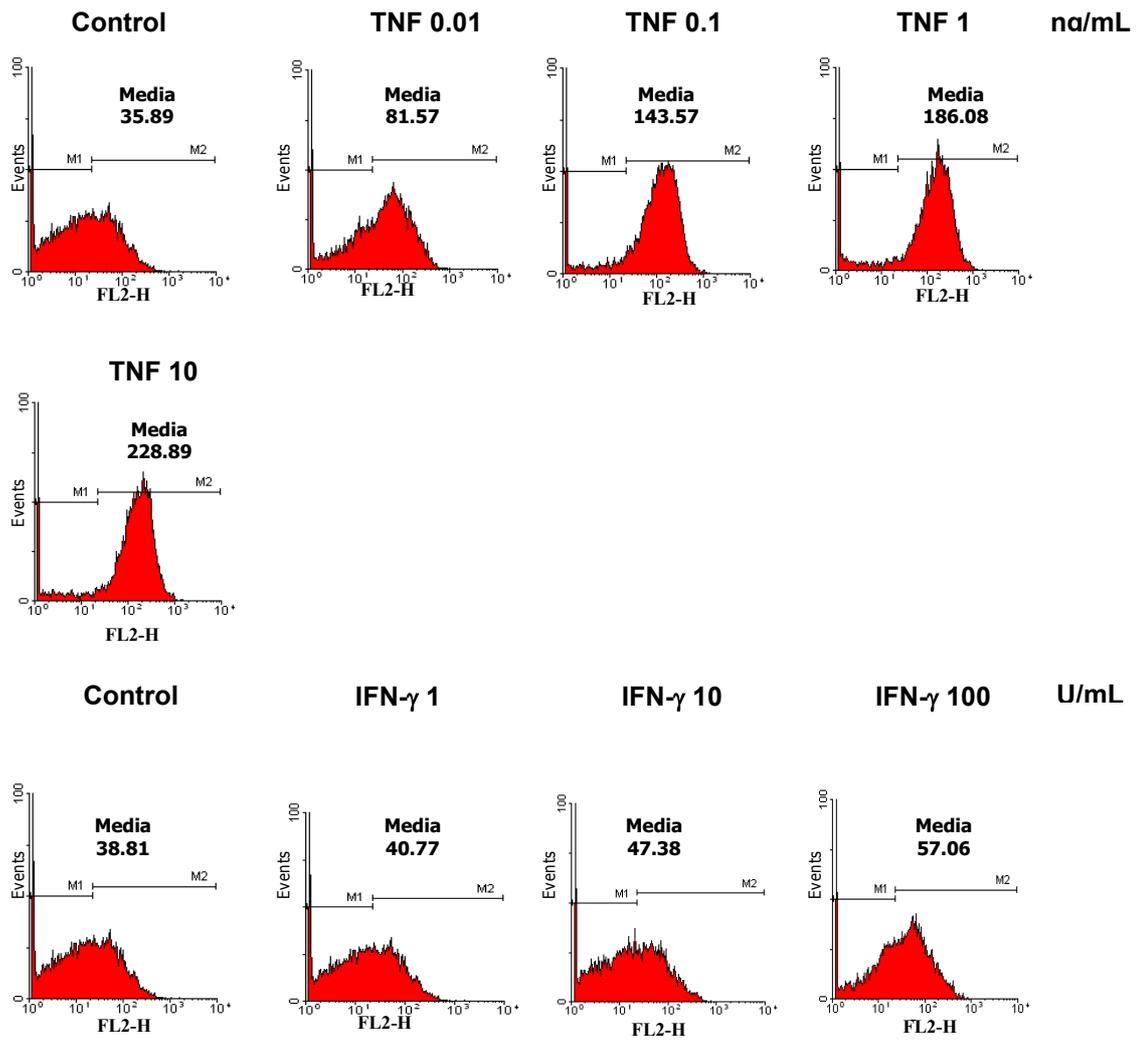


Figura 10.- Histograma del análisis de citofluorimetría para evaluar la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, en la superficie de células endoteliales humanas (HUVEC). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de TNF (0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL), e IFN- γ (1, 10, 100 U/mL) durante 6 h. Las células control no recibieron ningún tratamiento. El eje Y corresponde a la intensidad de fluorescencia a 540 nm representada como FL2-H en escala logarítmica. En el eje de las X el porcentaje de eventos (células). En la gráfica se observa los valores de la media de la intensidad promedio de fluorescencia (IMF).

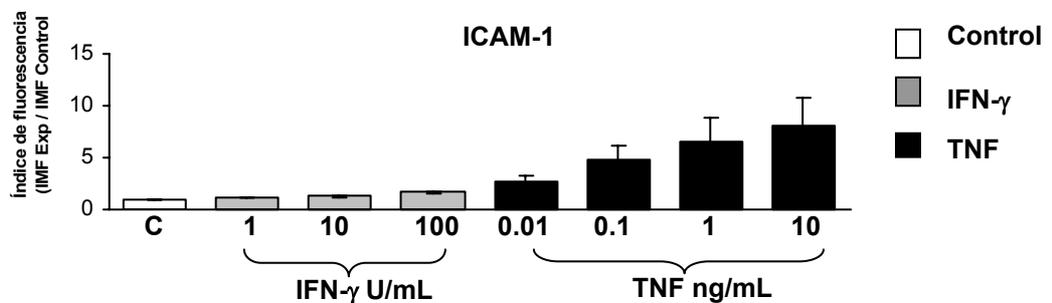


Figura 11.- Gráfica del Índice de fluorescencia de la expresión de ICAM-1, en la superficie de las células endoteliales humanas (HUVEC). Las células fueron tratadas con TNF (0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL), e IFN- γ (1, 10, 100 U/mL) durante 6 h. La intensidad media de fluorescencia de las condiciones experimentales se dividió entre la intensidad promedio de fluorescencia del control de cada grupo de experimentos. Se obtuvo la desviación y el error estándar, los experimentos se realizaron por triplicado.

Cinética de degradación de IκBs α, β y ε en respuesta al tratamiento con TNF.

Se realizaron inmunoensayos tipo western blot en lisados totales con el objetivo de evaluar la degradación de las tres isoformas de IκB-α, IκB-β e IκB-ε previamente identificadas en células endoteliales que se degradan permitiendo la translocación de NF-κB en respuesta a TNF o a las mezclas de citocinas secretadas por macrófagos activados (101).

En el caso de IκB-α se observó una degradación temprana que ocurre a partir de los 15 min, alcanzando una degradación casi total a los 20 min. Sin embargo, la proteína reaparece a los 40min y restablece los niveles basales a los 60 min. Estudios previos han documentado que esta segunda fase se debe a síntesis de *novo* (103). En el caso de IκB-β la cinética de degradación es mas lenta, aunque también se inicia a los 15 min. En este caso la degradación es casi total apenas después de 60 min. (Figura 12,13)

En el caso de IκB-ε la cinética es muy similar a la de IκB-β. Las intensidades relativas en los controles (primer carril de los cuatro paneles) son distintas para las tres isoformas siendo mayor IκB-ε > IκB-α >> IκB-β. Sin embargo, estas diferencias no deben ser interpretadas como mayor o menor abundancia de las distintas isoformas, ya que en su detección se emplearon diferentes anticuerpos a diferentes diluciones, que además poseen afinidades diferentes. Como control de cargado se empleó a la actina.

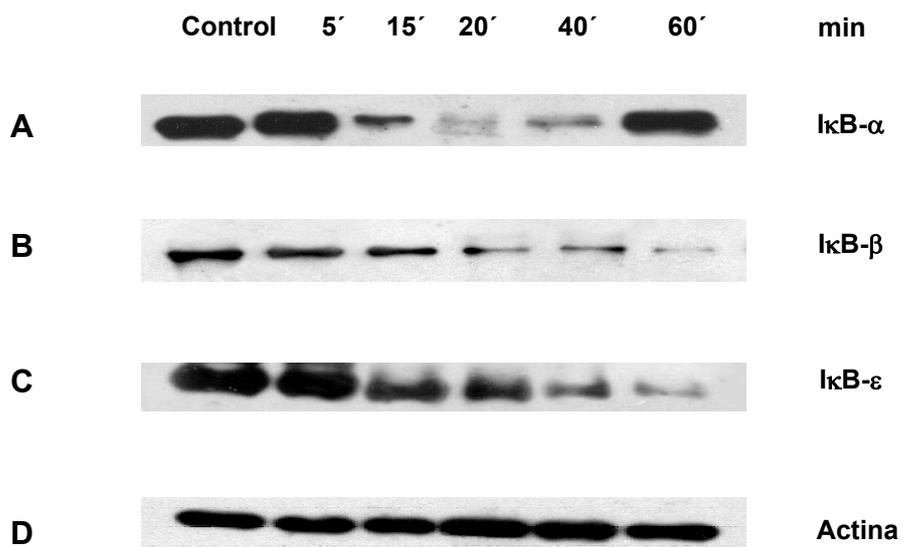


Figura 12.- Inmunoensayo en células endoteliales humanas (HUVEC) de la Cinética de Degradación de IκB-α (A), IκB-β (B) e IκB-ε (C). Las células fueron tratadas de 5 a 60 min con TNF. Los extractos de las células control se aislaron al tiempo 0 min. Como control de cargado se realizo un inmunoensayo con actina (D).

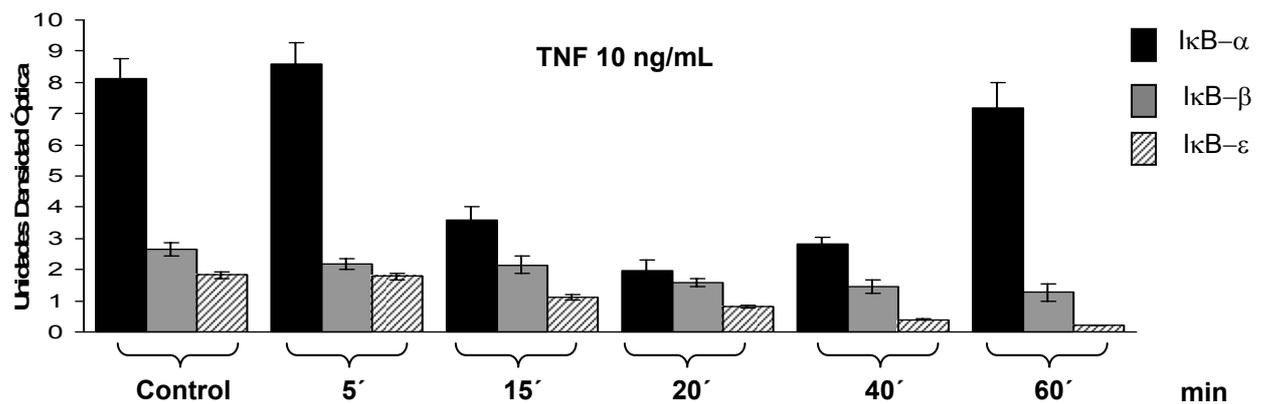


Figura 13.- Gráfica de la densitometría de la cinética de degradación de IκB-α, IκB-β e IκB-ε, en células endoteliales humanas (HUVEC). Las células fueron tratadas con 10 ng/mL de TNF. Se obtuvo la desviación y el error estándar, los experimentos se realizaron por triplicado.

Cinética de degradación de IκB-α, IκB-β e IκB-ε en respuesta al tratamiento con TNF, IFN-γ, y/o la combinación de ambos.

Se realizaron inmunoensayos tipo western blot en lisados totales con el objetivo de evaluar la degradación de las tres isoformas de IκB-α, IκB-β e IκB-ε en respuesta al tratamiento con 0.1 ng/mL de TNF, y 100 U/mL de IFN-γ, y la combinación de ambas citocinas. (Figura 14,15)

A diferencia de la figura anterior (Figura 12,13) la degradación de la isoforma IκB-α inicio a los 20min con TNF, el IFN-γ no tuvo ningún efecto sobre los niveles de alfa, pero la combinación de TNF más IFN-γ, condujo a la desaparición total de esta isoforma a los 20 min. A los 40 min alfa presenta un ligero incremento en las células tratadas con TNF, sin embargo el tratamiento con TNF e IFN-γ mantuvo los niveles de alfa indetectables. A los 60 min la isoforma IκB-α sigue incrementándose cuando las células fueron tratadas con TNF y en presencia del tratamiento de TNF mas IFN-γ reaparece pero a niveles mas bajos, sugiriendo el inicio de la síntesis de novo.

En presencia de TNF y de IFN-γ no se induce la degradación de la isoforma IκB-β, de 5 a 20 min, sin embargo se observa una degradación temprana a partir de los 20 min en respuesta al tratamiento de TNF más IFN-γ. Esta degradación continúa hasta los 60 min en presencia de TNF más IFN. En este caso la degradación es casi total apenas después de 60 min. En el caso de IκB-ε la cinética es más lenta a la de IκB-β. Como control de cargado se empleó a la actina.

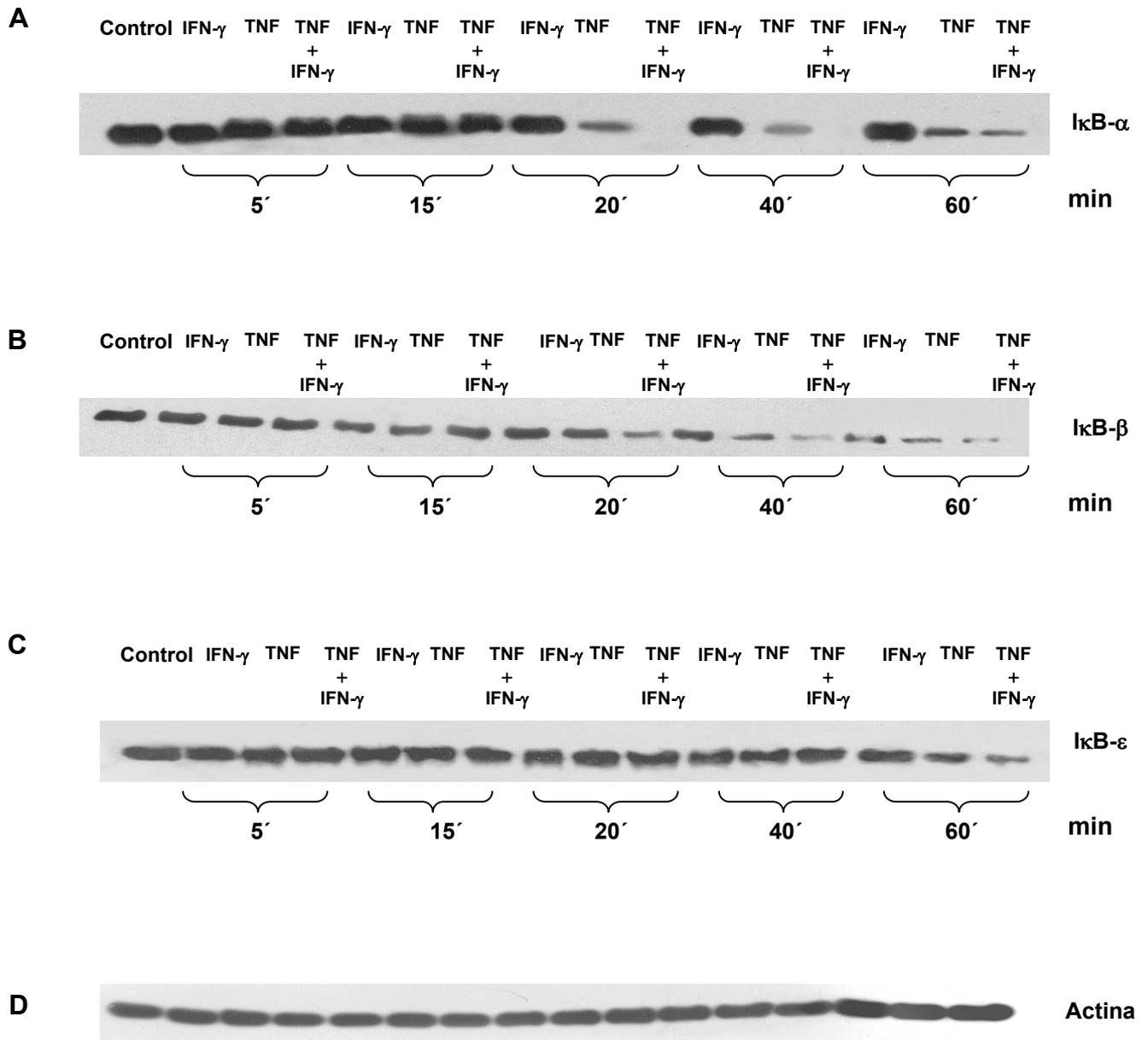


Figura 14.- Inmunoensayo en células endoteliales humanas (HUVEC) de la Cinética de Degradación de I κ B- α (A) , I κ B- β (B) e I κ B- ϵ (C), en células tratadas con 0.1 ng/mL de TNF, 100 U/mL de IFN- γ y/o la combinación de ambas citocinas de 5 a 60 min. Los extractos de las células control se aislaron al tiempo 0 min. Como control de cargado se realizó un inmunoensayo con actina (D).

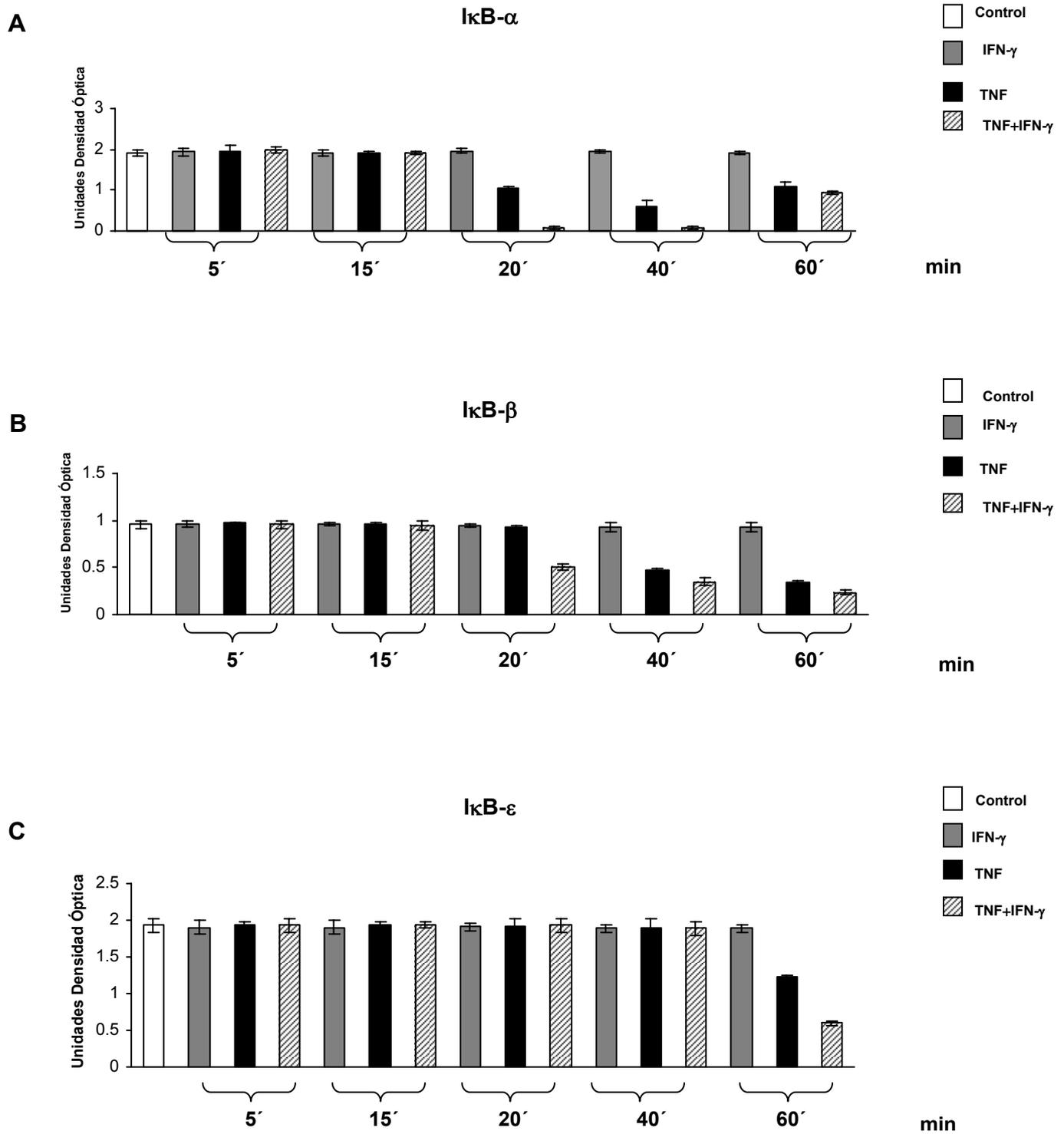


Figura 15.- Gráfica de la densitometría de la cinética de degradación de IκB-α, IκB-β e IκB-ε, en células endoteliales humanas HUVEC tratadas con 0.1 ng/mL de TNF, 100 U/mL de IFN-γ y/o la combinación de ambas citocinas de 5 a 60 min. Se obtuvo la desviación y el error estándar, los experimentos se realizaron por triplicado.

Expresión de las moléculas de adhesión selectina-E en células endoteliales humanas a diferentes tiempos de TNF e IFN- γ .

Con el objetivo de identificar los efectos moduladores de IFN- γ en la actividad de TNF y los tiempos a los cuales aparecen cambios se evaluó la expresión de selectina E. Se observó que la expresión en células tratadas con TNF a 0.1 ng/mL inicia desde las 2 h, incrementándose 35 veces más (298.65) respecto al control 2 h (8.45), y continúa a las 4h (514.25) con TNF, no se observa mayor incremento a las 6 h (498.27) con TNF. Las células que se trataron con IFN- γ no se observan cambios significativos en la expresión de selectina E. La combinación de TNF e IFN- γ incrementó la expresión de selectina a partir de las 2 h (398.78) respectó a las células tratadas con TNF (298.65), observándose la máxima expresión a las 4 h con TNF e IFN- γ (694.87) a diferencia de las células que se trataron con TNF (514.25). (Figura 16,17)

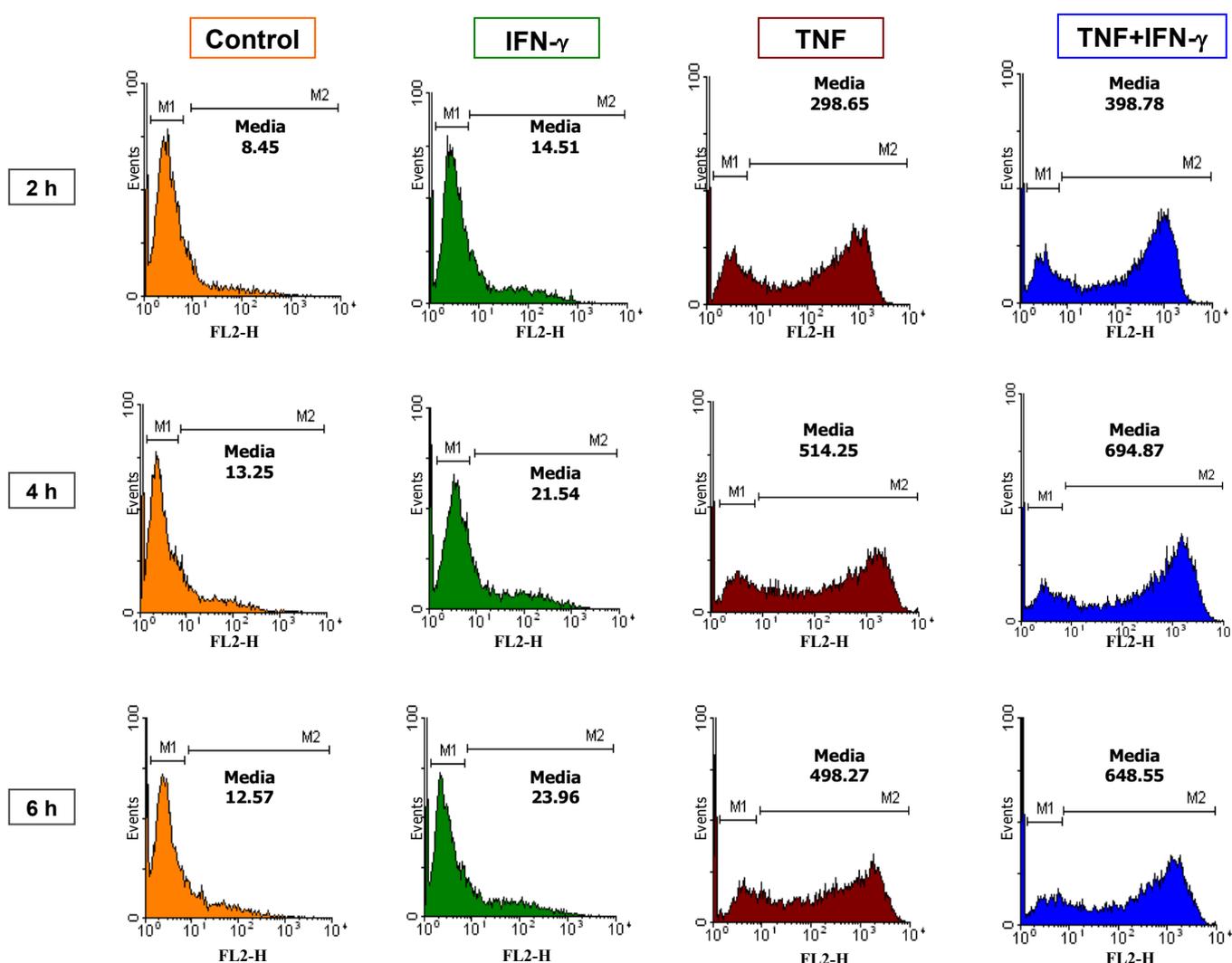


Figura 16.-Histograma del análisis de citofluorometría para la expresión de selectina E en células (HUVEC) tratadas con TNF 0.1 ng/mL, IFN 100 U/mL y/o la combinación de ambos durante 2, 4, 6 h. El eje Y corresponde a la intensidad de fluorescencia a 540 nm representada como FL2-H en escala logarítmica. En el eje de las X el porcentaje de eventos (células). En la gráfica se observa los valores de la media de la intensidad promedio de fluorescencia (IMF).

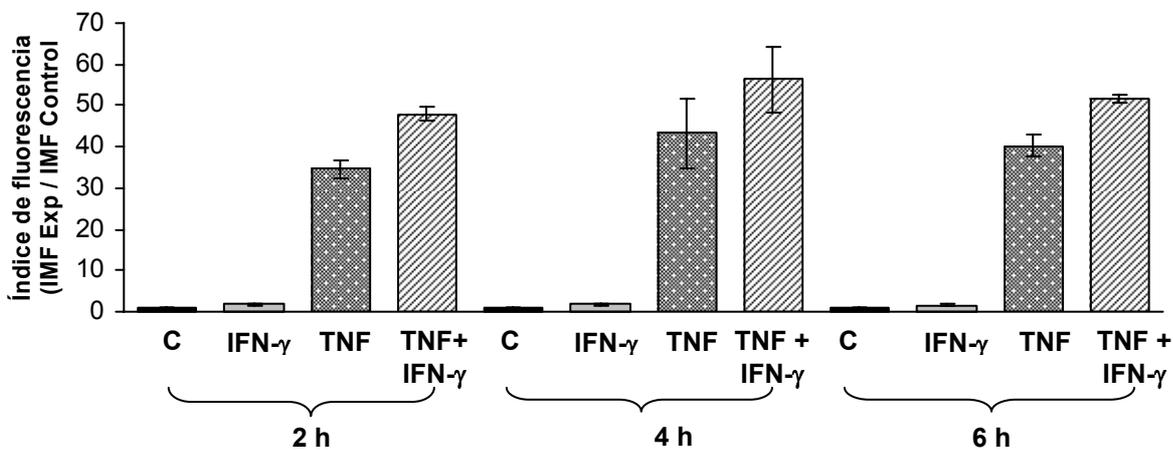


Figura 17.- Gráfica del Índice de fluorescencia de la expresión de selectina-E , en la superficie de las células endoteliales (HUVEC), tratadas con TNF 0.1 ng/mL, e IFN 100 U/mL y/o la combinación de TNF e IFN- γ durante 2, 4 y 6 h. La intensidad media de fluorescencia de las condiciones experimentales se dividió entre la intensidad promedio de fluorescencia del control de cada grupo de experimentos. Se obtuvo la desviación y el error estándar, los experimentos se realizaron por triplicado.

Expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 en células endoteliales humanas a diferentes tiempos de TNF e IFN- γ .

El siguiente objetivo fue identificar los efectos moduladores de IFN- γ en la actividad de TNF y los tiempos a los cuales aparecen cambios en la expresión de ICAM-1. Se observó que la expresión en células tratadas con TNF a 0.1 ng/mL inicia desde las 2 h, incrementándose 2.5 veces más (233.31) respecto al control 2 h (89.95), este efecto continúa a las 4h con TNF, el máximo evento se observó 6 h con TNF. En las células tratadas con IFN- γ no se observan cambios significativos en la expresión de ICAM-1. La combinación de TNF e IFN- γ incrementó la expresión de ICAM-1 a partir de las 4 h (644.82) respectó a las tratadas solo con TNF (.583.35), observándose la máxima expresión a las 6 h con TNF e IFN- γ (1013.05) a diferencia de las que se trataron con TNF (823.18). (Figura 18,19)

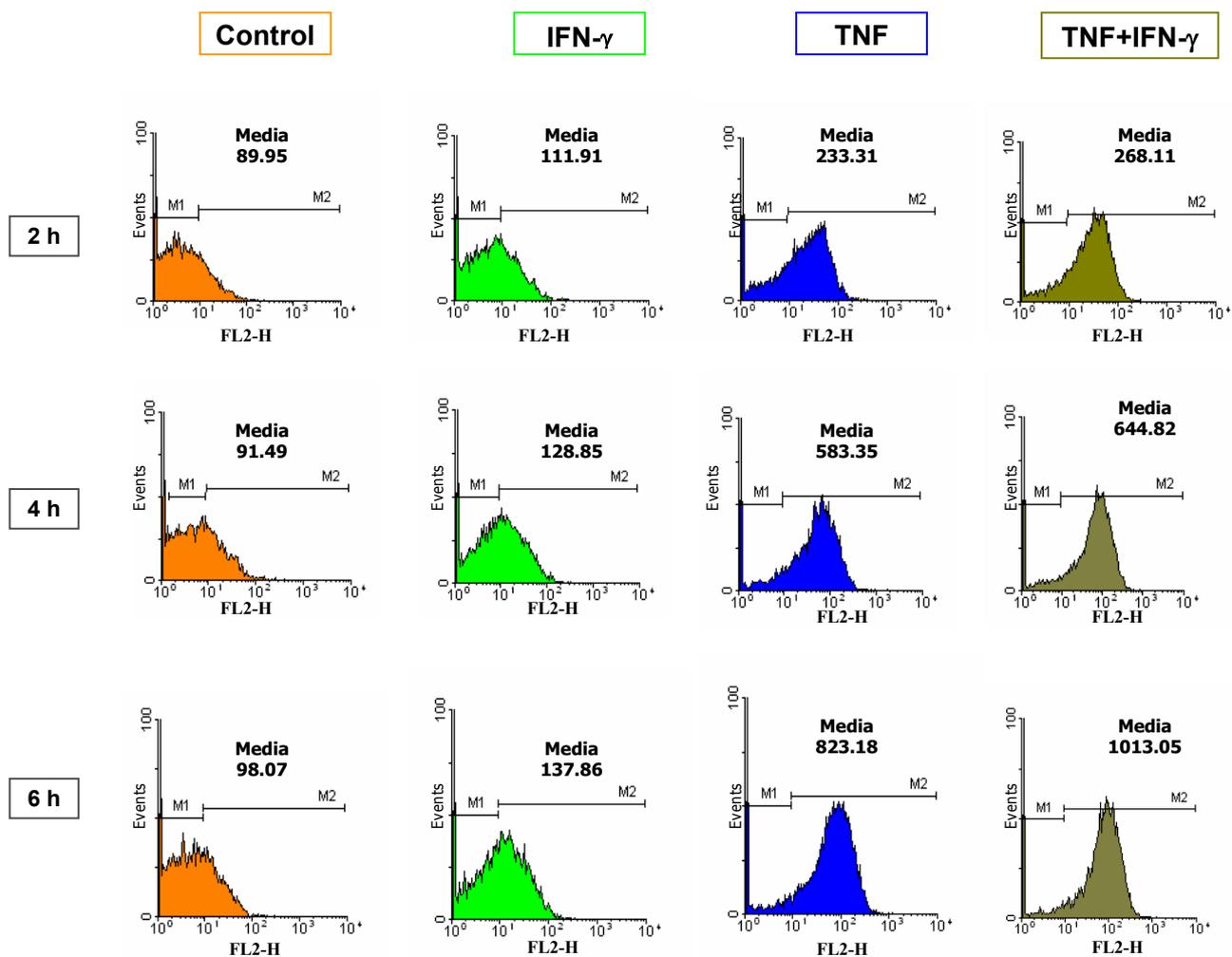


Figura 18.-Histograma del análisis de citofluorimetría para la expresión de ICAM-1 en la superficie de células endoteliales humanas (HUVEC). Las células fueron tratadas con TNF 0.1 ng/mL, IFN 100 U/mL o la combinación de TNF e IFN- γ durante 2, 4 y 6 h. El eje Y corresponde a la intensidad de fluorescencia a 540 nm representada como FL2-H en escala logarítmica. En el eje de las X el porcentaje de eventos (células). En la gráfica se observa los valores de la media de la intensidad promedio de fluorescencia (IMF).

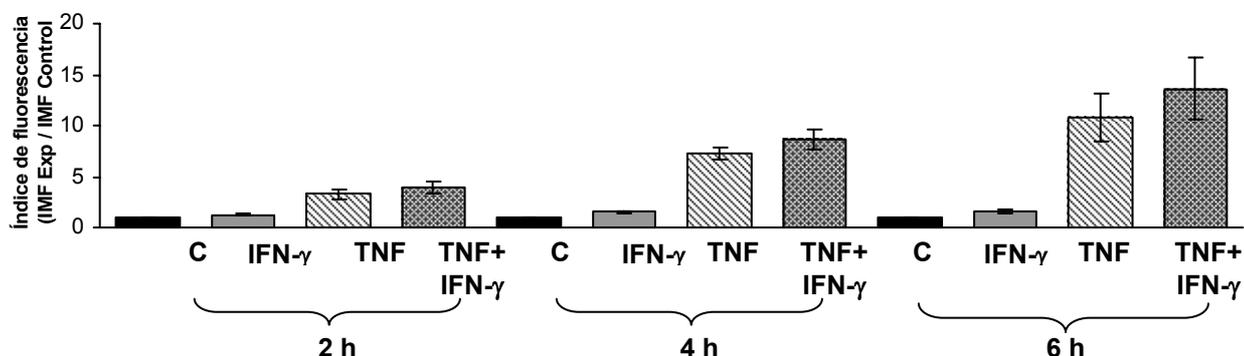


Figura 19.- Gráfica del índice de fluorescencia de la expresión de ICAM-1, en la superficie de las células endoteliales humanas (HUVEC), tratadas con TNF 0.1 ng/mL, e IFN 100 U/mL y/o la combinación de TNF e IFN- γ durante 2, 4 y 6 h. La intensidad de fluorescencia de las condiciones experimentales se dividió entre la intensidad promedio de fluorescencia del control de cada grupo de experimentos. Se obtuvo la desviación y el error estándar, los experimentos se realizaron por triplicado.

Expresión de las moléculas de adhesión selectina E, VCAM-1 e ICAM-1, en células endoteliales humanas tratadas a diferentes tiempos con TNF e IFN- γ .

Con el objetivo de identificar los efectos moduladores de IFN- γ en la actividad de TNF. Se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 por medio de inmunoensayo tipo western blot en extractos totales de las células endoteliales en los tiempos a los cuales aparecen cambios en la expresión de estas moléculas de adhesión.

La expresión de selectina-E en las células tratadas con TNF fue a partir de 2 h, a diferencia de las células que solo se trataron con IFN- γ en las cuales no se induce la expresión. El máximo evento se observó a las 4 h en las células tratadas con TNF e IFN- γ , a diferencia de las que solo se trataron con TNF. La expresión de selectina-E disminuye a las 6 h de tratamiento TNF y la combinación TNF/IFN- γ . (Figura 20A,21A)

En las células que solo se trataron con IFN- γ no se induce la expresión de VCAM-1, en las células tratadas con TNF, la expresión de VCAM-1 se observó a partir de 2 h. Existe un incremento en las células tratadas con TNF a las 4 h. En presencia de TNF e IFN- γ , la expresión de VCAM-1 se incrementa a las 4 h a diferencia de las que solo se trataron con TNF, sin embargo no se observó incremento a las 6 h de tratamiento. (Figura 20B,21B)

En el caso de ICAM-1, se observó que la expresión de esta molécula de adhesión en células tratadas con TNF se induce a partir de 2 h, a diferencia de las células que solo se trataron con IFN- γ . En presencia de TNF e IFN- γ se observó un incremento en la expresión de ICAM-1 a las 4 h con respecto a las células tratadas solo con TNF, el efecto continúa hasta las 6 h. (Figura 20C,21C)

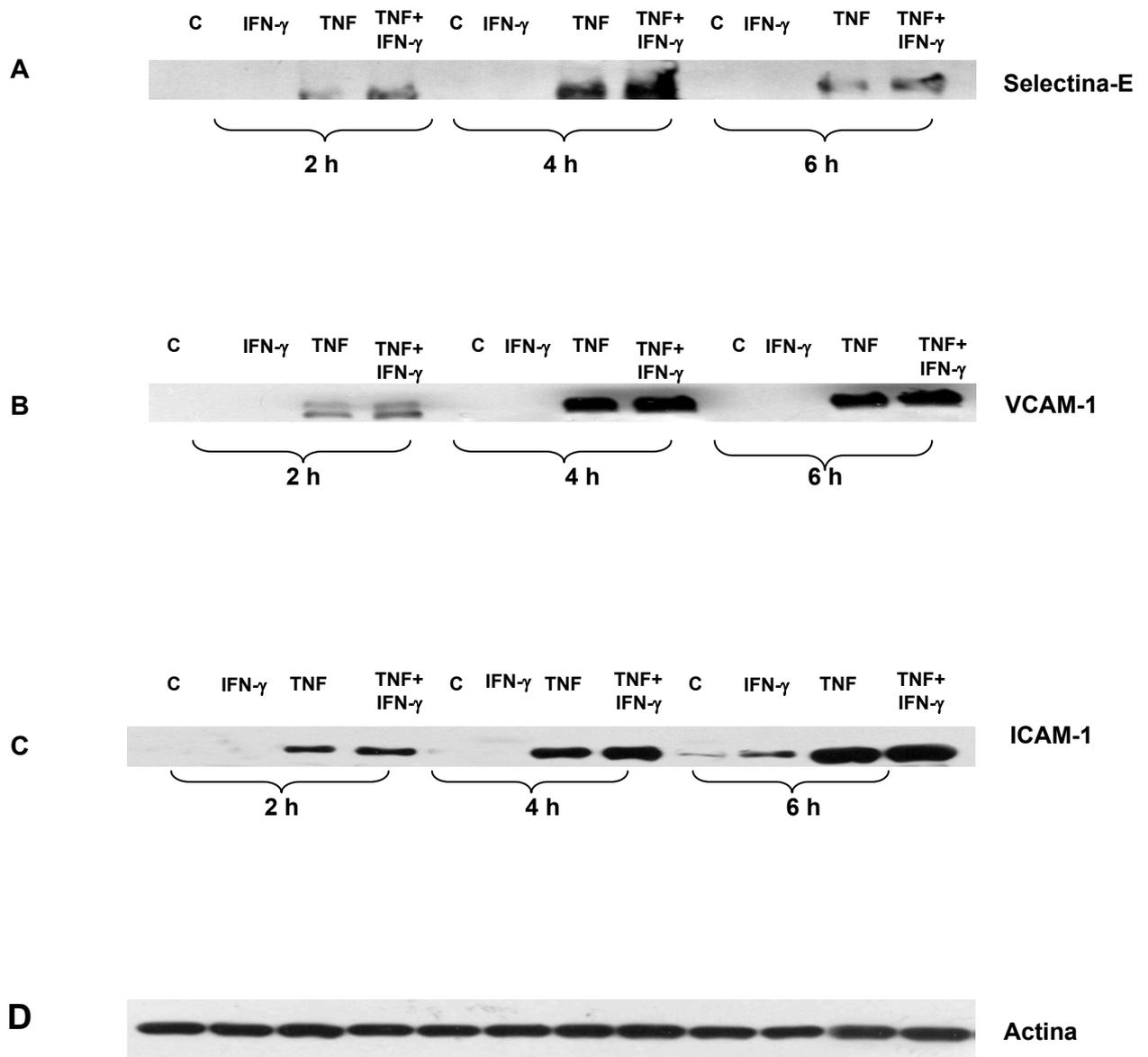


Figura 20.-Inmunoensayo de la expresión de las moléculas de adhesión selectina E (A), VCAM-1 (B), ICAM-1 (C), en las células endoteliales humanas (HUVEC). Las células fueron tratadas con TNF 0.1 ng/mL, IFN 100 U/mL y la combinación de TNF- α e IFN- γ durante 2,4 y 6 h. Los extractos de las células control se aislaron al tiempo 0 min. Como control de cargado se realizó un inmunoensayo con actina (D).

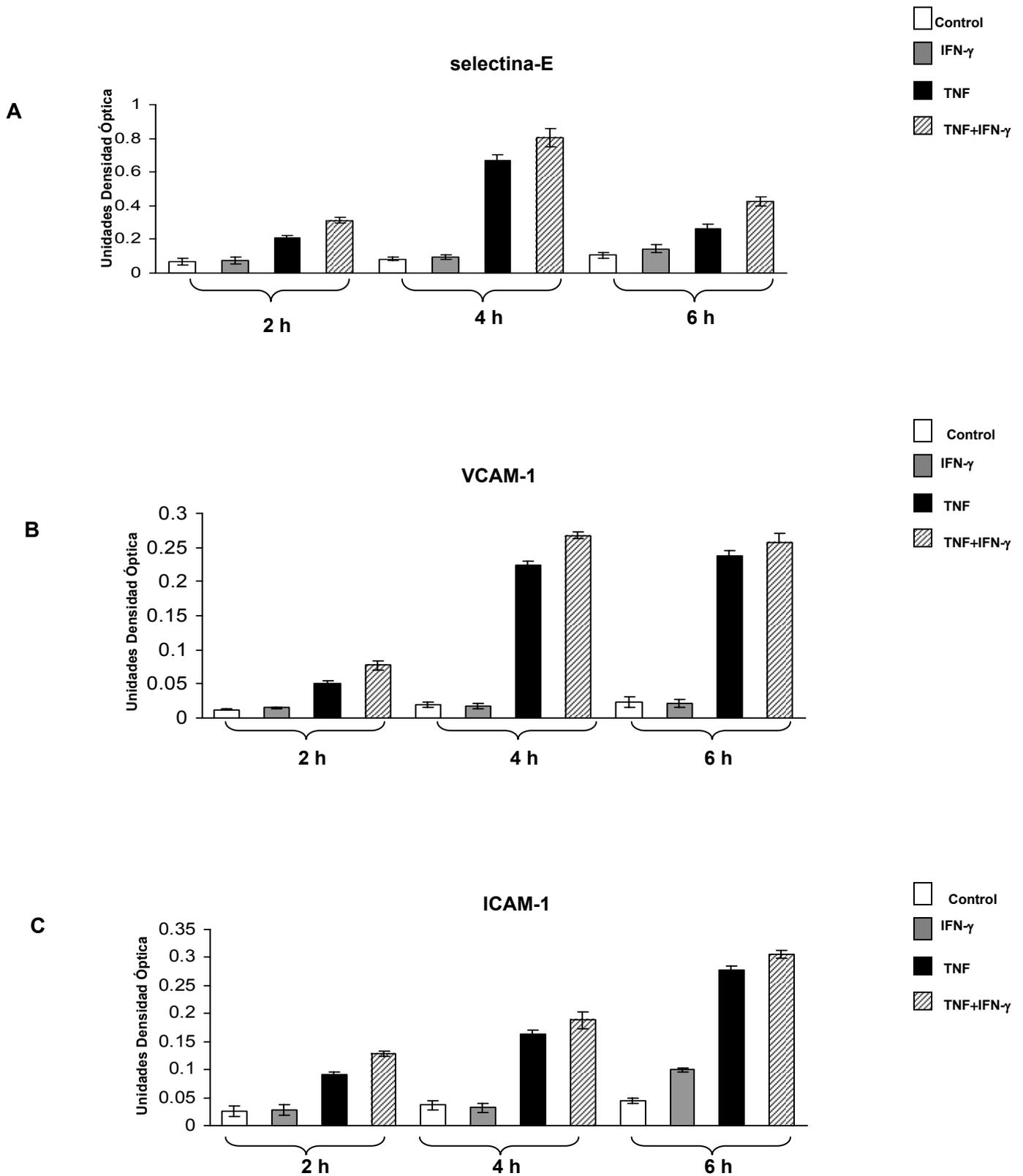


Figura 21.-Gráfica de la densitometría de la expresión de selectina E(A), VCAM-1 (B), ICAM-1 (C) en las células endoteliales humanas (HUVEC). Las células fueron tratadas con TNF 0.1 ng/mL, IFN 100 U/mL y la combinación de TNF e IFN- γ durante 2,4 y 6 h. Se obtuvo la desviación y el error estándar, los experimentos se realizaron por triplicado.

12.-DISCUSIÓN

Las células endoteliales derivadas de la vena de cordón umbilical humana (HUVEC) representan uno de los modelos que ha permitido entender mejor los procesos relacionados con la respuesta inflamatoria y fenómenos inmunológicos en condiciones *in vitro* que ha mostrado un comportamiento similar a la vasculatura *in vivo*. Estas células endoteliales tienen la capacidad de responder a diversos estímulos y han mostrado una respuesta asociada en procesos de coagulación, angiogénesis, etc, cuando el endotelio cambia de un estado de reposo hacia un fenotipo activado. (90,91)

El antecedente directo del presente trabajo de investigación fue el realizado por Lucia López Bojórquez en el grupo de investigación del Dr. Zentella, en el cual se evaluó la expresión de TNF y de la interleucina IL-1 β en medios condicionados de células U937 estimuladas con LPS. En este trabajo se encontró que los sobrenadantes que contienen factores solubles secretados por estas células tienen TNF e IL-1 β en bajas cantidades, sin embargo, los efectos de estas citocinas fueron muy potentes, sugiriendo que existen factores como IFN- γ que actúan en el contexto fisiológico de los medios condicionados.(101)

El TNF se reconoce como el mayor mediador de la respuesta inmune innata sin embargo, patologías relacionadas con la inflamación como es el caso de la mucositis oral provocada por radioterapia y quimioterapia, la enfermedad periodontal no pueden ser prevenidas solo por la inhibición de la secreción o de la actividad de TNF, esto se debe muy probablemente a la presencia de otros factores que actúan en estas respuestas biológicas como es el caso del IFN- γ que participa modulando sus acciones o incrementando los efectos de TNF en la respuesta inflamatoria.

Se ha reportado que cuando el IFN- γ actúa sobre TNF aumenta la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune. (88,89)

Con el objetivo de evaluar el efecto de potenciación de la respuesta del IFN- γ sobre el TNF, se determinaron las concentraciones mínimas a las cuales TNF induce la expresión de selectina-E y de ICAM-1 en las células endoteliales. Se observó que TNF incrementa la expresión de selectina-E desde 0.1 ng/mL, los resultados obtenidos para la expresión de ICAM-1 fueron similares observándose un incremento de la expresión a la misma concentración de TNF, en donde se observó un mayor desplazamiento de la intensidad de fluorescencia con 1 y 10 ng/mL de TNF.

Existen muchos reportes que mencionan que las concentraciones de TNF a las cuales se induce una mejor respuesta en la expresión de moléculas de adhesión y en la activación de NF- κ B son a concentraciones de 10 ng/mL.

Sin embargo las concentraciones requeridas *in vitro* para disparar respuestas biológicas, se encuentran en el intervalo de 0.1 a 10 ng/ml (5 a 500 nM), estas concentraciones se encuentran más de 100 veces por encima de la constante de disociación de su receptor de TNF que es de (3 nM). A una concentración de 1 ng/mL (50 nM) todos los receptores deben encontrarse ocupados, sin embargo, estas concentraciones *in vitro* no evocan la máxima respuesta biológica. Por esta razón nos interesa utilizar las concentraciones mínimas de TNF para inducir respuestas, lo cual podría reflejar algunas condiciones de las acciones biológicas que *in vivo* están sucediendo.

Uno de los efectos de potenciación del IFN- γ podría darse al facilitar la translocación de NF- κ B activado por TNF, por esta importancia fue relevante estudiar la degradación de las tres isoformas de I κ B α, β, ϵ involucradas en la mayoría de las respuestas inducibles a NF- κ B.

En concordancia con los datos reportados en la literatura (101,102,103), nosotros observamos que I κ B- α en respuesta a TNF se degrada rápidamente desde los 15 min, y la síntesis de novo comienza a partir de los 60 min con niveles de reaparición cercanos a los basales.

Estos eventos continúan con la degradación secuencial de I κ B- β e I κ B- ε . Lo que pudimos observar cuando se utilizaron concentraciones bajas de TNF, es que esta degradación se inicia a partir de los 20 min, pero en presencia de TNF más IFN- γ se induce una temprana degradación de I κ B- α a los 20 min, revelando un mecanismo de potenciación que involucra la degradación temprana de esta isoforma que conducía a la persistente activación de NF- κ B.

Cabe recordar que I κ B- α es uno de los primeros genes que se transcriben en respuesta a la translocación de NF- κ B, la cual es transitoria. (Figura 12,14)

La isoforma I κ B- β presenta una cinética de degradación mas lenta, los resultados observados en nuestro modelo de células endoteliales coinciden con lo reportado en la literatura, que representa una respuesta sostenida de NF- κ B (101).

En presencia de la combinación de TNF más IFN- γ se induce una degradación temprana I κ B- β a los 20 min. Este mecanismo es relevante porque el IFN- γ por sí solo no permite que el factor NF- κ B se transloca al núcleo y realice la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune. (Figura 14)

La degradación de ambas isoformas α y β incrementan las cantidades de NF- κ B que están libres para translocarse hacia el núcleo permitiendo incrementar la expresión de genes dependientes de este factor (103). La cinética de degradación de I κ B- ε es más lenta que la de α y β , sin embargo, en presencia de TNF más IFN- γ continúa esta degradación a los 60 min, I κ B- ε muestra una mayor degradación a este tiempo. Uno de los posibles mecanismos del efecto de potenciación de α y β es que la señalización de IFN- γ module la activación de I κ B/NF- κ B. (Figura 15). La cinética de degradación de las isoformas α y β , ε se ha estudiado en otras líneas celulares mostrando diferencias en los tiempos de degradación y síntesis, esto puede ser el resultado de diferencias en la regulación transcripcional de sus promotores.(105)

Para poder correlacionar estos datos de la cinética de degradación de I κ Bs, uno los efectos inmediatos de la activación de NF- κ B en respuesta al tratamiento con TNF, es el inicio de la transcripción de los genes que codifican para las moléculas de adhesión.

Por la importante participación secuencial de la expresión que estas moléculas tienen en el reclutamiento leucocitario durante la inflamación. En el caso de los efectos de IFN- γ se ha reportado que por sí solo no incrementa la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales (103).

Para poder estudiar estos efectos se realizaron experimentos con citofluorometría, para evaluar la expresión de ICAM-1 y selectina-E en la superficie de la membrana celular. Se realizaron inmunoensayos tipo western blot en extractos proteicos totales de células HUVEC después de haber sido incubadas con los distintos tratamientos de TNF e IFN- γ y la combinación de ambas citocinas.

En nuestros experimentos observamos una tendencia al incremento respecto al control, cuando se utilizaron 0.1 ng/mL de TNF evaluando la expresión de selectina-E, VCAM e ICAM-1 (Figura 16,18,20), sin que existan diferencias significativas. Pudimos observar que existe un incremento en la expresión de selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1, cuando se utilizaron 100 U/mL de IFN- γ , y 0.1 ng/mL de TNF (Figura 16,18,19). Aunque esta diferencia fue mayor no alcanzó a tener significancia estadísticamente significativa.

Las acciones de IFN- γ sobre TNF es que incrementa en la superficie de la membrana, la expresión de ICAM-1 y de selectina-E, esto sugiere que IFN- γ incrementa la cantidad de estas moléculas de adhesión en las células endoteliales, en presencia de TNF.

Muchos mecanismos podrían estar involucrados en el efecto de potenciación de IFN- γ sobre TNF, se ha reportado que en líneas tumorales IFN- γ incrementa el número de receptores de TNF, sin embargo estudios en algunas líneas celulares han encontrado que IFN- γ se encuentra mediando el incremento o a la afinidad de los receptores de TNF. Los efectos de esta combinación de citocinas *in vitro* podrían reflejar los eventos fisiológicos que están sucediendo *in vivo*, además de tener importantes consecuencias en el reclutamiento de los leucocitos y PMN en el inicio y prolongación de la respuesta inmune.

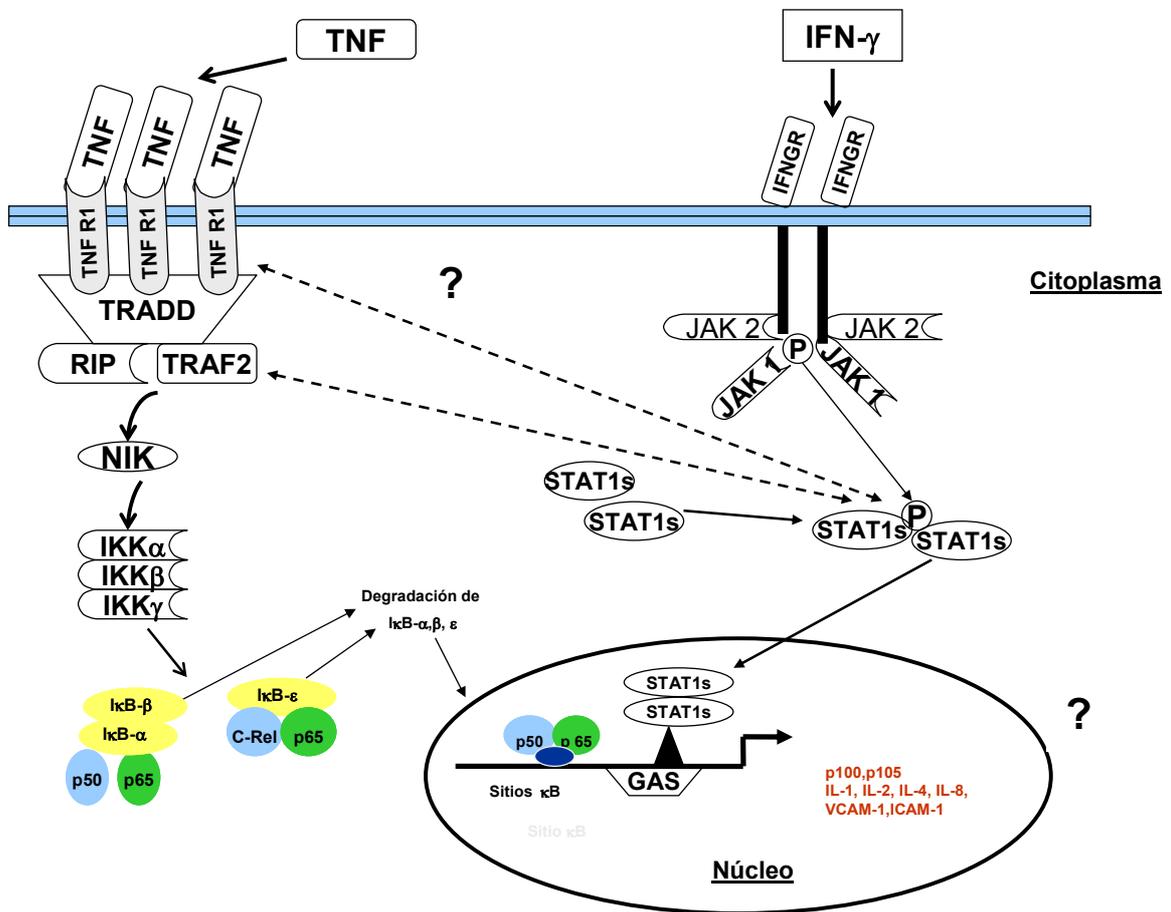


Figura 22.- Modelo de activación de NF-κB por TNF en combinación con IFN-γ.

IκB α, β y ε se degradan en el citoplasma para translocarse hacia el núcleo donde se unen a secuencias de los sitios de unión a NF-κB (κB). Las cinasas Jak1 y Jak2 de la vía de IFN-γ permiten la fosforilación y la formación del dímero de las STATs que se encuentran en el citoplasma para que puedan translocarse hacia el núcleo, en donde reconocen secuencias de los sitios activados gamma (GAS). Algunos estudios sugieren que los mecanismos moleculares de interacción de estas vías de señalización se encuentran a nivel de la transcripción, sin embargo podría existir otro mecanismo a nivel de las STATs de la vía de IFN-γ que estaría interactuando con alguno de los componentes del receptor de la vía de TNF.

13.- CONCLUSIONES

- La expresión de las moléculas de adhesión endoteliales selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 se incrementa incrementan sobre la basal desde 0.1 ng/ml de TNF.
- El IFN- γ incrementa la velocidad de degradación de I κ B- α en respuesta a TNF y también retrasa su re-expresión.
- El IFN- γ incrementa la velocidad de degradación de I κ B- β en respuesta a TNF.
- El IFN- γ incrementa la velocidad de degradación de I κ B- ε en respuesta a TNF.
- La magnitud de los cambios en las cinéticas de degradación de las diferentes isoformas de I κ B no correlacionan con las magnitudes de los incrementos en la expresión de las moléculas de adhesión.

14.- PERSPECTIVAS

Aún hay controversia sobre la coexistencia de TNF e IFN- γ durante las fases tempranas de la reacción inflamatoria. Sin embargo, la potenciación que induce el IFN- γ sobre el TNF representa un buen modelo que puede servir para entender los mecanismos moleculares por los cuales el IFN- γ , y otros factores fisiológicamente relevantes pueden potenciar los efectos de TNF.

Debido a que el IFN- γ puede potenciar la expresión de genes inducida por el TNF. Algunos estudios sugieren que el factor de transcripción STAT1 de la vía del IFN- γ podría mediar esta potenciación. Estos resultados del efecto de potenciación de las STATs han sido descritos en fibroblastos pulmonares de rata. Cualquiera que sea el mecanismo, la potenciación parece terminar en una transcripción más eficiente.

En la medida que se puedan identificar los puntos de convergencia y la regulación entre estas vías de transducción del TNF e IFN- γ , las investigaciones que se realicen con estos objetivos podrán utilizarse como un modelo que permita entender algunos de los mecanismos moleculares por los cuales el IFN- γ , y otros factores fisiológicamente relevantes que potencian los efectos de TNF.

15.- REFERENCIAS

1. Berne (2000). Fisiología Humana 3a. Edición, España Editorial Mosby pp:180-183.
2. Junqueira-Carneiro (2000). Histología Básica Texto y Atlas, 5a Edición España. Editorial Masson, , pp:205,206,209.
3. Best-Taylor Bases (2003). Fisiológicas de la práctica médica. 13a Edición, Editorial Panamericana, pp:69-72.
4. Alan Stevens-Jame Lowe (2000). Histología humana. 2a Edición, Editorial McGrawHill Interamericana España, pp:102,138,139,149.
5. Genneser (2000) Histología Básica. 3a Edición, Editorial Harcourt-Brace España, pp:258,380,382.
6. Jaffe EA, Nachmen RL, Becker GC, Minick CR (1973). Culture of human endothelial cells from umbilical veins. J. Clin. Invest 52:pp:2745-275.
7. Michael A. Gimbrone, Ramzi S. Cotran and Judah Folkman (1974). Human Vascular Endothelial Cells in Culture. The Journal of Cell Biology. pp:673-684.
8. Carine Michiels (2003). Endothelial Cell Functions. Journal of Cellular Physiology. pp:430-443.
9. Jeremy D. Pearson (1991). Endothelial Cell Biology. Radiology 179: pp:9-14.
10. Alberto Mantovani, Cecilia Garlanda. Endothelial Cells (2001): Immunological Aspects. Encyclopedia Life Sciences. pp:1-7.
11. Christopher D. Buckley, G. Ed Rainger, Gerard B. Nash and Karim Raza (2005). Endothelial cells, fibroblasts and vasculitis. Rheumatology pp:95-101.
12. Elisabetta Dejana (2004). Endothelial Cell-Cell Junctions: Happy Together. Nature Reviews, Molecular Cell Biology. Volume 5, pp:261-270.
13. Ralph L. Nachman and Eric A. Jaffe (2004). Endothelial cell culture beginnings of modern vascular biology. The Journal of Clinical Investigation. Volume 114 pp:1037-1040.

14. Frank Manconi, Robert Markham and Ian S. Frase (2000). Culturing endothelial cells of microvascular origin. *Methods in Cell Science* 22: pp:89-99.
15. Kumar, Abbas, Fausto (2005). *Patología Estructural y Funcional*, 7a Edición Editorial Elsevier España, pp:125,131.
16. Gartner (1997), *Histología Texto y Atlas*, Editorial McGrawHill Editorial Interamericana México, pp:238-239.
17. Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4^a ed. Ediciones Garland, Nueva York. pp:1280-1284.
18. Helmut G. Agustin (2004). *Endothelium Review BioEssays* Vol.16, No12 December pp:124-129.
19. Werner Risau (1995). *Differentiation of Endothelium*, *FASEB J.* pp:926-933.
20. Jordan S. Pober (2002). *Endothelial Activation:intracellular signaling pathways* *Arthritis Res* pp:109-116.
21. Ondine Cleaver, Douglas A Melton (2003). *Endothelial signaling during development*. *Nature Medicine* pp:456-462.
22. Ronal E. Unger, James Kirkpatrick (2002). *In vitro Expression of the endothelial phenotype comparative study of primary isolated cells and cells lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R*. *Microvascular Res* pp:348-397.
23. Joan M Cook-Mills and Tracy L. Deem (2005). *Active participation of endothelial cells in inflammation*. *J. Leukoc. Biol* pp:789-795.
24. Joost J. Oppenheim, and Marc Feldman (1998). *Introduction to the Role of Cytokines in Innate Host Defense and Adaptative Immunity*. *The Cytokine Handbook*. Third Edition. pp:879-958.
25. Dinarello Charles (2000). *Proinflammatory Cytokines*. *Chest*: 118:pp:503-508.

26. Darnell J. y Lodish H (1999). Molecular Cell Biology. 4^a ed. W.H. Freeman and Company, New York pp:205-326.
27. Luis Felipe Jiménez, Horacio Merchant Larios (2003). Biología Celular y Molecular. Editorial Pearson Educación México. pp:158-215.
28. Lewin Benjamin. (2000). Genes VII. Oxford University Press. pp:358-423.
29. Kevin J. Tracey (1998). Tumor Necrosis Factor. The Cytokine Handbook. Third Edition, pp:223-233.
30. Lisa A. Madge and Jordan S. Pober (2001). TNF- α Signaling in Vascular Endothelial Cells. Exp and Mol Pathol pp:317-325.
31. Cuzzola M, Mancuso G, Beninati C, Biodono C, Von Hunolstein C, Orefici G, et al (2000);. Human monocyte receptors involved in tumor necrosis factor responses to group B streptococcal products. Infect Immun pp:994-998.
32. Dinarello CA, Cannon JG: Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, et al (1986) TNF- α (cachectin) is an endogenous pyrogen and induce production of interleukin 1. J Exp Med pp:1433-1450.
33. G. Chen, D. V. Goeddel (2002), TNF Pathway, Sciences STKE <http://www.sciencemag.org/cgi/cm/CMP7107>.
34. Abbas Aabaul (2005). Inmunología Molecular de la Célula. Editorial Elsevier. pp:187-208.
35. Kuby, Golsdby (2004) Inmunologia 5a Edición Editorial McGraw Hill Interamericana. pp:357-379.
36. Guoqing Chen and David V. Goeddel (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. Science pp:31-35.
37. David S. Goodsell (2006). The Molecular Perspective: Tumor Necrosis Factor. The Oncologist pp:83–84.
38. Baud V, Karin M (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends Cell Biol pp:372–377.
39. Angus. W., Thompson (1998). Interferons. The Cytokine Handbook. Third Edition. pp:493-509.

40. M.J. Clemens (1999). The role of IFNs . Cytokines . Bios Scientific Publishers pp:55-59.
41. Ganes C. Sen (1998). The Interferons. The Cytokines in the Health and Disease.pp:199-204.
42. Akinori Takaoka and Hideyuki Yanai (2006). Interferon Signalling network in innate defence. Cellular Microbiology pp:907-922.
43. Michael G. Katze, Michael Gale (2002). Viruses and Interferon a fight for supremacy. Nature Review Volume 2, September, pp:675-685.
44. Leonidas C. Plataniias and Eleanor N. Fish (1999). Signaling pathways activated by interferons. Experimental Hematology pp:1583–1592.
45. George R. Stark, Ian M. Kerr, Bryan R. G. Williams, Robert H. Silverman, and Robert D. Schreiber (1998). How to cells respond to interferons. Annu. Rev. Biochem. 67: pp:227–64.
46. Sidney Pestka, Christopher D. Krause, Mark R. Walter (2004) Interferons, interferon like cytokines, and their receptors. Immunological Reviews Vol. 202:pp:8–32.
47. Anette H.H. van Boxel-Dezaire, M.R. Sandhya Rani and George R. Stark (2002). Complex Modulation of Cell Type-Specific Signaling in Response to Type I Interferons. Immunity 25, pp:361–372.
48. Pestka S (2000). The human interferon a species and receptors. Biopolymers ;55:pp:254–287.
49. Lefevre F, Guillomot M, D'Andrea S, Battegay S, La Bonnardiere C (1998). Interferon-d: the first member of a novel type I interferon family. Biochimie 80:pp:779–788.
50. Ozato K, Tsujimura H, Tamura T (2000). Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. Biotechniques pp:66–68.
51. Pestka S (2001). Modified interferons. PBL Biomedical Laboratories.[US 6,300,474], pp:1–22.

52. Massiel del Rosario Quijano, Pedro Prats Pérez (2000). Mecanismos de Señalización para el IFN gamma. BEB 20(3):pp:152-157.
53. G.Tau, P. Rothman (1999). Biologic functions of the IFN-gamma receptors. Allergy ,54,pp:1233-1251.
54. Steven M. Holland and John I. Gallin (2004). Interferon- γ in the treatment of infectious diseases.Chapter 22 Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook. Humana Press pp:331-350.
55. Bach EZ, Aguet M, Scheiber RD (1997). The IFN- γ a paradigm for receptor signaling. Annu Rev Immunol pp:563-591.
56. Leonardo K Teixeira, Bruna PF Fonseca, Bianca A Barboza, João PB Viola (2005). The role of interferon- γ on immune and allergic responses Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, (Suppl. I):pp137-144.
57. Terri N. Ellis & Blaine L. Beaman (2004). Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. Immunology 112 pp:2–12.
58. Billiau A (1996). Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. Adv Immunol 62:pp61-130.
59. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997). Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol 15:pp:749-795.
60. Jordan S. Pober and Ramzi S (1990). Cotran. Cytokines and Endothelial Cell Biology. Microbiological Reviews. Vol 70, N° 2, April pp:427-451.
61. Alberto Mantovani, Silvano Sozzani, and Martino Introna(1997). Endothelial Activation by Cytokines. Ann N Y Acad Sci Dec 15, 832:pp:93-116.
62. Alberto Mantovani, Elisabetta Dejana (1998). Cytokines and Endothelial Cells. Chapter 22 The Cytokine Handbook. Third Edition. pp:323-350.
63. Toshitkatsu Hanada, Akihiko Yoshimura (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. Cytokine & Growth Factors Reviews 13 pp:413-418.

64. Ali S, Kaur J, Patel KD. (2000) Intercellular Cell Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, and Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted Are Expressed by Human Breast Carcinoma Cells and Support Eosinophil Adhesion and Activation. *Am Journal of Pathol* No. 1: pp:313-321.
65. Albelda SM, Smith CW, Ward PA, (1994). Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8: pp:504-512.
66. Carlos T, Kovach N, Schwartz B, Rosa M, Newman B, Wayner E, Benjamin C, Osborn L, Lob R, Harlan J. (1991) Human Monocytes Bind to Two Cytokine-Induced Adhesive Ligands on Cultured Human Endothelial Cells: Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule-1 and vascular Cell Adhesion Molecule-1. *Blood* Vol. 77, No. 10: pp:2266-2271.
67. Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC. (2000) CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 6 (7): pp:591-603.
68. Injune Kim, Sang-Ok Moon, Sung Hoon Kim, Hyung Jin Kim, Young Soon Koh, Gou Young Koh (2001). Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- κ B Activation in Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 10, Issue 9: pp:7614–7620.
69. Gabay C, Kushner I. (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340: pp:448-451.
70. Kuldo JM, Ogawara KI, Werner N, Ásgeirsdóttir SA, Kamps JAAM, Kok RJ, Olema G (2005). Molecular Pathways of Endothelial Cell Activation for (Targeted) Pharmacological Intervention of Chronic Inflammatory Diseases. *Current Vascular Pharmacology* pp:11-39.
71. Jin H, Varner J (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer*, 90: pp:561-565.
72. Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta* 1242: pp:77-98.
73. Weiss L (2000). Some cell interactions. *Cancer and Metastasis Reviews* 19: pp:235-255.

74. Toborek M, Hennig B (1996). Is endothelial cell autocrine production of tumor necrosis factor a mediator of lipid-induced endothelial dysfunction? *Med Hypotheses* 47 (5): pp:377-82.
75. Yoshimura A (2006). Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci.* 97 (6): pp:439-44.
76. Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC (2000). CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 6 (7): pp:591-603.
77. Susana Frías González (2007). Caracterización de la adhesión de células metastásicas humanas a cultivos endoteliales humanos activados por factores solubles derivados de células tumorales. Tesis de Maestría del Programa de Ciencias Biológicas Facultad de Ciencias de la UNAM.
78. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R (2002). Integrins in invasive growth. *The Journal of Clinical Investigation* Vol. 19, No. 8: pp:999-1006.
79. Thomas Tedder, Douglas Steeber, Anjun Chen, Pablo Engel (1995). The Selectins ; vascular adhesion molecules. *FASEB*, July, pp:866-873.
80. Scott I. Simon and Chad E. Green (2005). Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7:3.pp:1–3.35.
81. Crockett-Torabi E. (1998). Selectins and mechanisms of signal transduction. *J. Leukocyte Biol.* pp:63:1–14.
82. Klaus Ley and Geoffrey Kansas (2006). Selectins in T-Cell Recruitment to Non lymphoid tissues and sites of Inflammation. *Nature*. Volume 4 May 4,pp:1-11.
83. Steven P. Jones, Steven D. Trocha, Micah Strange, Neil Granger, David Lefer (2001). Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* pp:2201-2212.
84. Okegawa T, Pong R, Li Y, Hsieh J (2004). The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochimica Polonica* Vol. 51, No. 2: pp:445-457.

85. Thomas Decker, Silvia Stockinger, Marina Karaghiosoff, Mathias Muller, and Pavel Kovarick (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest* 109:pp:1271-1277.
86. Kisseleva, S. Bhattacharya, J. Braunstein, C.W. Schindler (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* pp:2851-2862.
87. Corinne M. Silva (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23, pp:8017-8023.
88. Amit Verma, Suman Kambhampati, Simrit Parmar and Leonidas C, Plataniias (2003). Jak family of kinases in cancer. *Cancer and Metastasis* 22: pp:423-434.
89. Tammy P. Cheng (2001). Janus kinases and STAT family transcription factors: their role in the function and development of lymphoid cells. *Transcription Factors: Normal and Malignant Development of Blood Cells* pp:229-25.
90. L. Adamkova, K. Souckor, J. Kovarik (2007). Transcription Protein STAT1: Biology and Relation to Cancer. *Folia Biologica (Praha)* 53, pp:1- 6.
91. Patrick A. Baeuerle and David Baltimore (1996). NF- κ B: Ten Years After. *Cell*, pp:13-20.
92. Swaroop Aradhya and David L Nelson (2001). NF- κ B signaling and human disease. *Current Opinion in Genetics and Development* , 11:pp:300-306.
93. Bharat B. Aggarwal. Nuclear factor- κ B (2004). The enemy within. *Cancer Cell: September Vol 6*; pp:203-208.
94. Jorge Caamaño and Christopher A. Hunter (2002). NF- κ B Family of Transcription Factors: Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions. *Clin Microbiol Rev*, 15, N° 3;pp:414-429.
95. Matthew S. Hayden and Sankar Ghosh (2005). Signaling to NF- κ B. *Genes & Development* 18:pp:2195-2224.

96. Yumi Yamamoto and Richard B. Gaynor (2004). Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. January (2);pp:135-142.
97. Tao Lu, George Stark (2004). Cytokine Overexpression and Constitutive NF- κ B in Cancer. *Cell Cycle*, pp:1114-1117.
98. López-Bojorquez LN. La regulación del factor de transcripción NF- κ B. *Revista de Investigación Clínica* 56 Num (1):pp:83-92.
99. López-Bojorquez LN (2004). Resultado del Contexto de citocinas co-secretradas con TNF- α en la activación de células endoteliales. Tesis de Doctorado del Programa de Ciencias Biomédicas de la UNAM.
100. López-Bojórquez LN, Zentella A, Reyes Terán G. (2004) Molecular Mechanism Envolved in the Patogenesis of Septic Shock. *Arch of Med Res* 35 (6): pp:465-479.
101. López Bojorquez LN, F. Arechavaleta-Velasco, F. Vadillo-Ortega, D. Montés Sánchez, J.L Ventura Gallegos and A. Zentella-Dehesa (2004). NF- κ B translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- α and IL-1 β . *Inflamm Res* 53 pp:567-575.
102. Lee AH, Hong JH, Seo YS (2000). Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma synergistically activate the RANTES promoter through nuclear factor kappaB and interferon regulatory factor 1 (IRF-1) transcription factors. *Biochem J*. Aug 15;350 pp:131-142.
103. Cheshire JL, Williams BR, Baldwin AS Jr (1999). Involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in the synergistic activation of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon in preneuronal cells. *J Biol Chem*. 1999 Feb 19;274(8):pp:4801-4813.
104. Ohmori Y, Schreiber R.D, A.Hamilton T (1997). Synergy between Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha in Transcriptional Activation Is Mediated by Cooperation between Signal Transducer and Activator of Transcription 1 and NF- κ B. *J Biol Chem*. June 23;272(6):pp:14899-14907.

105. Hoffman, A, Levchenko, A Scott and Baltimore D. (2002). The I κ B-NF- κ B signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science* 298: pp:1241-1245