



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNAM  
POSGRADO** 

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**VALORACION DE LOS EFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS  
DEL PENTAPEPTIDO FILM SOBRE LA ACTIVACIÓN  
ENDOTELIAL**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

**QFB. AMBAR LÓPEZ MACAY**

TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA



**México, D. F.**

**NOVIEMBRE 2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# Valoración de los efectos anti-inflamatorios del penta péptido (FILM) sobre la activación endotelial

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Zentella Dehesa en el laboratorio del departamento de Bioquímica “Guillermo Soberón” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán. Una parte de la realización de este trabajo se llevo a cabo bajo la tutela del Dr. Juan Velásquez de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de Zacatecas del IMSS.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa.....INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

INCMNSZ

Dr. Javier Plascencia de la Parra..... FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Dr. Ruy Pérez Monfort.....INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de Jose Luis Ventura Gallegos en los experimentos de ensayo de adhesión y todos los relacionados con mi proyecto.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Ruy Pérez Monfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. José Pedraza chaverri	Facultad de Química
Secretario	Dr. Enrique Ortega Soto	Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
Suplente	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química
Suplente	Dr. José de Jesús García	Facultad de Química

# DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Especialmente a mis padres Aysela y Rafael por absolutamente todo lo que me han dado y apoyado para llegar hasta este punto más de mi vida, muchas gracias.

Para mis amigos de toda la vida y gente que amo y para la gente que he conocido últimamente también muchísimas gracias.

Y gracias a mis compañeros de laboratorio por soportarme

GRACIAS A TODOS POR AYUDARME A SER LO QUE SOY



“Si avanzo, seguidme; si me detengo, empujadme; si retrocedo matadme”.

ÍNDICE

PÁGINA

Agradecimientos

Dedicatoria

RESUMEN

4

Abreviaturas

5

**I.-INTRODUCCION**

**7**

RESPUESTA INFLAMATORIA

7

Tipos de inflamación

8

- Inflamación aguda

8

- Inflamación crónica

9

Migración leucocitaria

9

COMPONENTES CELULARES

10

- Neutrófilos

11

- Monocitos y macrófagos

11

- Eosinófilos

11

- Plaquetas

11

- Linfocitos

11

- Células endoteliales

12

COMPONENTES MOLECULARES

12

- Aminas vasoactivas

12

- Proteasas plasmáticas

13

- Metabolitos del ácido araquidónico

13

- Citocinas

13

ANTI-INFLAMATORIOS

17

Anti-inflamatorios esteroideos

17

Anti-inflamatorios no esteroideos

17

	PÁGINA
NUEVAS ESTRATEGIAS ANTI-INFLAMATORIAS	18
PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA	20
FILM (Factor de inhibición de la locomoción de monocitos)	22
• Antecedentes	22
• Obtención del FILM	23
• Efectos <i>in vitro</i> del FILM	24
• Efectos <i>in vivo</i> del FILM	26
• ¿Cuál es el mecanismo anti-inflamatorio del FILM?	27
ENDOTELIO VASCULAR	28
Biología del endotelio vascular	28
Funciones del endotelio	32
Regulación del tono vascular	32
Óxido nítrico (NO)	33
Vasoconstricción	33
Coagulación y fibrinólisis	34
Angiogénesis	36
LA ACTIVACIÓN DEL ENDOTELIO	37
• Fenotipo activado	38
• La adhesión celular de leucocitos a las células endoteliales	39
• Moléculas de adhesión	41
• Moléculas de adhesión más relevantes en el endotelio	42
• HUVECs como modelo de estudio <i>in vitro</i>	44

	PÁGINA
<b>ANTECEDENTES DEL PROYECTO</b>	<b>45</b>
• Respuesta anti-inflamatoria del FILM in vivo.	45
• Efectos directos del FILM sobre U937 in vitro con y sin PMA	45
<b>II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>46</b>
<b>III.- HIPÓTESIS</b>	<b>46</b>
<b>IV.-OBJETIVO GENERAL</b>	<b>47</b>
Objetivos específicos	47
<b>V.-MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
• Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana	49
• Cultivo de células U937	50
• Ensayo de viabilidad de endotelio	50
• Ensayo de adhesión	51
• Siembra de células HUVEC´s	51
• Cuantificación de la adhesión celular	52
• Ensayo de efecto del FILM sobre el endotelio	52
• Extracción de RNA	52
• Reacción de retrotranscripción y PCR	53
• PCR en tiempo real	54
<b>VI.-RESULTADOS</b>	<b>57</b>
Actividad biológica del film	57
Viabilidad celular de huvec`s	60
Efecto en la expresión génica endotelial del FILM	62
Efecto del FILM sobre la activacion endotelial	66
<b>VIII.- DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
<b>IX.- CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<b>X.-PERSPECTIVAS</b>	<b>82</b>
<b>XI.-BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>83</b>

## RESUMEN

La reacción inflamatoria ocurre como respuesta a procesos infecciosos o traumas siendo dirigida a restablecer la homeostasis del individuo. A pesar de ello, la inflamación excesiva causa daño, como durante el choque séptico en dermatitis atópica o en enfermedades auto-inmunes como la artritis reumatoide, por lo tanto los fármacos que disminuyen o detienen la inflamación son útiles en el tratamiento de esas enfermedades. Las células endoteliales son componentes esenciales en la inflamación, contribuyendo además a la regulación del tono vascular y produciendo óxido nítrico cuando se activa el endotelio por un estímulo externo, este disminuye el flujo sanguíneo permitiendo la adhesión de leucocitos fagocíticos ayudando a su extravasación al sitio de lesión o infección. La activación endotelial se caracteriza no sólo por la expresión de moléculas en su superficie que se adhieren a monocitos (selectina E, ICAM-1 y VCAM-1) sino también por la activación de receptores de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1). Actualmente hay en estudio una gran variedad de productos biológicos con propiedades anti-inflamatorias evaluando su posible uso como fármacos anti-inflamatorios.

La *Entamoeba histolytica* produce un factor que inhibe la locomoción de monocitos por lo que recibió el nombre de factor inhibidor de la locomoción de monocitos FILM (Kretschmer R., 1985). La purificación de este factor indicó que es un pentapéptido y se ha asociado a diferentes efectos anti-inflamatorios, que van desde el abatimiento del estallido respiratorio y la producción de óxido nítrico, tanto en monocitos como en neutrófilos polimorfonucleares hasta la alteración del AMPc y los microtúbulos *in vitro*. Los efectos del FILM *in vivo* incluyen la inhibición de la inflamación tardía previniendo la infiltración de monocitos en ventanas de Rebeck. El FILM también promueve la disminución de la expresión de VLA-4 y VCAM-1 en monocitos y endotelio vascular así como la expresión inducida de quimiocinas MIP1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  y I-309. A pesar de estos estudios, todavía no se ha esclarecido los mecanismos que utiliza el FILM para inhibir la progresión hacia la fase tardía en la inflamación, aunque ya se está tratando de probarlo como posible fármaco. En este trabajo se estudió el posible efecto neutralizante del FILM sobre la activación del endotelio vascular tomando de referencia sus efectos *in vitro* sobre monocitos U937, así como sus efectos *in vivo* sobre endotelio al disminuir VCAM-1, así como su acción sobre las principales vías de activación del endotelio, en particular la activación de NF  $\kappa$ B por TNF. Al finalizar este estudio se encontró un efecto directo del FILM sobre la activación endotelial, al abatir la expresión de moléculas de adhesión como Sele E, VCAM-1 e ICAM-1, aunque no disminuyó la capacidad adhesiva del endotelio activado. Estos datos sugieren que *in vivo* deben existir más factores adicionales al FILM que ayudan a detener el proceso inflamatorio tardío observado *in vivo* y que *in vitro* están ausentes, por lo que concluimos que el FILM presentó un efecto directo parcial sobre la activación endotelial.



## ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AIEs	Anti-inflamatorios esteroideos
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
cDNA	Acido dexosirribonucleico complementario
CE	Célula endotelial
COX	ciclooxigenasa
DNA	Acido dexosirribonucleico
DNCB	2- dinitroclorobenceno
EBV	Virus de Epstein Barr
ELAM-1	Molécula de adhesión de ligando a endotelio
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial-
FILM	Factor inhibitorio de la locomoción de monolitos
FVW	Factor de Von Willebrand
HUVEC's	Células endoteliales de cordón umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IGF-1	Factor de crecimiento 1 relacionado con la insulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
5LPO	5-lipooxigenasa
I309	Quimiocina de mononucleares de unión al receptor CCR8
MAC-1	Molécula de adhesión de macrófagos
MIP1- $\alpha$	Proteína inflamatoria de macrófagos alfa
MIP1- $\beta$	Proteína inflamatoria de macrófagos Beta
NF $\kappa$ B	Factor de transcripción nuclear Kappa de células B

NO	Óxido nítrico
PAF	Factor activador de las plaquetas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-ECFG	Factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas
PDFG	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PECAM-1	Molécula de adhesión endotelio-plaquetaria
RNA	Acido ribonucleico
RNI	Reactantes intermedios de nitrógeno
ROI	Reactantes intermedios de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
SELE	Selectina E
TxA2	Tromboxano A2
TFG-alfa	Factor de crecimiento transformante alfa
TFG-beta	Factor de crecimiento transformante beta
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TNF $\beta$	Factor de Necrosis Tumoral beta
U937	Línea celular monocítica U937
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1
VEFG	Factor de crecimiento vascular endotelial
VIP	Péptido vaso activo intestinal
VLA-4	Antígeno de activación tardía 4

## INTRODUCCION

### RESPUESTA INFLAMATORIA

Cuando se produce una rotura de la piel o de las mucosas, los microorganismos pueden pasar del medio externo al interno. Como reacción y en un intento de localizar al agente invasor, se produce una reacción en el tejido conectivo vascularizado que se denomina inflamación. La respuesta inflamatoria (inflamación) es parte de la inmunidad innata. Este complejo proceso produce el acumulo de fluidos y leucocitos en el espacio extravascular. La inflamación puede ser originada por factores endógenos (necrosis tisular o rotura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos (corte, etc.), físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). Aunque en algunos casos, como la hipersensibilidad, la inflamación puede tener consecuencias nocivas, por lo general es una respuesta protectora que trata de restaurar los tejidos lesionados. Tras un proceso inflamatorio puede ocurrir lo siguiente:

- 1 Resolución con retorno a una estructura y función normales
- 2 Supuración con formación de absceso
- 3 Hinchazón con regeneración de tejido especializado o fibroso formando una cicatriz
- 4 Persistencia del agente causante, haciéndose el proceso crónico

La respuesta inflamatoria está formada por plasma, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares del tejido conectivo. Entre las células circulantes se incluyen los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son los mastocitos, que rodean los vasos sanguíneos y los fibroblastos. La matriz extracelular consiste en proteínas fibrosas estructurales (colágeno, elastina), glicoproteínas adherentes (fibronectina, laminina, entactina, tenascina y otras) y proteoglicanos. La membrana basal es un componente especializado de la matriz extracelular que consiste en glicoproteínas adhesivas y proteoglicanos (Hawiger, 2001).

### TIPOS DE INFLAMACIÓN

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica. La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos. La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo.

#### Inflamación aguda

Los cambios que se producen tras la lesión tisular se deben a tres procesos:

- 1 Cambios en el flujo y calibre vascular, que hacen que aumente el flujo sanguíneo.
- 2 Cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumentan la permeabilidad vascular e inducen la formación de exudado inflamatorio.
- 3 Paso de los leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones.

En los primeros 10-15 minutos se produce una hiperemia (aumento del flujo sanguíneo) por dilatación de arteriolas y vénulas y apertura de los vasos de pequeño calibre. Tras esta fase aumenta la viscosidad de la sangre, lo que reduce la velocidad del flujo sanguíneo. Al disminuir la presión hidrostática en los capilares, la presión osmótica del plasma aumenta, y en consecuencia un líquido rico en proteínas sale de los vasos sanguíneos originando el exudado inflamatorio.

### **Inflamación crónica**

Si la inflamación dura semanas, meses o años se considera crónica, y tiene dos características importantes:

- El infiltrado celular está compuesto sobre todo por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
- La reacción inflamatoria es más productiva que exudativa, es decir, que la formación de tejido fibroso prevalece sobre el exudado de líquidos.

La inflamación crónica puede producirse por diversas causas: a) progresión de una inflamación aguda; b) episodios recurrentes de inflamación aguda y c) inflamación crónica desde el comienzo asociada frecuentemente a infecciones intracelulares (tuberculosis, lepra, etc.). La inflamación crónica se caracteriza por la presencia de macrófagos y sus derivados (células epiteloideas y gigantes), linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos y fibroblastos.

### **Migración leucocitaria**

Inicialmente, en la inflamación aguda se acumulan predominantemente los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares y en las fases tardías, los monocitos y macrófagos. Una vez que los leucocitos entran en contacto con la célula endotelial, proyectan pseudópodos y migran por la superficie hasta que detectan una unión celular inter-endotelial (Figura 1). Durante su paso desde la luz vascular al tejido extravascular, el leucocito rompe las uniones inter-endoteliales y la membrana basal probablemente a través de la secreción de colagenasa.

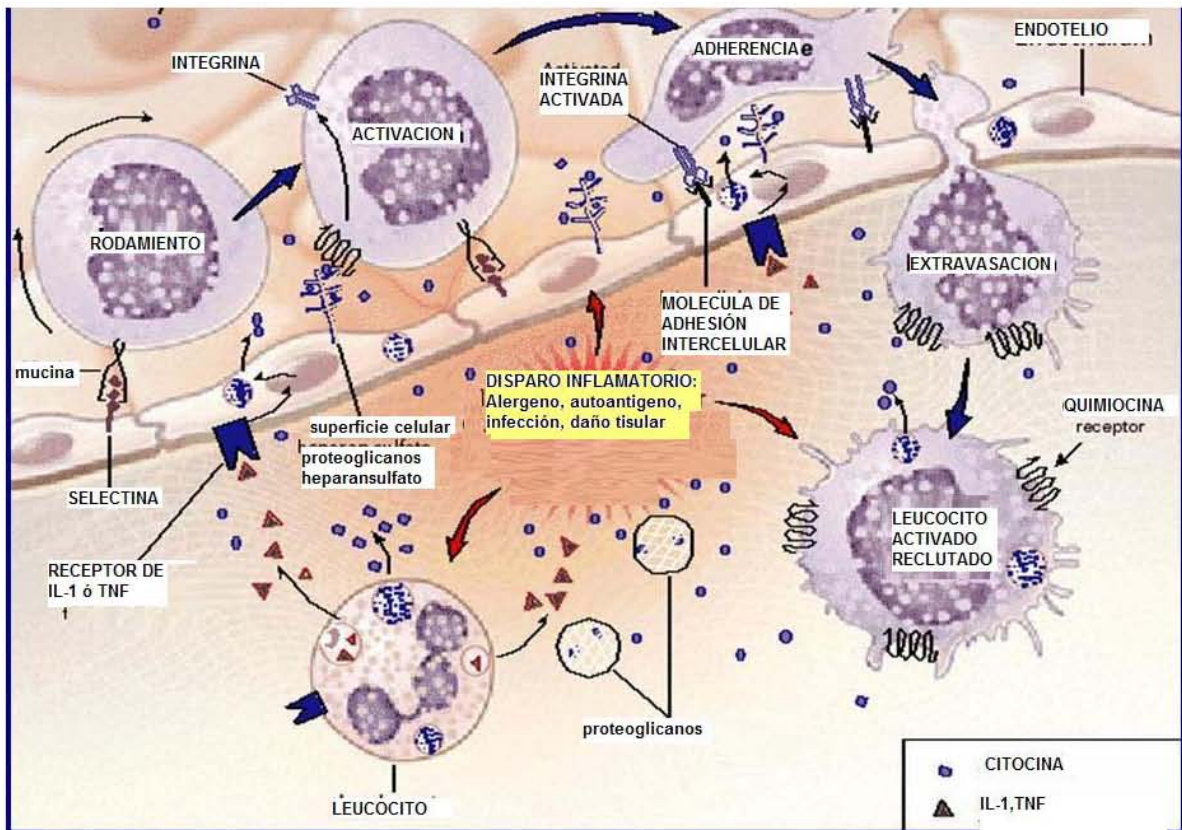


FIGURA.-1 Adhesión firme de leucocitos y polimorfonucleares al endotelio activado. Tomado de (Zohlnhofer *et al.*, 2000).

El tipo de leucocito que migra depende mucho del tiempo que dura la inflamación y del tipo de estímulo. En la mayoría de los casos, en la inflamación aguda los neutrófilos son las células predominantes durante las primeras 24 horas. Estas células empiezan a acumularse en los primeros minutos tras la lesión, mientras que los monocitos y macrófagos se acumulan más tarde, tras 24 horas. Después de la extravasación, los leucocitos migran en los tejidos a los lugares donde se ha producido la lesión mediante el proceso de quimiotaxis (Coleman, 2001).

## COMPONENTES CELULARES

En la inflamación intervienen multitud de células, pero entre ellas destacan los granulocitos neutrófilos y los fagocitos mononucleares.

### NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos responden a mediadores solubles migrando al sitio de daño, ingiriendo y destruyendo patógenos invasores. Los neutrófilos contienen gránulos primarios y secundarios que contienen mediadores inflamatorios, además su vida es muy corta, sólo de 3 a 4 días.

### MONOCITOS Y MACRÓFAGOS

Los macrófagos activados fagocitan y liberan proteínas antibacterianas y mediadores pro inflamatorios, además, complementan la función de los neutrófilos en la fase aguda. Los fagocitos mononucleares se diferencian en prácticamente todos los tejidos del organismo de distinta manera según el tejido que ocupan, dando lugar a macrófagos. Los macrófagos cumplen el papel central durante la inflamación crónica y para llevar a cabo sus funciones, los macrófagos necesitan ser activados por el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Underhill, 2002).

### EOSINÓFILOS

Los eosinófilos son células polimorfonucleares que participan en la respuesta frente a alérgenos respiratorios, gastrointestinales y dermatológicos y frente a parásitos helmínticos (respuesta alérgica).

### PLAQUETAS

Las plaquetas liberan mediadores inflamatorios, activan neutrófilos e interactúan con linfocitos aportando reactivos para la síntesis de las prostaglandinas. Las plaquetas participan en la resolución de inflamación.

### LINFOCITOS

Los Linfocitos B y T cumplen funciones en la inmunidad adquirida, citotóxica e inflamación (Interferones, anticuerpos, Interleucinas, etc.).

### CÉLULAS ENDOTELIALES

Estas células interactúan con neutrófilos en la migración (adherencia), sintetizan y liberan numerosos mediadores inflamatorios, las demás funciones se verán más adelante.

### COMPONENTES MOLECULARES

Las células del sistema inmune producen muchas moléculas químicas que participan en distintos pasos de la inflamación como las proteínas plasmáticas, las cuales incluyen miembros del sistema de complemento, proteínas de fase aguda y otros mediadores de inflamación. Los fagocitos realizan una labor de gran importancia, ya que son los principales productores de las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  y además liberan otras moléculas como: la enzima activadora de plasminógeno y fosfolipasa, radicales de oxígeno, peróxido, factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación, tales como prostaglandinas y leucotrienos (Aosasa *et al.*, 2000).

#### Aminas vasoactivas

Histamina: se encuentra en células cebadas, basófilos y plaquetas almacenada en gránulos que secretan agentes inflamatorios, moléculas del complemento (C3a, C5a), proteínas lisosomales como la IL1 e IL8. La histamina es el gran mediador de la fase aguda, sus efectos son: vasodilatación de arteriolas y vénulas, así como la alteración de la permeabilidad en las vénulas.

Serotonina: es almacenada en las células entero cromo afines, plaquetas y células del sistema nervioso. La liberación de serotonina se produce gracias al factor activador de plaquetas (PAF). Sus acciones son muy semejantes a las de la histamina.



### Proteasas plasmáticas

Sistema del complemento: este puede activarse por la vía clásica o por la vía alternativa liberándose los factores del complemento que tienen como misión principal vaso dilatar la zona de la inflamación y la liberación de sustancias como la histamina o los leucotrienos, así como producir adhesión y quimiotaxis de leucocitos a los que activa, también favorece la fagocitosis.

### Metabolitos del ácido araquidónico

Las moléculas derivadas del ácido araquidónico, también llamadas eicosanoides, representan al grupo más importante de mediadores y moduladores de la respuesta inflamatoria. Estos mediadores lipídicos, son sintetizados a partir de fosfolípidos de membrana, por acción de la enzima fosfolipasa A2. Los estímulos inflamatorios que activan la fosfolipasa A2 son muchos, físicos, químicos, hormonales y neuro hormonales. A partir del ácido araquidónico, por acción de las enzimas ciclooxigenasas (COX) derivan las prostaglandinas; por acción primero de la ciclooxigenasa y después de la tromboxano-sintetasa el tromboxano A2 (TxA2); por acción de la 5-lipooxigenasa (5LPO) los leucotrienos y por acción de la enzima acetiltransferasa el factor activador de las plaquetas PAF(Casale *et al.*, 1993).

### Citocinas

Las citocinas se producen de forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en las respuestas inmunes innatas con un agente extraño. Los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas aunque también pueden ser producidas por linfocitos activados y otras células no pertenecientes al sistema inmune, como células endoteliales y fibroblastos (Spellberg & Edwards, 2001).

**IL-1.** Es producida fundamentalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células dendríticas, endoteliales, NK y otros tipos celulares. Existen dos formas, IL-1alfa e IL-1beta que, aunque solamente tienen un 25 % de homología en su secuencia aminoacídica, comparten el mismo receptor y

ejercen efectos biológicos similares. Parte de sus efectos pro inflamatorios se debe a que induce la liberación de histamina en los mastocitos, generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación. Es el principal pirógeno endógeno, induciendo fiebre a través de la producción de prostaglandinas. También promueve la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y actúa sobre el SNC induciendo sueño y anorexia, típicamente asociados con los procesos infecciosos (Fleisher & Bleesing, 2000).

**IL-6.** Es producida fundamentalmente por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Junto con la IL-1 es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno. Además de su efecto en la inflamación, se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas. También puede aumentar la producción de IL-2 y el desarrollo de los precursores hematopoyéticos dependientes de la IL-3

**IL-10.** Es producida por linfocitos del tipo Th2, así como también por monocitos/macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros varios tipos celulares. Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, entre las que podemos citar IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-12, y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. También tiene efectos anti-proliferativos sobre muchos tipos celulares. La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmuno-moduladoras. Se ha visto que es un cofactor para el crecimiento de líneas y colonias de células mastocíticas in vitro. Regula las funciones mediadas por linfocitos B induciendo la síntesis de IgG, y por linfocitos T, influyendo en el desarrollo de timocitos y células T. También ejerce efectos reguladores sobre la angiogénesis. El virus de Epstein Barr secreta una proteína que posee una gran homología estructural con la IL-10 humana (vIL-10), y que tras unirse con baja afinidad al propio receptor de la IL-10, ejecuta actividades biológicas similares. Relacionadas estructural y

funcionalmente con la IL-10 se han descrito recientemente nuevas moléculas tales como la IL-19, IL-20 e IL-22, cuyas funciones son todavía poco conocidas.

**TNF.** Los factores de necrosis tumoral fueron descritos inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores. Con posterioridad, sin embargo, ganaron protagonismo por las numerosas funciones que ejercen sobre las respuestas inmunes. Se han descrito dos moléculas estrechamente relacionadas, el TNF-alfa y el TNF-beta, con elevada homología en su secuencia aminoacídica. El TNF-alfa es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el LPS, siendo esta citocina el principal responsable del choque séptico asociado a bacteriemias. También puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos. Junto con la IL-1 está implicado en los procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos, elevando la temperatura corporal y produciendo caquexia y sueño al actuar sobre el SNC. Por otra parte, induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos. El TNF-beta o linfoxina, es producido exclusivamente por linfocitos T activados, aunque se une a los mismos receptores que el TNF-alfa e induce funciones similares (Chen *et al.*, 2000).

El factor de transcripción NFκB es el corazón central en el control de la inflamación mediada por citocinas. La rápida inducción de citocinas y moléculas de adhesión por este factor es importante en el proceso inflamatorio mediante la vía de activación dependiente de TNF (Muenchen, Lin *et al.*, 2000). La sobreproducción de TNF se presenta en distintas enfermedades que incluyen choque séptico, aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes, cáncer, etc. (Dobrovolskaia, Medvedev *et al.*, 2003).

El factor de transcripción NF-κB fue inicialmente identificado como un regulador de la expresión de la cadena ligera kappa de linfocitos B murinos. Subsecuentemente se ha encontrado que es un regulador de genes de respuesta temprana involucrados en la interacción célula-célula, comunicación

intercelular, reclutamiento o trasmigración, amplificación de señales patogénicas y en la aceleración de la tumorigénesis (Figura 2) (Shishodia *et al.*, 2003).

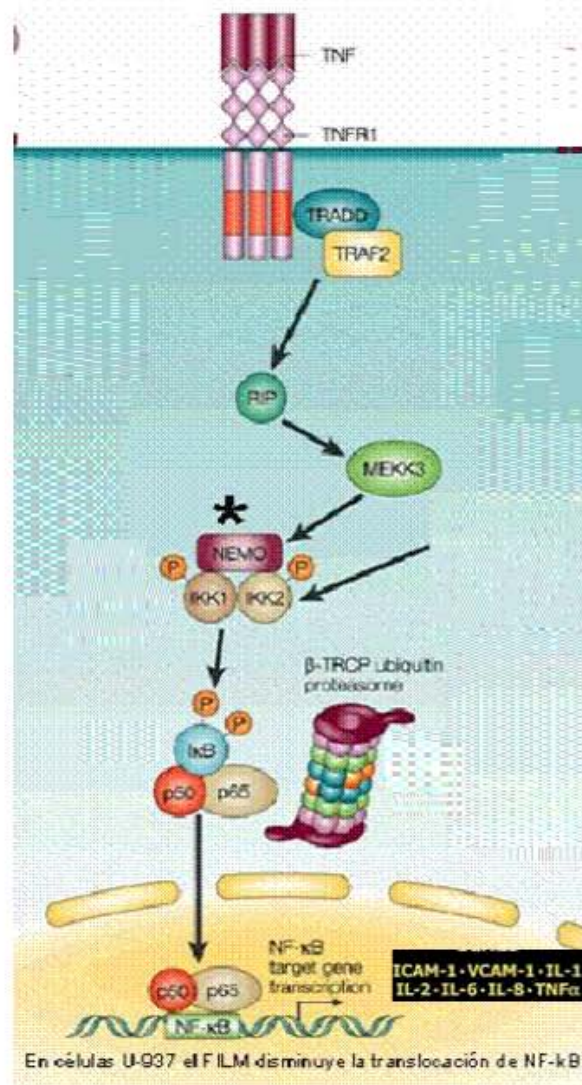


Figura 2.- Vía clásica de activación de NFκB, activación dependiente de receptores de citocinas (TNFα e IL1β). Modificada de Estrada Bernal, 2003.

La expresión de genes de respuesta temprana mediada por miembros de la familia de factores de transcripción NF- κB es inducida por una amplia variedad de señales. Entre estas se incluyen citocinas, mitógenos, partículas ambientales, metales tóxicos, estrés intracelular, productos virales o bacterianos y luz UV.

## ANTI-INFLAMATORIOS

### Anti-inflamatorios esteroideos (AIES)

Los glucocorticoides son esteroides que inhiben diferentes mecanismos del sistema inmune a múltiples niveles. Son potentes anti-inflamatorios e inmunosupresores. Los más empleados son la hidrocortisona, la cortisona, la metilprednisolona (Urbason) y la dexametasona. Sus efectos secundarios son numerosos e importantes, por lo que sólo deben emplearse en cuadros clínicos graves como asma, enfermedades auto inmunes o rechazos en transplantes. Su aplicación tópica evita muchos efectos secundarios, siendo muy utilizados en dermatología, oftalmología y otorrinolaringología (Tanaka *et al.*, 1993)

Entre los medicamentos anti-inflamatorios esteroides, el más conocido es la prednisona. La prednisona y medicamentos similares tienen un potente efecto anti inflamatorio, por eso son tan útiles en enfermedades en las que la inflamación es causa principal no sólo de dolor, sino que puede producir daño a veces irreversible en los órganos o tejidos (Lehman & Onel, 2000). En reumatología hay enfermedades, como el lupus eritematoso sistémico o la dermatomiositis, en las cuales la inflamación es muy importante y por tanto puede en un plazo relativamente corto dañar al organismo. En estos casos se pueden necesitar dosis altas de prednisona. Por otra parte, en algunos pacientes con artritis reumatoide se puede necesitar prednisona para el control de la inflamación de las articulaciones; en estos casos la dosis generalmente es baja (Mok *et al.*, 1999).

### Anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los anti-inflamatorios no esteroideos representan un grupo terapéutico de muy amplia difusión a nivel mundial por sus acciones anti-inflamatoria, antipirética, analgésica y antiagregante plaquetaria. Así, unos 70 millones de prescripciones de estos fármacos se realizan anualmente en EE.UU. y unos 25

millones en España, presentando, además, este consumo tasas interanuales de crecimiento por encima del 5%. Estas cifras, no obstante, sólo nos acercan a la magnitud real del problema al no incluir los envases adquiridos sin receta. Así, entre los diez fármacos más vendidos en España sin receta médica, el ácido acetilsalicílico es el primero de ellos y principio activo de otros tres. El uso "indiscriminado" de estos fármacos lleva consigo un elevado riesgo de aparición de efectos adversos, considerándose los AINEs responsables de hasta el 20-25% de todas las reacciones adversas a fármacos comunicadas con distintos grados de gravedad, esos efectos adversos se pueden presentar en hasta un 60% de los pacientes, siendo dichos efectos y sus consecuencias, los que encarecen el precio real de los fármacos AINEs hasta en un 86%.

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de fármacos químicamente heterogéneo que suelen tener en común una actividad antipirética, analgésica y anti-inflamatoria, así como un perfil cualitativamente similar de efectos adversos. Estos medicamentos son ampliamente utilizados en diferentes situaciones clínicas, de tal forma que, en dosis únicas o pautas cortas, son analgésicos efectivos en el tratamiento del dolor leve-moderado de origen somático (músculo-esquelético), dolor postoperatorio, dolor visceral (dismenorrea, cólico renal) y dolor óseo metastásico. Se usan a dosis anti-inflamatorias mantenidas para el tratamiento sintomático del dolor e inflamación en enfermedades reumáticas (artritis reumatoide, espóndilo artropatías inflamatorias, artrosis, reumatismos de partes blandas y otros procesos).

## NUEVAS ESTRATEGIAS ANTI-INFLAMATORIAS

Actualmente hay disponibles dos fármacos que actúan bloqueando los efectos del factor de necrosis tumoral, que han sido autorizados para su utilización en cuadros de artritis reumatoide que no responden o en los que no se puede utilizar metotrexato, el auténtico «estándar de oro» de la terapia antirreumática. El infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico humano

derivado de ratón que inhibe la actividad funcional de TNF-alfa (factor de necrosis tumoral). El infliximab *in vivo*, forma rápidamente complejos estables con el TNF-alfa humano, un proceso que es paralelo a la pérdida de bioactividad del TNF-alfa. El etanercept por su parte, recientemente registrado en la Unión Europea, también bloquea de manera efectiva al TNF, habiendo mostrado la unión del mismo a los receptores de membrana, impidiendo las respuestas celulares e inactivando biológicamente al TNF (Perretti *et al.*, 2002a; Perretti *et al.*, 2002b). El etanercept también modula las respuestas biológicas que son inducidas o reguladas por el TNF, entre las que cabe incluir a las moléculas de adhesión, otras citocinas séricas y las metaloproteinasas (Shiff & Rigas, 1999).

Existen actualmente algunos agentes anti-inflamatorios como el methotrexato que disminuyen la concentración de IL-1 en los tejidos reumatoideos, el inhibidor de IL-1 más efectivo es un recombinante humano IL-antagonista receptor que se encuentra ahora bajo investigación, ambas formas de IL-1 (IL-1a e IL-1b) pueden activar las células inflamatorias al acoplarse al receptor IL-1 de superficie, por tanto, la regulación de la actividad IL-1 depende en parte, de la producción de una antagonista del receptor de IL-1 que se acopla competitivamente a los IL-1 receptores de superficie con lo que previene que IL-1 medie la función inflamatoria.

La importancia de la adhesión de las moléculas en las reacciones inflamatorias es cada vez más aparente. Estas moléculas desempeñan un papel crítico en la diapédesis y migración de las células inflamatorias. Un inhibidor efectivo de la función de adhesión molecular, por tanto, puede resultar útil en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias.

## PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA

El ácido acetilsalicílico y los anti-inflamatorios esteroides en cierta medida inhiben el sistema NF- $\kappa$ B, pero inducen severos efectos colaterales indeseables, por ello, la búsqueda de factores de intervención más específica y selectiva al nivel de la modulación de la expresión inducida de citocinas pro inflamatorias vía NF- $\kappa$ B es un tema emergente en la terapéutica anti-inflamatoria, esto incluye también productos biológicos como el FILM u otros péptidos (VIP, Péptido T, EBV-LMP1, etc.). En la actualidad, se está trabajando para confirmar estos datos en otros modelos y poder iniciar los estudios toxicológicos, por su parte la proteína M3 es una proteína de origen viral que ha mostrado una actividad neutralizadora frente a un amplio conjunto de moléculas pertenecientes a la familia de las quimiocinas. Existen empresas como Biotherapix que está investigando el uso de derivados de esta molécula para frenar procesos inflamatorios en los que las quimiocinas son un elemento clave (Fukuda et.al., 2000). La proteína M3 muestra ventajas sobre otras moléculas biológicas terapéuticas, como su actividad inhibidora contra múltiples quimiocinas y su baja toxicidad (Grubb *et al.*, 2005).

La creciente comprensión de la compleja red de citocinas pro - y anti - inflamatorias y sus receptores, ha permitido ya intervenciones puntuales en casos de artritis reumatoide refractaria usando anticuerpos monoclonales quiméricos (humano: murino) anti TNF- $\alpha/\beta$ , o mediante complejos solubles de proteína fusionada receptor IG-1 tipo II de TNF- $\alpha$ , con resultados muy alentadores. Una estrategia más reciente pretende intervenir al nivel del coordinador central NF- $\kappa$ B, responsable de la expresión inducible de una amplia gama de citocinas pro-inflamatorias y otras moléculas reactivas. El ácido acetilsalicílico y los esteroides en cierta medida inhiben el sistema NF- $\kappa$ B, pero tienen severos efectos colaterales indeseables. La búsqueda de factores de intervención más fina y selectiva al nivel de la modulación de la expresión inducida de citocinas pro inflamatorias vía NF- $\kappa$ B es un tema emergente en la terapéutica anti-inflamatoria. Productos biológicos que van desde lipoproteínas de alta densidad HDLs (Cockerill *et al.*, 1994), o péptidos endógenos como el



de la MSH Hormona estimulante de melanocitos (Grubb *et al.*, 1996) (Grubb *et al.*, 2005) se prueban actualmente en sistemas endoteliales *in vitro* e *in vivo* así como exógenos con propiedades anti-inflamatorias como los que mimetizan a la selectina E de fagos (Fukuda *et al.*, 2004).

La capacidad anti-inflamatoria de los péptidos reguladores endógenos, como el péptido vasoactivo intestinal (VIP) o la somatostatina, puede abrir una vía terapéutica para el tratamiento de alteraciones inflamatorias agudas y crónicas, que a menudo desencadenan una respuesta autoinmune. El VIP ya ha demostrado en modelos animales que puede ser efectivo en algunas patologías del sistema nervioso central o en artritis reumatoide; ahora se está analizando el potencial de la adrenomedulina (AM) y la urocortina (UCN), dos péptidos reguladores naturales que, debido a su perfil de síntesis, expresión de receptores y modo de acción, se perfilan como candidatos muy atractivos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias-autoinmunes.

## FILM (FACTOR DE INHIBICIÓN DE LA LOCOMOCIÓN DE MONOCITOS)

## ANTECEDENTES

La *Entamoeba histolytica*, es un protozooario extracelular intestinal que causa globalmente 50 millones de casos de enfermedad y aproximadamente 100,000 muertes al año, destacando la población de nuestro país como una de las principales afectadas. El estudio de la infección del parásito indica diversos factores de virulencia como la acción de proteinasas de cisteinas que degradan la matriz extracelular del tejido del huésped, la acción de lectinas en los trofozoitos permite la adherencia las células blanco y la muerte por apoptosis inducida por *E. histolytica* sobre las células del hospedero (Gilchrist & Petri, 1999). Si la *E. histolytica* invade más allá del intestino (habitat natural) y llega al hígado, suscita una reacción inflamatoria inusual donde inicialmente la invasión se acompaña de una intensa inflamación aguda, pero ésta cede el paso a un proceso predominantemente necrótico, y en los estadíos más avanzados la inflamación es sorprendentemente escasa (dato obtenido de autopsias, pero también de estudios experimentales) de hecho, el líquido de la cavidad del hígado invadido no es purulento, sino necrótico, lo que pone en entredicho lo apropiado del término absceso hepático amibiano, término empleado en el lenguaje médico. Esta ausencia de inflamación tardía es ciertamente inédita en las relaciones entre hospederos y parásitos extracelulares y llamó ya la atención de Councilman y Lafleur en su descripción clásica de las lesiones amibianas en 1891. La observación fue repetidamente confirmada, y fue Pérez-Tamayo en México, quién en el marco de un conocimiento ya más avanzado del proceso inflamatorio, propuso como posible causa de la pobreza inflamatoria en las lesiones amibianas tardías, una perturbación local de la quimiotaxis de los leucocitos hacia el foco infeccioso, causada por productos del microorganismo (Perez-Tamayo *et al.*, 1986). El carácter local de esta perturbación lo sugería el hecho de que la capacidad inflamatoria sistémica de estos pacientes, antes y después del evento amibiano y de hecho durante el mismo (aunque lejos del hígado) era normal. Otros estudios señalarían además que al sanar el paciente, como consecuencia afortunada de esta escasez inflamatoria tardía, ocurre la restitución perfecta del órgano afectado (hígado,

piel) por regeneración sin cicatrización (*restitutio ad integrum*). Este parásito (protozooario extracelular) evade las defensas inflamatorias del hospedero cancelando la fase tardía o avanzada de la motivó la búsqueda de posibles factores anti-inflamatorios producidos por el parásito como causa del inusitado fenómeno. En 1985 se identificó en el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica* de diversos grados de virulencia, un factor termoestable, de peso molecular bajo (<750 Da), capaz de inhibir *in vitro* la locomoción aleatoria, quimocinética y quimiotáctica inducida con quimioatrayentes como el zimosan de los fagocitos mononucleares de la sangre periférica humana (monocitos fagocíticos: macrófagos), pero no la de los polimorfonucleares neutrófilos (Kretschmer *et al.*, 1985).

#### Obtención del FILM

Fue hasta el año 2001 al realizar varias técnicas en orden secuencial: centrifugación, ultra filtración, cromatografía (Sephadex-G15 y HPLC-18), espectrometría de masas en tandem (MALDI-MS, TS-Quadrapole Liquid Chromatography (TS-Q-LC-MS) y verificación por el método de secuenciación N-terminal de Edman, se logró conocer la estructura química primaria del factor (Kretschmer *et al.*, 2001). Se trata de un pentapéptido con la secuencia Met-Gln-Cys-Asn-Ser PM = 581 Da; con los polos amino y carboxi-terminales del par de cadenas en posición paralela. No obstante no se ha aclarado, la actividad anti-inflamatoria comparada de las formas monoméricas y diméricas del FILM, pero un péptido sintético 96% puro del mismo mostró poseer, a dosis equimoleculares (formas monoméricas y dimericas), las mismas propiedades anti-inflamatorias que el material nativo. Se aclaró también, mediante cultivos con aminoácidos marcados radiactivamente, que la *E. histolytica* sintetizaba de novo este péptido(Kretschmer *et al.*, 2001), mientras que la *E. dispar*, su símil no patógeno no lo hacía. Se postula que el FILM parte de un péptido mayor o una proteína, desde donde se desprende por acción de proteasas puntuales. A la fecha en el genoma de *E. histolytica* (The Sanger Institute) existen reportadas dos secuencias que codifican al péptido FILM. Se desconoce todavía la naturaleza de la proteína pariente de la que proviene el FILM tampoco se sabe con certeza si en la invasión tisular el parásito utiliza este

recurso anti-inflamatorio o si lo sintetiza *in vivo*, pero ello no resulta improbable.

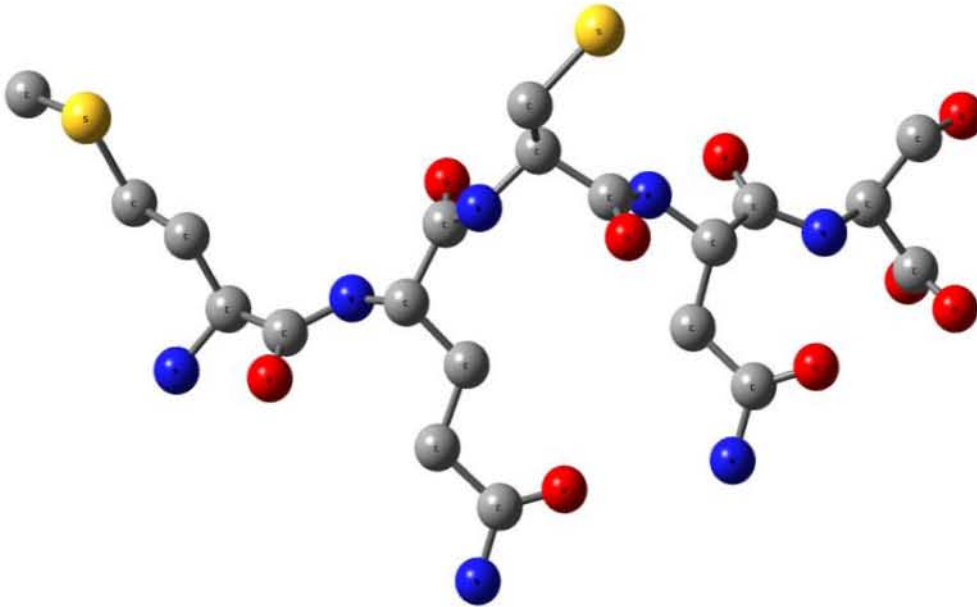


FIGURA 3.- Modelo molecular del péptido FILM. Tomada de Krestchmer et.al., 2001.

### EFFECTOS *in vitro* DEL FILM

Se descubrió mas adelante que el FILM, también era capaz de afectar la capacidad oxidativa de los leucocitos, al abatir el estallido respiratorio, la generación de reactantes intermedios de oxígeno (ROI), y la producción de oxido nítrico (NO) desde la arginina (i.e. generación de reactantes intermedios de nitrógeno (RNI), pero ahora tanto en monocitos como en neutrofilos polimorfo nucleares (Krestchmer et.al., 2001). El FILM no afecta curiosamente ninguna de las funciones antes mencionadas en los PMN eosinófilos (Krestchmer *et al.*, 1991). Además, el FILM ejercía sus efectos sobre los monocitos y sobre los neutrofilos polimorfo nucleares sin afectar la viabilidad celular. Estudios subsecuentes fueron agregando diversos detalles funcionales como el estar relacionado el péptido a un receptor para manosa, efecto sobre

los niveles de AMPc y el GMPc, alteraciones en la estructura de los microtúbulos, etc. (Kretschmer *et al.*, 1991; Kretschmer *et al.*, 2000; Kretschmer *et al.*, 2001). El FILM tiene efectos sobre la producción de óxido nítrico cuando es inducido y además inhibe a quimiocinas pro-inflamatorias como MIP 1 $\beta$ , MIP 1 $\alpha$ , I-309 que atraen a monocitos fagocíticos y del receptor de quimiocinas CCR1 esto en una línea monocítica U937 (Rico *et al.*, 2000; Rico *et al.*, 2003). Igualmente, el pentapéptido inhibe la síntesis de la proteína acopladora MyD88 y altera su translocación membranal. Las citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6 (involucradas en esta vía de señalización) aparentemente se abaten en tanto que se incrementa la síntesis de IL-10, la citocina anti-inflamatoria por excelencia.

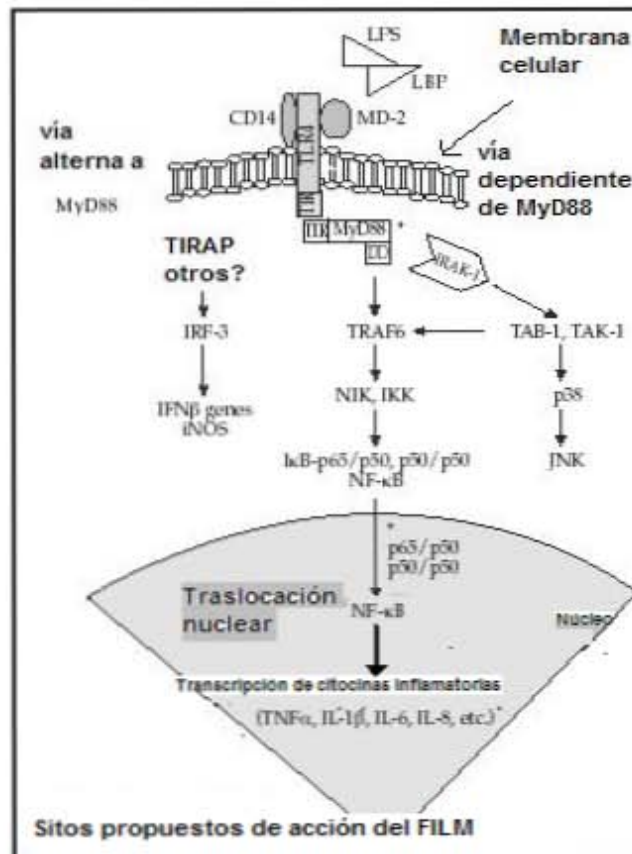


FIGURA.- 4.- Propuesta de sitios de acción del FILM a través de la vía de NFκB. (Rico et.al., 2003)

EFECTOS *IN VIVO* DEL FILM

Los primeros intentos de ensayos *in vivo* del FILM fueron alentadores. Por una parte, su aplicación en ensayos de hipersensibilidad en la piel de voluntarios humanos retrasaba claramente el arribo de macrófagos a las fases tardías del foco inflamatorio, y por otra, que tanto el FILM nativo como el sintético inhibían macro y microscópicamente la reacción de hipersensibilidad retardada cutánea al DNCB (1-cloro-2-4 dinitrobenceno), un excelente modelo de inflamación tardía en cobayos y gerbos (Kretschmer *et al.*, 2000) por lo que mediante estos estudios se logró además la primera aproximación cuantitativa de la dosis: respuesta del FILM. Posteriormente se encontró que versiones del péptido aleatoriamente desordenadas (scramble: Gln-Cys-Met-Ser-Asn) de los mismos aminoácidos que constituyen el FILM no lograban tal inhibición.

Los estudios recientes señalan que el FILM es además capaz de inducir una sobre-expresión de IL-10 en la línea celular U937 y aparentemente interferir con la translocación citoplásmico-nuclear de la señal central NF-kB (Utrera-Barillas *et al.*, 2003), el cual es la parte central de la inmunidad innata, y la ruta reguladora de citocinas pro-inflamatorias, adhesinas, moléculas oxidantes, reactantes de fase aguda, etc., en todos los organismos que la poseen, desde los vertebrados, pero evolutivamente tan antiguos como los insectos, donde el sistema se denomina Dorsal-Dif-Relish y opera con la misma lógica molecular que el NF-kB. Finalmente otros estudios no pudieron demostrar ni hipersensibilidad inmediata ni retardada (pruebas cutáneas al FILM) así como anticuerpos anti FILM clase IgG en gerbos inyectados intramuscularmente repetidamente con FILM adyuvantizado (FILM tetramerizado). Por ahora sólo se ha podido demostrar una débil inmunidad celular *in vitro* transformación blastoide al FILM (Kretschmer *et al.*, 2001), sin embargo, estos animales resistieron sin lesión hepática una segunda inyección de trofozoitos de *E.histolytica*, como si se hubiera logrado una cancelación de la acción anti-inflamatorio de la *E.histolytica* (Gimenez-Scherer *et al.*, 2004).

¿Cuál es el mecanismo anti-inflamatorio del FILM?

Los datos inmunobiológicos que involucran al FILM con varias estirpes celulares (FM, PMNn, células endoteliales, etc.) afectando fenómenos tan diversos, aunque interrelacionados, como la adherencia leuco-endotelial y diapédesis, la locomoción celular y la generación de radicales de oxígeno y nitrógeno (ROI, RNI), motivaron a estudiar el efecto del FILM sobre el complejo, redundante y promiscuo sistema auto y parácrino de señales pro y anti-inflamatorias que se generan endógenamente y con intención homeostática a través de un número creciente de citocinas (Key *et al.*, 1990). En ocasiones esta red polariza dando lugar a cuadros clínicamente identificables de excesos o déficit del fenómeno inflamatorio. En este sentido, resulta interesante recordar que inhibiendo con cicloheximida la síntesis de proteína en la célula expuesta a FILM (y a un quimioattractante, zimósán), se canceló también el efecto inhibitorio del FILM. Esta singular observación hizo pensar que el efecto anti-inflamatorio del FILM podría incluir, o mayoritariamente depender de la inducción y sobre-expresión de alguna citocina anti-inflamatoria como IL-10. Además, el FILM perturba la pareja adhesina-ligando VLA-4, VCAM-1, esencial para la marginación y diapédesis de macrófagos en la venula post-capilar (Rico *et al.*, 1992; Rico & Kretschmer, 1997).

### ENDOTELIO VASCULAR

La formación del endotelio se inicia temprano en la embriogénesis y es el responsable de la circulación del torrente sanguíneo, la fluidez de la sangre, el tono vascular y de mecanismos de defensa del organismo tan importantes como el fenómeno inflamatorio y la respuesta inmune. El endotelio, por su localización estratégica, separa el medio exterior agresivo del intersticio tisular, cumpliendo una función de defensa del huésped a nivel del tegumento mucocutáneo, el pulmón, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular. Anteriormente se le consideraba como un recubrimiento inerte de los vasos sanguíneos.

En las últimas décadas ha sido importante descubrir funciones cruciales del endotelio vascular es capaz de sintetizar, almacenar y liberar moléculas especiales que inciden en el funcionamiento normal de órganos diferentes. El endotelio cumple una función de “esponja” al almacenar moléculas producidas por él mismo y sustancias no endoteliales.

### BIOLOGÍA DEL ENDOTELIO VASCULAR

El manto endotelial provee una superficie activa para el intercambio gaseoso, acuoso y macromolecular y para el tráfico celular (Ryan & Ryan, 1984). El endotelio tiene una organización única, sirviendo de portero entre el medio exterior, que puede ser agresivo y el medio interior que debe ser protegido. El endotelio constituye una capa unicelular continua que sirve de interfase estructural y funcionalmente entre el torrente circulatorio y la pared vascular. Por su localización especial, capta señales químicas, físicas e inmunológicas y de acuerdo con éstas cumple funciones específicas en salud y enfermedad (Badimon & Martinez-Gonzalez, 2002).



Las señales son reconocidas por el endotelio y traducidas en mensajes intracelulares, dando como resultado la activación de genes que llevan a la síntesis de autacoides que actúan sobre la pared vascular y la población celular intravascular. El endotelio comanda los procesos de anti-trombogenicidad, vasoconstricción y vasodilatación, éxodo de la población blanca intravascular y angiogénesis. Es el responsable de la aterosclerosis y de la hipertensión arterial al regular la composición de la matriz extracelular, la acumulación lipídica y el comportamiento de la célula muscular lisa de la pared vascular. El endotelio es un órgano, ubicuo, de espesor mínimo (unicelular), invisible, intocable, antiadhesivo, tromborresistente, con características anticoagulantes y fibrinolíticas y comportamiento multifuncional, bifásico, paraneuronal y circadiano.

El endotelio *ex vivo* tiene una morfología irregular; *in vivo* se aprecia aplanado como consecuencia de la hemorreología; en cultivo se le ha comparado con el aspecto de un empedrado; en hipertensión su morfología cambia, la célula hace hernia hacia la luz del vaso sanguíneo. El endotelio constituye una interfase unicelular, dinámicamente mutable y bioquímicamente activa, entre el torrente circulatorio y la intimidad de los tejidos y de los órganos de la economía animal, cumpliendo función de “portero”. El endotelio es un órgano de espesor unicelular, pero sorprendentemente multifuncional y de gran plasticidad (Carman *et al.*, 2003).

La célula endotelial reposa sobre una membrana basal sintetizada por ella misma, en directo contacto con una estructura delgada: la íntima, de linaje hematopoyético, cuya población mesenquimal indiferenciada se aprecia inmersa en una matriz extracelular. Esta población mesenquimal indiferenciada debe ser considerada como predeterminada, competente, pluripotente, capaz de diferenciarse en células endoteliales, macrófago de: íntima, linfocito, dendrocito, mastocito, fibroblasto, célula muscular lisa de la íntima y aún osteoblasto (Figura 5). La matriz extracelular subendotelial es una superficie trombogénica que favorece la adhesión plaquetaria y la activación del sistema de la coagulación. La íntima separa el recubrimiento endotelial de la media, teniendo como límite externo la túnica o lámina elástica interna, representada

por una pared agujereada de tejido elástico que por su aspecto morfológico se ha comparado con la “red del pescador” (Figuras 5 y 6).

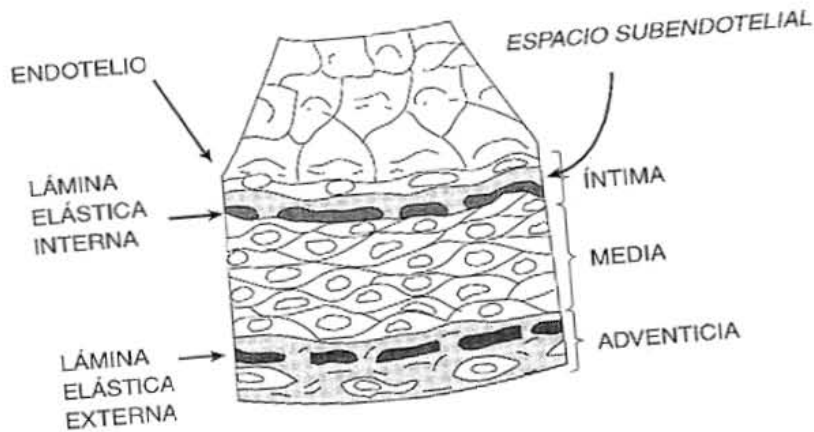


FIGURA 5.- Relación topográfica entre endotelio y subendotelio. La íntima arterial está constituida por la capa endotelial en contacto con el torrente circulatorio, la membrana basal que sirve de apoyo a esta capa y por el subendotelio. Figura tomada de (Millan *et al.*, 2006).

El endotelio, localizado estratégicamente, capta toda clase de estímulos intravasculares y los transmite a la íntima y a la media. La fuerza hemodinámica de un estrés por fricción (shear stress) mínimo de 10 dinas/cm<sup>2</sup> es captada por el recubrimiento endotelial, orquestando el comportamiento y la regulación genética del endotelio y de la población celular de la íntima con la respectiva activación transcripcional y traduccional. Las arterias y venas se caracterizan por poseer tres capas o tunicas: íntima, media y adventicia, claramente distinguibles en los vasos de mayor calibre. La íntima de los vasos de gran calibre como son la aorta y sus grandes ramas, está revestida por las células endoteliales y por el tejido conjuntivo sub-endotelial subyacente, éste último constituido por colágeno, proteoglicanos, elastina y otras glicoproteínas de la matriz intracelular (Figura 6).

Las células endoteliales son esenciales en la vascularización y cubren cerca de 1000 m<sup>2</sup> en promedio en humanos adultos. El endotelio, componente principal de la pared arterial, reviste arterias y venas formando la interfase antitrombótica entre la sangre y los tejidos subendoteliales potencialmente trombogénicos. Es por eso, que la integridad del endotelio es un requerimiento fundamental para considerar la estructura y función normales de la pared vascular.

Las células endoteliales se unen a través de receptores de superficie, a un número de proteínas en la matriz interna incluyendo pero no limitada, a fibronectina, vitronectina las colágenas, laminina y Factor de Von Willebrand. Estas interacciones tienen una importancia particular en la cicatrización, la respiración vascular (Oppliger *et al.*, 2003) y la angiogenesis. Las células endoteliales a la vez expresan sobre su superficie a distintas  $\beta_1$  integrinas, la integrina  $\alpha\beta_3$  y receptores de vitronectina. Estos últimos son importantes en la adhesión de células endoteliales, la extensión y formación de contacto focal sobre una variedad de proteínas de la matriz que parecen ser importantes componentes de la metástasis y la angiogénesis (Gibbs *et al.*, 2002).



FIGURA 6.- Las paredes arteriales están compuestas de cilindros concéntricos dispuestos uno dentro de otro para formar sus tres capas. Figura de (Gibbs *et al.*, 2002).

El estudio del órgano endotelial ha llevado a lo que hoy se conoce con el

nombre de medicina vascular y se hace referencia a enfermedades vasculares, desórdenes vasculares, biología vascular y enfermedades angiogénicas. En igual forma, se ha concluido que el endotelio funciona sincrónicamente con la pared vascular y la adventicia y por eso se habla del órgano endotelial. Éste conforma trece barreras que coordinan todo el funcionamiento del organismo humano y por esta razón se considera que el endotelio es la vida y la muerte del organismo animal.

### **FUNCIONES DEL ENDOTELIO**

Hace tan solo unas décadas se pensaba que el endotelio vascular era inerte, sin embargo, actualmente los investigadores han demostrado que las células endoteliales intervienen activamente en los fenómenos de coagulación, regulación del tono vascular, inflamación, neo-vascularización en algunos estados patológicos como los tumores o la retinopatía diabética, y posiblemente en la presentación antigénica. Así mismo, el endotelio vascular es determinante en la patogénesis de ciertas entidades reumáticas como la esclerosis sistémica progresiva, tanto la forma difusa como la variante localizada.

#### **Regulación del tono vascular**

La regulación del tono vascular ocurre a través de sustancias vasoactivas como el óxido nítrico, y factor polarizante derivado del endotelio (Stoclet *et al.*, 1996); de su equilibrio se permite mantener la presión arterial y el tono vascular dentro de los límites normales, así como definir el comportamiento de las citocinas y las selectinas que son moléculas de adhesión. Por otra parte sintetizan también compuestos vasoconstrictores como endotelina 1, tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandina F<sub>2</sub> alfa y anión superóxido. De allí su importancia en la patogenia de la aterosclerosis, la hipertensión arterial y los trastornos hemodinámicos de la sepsis. Esta función determina aspectos como la reacción de los vasos sanguíneos ante las variaciones del flujo y el control de la resistencia vascular, por lo que es uno de los contribuyentes principales en el mantenimiento de la tensión arterial. Hablaremos un poco mas de esta

función endotelial cuando se menciona el endotelio activado (Stankova *et al.*, 1995).

### ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico un mediador inflamatorio gaseoso, es producido por células endoteliales, macrófagos y algunas neuronas. Es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, por la enzima Oxido nítrico sintasa (NOS). En condiciones fisiológicas, el NO tiene muchos efectos, y al ser de vida media muy corta (segundos), estos efectos dependen de donde es sintetizado (Smith *et al.*, 1998) (Soszynski, 2004). El óxido nítrico producido por los macrófagos actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Puede oxidar los grupos sulfhidrilos de las proteínas y llevar al agotamiento del glutatión citosólico y puede reaccionar con el anión súper óxido para formar dióxido de nitrógeno, el cual resulta ser fuertemente oxidante, y un radical hidroxilo, muy reactivo ( $\text{NO} + \text{O}_2\text{NO}_2 + \text{OH}$ ). El óxido nítrico, al inhibir la adhesión plaquetaria al endotelio vascular dañado, contribuye a evitar el intento más válido para provocar la trombosis arterial, y a su vez, el paso inicial que conlleva a la activación, y con ello a la agregación o liberación plaquetaria (Mateo *et al.*, 2006).

### VASOCONSTRICCIÓN

Las endotelinas son polipéptidos de 21 aminoácidos sintetizadas en el endotelio a partir de un precursor conocido como preproendotelina. Aunque existen tres variedades diferentes, solo la endotelina-1 es producida por la íntima vascular, bajo el influjo de diferentes factores, como la angiotensina II, catecolaminas, lipoproteínas e insulina, y de fenómenos como la hipoxia e isquemia tisular. De igual manera, factores como prostaglandinas o la hormona natriurética auricular tienden a inhibir su producción. Se han descrito dos receptores (tipo A y B) que son responsables de la acción biológica de la endotelina, sin embargo, el receptor tipo A, localizado en los miocitos de la pared vascular y las fibras del miocardio, es el que tiene mayor importancia. La síntesis de estos receptores se incrementa por acción del AMPc, factor de crecimiento epidérmico y estrógenos y se inhibe cuando se expone a la endotelina-1, angiotensina II y al factor de crecimiento derivado de las

plaquetas. La activación de estos receptores induce fenómenos de vasoconstricción mediados por fosfolipasa C, enzima que degrada los lípidos de membrana generando diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3); este a su vez incrementa la concentración citosólica de calcio, favoreciendo la contracción del músculo liso; además el calcio y el diacilglicerol poseen acciones mitógenicas, por lo cual la liberación sostenida de endotelina-1, es capaz de producir hiperplasia de la capa media de los vasos sanguíneos ocasionando vasoconstricción (Mateo *et al.*, 2006).

### **COAGULACIÓN Y FIBRINÓLISIS**

Durante muchos años la incapacidad del endotelio de activar la cascada de coagulación y fomentar la adhesión de plaquetas se consideró una función pasiva, relacionada con ciertas carencias más que como resultado de su participación activa en la hemostasia. Esta idea cambió al descubrirse que las CE producían prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), un extraordinario inhibidor de la agregación plaquetaria. Posteriormente, se descubrió que el NO actúa sinérgicamente con la prostaciclina como antiagregante plaquetario. De hecho, el NO inhibe la adhesión, la activación, la secreción y la agregación plaquetaria. El endotelio ejerce un papel central en la regulación de la hemostasia ya que aporta importantes elementos de los sistemas de coagulación, trombosis y fibrinólisis del organismo. Además de NO y PGI<sub>2</sub>, las CE producen trombomodulina, moléculas con actividad heparina-like y ADPasa, que hidroliza el ADP funcionando como agregante plaquetario. Como agentes protrombóticos secreta PAF, moléculas de adhesión para las plaquetas (como vWF, fibronectina y trombospondina) y factores de coagulación como el factor V, en respuesta a distintos factores fisiopatológicos expresa factor tisular. El endotelio también regula la fibrinólisis, y que produce al activador tisular del plasminógeno (t-PA), urocinasa y el inhibidor-1 de la t-PA. La biosíntesis de estas moléculas es alterada por los lípidos plasmáticos, particularmente por las VLDL, que ejercen su acción a través de un elemento de respuesta a VLDL presente en el promotor del gen que codifica para el PAI-139. Este efecto de las VLDL se incrementa si éstas proceden de individuos con hipertrigliceridemia.

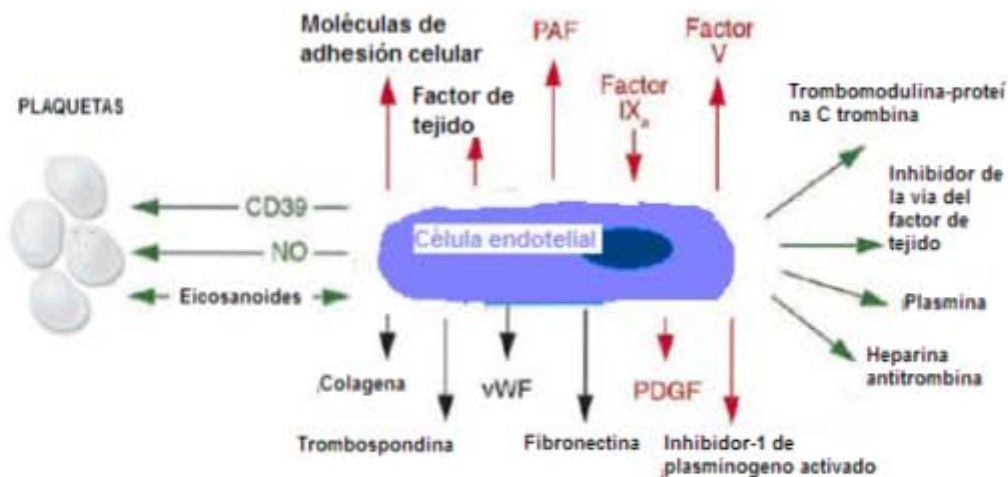


FIGURA 7.- Factores participantes en la coagulación y fibrinólisis liberados por las células endoteliales. Modificado de (Nachman & Jaffe, 2004).

La susceptibilidad individual a la alteración de esta función endotelial por la hipertrigliceridemia parece ligada a la presencia de ciertas variantes polimórficas en el gen del PA-1, como el polimorfismo Hindi que se ha asociado con diferencias en la actividad y la capacidad de las VLDL de modular la producción de PAI-140. Algunos estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre los valores elevados de colesterol en plasma y tiempo prolongado de euglobina, lo que sugiere una alteración del equilibrio entre la liberación de activadores del plasminógeno y sus inhibidores por el endotelio (Nachman & Jaffe, 2004). El efecto de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa sobre el equilibrio t- PA/PAI-142,43 podría contribuir a los efectos vasculares directos que se han atribuido a estos fármacos. Finalmente, los resultados de diferentes estudios epidemiológicos en relación con el posible efecto de los lípidos sobre la producción y la secreción del vWF son contradictorios (Beacham *et al.*, 1992).

Balance hemostático / trombótico del endotelio	
FACTORES	
PROTROMBOGENICOS	ANTITROMBOGENICOS
PAF (Factor activador de plaqueta)	tPA (Activador de plasminógeno tisular)
WF (Factor de von Willebrand)	ECTO-ADPase
TF (Factor tisular)	Moléculas tipo heparina
PAI-1 (Inhibidor-1 del activador del plasminógeno)	PGI <sub>2</sub> (Prostaciclina)
Otros factores de coagulación	TM (Trombomodulina)
	UK (Uroquinasa)

Tabla 1.- Factores moleculares en el balance homeostático trombotico endotelial. Tomada de Badimon, 2006

## ANGIOGÉNESIS

Las células endoteliales producen un grupo de factores de crecimiento que son mitógenos para el endotelio y pueden inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis. Este estímulo angiogénico dentro de los varios efectos que tiene, produce alargamiento y proliferación de las células endoteliales así como la reparación de nuevos vasos sanguíneos (Bicknell *et al.*, 1996).

Durante la embriogénesis, el desarrollo de nuevos vasos por medio de la diferenciación de las células endoteliales se denomina vasculogénesis, y el proceso morfogénico mediante el cual se forman nuevos microvasos por ramificación de los preexistentes se denomina angiogénesis, y ocurre durante toda la vida. En el cerebro, la angiogénesis se presenta en respuesta a una variedad de daños, tales como eventos isquémicos e infarto, infección, tumores y trauma. Esta respuesta estrictamente regulada contrasta con la angiogénesis incontrolada y persistente que sucede durante el crecimiento tumoral.



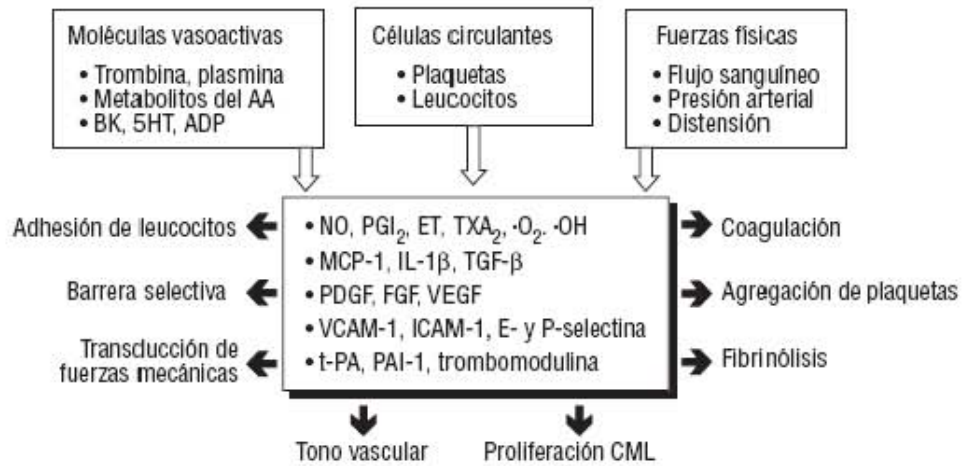
En el sistema nervioso central la angiogénesis comprende los siguientes pasos:

1. Disolución de la continuidad vascular preexistente y migración de las células endoteliales.
2. Organización estructural de los microvasos, incluyendo la formación de uniones interendoteliales estrechas.

Esta cascada es regulada por una variedad de biomoléculas angiogénicas positivas y negativas. Los estímulos angiogénicos convierten a las células endoteliales en un fenotipo proliferativo y migratorio que expresa factores de crecimiento, proteasas e inhibidores de proteasas, moléculas de adhesión y receptores. Para iniciar el proceso de migración de las células endoteliales, se requieren enzimas proteolíticas que rompan la continuidad de la lámina basal. La uroquinasa, el activador tisular del plasminógeno y una variedad de metaloproteinasas que incluyen gelatinasa y colagenasa tipo IV, pueden romper la matriz proteica de la membrana basal a través de la activación de receptores específicos.

### **LA ACTIVACIÓN DEL ENDOTELIO**

La adquisición del fenotipo activado es en muchos aspectos, similar a la diferenciación de las células hematopoyéticas, con la diferencia de que este último evento es unidireccional; esto es, las células se comprometen a un cierto linaje y no puede revertir el fenotipo. En cambio, si bien el fenotipo constitutivo de las células endoteliales puede pasar a un estado activado, después de 12 a 24 h las células endoteliales regresan al fenotipo constitutivo.



**Fig. 8.** Factores derivados del endotelio. Moléculas secretadas por el endotelio en respuesta a estímulos (células circulantes, sustancias vasoactivas, fuerzas físicas) y funciones vasculares reguladas por el endotelio. Tomado de (Muller, 2002).

### El fenotipo activado

La habilidad de diferentes tipos celulares para trans-diferenciarse muestra la capacidad para adaptarse a los requerimientos locales y así ampliar el rango de funciones metabólicas y fisiológicas que pueden realizar. La activación endotelial está asociada a distintos cambios fenotípicos que, de una manera semejante al proceso de transdiferenciación del fenotipo constitutivo, sirve para que la célula se adapte localmente a los requerimientos funcionales que se necesitan durante condiciones como daño tisular, la presencia local de agentes infecciosos o cambios en las condiciones de perfusión. Normalmente, se considera que las células endoteliales están activadas cuando están proliferando o cuando permiten la adhesión de células sanguíneas.

El fenómeno de activación se lleva a cabo principalmente en la microvasculatura (precapilares, capilares y venas postcapilares) e involucra la expresión de genes de "activación" en células endoteliales de diferentes tejidos y órganos, que por sí son heterogéneas en su morfología, fisiología y función. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados in vitro para analizar la activación endotelial se han efectuado con células endoteliales primarias derivadas de grandes vasos como la aorta de bovino o la vena umbilical de humanos. Los 'genes de activación' se expresan sin afectar a los genes de

diferenciación que distinguen a las células endoteliales maduras de sus precursores (Maeda *et al.*, 2002). Sin embargo, una clara diferencia entre los genes que se expresan en el estado activado y aquellos que definen el estado diferenciado de las células endoteliales radica en que la expresión de los primeros es un fenómeno transitorio en donde la magnitud y la duración de su expresión es dependiente de señales microambientales, como puede ser la presencia de citocinas pro inflamatorias. En algunos casos patológicos, como la formación de placas ateroscleróticas, la constante presencia de señales pro-inflamatorias transforma una respuesta endotelial transitoria en permanente.

Si bien son muchos los elementos de regulación transcripcional que participan en la transición del estado endotelial quiescente al estado activado, se ha reconocido que uno de los encargados centrales de encender los genes que caracterizan al estado activado es el factor nuclear NF- $\kappa$ B del cual depende la expresión de diversas moléculas de adhesión, citocinas y algunos factores de crecimiento (Agustin *et al.*, 1994).

En años recientes, el fenotipo de activación endotelial inducido por citocinas durante la inflamación, ha sido caracterizado extensamente tanto *in vivo* como *in vitro*. Uno de los primeros pasos en la cascada inflamatoria es la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E (CD62E), selectina-P (CD62P), VCAM-1 (CD58) e ICAM-1. La expresión de estas moléculas es dependiente de citocinas pro inflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-1  $\beta$  y permite que las células circulantes se adhieran al endotelio activado y lleguen al sitio de inflamación.

#### La adhesión celular de leucocitos a las células endoteliales

Se conocen dos mecanismos por los cuales las células se comunican entre sí para lograr una buena respuesta inmune: las citocinas y las moléculas de adhesión (interacción "receptor-ligando"); su función coordinada es necesaria, pues algunas citocinas inducen y regulan las moléculas de adhesión. Las interacciones matriz extracelular-célula y célula -célula juegan un papel muy importante en la migración y la activación de leucocitos durante el proceso

inflamatorio. La adhesión de leucocitos a las células endoteliales y reclutamiento al tejido extravascular son eventos fundamentales en la patogénesis de una enfermedad inflamatoria. Todas en la cascada de reclutamiento son dirigidas por moléculas de adhesión CAM's células expresadas en ambos leucocitos y células endoteliales. Así mismo diferentes tipos de CAM's son responsables de las diferentes etapas en la extravasación de leucocitos. Esta cascada incluye, las selectinas, las integrinas y los miembros de la familia de las inmunoglobulinas. La expresión de estas moléculas de adhesión es inducida por varios estímulos incluyendo citocinas como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , quimiocinas como IL8 y mediadores lipídicos y peptídicos.

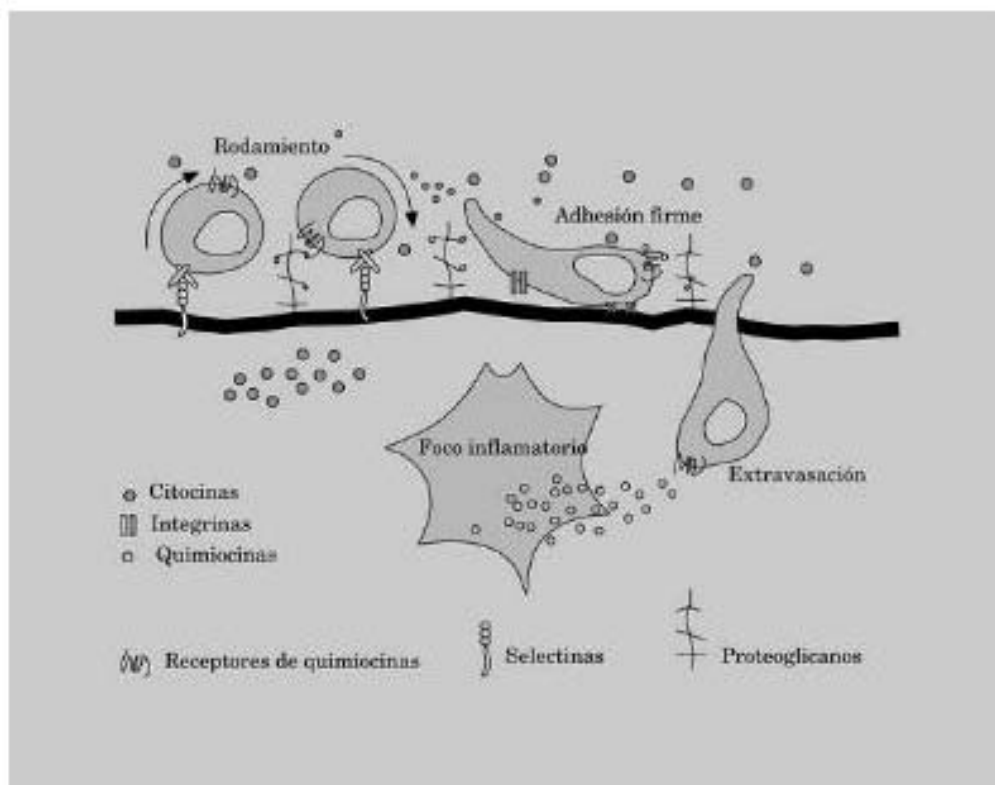


Figura 9.- Esquema de migración celular durante la extravasación. Se representan los pasos sucesivos y las moléculas implicadas en la extravasación leucocitaria desde el torrente circulatorio a los focos de inflamación (Chang *et al.*, 1995).

El fenómeno de activación leucocitaria es aparentemente muy rápido y resulta en la generación de señales que inducen la activación de las integrinas de la membrana (integrinas beta-2 en el caso de los neutrófilos e integrinas beta-1, beta-2 y beta-7 en el caso de los linfocitos); como ya se ha expuesto, la

activación de integrinas en la membrana resulta en un incremento significativo en su afinidad por sus ligandos, VCAM-1 para las integrinas  $\alpha_4/\beta_7$  y  $\alpha_4/\beta_1$  e ICAM-1 y -2 para las integrinas leucocitarias  $\beta_2$ . El mismo proceso de activación leucocitaria resulta en una redistribución de las integrinas en la membrana celular y este fenómeno, aunado a la activación de las mismas, incrementa la avidéz de las integrinas del leucocito y permite la adhesión firme al endotelio. Como se ha mencionado anteriormente, la redistribución de integrinas y su activación son fenómenos esenciales en la formación de las adhesiones y contactos focales y por lo tanto en la generación de señales de activación celular a través de integrinas (Onat *et al.*, 2007).

### Moléculas de adhesión

Con el término moléculas de adhesión se designa a un grupo diverso de moléculas proteicas involucradas en procesos biológicos de vital importancia como: la embriogénesis; la reparación tisular; la diferenciación, crecimiento, comunicación y movilización celular.

Las moléculas de adhesión realizan dos funciones principales:

Se unen a contra-receptores específicos ubicados en otras células o la matriz extracelular, facilitando las interacciones celulares y la migración de ellas por los diferentes tejidos.

Transducen señales reguladoras de la transcripción celular luego de la interacción con sus ligandos

TABLA. 2 Familia de proteínas de adhesión celular. (Nishiwaki *et al.*, 2007)

<b>Familia</b>	<b>ligandos</b>	<b>interacciones</b>
<b>Selectinas</b>	Carbohidratos	heterofilica
<b>Integrinas</b>	Matriz extracelular	heterofilica
	Ig superfamilia proteína	heterofilica
<b>Proteínas de superfamilia Ig</b>	Integrinas	heterofilica
	Ig superfamilia proteína	homofilica
<b>Caderinas</b>	Caderinas	homofilica

Moléculas de adhesión más relevantes en el endotelio

ICAM-1 (Molécula de Adhesión Intercelular 1) y VCAM-1 (Molécula de Adhesión Celular Vascular 1) son miembros de la familia de inmunoglobulinas involucradas en la adhesión celular. ICAM -1 es encontrada sobre la superficie de las células endoteliales, pero su expresión puede ser significativamente incrementada por la activación endotelial con citocinas o endotoxinas. La ICAM-1 se une a un miembro de integrinas de la subfamilia 1 beta como es LFA-1 (Antígeno asociado a la función de linfocitos, también conocido CD11a/CD18) y Mac1 (Antígeno de macrófagos-1 también llamado CD11b/CD18) La adhesión de leucocitos a ICAM-1 es realizada por LFA-1 así como cambios conformacionales así como la movilización de Mac-1 a la superficie de la célula por fusión de los gránulos almacenados a la membrana celular (Garbacki *et al.*, 2005) (Langston *et al.*, 2007).

VCAM-1.- Es una proteína endotelial transmembranal y su receptor es VLA-4 (Antígeno muy tardío-4 también conocido como CD49d/CD29). Esta integrina  $\beta$ -1 tardía media la adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos y células asesinas naturales (NKC'S) a células endoteliales activadas. Esta molécula juega una función importante en la inflamación vascular y su expresión es regulada por el factor de transcripción NF $\kappa$ B por activación del endotelio por citocinas proinflamatorias desde las 3 horas de estímulo hasta las 24 horas de acuerdo a diferentes reportes (Gao *et al.*, 2007).

Selectina E.- LEC-CAM-2 o ELAM-1, se expresa de manera transitoria en los endotelios vasculares en respuesta a IL1 o TNF en los procesos inflamatorios. Ella permite la adhesión de macrófagos y neutrófilos al endotelio inflamado. Esta se expresa por estimulación de citocinas inflamatorias, por lo que se piensa que es la responsable de la acumulación de leucocitos de la sangre al sitio de inflamación por medio de la adhesión de las células a la superficie celular. (Collins *et al.*, 1998; Watson, 2006).

P-Selectina ó LEC-CAM-3.- Se encuentra en la plaquetas y endotelio. A ella se adhieren los fagocitos a las plaquetas activadas y a las células endoteliales. Las selectinas tienen relación con la interacción célula-célula entre leucocitos y células endoteliales. Su papel más relevante está en la adhesión inicial, de neutrófilos y monocitos al endotelio activado por citocinas, lo que permite la quimiotaxis mediada por Integrinas y la migración transendotelial (Laferriere *et al.*, 2004).

**HUVECs COMO MODELO DE ESTUDIO *in vitro***

La gran variedad de funciones que involucran a las células endoteliales en diversos eventos biológicos, obligan a estudiarlas con más detalle por lo que además de los estudios realizados *in vivo*, se les ha aislado y cultivado para estudios *in vitro* para conocer todas aquellas funciones difíciles de investigar *in vivo*. Los cultivos de células endoteliales se han probado e intentado por un gran número de investigadores, sin embargo se han encontrado muchos problemas en ese camino que van desde la incapacidad de mantenerlas en cultivos puros en periodos de tiempo largos así como la incapacidad para identificar las células cultivadas como endotelio, por lo que investigadores como (Jaffe *et al.*, 1973) y colaboradores se esmeraron en completar la caracterización de los cultivos de células endoteliales derivadas de cordones umbilicales humanos. Se ha estudiado la célula endotelial del humano en el cordón umbilical, las vellosidades sinoviales, el prepucio, la placenta y el tejido adiposo de la mama y del abdomen. El endotelio del cerdo ha sido utilizado como modelo animal debido a su semejanza con el de humanos. En investigación se utiliza frecuentemente el endotelio venular del cordón umbilical del humano (HUVEC). Este endotelio es único ya que exhibe propiedades intermedias entre el endotelio de vasos grandes (aorta) y el endotelio de la microvasculatura. En cultivo, resiste hasta cuatro pasajes, más allá pierde rápidamente sus características normales. Pero el HUVEC es un modelo excelente para estudiar la adhesión y la diapédesis en el proceso inflamatorio, en lugar del endotelio de las vénulas post-capilares que son muy difíciles de cosechar y de cultivar (Vane *et al.*, 1990).



## ANTECEDENTES AL PROYECTO

Respuesta anti-inflamatoria del FILM *In vivo*.

De los efectos más sobresalientes del FILM *in vivo* se incluyen la inhibición de la inflamación tardía previniendo la infiltración de monocitos en ventanas de Rebuck, la inhibición de la hipersensibilidad al 1-cloro-2,4-dinitrobenceno en gerbos y cobayos, así como la disminución de la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 y VCAM-1 en el endotelio postcapilar vascular.

Efectos directos *in vitro* del FILM sobre U937 con y sin PMA

Se han encontrado efectos directos *in vitro* del FILM sobre U937 con y sin PMA disminuyendo la expresión inducida de quimiocinas MIP1 $\beta$  MIP-1 $\alpha$  y I-309. Así mismo se ha investigado *in vitro* el efecto del FILM sobre la expresión en citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias es diversos estudios por PCR en tiempo real, encontrando que inhibe diversas citocinas como IL1-, TNF, IL8 y sobre-expresa a IL10 una citocina anti-inflamatoria (Rico & Kretschmer, 1997) (Kretschmer *et al.*, 2001). Sin embargo, todavía no se ha esclarecido que vías o mecanismos utiliza específicamente este péptido para inhibir la progresión hacia la fase tardía del proceso inflamatorio.

Así mismo, no se sabe cuales son todos los componentes celulares que se ven afectan por el FILM y son los estudios *in vivo* sobre la disminución de la molécula de adhesión VCAM-1 en el endotelio, los que nos hizo preguntarnos, si el FILM puede actuar directamente sobre una de las células más importantes en el proceso inflamatorio como es la célula endotelial vascular, a través de neutralizar o contrarrestar la activación endotelial necesaria en la respuesta inflamatoria.

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La activación endotelial durante el proceso inflamatorio inducido por citocinas (TNF  $\alpha$ ) involucra un cambio en la fisiología de las células endoteliales que se refleja en cambios en la expresión génica dependiente del factor NF $\kappa$ B y esto está asociado a un aumento en la capacidad adhesiva que correlaciona con la expresión de moléculas de adhesión como selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1. Es VCAM-1 especialmente la que es inhibida por el FILM in vivo (Gimenez-Scherer *et al.*, 2000), en células endoteliales y cabe preguntarnos si este pentapéptido anti-inflamatorio actúa directamente sobre la activación del endotelio vascular para inhibir la inflamación.

## HIPOTESIS

En base a sus antecedentes como un agente anti-inflamatorio *in vivo*, proponemos que el FILM es capaz de inhibir la activación por TNF  $\alpha$  en el endotelio vascular, en un sistema *in vitro* de células monocíticas U937 y células endoteliales humanas.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto anti-inflamatorio del FILM en un sistema de adhesión intercelular *in vitro*. Interferir sobre la activación de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC's) activadas con TNF  $\alpha$ , evaluando la adhesión de células monocíticas U937.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1 Preparar cultivos primarios de células endoteliales a partir de cordones umbilicales humanos obtenidos recientemente.
- 2 Estandarizar el ensayo de adhesión: Realizar una curva de concentraciones de TNF contra porcentaje de adhesión de U937 a células HUVEC's activadas por 3 horas con TNF, con el fin de identificar los rangos mínimos de TNF capaces de activar al endotelio.
- 3 Corroborar la actividad biológica del FILM midiendo su efecto inhibitorio sobre citocinas y quimiocinas en monocitos estimulados con dos procedimientos independientes: PMA por 48 horas y TNF  $\alpha$  por 1 hora
- 4 Evaluar el potencial efecto anti-inflamatorio del FILM sobre las células endoteliales (HUVECs) en condiciones basales o estimuladas con TNF  $\alpha$ . Por medio de PCR en tiempo real medir la expresión de: moléculas de adhesión (Selectina E, VCAM-1, ICAM-1) y citocinas pro-inflamatorias (TNF  $\alpha$ ) en un rango de tiempo de exposición al péptido de ½ a 6 horas.
- 5 Evaluar la viabilidad celular de cultivos de HUVEC's tratadas con FILM y/o TNF en un rango de 1 a 6 horas de tratamiento, por el método de cristal violeta.
- 6 Analizar el potencial efecto anti-inflamatorio del FILM sobre células endoteliales (HUVEC's) activadas con TNF  $\alpha$  por 3 horas, evaluando su capacidad de adhesión de células monocíticas U937.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

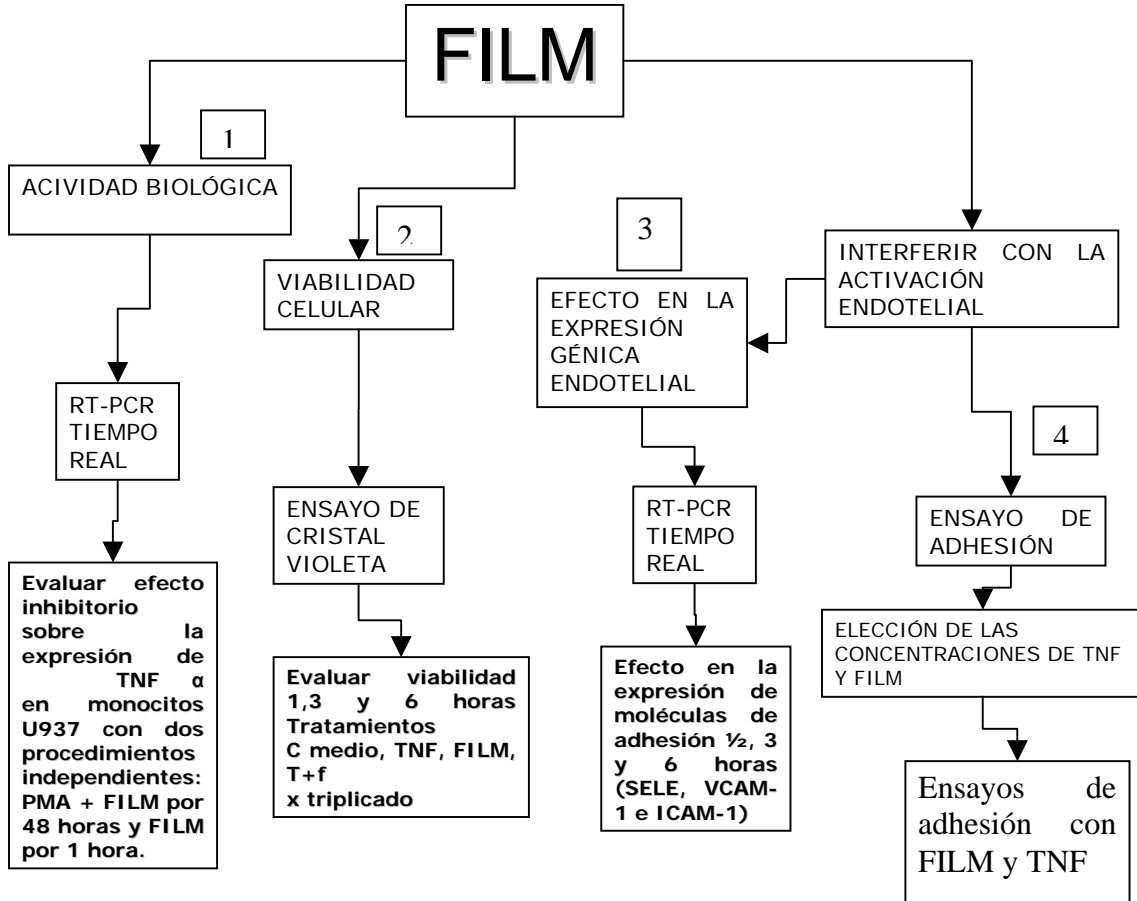


Figura 10.- Esquema de la estrategia experimental indicando las 3 distintas líneas de trabajo que se siguieron en el desarrollo de esta tesis.

### MATERIAL Y METODOS

#### Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana

Las células endoteliales de vena de cordones umbilicales humanas (HUVECs) se obtuvieron de cordones umbilicales de partos eutócicos y cesáreas de acuerdo al procedimiento descrito por Jaffe en 1973. Los cordones se procesaron dentro de las primeras 48 horas después de su obtención. Los cordones umbilicales se lavaron y limpiaron con solución salina fisiológica (SSF) estéril. Después de canular la vena umbilical, el endotelio vascular se sometió a disgregación enzimática agregando 10 ml de colagenasa (tipo 4, Worthington Biochemical Corporation) al 0.02%, disuelta en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Las venas umbilicales ya cargadas con colágenasa se incubaron por 15 min a 37°C. Al terminar esta incubación los cordones se frotaron para despegar las células endoteliales de la lámina basal de la vena, y posteriormente se cortó el cordón cargado para recolectar las células endoteliales disociadas en un tubo estéril con suero fetal bovino (In vitro, México).

Las células obtenidas con la digestión enzimática se centrifugaron a 1,200 rpm (800 x g), por 5 min en una centrífuga Labofuge 400 Heraeus Instruments, rotor 8179. La pastilla se resuspendió en medio M199 (GIBCO, USA) suplementado con glutamina (GIBCO BRL) al 1%, 0.1 mg/ml de factor de crecimiento endotelial (Biomedical Technologies Inc.), 0.1 mg/ml de heparina (Sigma, USA) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Además al medio se adicionó una dilución al 1% de una preparación comercial de estreptomicina y penicilina (GIBCO BRL). Las células se mantuvieron a 37 °C con humedad relativa del 100% y 5% de CO<sub>2</sub>. El pasaje 1 fue preparado al 80% de confluencia en cajas petri estéril. Las células HUVECs se incubaron y llevaron a semiconfluencia hasta su uso. Dependiendo del tipo de experimento, las células endoteliales se levantaron de la caja de cultivo con una solución al 0.1% de tripsina/verseno (Sigma) por 2 min. Y se sembraron en placas de 48 pozos o en placas de 6 pozos a una densidad de 30,000 a 50,000 células por pozo para las cajas de

## MATERIAL Y METODOS

48 y de 250,000 para las de 6 pozos en medio M-199 suplementado como se indico anteriormente. Los experimentos se realizarón 24-48 horas después.

### Cultivos de células U937

Las células de la línea promielocítica humana U937 mantuvieron en medio RPMI-1640 (GIBCO, Rockville MD, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, Rockville MD, USA) y una dilución al 1% de estreptomicina/penicilina (GIBCO Rockville MD, USA). Las células se mantuvieron a 37°C con humedad relativa del 100% y 5% de CO<sub>2</sub>. Para prevenir su activación por endotoxinas sólo se empleo material plástico nuevo para el cultivo de estas células.

### Ensayo de viabilidad del endotelio

#### Método de Cristal violeta

Las células en cultivo (HUVEC`s) se trataron con TNF, FILM o ambos, manejando las mismas concentraciones que en los experimentos del efecto del FILM sobre el endotelio. De los tiempos (0.5, 1, 3, 6 h) solo se manejaron tres representativos frente a los cuatro anteriores.

Una vez terminado el tiempo de tratamiento a las células se les retiró el medio y se colocó glutaraldehído al 1.1% disuelto en medio DMEM (Dulbeco Medium Eagle Modified) y con suero de ternera al 0.1% (Gibco), durante 15 minutos. Al terminar el tiempo se aspiró el glutaraldehido y se dejaron secar los pozos y posteriormente se colocó una solución de cristal-violeta (SIGMA) al 0.1 % por 15 minutos en agitación. Al finalizar el tiempo se retiró la solución de cristal-violeta y se lavó 3 veces con agua corriente. Las células teñidas se observaron al microscopio hasta notar una coloración homogénea en todas. Después se resuspendieron con una solución de ác. Acético al 10%. Las muestras se leyeron a 595 nm en un lector de placas de Elisa (Opsys MR. Dinnex. Technologies) de 96 pozos de 100-200 µl además se leyó un blanco con únicamente ácido acético. Los resultados se reportaron en porcentaje con

respecto a las muestras sin tratamiento.

### ENSAYO DE ADHESIÓN

#### Siembra de células HUVEC's

Se colocó tripsina (Sigma) 0.1% sobre las HUVECS durante 3 min para removerlas de la caja petri y se centrifugaron 1500 rpm (800 x g) por 5 minutos, después se resuspendió el pellet en medio M-199 suplementado y se contó el número de células para sembrarlas en cajas de 48 pozos para el ensayo de adhesión con 50,000 células por pozo. Las células se incubaron a 37°C de 2-3 días.

#### Marcado de las células U937

Las células U937 se contaron para colocar 2-3 x10<sup>6</sup> células en una caja petri (10 cm de diámetro) con 10 ml de medio RPMI suplementado al que se adicionaron 10 µCi de timidina tritiada (H<sup>3</sup>) (Amersham Biosciences). Después de 2 días de incubación las células marcadas se emplearon para los ensayos de adhesión. El día de la realización del ensayo de adhesión se lavaron los pozos dos veces con PBS suplementado con 5 mM Ca<sup>2+</sup> y 8.3 mM Mg<sup>2+</sup>. Después de este lavado se colocó medio M199 (controles) o medio suplementado con TNF alfa y/o FILM en cada pozo a las concentraciones indicadas en cada caso.

Después de 3 h de incubación con TNF y/o FILM, se removió el medio y se adicionó medio fresco y se adicionaron 250,000 células U937 marcadas radiactivamente en cada pozo. Las células U937 se co-incubaron con las células HUVECs por 3 horas más a 37°C. Al término de este tiempo se verificó la adhesión de las células U937 a las células endoteliales en el microscopio. Los pozos se lavaron 3 -4 veces con PBS Ca<sup>2+</sup> (5 mM), Mg<sup>2+</sup> (8.3 mM) y las células se lisaron con 500 µl de NaOH 0.2 M. El ADN se hidrolizó a 4°C por 24 h para la posterior determinación cuantitativa de la adhesión celular.



### Cuantificación de la adhesión celular

Se leyeron los blancos con 3 ml de líquido de centelleo colocados en viales en un contador de emisiones  $\beta$  (modelo LS6000, Beckman Palo Alto C.A.), posteriormente, se leyeron las muestras y los resultados se expresarán como el porcentaje de células adheridas en relación al total de células U937 marcadas agregadas al pozo. La adhesión se expresa como el porcentaje de células adheridas con respecto al total de células adicionadas a cada pozo. Para esto, en todos los experimentos se cuantificó por triplicado la radiactividad incorporada en 250,000 células U937.

### Experimentos con células U937 expuestas PMA y FILM

Se utilizó la línea humana promielocítica U937 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA) en medio RPMI 1640 libre de endotoxinas (in vitro, Life Technologies, Eggenstein, Germany) suplementado con 2 mM L-glutamina, 1.5 g/L bicarbonato de sodio, 4.5 g/L-glucosa, 10 mM HEPES, 1.0 mM piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino libre de endotoxinas (SFB, Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Las células se incubaron a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se trataron con 86  $\mu$ M del péptido sintético FILM (American Peptide Co. Sunnyvale CA. E.U.) y/o  $8 \times 10^{-5}$   $\mu$ M PMA (12-miristato 13-acetato de forbol) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por los tiempos indicados.

### EXTRACCIÓN DE RNA

Se extrajo el RNA total de células monocíticas U937 o de células endoteliales HUVEC's por medio una variante del método de Chomsky basada en una preparación comercial (TRIPURE®, ROCHE, Germany). Después de retirar el medio y lavar las células con PBS se le agregaron 0.5 ml de reactivo tripure, la mezcla se hizo pasar por una jeringa de insulina 5 veces y de ahí se transfirió a un tubo Eppendorff de 1.5 ml. Se adicionaron 200  $\mu$ l de

## MATERIAL Y METODOS

cloroformo a cada muestra, se agito por 15 seg y los tubos se mantuvieron a 4<sup>0</sup>C. Después de 15 min las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4<sup>0</sup>C en una centrifuga Termo Electron Corporation Micromax RF. Se recolectó la fase acuosa en un tubo nuevo al que se agregaron 250 µl de isopropanol manteniéndose a 4<sup>0</sup>C por 15 min y se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min a 4<sup>0</sup>C. El pellet se lavo con 0.5 ml de etanol al 75%. El precipitado se dejó secar y se resuspendió en agua pretratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se calentó de 55-60 <sup>0</sup>C por 10 min para favorecer la solubilidad del RNA total. La cantidad de RNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Beckman DU-64 Spectrophotometer) midiendo la absorbencia a 260 nm, la calidad del RNA se determino en geles de agarosa-formaldehido al 1.2% corroborando la presencia de bandas definidas de los RNAs ribosomales s y 18s.

### Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se obtuvo el cDNA a partir del rna total obtenido de las HUVEC'S después de ser tratadas con TNF o FILM y poder evaluar cambios en la expresión del mensajero de las moléculas de adhesión Selectina E, VCAM-1 e ICAM-1 pero antes de realizarlas por PCR tiempo real ajustamos las cantidades de todas las muestras tratadas y no con el gen de actina por PCR tiempo final. Se tomaron aproximadamente 2 µg de RNA total de acuerdo al protocolo de Perkin Elmers GeneAmp PCR Instruments. Se llevo acabo la formación del cDNA de las muestras con la enzima MuLV RT en presencia de oligo-dT así como de inhibidor de RNAasas. La reacción se llevó a cabo en un equipo PTC-100 Peltier Termal Cyler. Las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron:

10 min	25 <sup>0</sup> C
15 min	42 <sup>0</sup> C
5 min	95 <sup>0</sup> C
Infinito	4 <sup>0</sup> C

## MATERIAL Y METODOS

Para la reacción de PCR se sintetizaron oligonucleotidos específicos basados en las secuencias de los genes (actina). Para cada una de las reacciones de amplificación se uso el promedio del Tm de los oligonucleotidos utilizados. Se utilizo el siguiente protocolo para todas las reacciones:

1 min - 95<sup>0</sup>C

30 ciclos de:

1 min -- 95<sup>0</sup>C

1min -- Tm de cada par de oligonucleótidos actina

7 min-- 72<sup>0</sup>C

Infinito.--- 4<sup>0</sup>C

Al termino de la reacción se tomaron 10 µl de la mezcla de reacción, los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 3% y se visualizaron tiñendo los geles con bromuro de etidio y se analizaron mediante el programa de Gel logic 100 imaging System de Kodak.

Secuencias de oligonucleotidos utilizados para la amplificación de las distintas moléculas estudiadas en PCR tiempo final.

GEN	PRIMER	LONG.	POSICION	TM	SECUENCIA	TAMAÑO DEL PRODUCTO
β Actina	Sentido	20	371	55	gtggggcgccccaggcacca	540
	Anti	20	390	55	ctccttaatgtccgcacgat	

### PCR TIEMPO REAL

Se utilizaron los cDNAs de las muestras de endotelio y U937 usándose diluciones 1:10 y 1:100 y usando 5 µl de la dilucion1:10 para hacer la reacción de PCR de acuerdo al protocolo del LightCycler® Taqman Master de Roche. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el termociclador LightCycler 2.0 de Roche. La mezcla de reacción se colocó en capilares, posteriormente se

## MATERIAL Y METODOS

añadieron las muestras, se taparon los capilares y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 seg. Los capilares se colocaron en el carrusel del termociclador para iniciar la reacción. Los oligonucleotidos se diseñaron gracias al programa de Probe Universal Library de Roche. Adicionalmente se utilizaron sondas específicas para cada uno de los productos de PCR también de Roche. Para cada una de las reacciones de amplificación se uso el promedio del Tm de los oligonucleotidos utilizados y se llevó a cabo la reacción en las siguientes condiciones.

Modo Análisis	Num. Ciclos	Temperatura	tiempo
Ninguno	1	40 <sup>0</sup> C	2 min
Pre incubación			
Ninguno	1	95 <sup>0</sup> C	10 min
Amplificación			
Cuantificación	45	95 <sup>0</sup> C	10 seg
		60 <sup>0</sup> C	30 seg
		72 <sup>0</sup> C	1 seg
Enfriamiento			
Ninguno	1	40 <sup>0</sup> C	30 seg

Se realizo primero la amplificación de HPRT (Hipoxantina fosforribosil transferasa) y de los genes de interés. Los resultados de la cuantificación se reportaron como expresión relativa, utilizando los algoritmos del programa Light Cycler 2.0 que utilizan los valores de cuantificación absoluta del gen a estudiar normalizándolos con los valores obtenidos con el gen de expresión constitutiva (HPRT). Estos datos se reportan en CP (“crossing point”) que es el punto donde la señal de fluorescencia indica el incremento del templado encontrándose en la fase exponencial de curva.

## MATERIAL Y METODOS

Secuencias de oligonucleotidos utilizados para PCR en tiempo real diseñados con el programa Universal Probe Library de Roche®.

GEN	PRIMER	LONG.	POSICION	TM	%GC	SECUENCIA	MEDIDA
				PRODUCTO nt			
IL6	Sentido	18	123-140	60	61	gaaggcagcaggcaacac	86
	Anti	21	55 – 75	59	52	gccagctatgaactcctct	
TNF $\alpha$	Sentido	20	371 -390	59	55	gccagagggctgattagaga	123
	Anti	20	268-287	59	55	cagcctcttctcctcctga	
VCAM1	Sentido	24	1324 -1347	59	42	gatttctggatctctagggaaatga	67
	Anti	23	1281 1303	59	39	tggacataagaaactggaaaagg	
IL1 $\beta$	Sentido	20	153-172	59	50	ggccatcagctcaaagaac	70
	Anti	20	103-122	60	50	gagctgccagtgaaatgat	
ICAM1	Sentido	19	8803-9921	60	53	attcaaggctctgccaacc	90
	Anti	22	8746-8767	59	50	gagagagacactgccctaata	
HPRT	Sentido	20	133-152	60	55	cgagcaagacgttcagtcct	102
	Anti	24	51-74	59	33	tgaccttgattattttgcatacc	
eNOS	Sentido	18	1440-1457	60	61	ccgggtatccagggtccat	60
	Anti	20	1398-1417	59	55	gacctcaccgctacaacat	
iNOS	Sentido	18	2535-2552	60	61	tggccatcctcacaggag	72
	Anti	21	2481-2501	59	48	tggcagaatctacaaagtcc	
Selectina E	Sentido	19	550-558	60	53	tggccactgcaggatgtat	61
	Anti	20	508-527	59	50	gcaagaagaagcttgccta	
Factor de Von Willebrand	Sentido	20	7348 – 7367	60	55	gtggggacactctttgacac	60
	Anti	20	7308 – 7327	60	55	agtgacagaccaactcacc	

repeticiones de cada 3 experimentos por triplicado para cada tratamiento. Los resultados se analizaron por ANOVA  $p < 0.05$  y por la prueba de t de Student para determinar el nivel de significancia.

# RESULTADOS

## 1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FILM

### Efecto del FILM sobre el RNAm de TNF en células U937

El pentapéptido sintético FILM no es comercial por lo que en esta tesis empleamos un péptido sintetizado por la empresa American Peptide Co. (Sunnyvale CA. E.U.), mismo que nos fue donado por el Doctor Juan Velásquez, (Unidad Multidisciplinaria de Zacatecas del IMSS). Con el propósito de comprobar, que el péptido anti-inflamatorio al cual tuvimos acceso tuviera la actividad biológica previamente reportada, se llevaron a cabo dos ensayos independientes previamente reportados en células U937: 1 el abatimiento del RNAm de TNF e IL6 a la hora de adición del FILM y 2 el abatimiento del RNAm de TNF por FILM a las 48 horas en células estimuladas con PMA.

Se había reportado que los niveles de RNAm de TNF disminuyen en células monocíticas de la línea U937 cuando se exponen únicamente a FILM (84  $\mu$ M) por 1 hora (Utrera-Barillas *et al.*, 2003). Por tanto, se realizó un ensayo cultivando células de la línea U937 estimuladas en presencia o ausencia de FILM por una hora en medio RPMI. Se extrajo el RNA total a la hora de exposición, posteriormente, se utilizó el RNA total previamente cuantificado para llevar a cabo una reacción de RT-PCR. El cDNA obtenido se cuantificó y a partir de él, por medio de PCR en tiempo real se determinó la expresión del RNAm de TNF $\alpha$ , normalizándolo con el valor de la amplificación del RNAm de HPRT como gen constitutivo como se indicó en materiales y métodos.

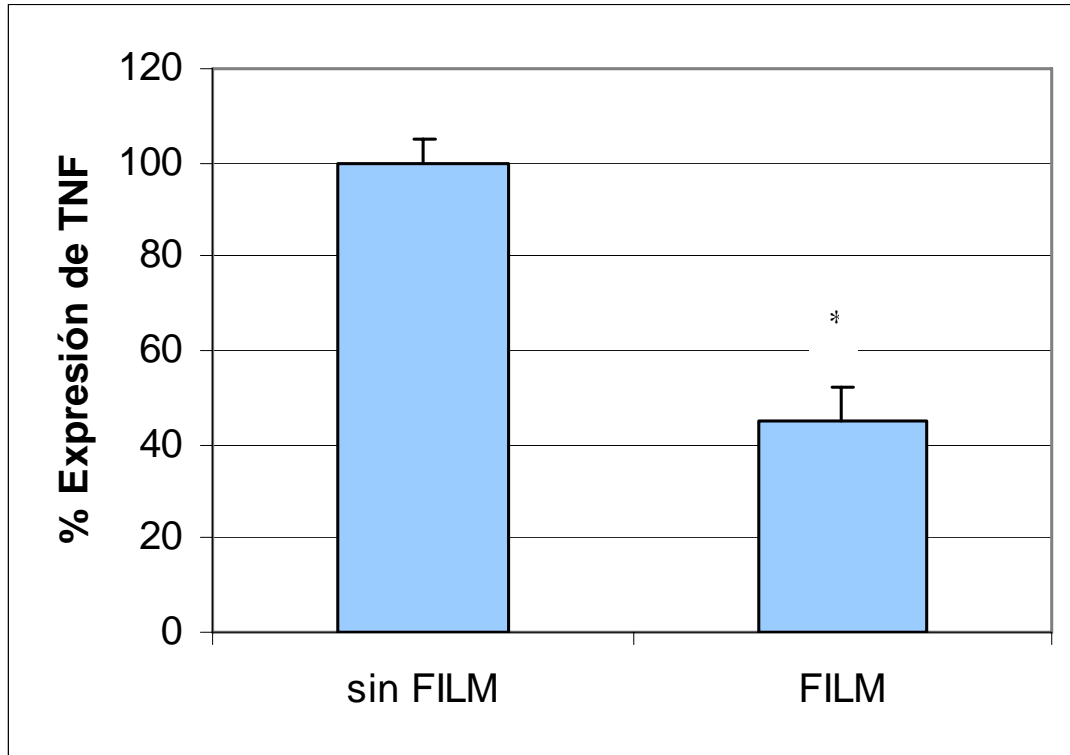


Figura 11.- Expresión relativa de TNF a la hora de exposición a FILM (84µM). Los asteriscos muestran una diferencia significativa con respecto al control de medio RPMI (p<0.05, t Student y ANOVA. n= 3

En concordancia al efecto previamente reportado del FILM sobre el mensajero de TNF de reducción en un 50%, encontramos una disminución del 55% (Fig.-11). En el mismo trabajo se reportó que el FILM también abate los niveles del mensajero de IL6, desafortunadamente, la reacción de PCR en tiempo real para esta interleucina no generó el producto esperado, por lo que no se continuó con este ensayo.

#### Efecto del FILM sobre el RNAm de TNF en células U937 estimuladas con PMA

A la par del ensayo anterior se determinó el efecto del FILM en células U937 activadas con PMA según se ha reportado (Utrera-Barillas *et al.*, 2003). Los autores determinaron la expresión de citocinas como TNF e IL1β, y quimiocinas como MIP 1α a las 48 horas por PCR tiempo real. Nosotros medimos únicamente los cambios en el contenido del RNAm de TNF. Los tratamientos se llevaron a cabo de la forma siguiente:

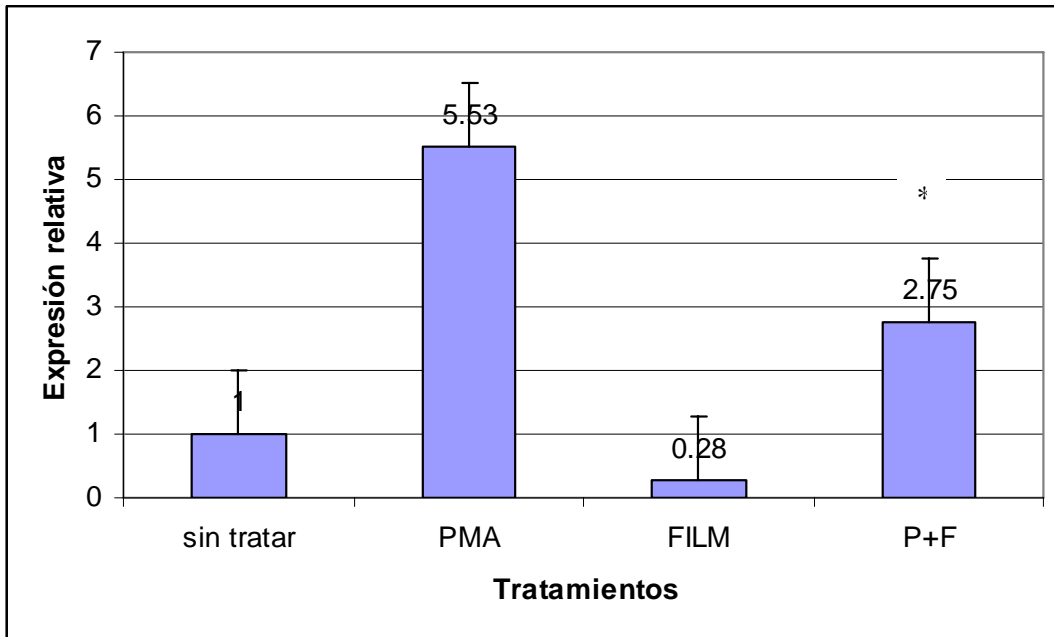


Figura 12.- Expresión relativa de los transcritos de TNF se utilizaron  $1 \times 10^6$  células U937 expuestas por 48 horas a  $84 \mu\text{M}$  de FILM,  $0.16 \mu\text{M}$  de PMA ó una mezcla de ambos. Los asteriscos muestran una diferencia significativa con respecto al tratamiento con PMA. ( $p < 0.05$ , t Student y ANOVA.  $n = 3$ ).

El FILM disminuyó la expresión del mensajero de TNF en células U937 tratadas con PMA de manera significativa con respecto al control estimulado con PMA aproximadamente en un 50% en la expresión inducidas de TNF por PMA. Estos resultados son similares a los reportados por Utrera Barillas en el 2003 donde se encontró una disminución de aproximadamente un 50%. Con estos dos resultados consideramos que la actividad biológica del FILM sintético que utilizamos en nuestro proyecto es la esperada.



### 2.- VIABILIDAD CELULAR DE HUVEC`s

Para comprobar que las células endoteliales no resultaran dañadas al ser tratadas con FILM, se evaluó su posible efecto citotóxico durante el tiempo que duraran los experimentos. Con este fin se aplicó una prueba sencilla de viabilidad, basada en la tinción de las proteínas de las células vivas adheridas a la placa. En nuestro grupo se ha demostrado que la viabilidad de las HUVEC`s en cultivo control o estimuladas con TNF se mantiene inalterada por 48 horas (Jaffe *et al.*, 1973) (Estrada, 2003; Lopez-Marure *et al.*, 2007). En tiempos posteriores a las 48 horas, el endotelio empieza a disminuir su viabilidad de manera significativa, dependiendo de los tratamientos y las condiciones de cultivo.

El porcentaje de viabilidad se expresó como el porcentaje de absorbancia de cada pozo tratado con respecto a los controles no tratados, y se reportan para diferentes tiempos 1, 3 y 6 horas (Figura 13).

Resultados de viabilidad de 1-6 horas

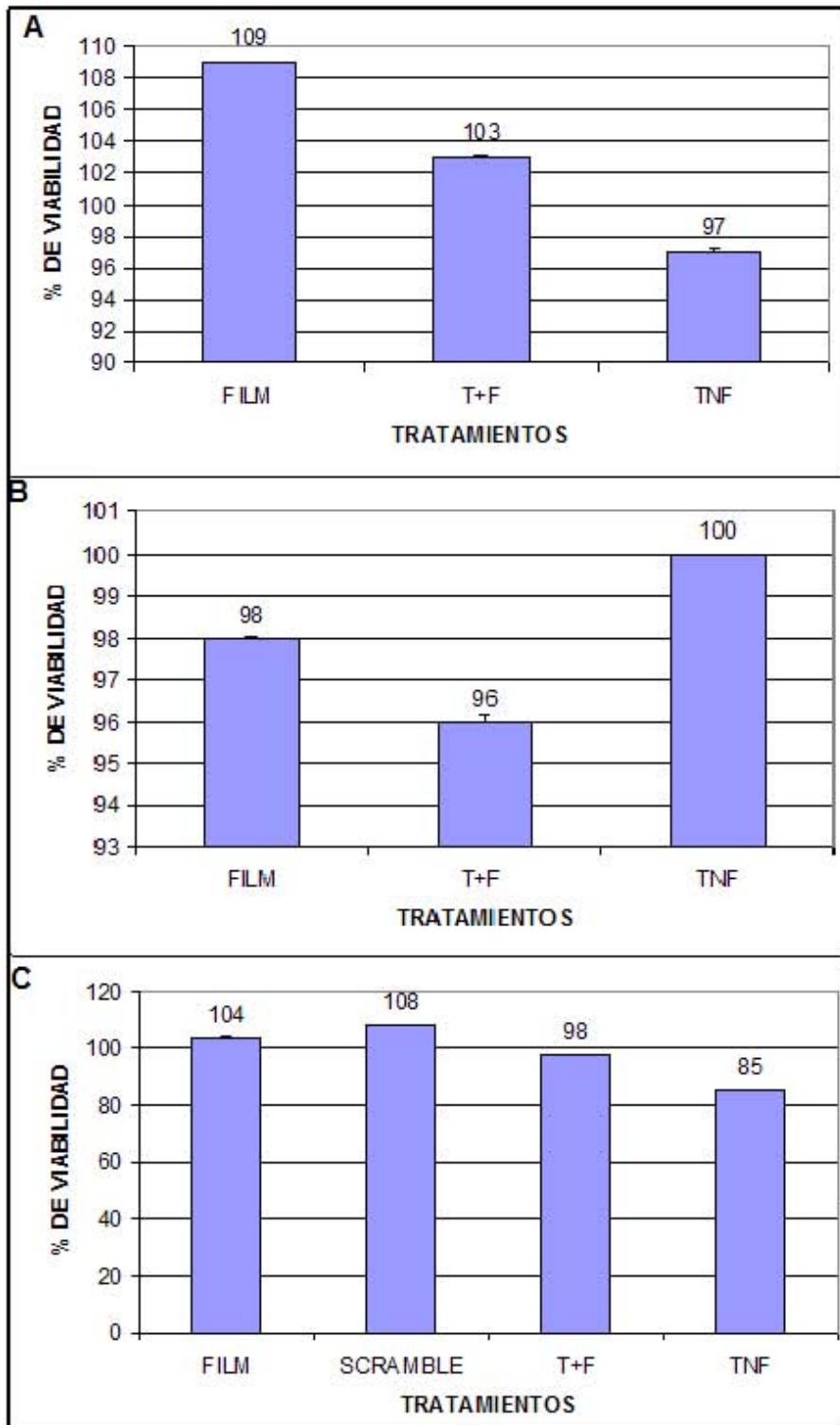


Figura 13.- Porcentaje de viabilidad de HUVEC's expuestas por 1 hora figura A, 3 horas en B y 6 horas en C a FILM (84µM) y TNF (1 ng/ml) y ambos TNF+FILM. Los datos reportados no muestran diferencias significativas con respecto al control de medio M-199, el cual representa el 100%. ( $p < 0.05$ , t Student y ANOVA  $n = 3$ )

Los tratamientos sobre el endotelio cultivado no presentaron una disminución significativa de la viabilidad celular con respecto al control de medio M-199 de 1 a 6 horas de tratamiento, aunque existe una pequeña disminución a las 6 horas no significativa. Los resultados con FILM o con TNF+ FILM no afectan significativamente la viabilidad de las HUVEC's. Estos resultados muestran que nuestros cultivos celulares mantuvieron integra su viabilidad aun con los tratamientos recibidos.

### 3.- EFECTO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA ENDOTELIAL DEL FILM

Dado que el FILM posee actividad anti-inflamatoria *in vivo* y además interfiere con la activación de células U937 mediada por PMA, se evaluó si existía un efecto directo sobre células endoteliales en cultivo (HUVECs). Se inicio por evaluar si el FILM interfiere con la expresión de RNAs mensajeros de tres moléculas de adhesión que normalmente se expresan en las células endoteliales en respuesta a un estímulo con TNF (Estrada, 2003). Los RNA mensajeros se evaluaron por medio de RT acoplado a PCR en tiempo real a diferentes tiempos. Dado que la selectina E se expresa rápidamente, se evaluó después de 1/2 y 3 h de exposición a TNF. VCAM-1 e ICAM-1 se expresan posteriormente, por lo que VCAM-1 se evaluó a las 3 h e ICAM-1 a las 6 h. En todos los casos las células HUVEC's se trataron simultáneamente con FILM y TNF.

Efecto del FILM sobre la expresión relativa del gen de Selectina E

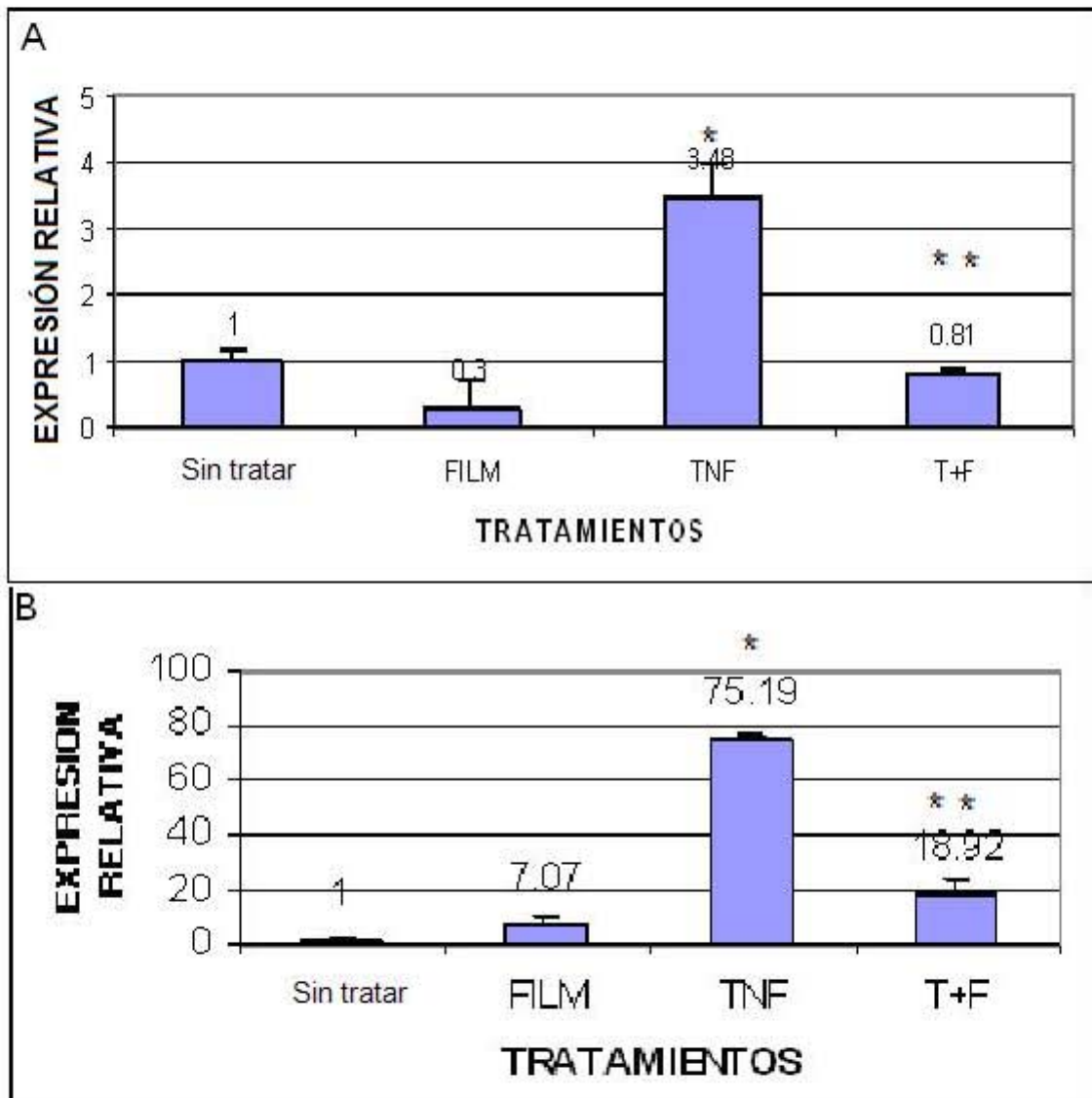


Figura 14.- Expresión relativa de Selectina E con FILM (84 $\mu$ M) y/o TNF (1 ng/ml) después de 30 min (A) o después de 3 horas (B). Un asterisco corresponde a una diferencia significativa con respecto al control. Los dos asteriscos muestran una diferencia significativa con respecto al tratamiento con TNF ( $p < 0.05$ , t Student y ANOVA.  $n = 3$ )

La adición de FILM tiene el efecto de reducir la expresión basal de selectina

## MATERIAL Y METODOS

E, se encontró que disminuye un 62%. La adición de TNF a las células induce un aumento en la expresión de selectina E, casi 4 veces respecto al basal, esta inducción disminuye cuando se adiciona el FILM en un 76% (Figura 14A).

Cuando se exponen las células endoteliales a 3 horas con TNF (Figura 15B) en lugar de 30 min. (Figura 15A) se encuentra que el nivel de expresión de selectina E se incrementa de 3.48 a los 30 min a 75.19 a las 3 horas, es decir, 21 veces más. No obstante este incremento, la adición de FILM si logra reducir la expresión de selectina E y a un porcentaje similar al que resultó a los 30 min, 74.8%.

Efecto del FILM sobre la expresión del gen de VCAM-1

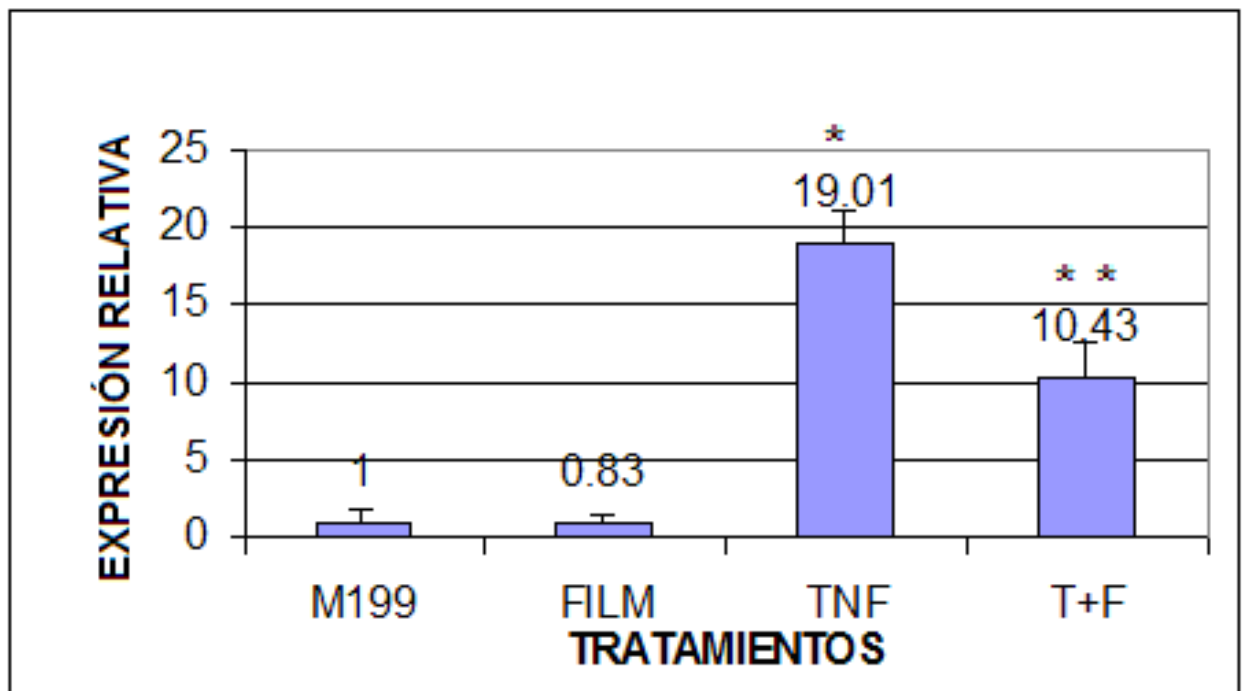


Figura 15.- Expresión relativa de VCAM-1 después de 3 horas de exposición a FILM (84 $\mu$ M) y/o TNF (1 ng/ml). Un asterisco corresponde a una diferencia significativa con respecto al control. Los dos asteriscos muestran una diferencia significativa con respecto al tratamiento con TNF ( $p < 0.05$ , t Student y ANOVA. n= 3)

La cantidad del RNAm de VCAM-1 se incrementó 19 veces a las 3 horas de exposición por TNF. Resultados similares de trabajos previos en nuestro grupo

## MATERIAL Y METODOS

(Estrada, 1998). Con la presencia de FILM disminuye significativamente (45.13%) la expresión del RNAm de VCAM-1 a las 3 horas inducida por TNF y FILM con respecto al tratamiento de TNF, aunque no abate la cantidad del RNAm de VCAM-1 a los niveles basales ó sin tratamiento.

Efecto del FILM sobre la expresión del gen de ICAM-1

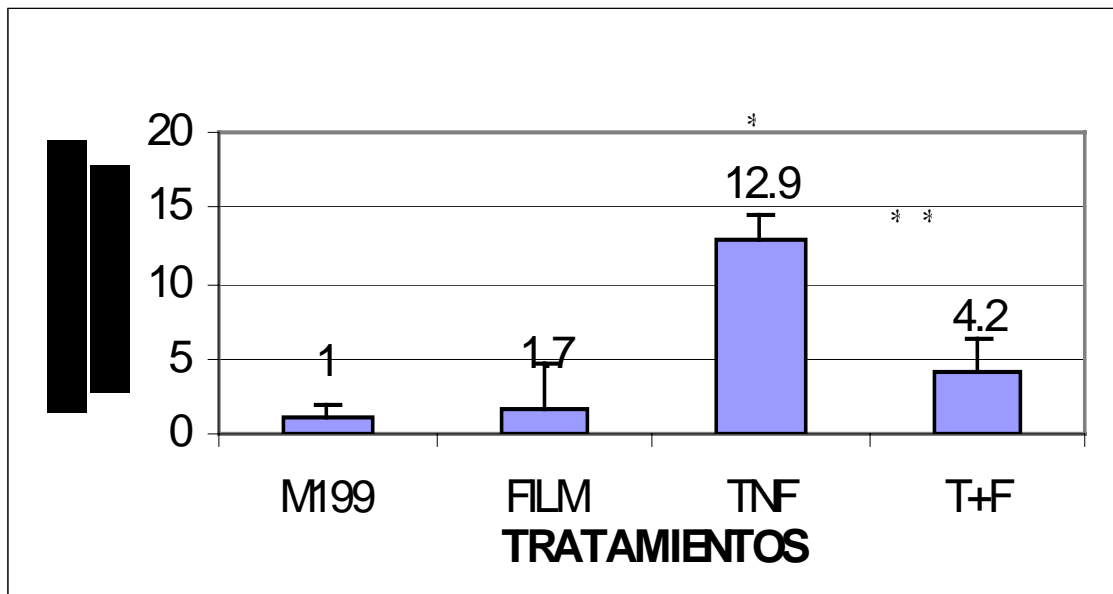


Figura 16.- Expresión relativa de ICAM-1 después de 6 horas de exposición a FILM (84µM) y/o TNF (1 ng/ml). Un asterisco corresponde a una diferencia significativa con respecto al control. Los dos asteriscos muestran una diferencia significativa con respecto al tratamiento con TNF ( $p < 0.05$ , t Student y ANOVA.  $n = 3$ )

La expresión de ICAM-1 se incrementó 3 veces a las 6 horas de activación por TNF nuevamente resultado esperado de acuerdo a trabajos anteriores en nuestro grupo (Estrada, 1998). El FILM disminuye significativamente (67.4%) la expresión del RNAm de ICAM-1 inducida por TNF. El FILM no logró abatir el contenido del RNAm de ICAM-1 hasta los niveles basales, similar a lo encontrado para la selectina E y VCAM-1.

El incremento en la expresión endotelial de moléculas de adhesión como son Selectina E, VCAM-1 e ICAM-1 en respuesta al TNF, es un marcador importante de la respuesta inflamatoria. El FILM disminuyó el contenido de RNAm de estas tres moléculas de adhesión con respecto a sus niveles incrementados en presencia de TNF. Estos resultados en conjunto sugieren un

efecto directo del FILM sobre la activación endotelial.

#### 4 EFECTO DEL FILM SOBRE LA ACTIVACION ENDOTELIAL

La finalidad principal de este trabajo fue evaluar el posible efecto anti inflamatorio sobre la activación endotelial por el pentapéptido FILM. Por un lado, se evaluó la posible interferencia con los incrementos en los niveles de los RNAm de moléculas de adhesión asociados a la activación endotelial. Por otro lado, se valoró su posible interferencia con la adhesión de células monocíticas U937 a HUVEC's estimuladas con TNF. Conocemos que concentraciones de 0.5 a 10 ng/ml de TNF promueven un fenotipo endotelial activado (Estrada, 1998) y tomando de referencia esto decidimos usar dos de estas concentraciones para estimular el endotelio.

#### **Análisis microscópico del ensayo de adhesión de células U937 a HUVEC's activadas con TNF**

Inicialmente, se realizó una curva dosis-respuesta para registrar visualmente los cambios en la adhesión de U937 a HUVEC's pretratadas con diferentes concentraciones de TNF. Las figuras 17 y 18 muestran dos versiones diferentes de las mismas micrografías que registran el incremento de adhesión de células U937 a HUVEC's preestimuladas.

Con la finalidad de mostrar claramente ambas células HUVEC's y U937 con TNF en la misma imagen. La figura 18 es la versión modificada con filtro ya que en la figura original (Figura 17) no es fácil distinguir claramente a las HUVEC's por la cantidad de U937 sobre ellas. Como se muestra en la figura 18 (A-K) las células U937 se distinguen por su forma circular y refringencia así como su

## MATERIAL Y METODOS

tamaño, que es más pequeño que el de las células endoteliales, estas a su vez son alargadas y opacas; además, las HUVECs crecen en una monocapa que se encuentra en un plano inferior al de las U937, que crecen en suspensión. Las micrografías de las figuras 17 Y 18 muestran un incremento gradual de la adhesión de monocitos U937 al endotelio conforme al aumento en la concentración de TNF.

Las figuras 17 Y 18 muestran células endoteliales activadas adhiriendo de 2 o más células U937 notándose de manera mas clara en concentraciones bajas como se aprecia en la figura 19 (G, flecha blanca); sin embargo, ambas figuras también muestran espacios donde las células endoteliales aun en concentraciones altas de TNF, no adhieren a ninguna célula U937 como se aprecia en la figura 18 (F, flecha blanca). Esta observación es inesperada y refleja que el incremento de la capacidad adhesiva se da en forma heterogénea en la población de células endoteliales.



## MATERIAL Y METODOS

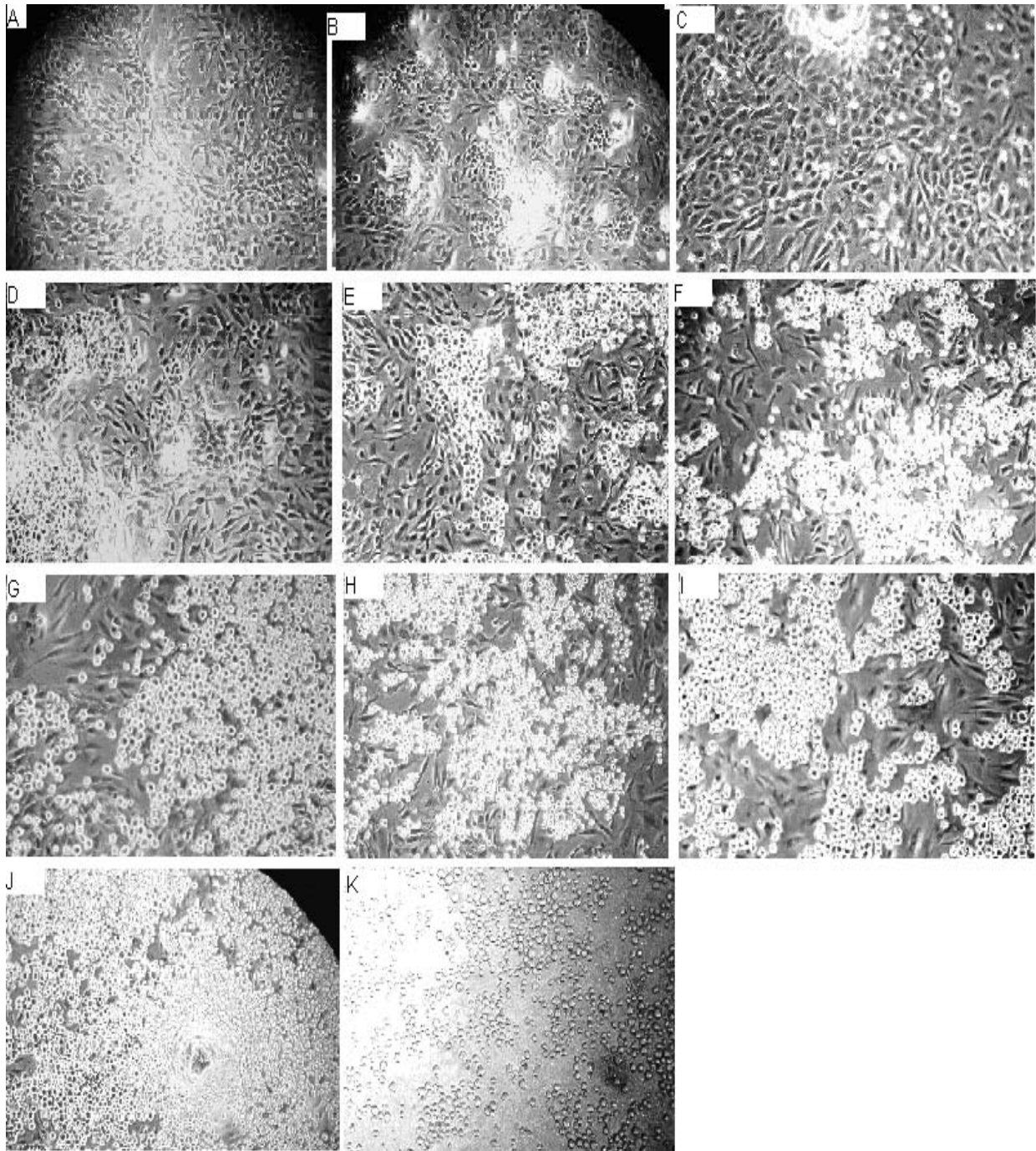


Figura 17.- Aspecto de la curva de adhesión de células U937 a HUVEC's activadas con TNF  $\alpha$ . Células endoteliales en: (A) medio M-199, (B-J) Concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 10 ng/ml de TNF, (K) células U937 en medio RPMI. Las fotos se tomaron con una cámara Kodak DC290 Zoom.

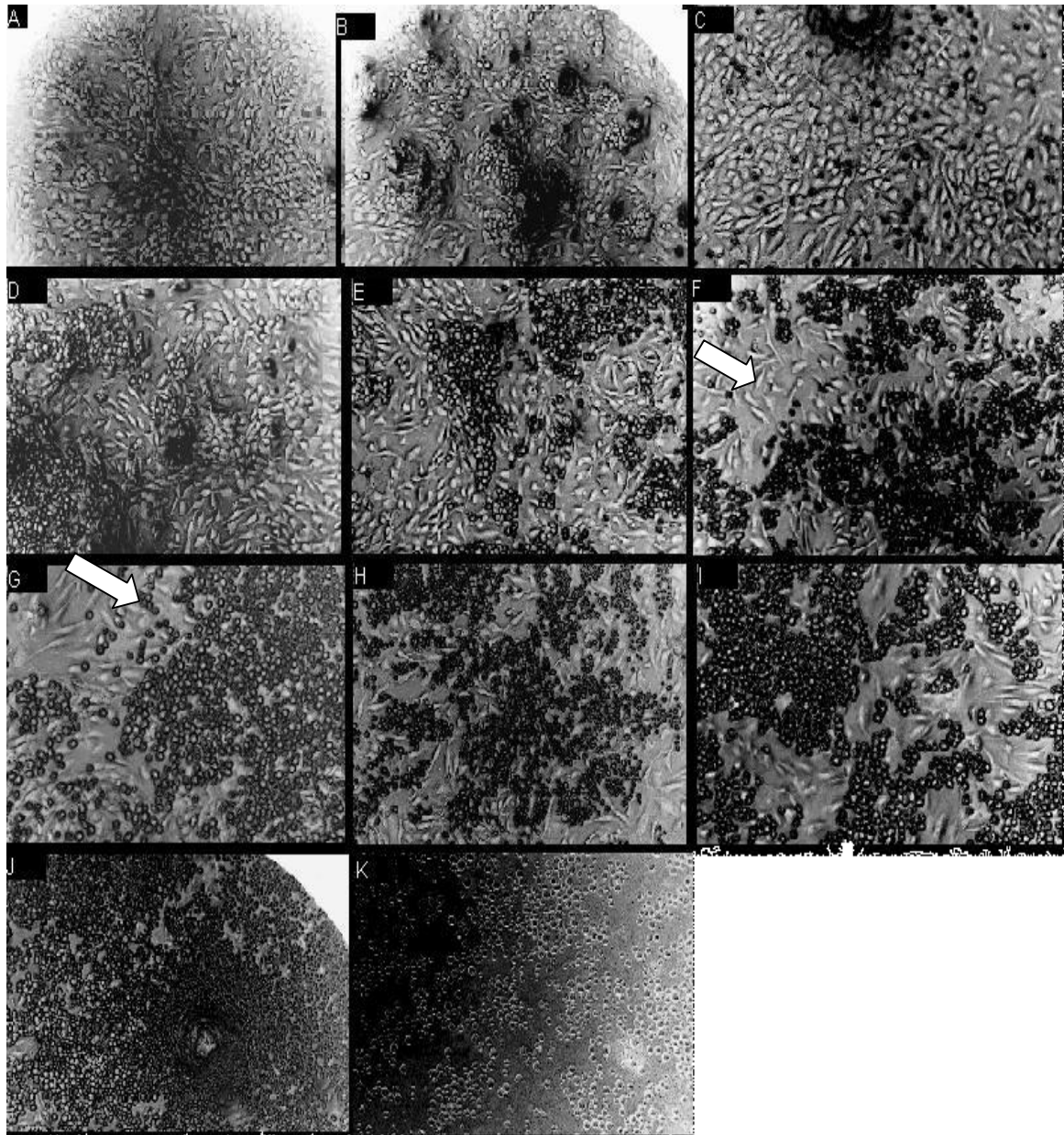


Figura. 18- Aspecto de la curva de adhesión de células U937 a HUVEC's activadas con TNF  $\alpha$ . Versión modificada con inversión de colores de la fig 17. Aquí se muestra de manera mas clara la diferencia entre las células endoteliales alargadas en monocapa contrastando con las U937 más pequeñas y circulares. Células endoteliales en: (A) medio M-199, (B-J) Concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5,10 ng/ml de TNF, (K) células U937 en medio RPMI. Las fotos se tomaron con una cámara KodaK DC290 Zoom.

## MATERIAL Y METODOS

Análisis cuantitativo del ensayo de adhesión de células U937 a HUVEC's activadas con TNF

Posteriormente, se realizó una curva dosis-respuesta para determinar los cambios en el porcentaje de adhesión a diferentes concentraciones de TNF. Se cuantificó esta adhesión marcando las células U937 con timidina tritiada como se indica en materiales y métodos. El incremento en el porcentaje de adhesión no fue lineal en ninguno de los intervalos (un aumento de dosis del doble no se reflejó en el doble de adhesión), pero sí mostró un incremento proporcional a todo lo largo de la curva. La adhesión es significativa desde la concentración de 0.1 ng/ml hasta 10 ng/ml con respecto al control (\*  $p < 0.05$  por t Student y ANOVA). Las concentraciones más altas de 1, 5, y 10 ng/ml tienen una mejor activación endotelial con respecto a las demás, alcanzando un incremento que va del 40% al 60%.

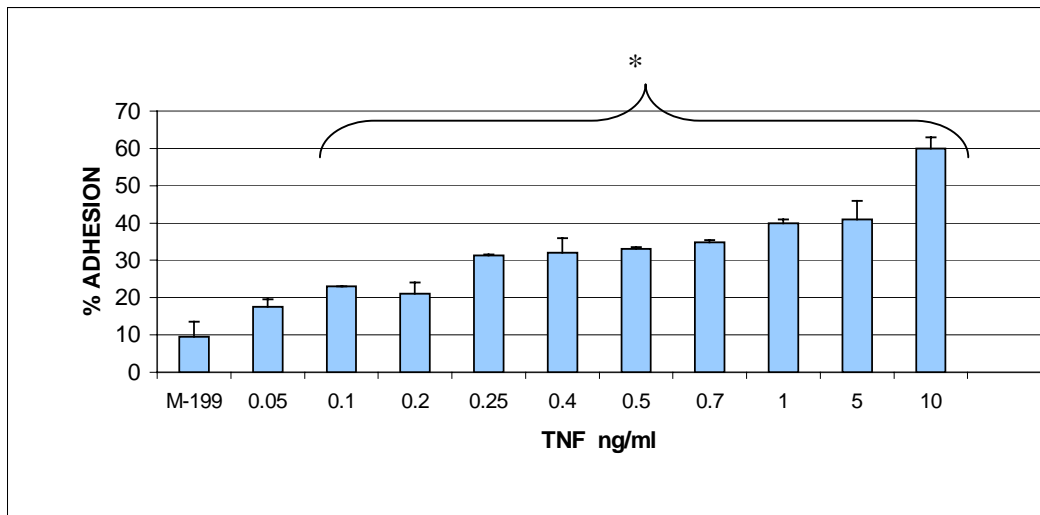


Figura 19.- Curva de adhesión de células U937 a HUVEC's inducidas por diferentes concentraciones de TNF por 3 horas, posteriormente a las 3 horas de activación se agregaron las células U937 marcadas con tritio radiactivo por 3 horas más. Los datos presentados son de tres experimentos independientes por triplicado (\*  $p < 0.05$  por t Student y ANOVA entre control y tratamiento).

### EFFECTO DEL FILM SOBRE LA ADHESION DE CELULAS U937 A HUVEC'S

Con base en la curva dosis respuesta, se seleccionaron dos concentraciones de TNF para activar al endotelio para poner a prueba el posible efecto antagonista del FILM. La primera 0.1 ng/ml, fue la concentración más baja que presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la adhesión en células control sin tratamiento. La segunda 1 ng/ml, es la concentración más utilizada por nuestro grupo y en la literatura para activar el endotelio.

La concentración de 84 $\mu$ M FILM utilizada se escogió con base a los estudios reportados *in vitro* en monocitos y polimorfonucleares (Kretschmer *et al.*, 1985; Kretschmer *et al.*, 2000; Kretschmer *et al.*, 2001; Utrera-Barillas *et al.*, 2003). Esta concentración se utilizó en todos los experimentos de esta tesis.

El tiempo de adición del FILM se eligió con base a los estudios realizados anteriormente *in vitro* e *in vivo* que lo colocan simultáneamente o una hora antes de la estimulación. En el caso de nuestras células HUVEC's se colocó una hora antes y simultáneamente a la activación por TNF.

Los siguientes histogramas muestran los resultados de los tratamientos con TNF a diferentes tiempos de adición del FILM (Figura 20).

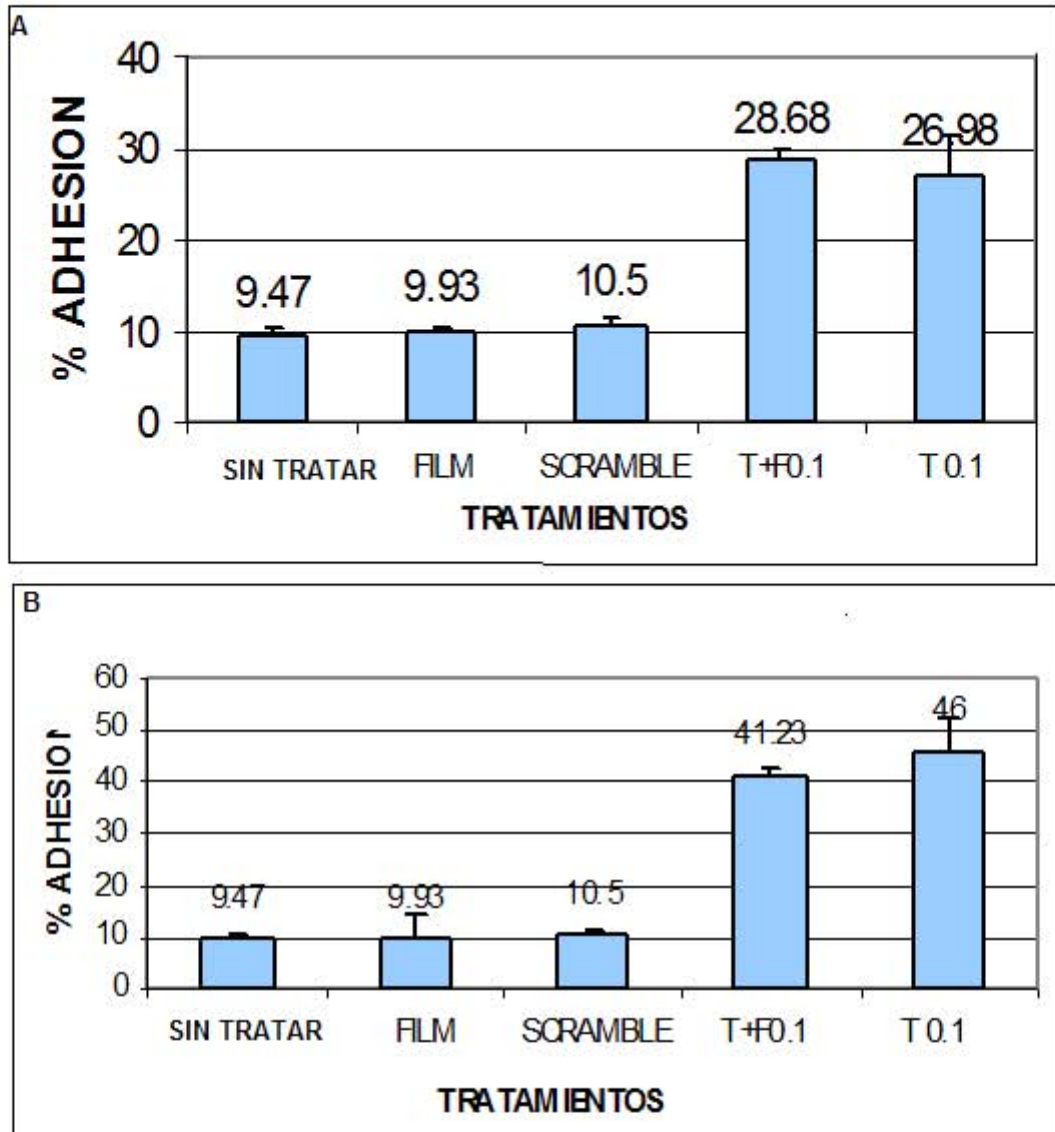


Figura.- 20 Ensayo de adhesión con adición de FILM 1 h antes del TNF A 0.1 ng/ml y B 1 ng/ml. Los tratamientos de TNF y TNF +FILM son significativos con respecto al control. Se utilizó un control del péptido usando una versión desordenada en la secuencia del FILM.

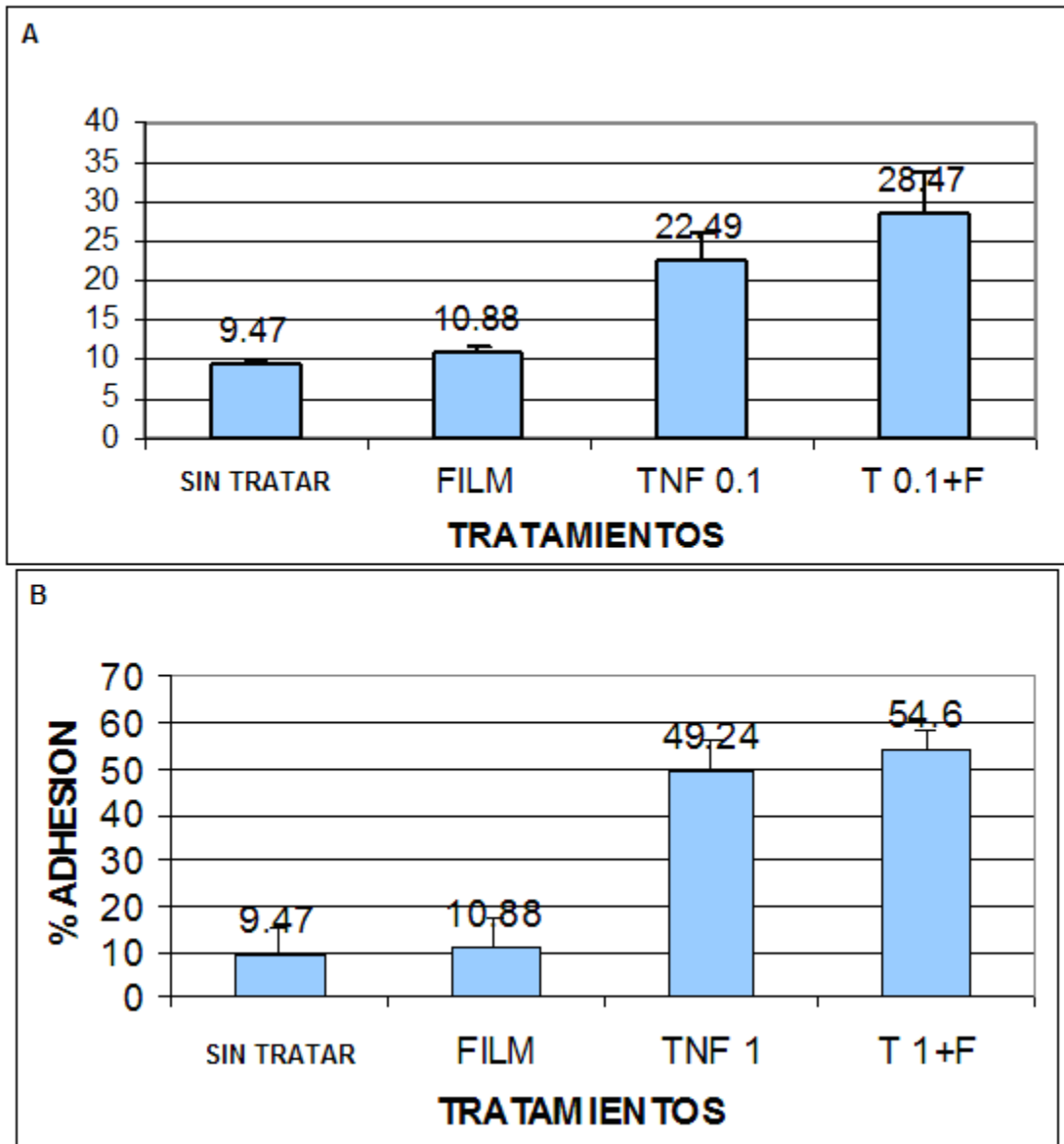


Figura.-21 Adhesión con adición de film simultáneamente con tnf A 0.1 ng/ml y B 1 ng/ml. Los tratamientos de TNF t TNF +FILM son significativos con respecto al control. Los datos presentados son de tres experimentos independientes con

## MATERIAL Y METODOS

El TNF incrementó la capacidad de adhesión de las HUVECs a las U937, 0.1 ng/ml de TNF indujo un incremento en la adhesión de 25% más que la adhesión de células control, mientras que un estímulo con 1 ng/ml de TNF condujo a un incremento del 40%, de manera similar a la curva de TNF.

La adición de FILM una hora antes que el TNF no afectó significativamente la adhesión inducida por TNF a ninguna de las dos concentraciones utilizadas (Figura 20).

Cuando el FILM se añadió al mismo tiempo que el TNF no se afectó significativamente la adhesión inducida por TNF a ninguna de las dos concentraciones de TNF utilizadas (Figura 21).

En conclusión, el FILM no afecta la capacidad adhesiva de las HUVEC's a la concentración y tiempo utilizado en este ensayo activadas por TNF en las condiciones estudiadas, sin embargo si afecta componentes del proceso de activación endotelial como son la expresión de RNA's mensajeros de moléculas de adhesión endotelial.

### DISCUSIÓN

La finalidad principal de este proyecto fue evaluar el posible efecto anti inflamatorio sobre la activación endotelial por el pentapéptido FILM. Por un lado, se evaluó la posible interferencia con los incrementos en los niveles de los RNAm de moléculas de adhesión asociados a la activación endotelial y por otro, el efecto neutralizante del péptido sobre la capacidad adhesiva del endotelio.

El FILM interfirió parcialmente sobre la activación endotelial disminuyendo la expresión de RNA's mensajeros de moléculas de adhesión endotelial que incluyen a Selectina E, VCAM-1 e ICAM-1, pero sin interferir con la capacidad adhesiva del endotelio activado por TNF.

#### Cultivo de HUVEC's como modelo de estudio para anti-inflamatorios

Hoy en día se considera que el endotelio es un componente importante en la respuesta inflamatoria, ya que si bien, no pertenece al mismo linaje hematopoyetico que las demás células del sistema inmune, es la puerta principal del paso de estas al sitio de daño o foco infeccioso, libera citocinas pro-inflamatorias además de expresar moléculas de adhesión que ayudarán en la adhesión de monocitos y leucocitos. La gran superficie que representa el endotelio vascular que recubre la parte interna de los vasos sanguíneos, le permite cumplir funciones a nivel local en distintos eventos fisiológicos e inmunológicos que ya se han mencionado.

Los estudios sobre el endotelio han utilizado sistemas de cultivo de diversas células endoteliales de micro y macro vasculatura, así como de venas de cordones umbilicales con la finalidad de estudiar a fondo todas las funciones en las que se ve implicado, así como el mal funcionamiento o disfunción. Se utilizan actualmente modelos en endotelio *in vivo* e *in vitro* para estudiar las propiedades anti-inflamatorias de fármacos obtenidos de extractos de plantas o animales incluso de productos sintéticos, dentro de este último grupo se han



## MATERIAL Y METODOS

probado una variedad de péptidos con potencial anti-inflamatorio. Debido a los efectos secundarios de diversos fármacos anti-inflamatorios se buscan nuevas sustancias más eficaces y con menos efectos adversos. Los modelos en células endoteliales han servido como pilar importante en este tipo de investigaciones. Fármacos ya probados como la dexametasona o el infumab, etherneceet, rofecoxib (Griffoni *et al.*, 2007), aspirina, cilostazol (Gao *et al.*, 2007) se han probado sobre el endotelio in vivo e in Vitro recientemente, así como sustancias en proceso de valoración como la efomicina M (Garbacki *et al.*, 2005), proantocianidinas (Sibbald, 2006) y tripterina (Zhang *et al.*, 2006).

En base a que el FILM disminuye la expresión de VCAM-1 in vivo, decidimos utilizar un sistema de cultivo *in vitro* para probar si el FILM puede tener un efecto directo sobre células del endotelio vascular.

Una variedad de estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, se han apoyado del sistema intercelular de células endoteliales de cordón umbilical humano, el cual se ha estandarizado desde hace tiempo en el laboratorio (Lopez-Marure *et al.*, 1997; Adriana, 1998; Estrada, 1998; Estrada, 2003; Frias, 2007). A través de este sistema de cultivo *in vitro* se han podido dilucidar diversos aspectos relacionados a la activación endotelial por citocinas como el TNF, IL1 $\beta$  o sustancias como el LPS que activan el sistema de Nf $\kappa$ B.

Este proyecto utilizo un sistema de cultivo endotelial, utilizando células endoteliales HUVEC'S para estudiar el efecto neutralizante del péptido anti-inflamatorio FILM frente a la activación del TNF por lo que se midió la viabilidad de las células tratadas con el péptido y la citocina esperando no afectarán al endotelio durante el tratamiento. Los resultados mostraron que en ninguno de los tratamientos se afecto de manera importante la viabilidad del endotelio, descartando que las repuestas se relacionaran a efectos tóxicos sobre los cultivos. Cabe hacer notar que se utilizaron tiempos cortos de exposición al péptido con un máximo de 6 horas y no sabemos si en tiempos más largos pueda haber un efecto tóxico del FILM.

### ENSAYO DE ADHESIÓN DE U937 A HUVEC'S

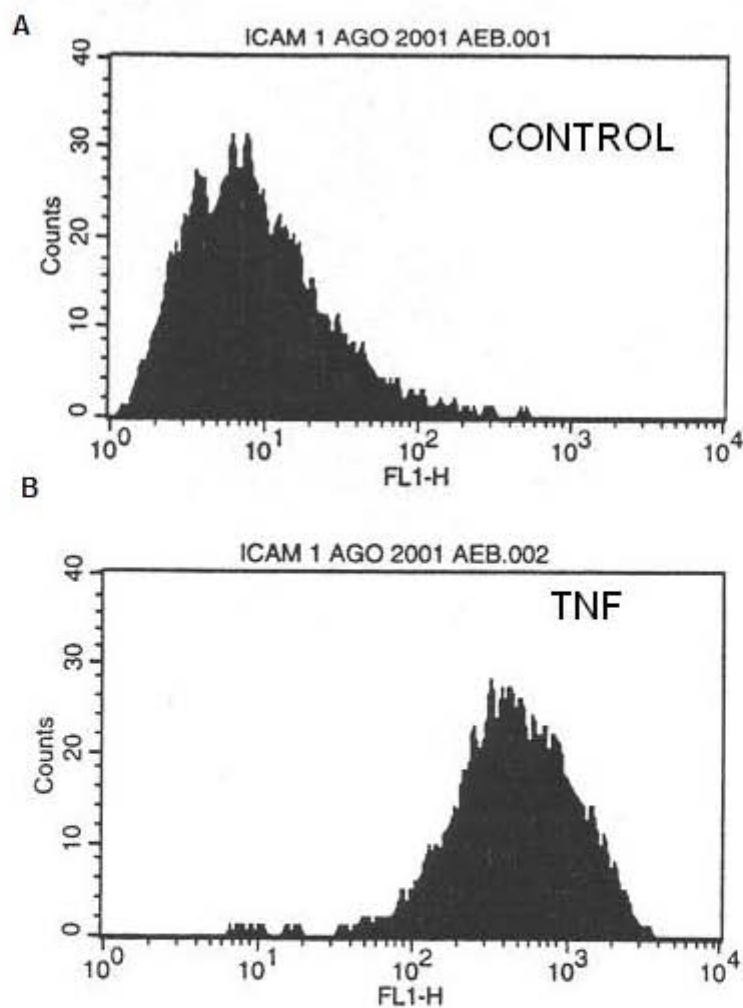
La adhesión leucocitaria a las células endoteliales vasculares es una parte central en la respuesta inflamatoria una vez que se ha activado el endotelio. La activación del sistema NF- $\kappa$ B en las células endoteliales mejor caracterizado está mediada por el Factor de Necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ). El desarrollo de nuevas técnicas de cultivo ha ayudado a entender los aspectos moleculares de las funciones endoteliales y su papel en el reclutamiento leucocitario. Tanto *in vitro* como *in vivo*, los datos bibliográficos (Laferrriere *et al.*, 2004; Mendez-Cruz *et al.*, 2007; Prasad & Krishnan, 2007) muestran que las células endoteliales activadas presentan una superficie pro-adhesiva a los leucocitos sin estimular, promoviendo así su reclutamiento durante la respuesta inflamatoria.

Como ya se mencionó se utilizó el ensayo de adhesión para evaluar si el FILM podía interferir con la activación endotelial. Con el objetivo de establecer la dosis mínima de activación del endotelio que pudiera ser confrontada con el efecto neutralizante del FILM, iniciamos se realizó una curva dosis-respuesta de TNF eligiendo un rango de concentraciones de TNF que pudiera activar de manera eficiente y significativa al endotelio. Se utilizaron concentraciones de TNF ya probadas por nuestro grupo y en otros laboratorios, así como concentraciones bajas de TNF no reportadas en ensayos de adhesión.

El análisis microscópico de la curva de adhesión de U937 a HUVEC's activadas con TNF muestra un incremento gradual pero no lineal de la adhesión conforme al incremento en la concentración de TNF. De manera relevante se observan células HUVEC's que a pesar de haber sido sometidas al estímulo con TNF no adhieren ninguna célula U937 aún en las concentraciones más altas. Reportes de estudios que evalúan por citometría de flujo, miden el incremento de ICAM-1 (Eshel *et al.*, 2002; Estrada, 2003; Galicia, 2007) indican que toda la población responde al estímulo con TNF (Figura 22),

## MATERIAL Y METODOS

sin embargo, existe en estas células una población que no alcanza a expresar un fenotipo adhesivo. Esta observación refleja que el incremento de la capacidad adhesiva se da en forma heterogénea en la población de células endoteliales. Esta heterogeneidad se ha reportado en estudios *in situ* en pulmón con personas de síndrome de deficiencia respiratoria aguda pero para VCAM, y selectina E (Muller, 2002, 2003). La heterogeneidad funcional es un hecho que ha sido difícil de explicar, una explicación se basa en que las células se encuentren en diferentes fases del ciclo celular pero estudios de nuestro grupo en HUVEC's muestran que la heterogeneidad es independiente de la fase del ciclo celular (comunicación personal Dr. Zentella). Alternativamente, se ha propuesto la existencia de ciclos metabólicos pero que hasta la fecha no han sido demostrados.



## MATERIAL Y METODOS

Figura 23.- Niveles de ICAM-1 en células endoteliales tratadas con A) sin TNF y B) TNF 10ng/ml, analizadas por citometría .imagen tomada de Galicia, 2007.

En el análisis cuantitativo del ensayo de adhesión la curva dosis respuesta mostró un incremento en el porcentaje de adhesión que no fue lineal en todo el intervalo solo en los primeros cuatro puntos de la curva (Figura 24).

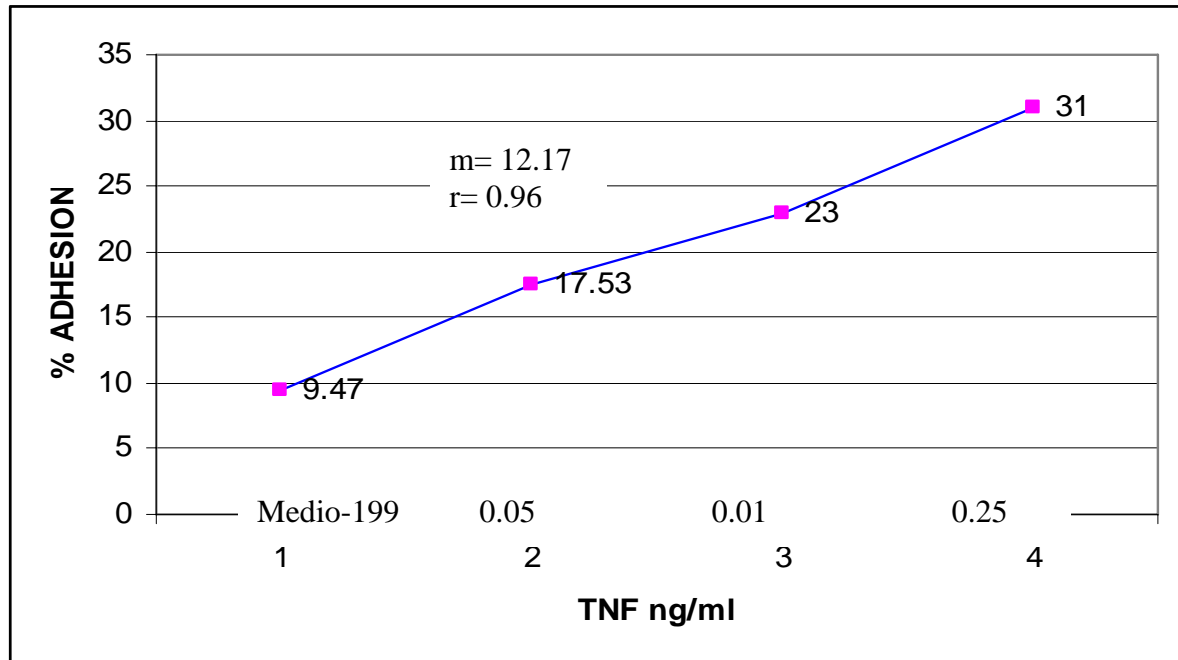


Figura 24.- Grafico con analisis de regresión lineal de un segmento de la curva de adhesión de TNF con las primeras cuatro concentraciones de TNF de la figura 20.

Se eligieron finalmente dos concentraciones, una de 0.1 y otra de 1 ng/ml, la primera lo suficientemente baja pero significativa (mínima activación en las condiciones del ensayo) que no presentara una activación tan fuerte que el FILM no pudiera afectarla y utilizamos otra de 1 ng/ml concentración mayor utilizada comúnmente en ensayos de adhesión (Estrada, 1998; Estrada, 2003; Frias, 2007; Galicia, 2007; Estrada, 2002) además esta concentración se había utilizado para activar células U937 expuestas simultáneamente a FILM a comienzos del 2007(Dr. Juan Velásquez UMIZ, 2006 y 2007 datos sin publicar aun).

### Efecto del FILM sobre la adhesión de células U937 a HUVEC'S

El objetivo final de esta tesis fue analizar el efecto del FILM sobre la activación endotelial a través de ensayos de adhesión con TNF a dos diferentes concentraciones de activación agregando el FILM simultáneamente o una hora antes de la activación. Cuando el FILM se añadió una hora antes o simultáneamente que el TNF no afectó significativamente la adhesión inducida por TNF a ninguna de las dos concentraciones utilizadas. Esto muestra que in vitro el péptido anti-inflamatorio FILM no tiene un efecto directo sobre la célula endotelial activada que se refleje en una disminución de su capacidad adhesiva.

### EFEECTO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA ENDOTELIAL DEL FILM

Actualmente, se desconoce el mecanismo o mecanismos que tiene el FILM para llevar a cabo su efecto anti-inflamatorio in vivo). Los efectos anti-inflamatorios in vitro e in vivo del FILM, obligaron a estudiar el efecto del FILM sobre el sistema de citocinas pro y anti-inflamatorias). Tratando de responder esta pregunta se encontró que en células estimuladas con PMA el FILM inhibe la expresión inducida del NO, de las quimiocinas pro-inflamatorias atrayentes de FM, MIP-1beta, MIP-1alfa, I-309 (pero no de RANTES, IL -8, MCP-1, linfotactina) y del receptor CCR1.

Los estudios complementarios realizados in vivo mostraron que el FILM nativo y su forma sintética, inhiben la hipersensibilidad retardada al DNCB y perturba el dúo adhesina-ligando VLA-4 VCAM-1 de la marginación y diapédesis de monocitos en piel de cobayos (Gimenez Scherer *et al.*, 1997; Gimenez-Scherer *et al.*, 2000; Gimenez-Scherer *et al.*, 2004). Esto origino el presente estudio in vitro.

El FILM sintético utilizado en este proyecto y cuya actividad se comprobó, fue capaz de disminuir los niveles de RNAm de moléculas de adhesión utilizadas como marcadores de la activación endotelial como son la selectina E, VCAM-1 e ICAM-1 si bien la disminución del RNAm no es sinónimo de una disminución de la proteína funcional, si nos dice que el péptido ejerce un efecto directo sobre el endotelio activado al disminuir la presencia del RNA m, ya sea por afectar parte de su transcripción o disminuir la estabilidad del mismo. Este efecto sobre las tres moléculas en intervalos distintos de tiempo que van de 0.5 a 6 horas corresponde a efectos rápidos del FILM similares al efecto sobre la expresión del mensajero de TNF e IL1 $\beta$  en células U937. (Resultados inéditos del Dr. Juan Velazquez, UIMZ, 2006). La sobre expresión de moléculas de adhesión es también un marcador de una respuesta inflamatoria alterada en muchas enfermedades, por tanto son ahora un blanco para nuevos fármacos anti-inflamatorios. También se han desarrollado anticuerpos contra receptores de moléculas de adhesión.

El decremento en la expresión de moléculas de adhesión sobre el endotelio por el FILM se añade al efecto que ejerce sobre las moléculas de adhesión de monocitos. Adicionalmente, el FILM disminuye la expresión de la contraparte de las moléculas de adhesión que se expresan en monocitos. Tal es el caso de la expresión de selectina L en la línea MRC-5 (2004) y de VLA-4 en sangre monocitos in vivo (1997).

Finalmente, el péptido mostró un efecto directo parcial sobre la activación endotelial, al abatir la expresión de moléculas de adhesión aunque no haya afectado la capacidad adhesiva del endotelio activado. Estos datos sugieren que in vivo deben existir más factores adicionales al FILM que ayudan a detener el proceso inflamatorio tardío observado in vivo y que in Vitro están ausentes.

### CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran por primera vez, que además de leucocitos humanos, células endoteliales humanas responden de manera directa *in vitro* al FILM. Por lo tanto, concluimos que dos de los tipos celulares relevantes en la reacción inflamatoria son afectados directamente por el penta péptido, fortaleciendo la idea de su acción anti-inflamatoria sobre diversos tipos celulares.

### PERSPECTIVAS

Esta tesis despierta nuevas y diversas inquietudes acerca de los efectos anti-inflamatorios del FILM sobre el endotelio. Por un lado si el FILM es capaz de disminuir la expresión de los mensajeros de moléculas de adhesión importantes en la adhesión, ya sea de fijación laxa como Selectina E o fijación firme como VCAM-1 e ICAM y no disminuye la capacidad adhesiva de las células endoteliales activadas, este efecto parcial podría vincular a otras moléculas de adhesión que no son afectadas en esas condiciones experimentales por el FILM. Falta por tanto complementar el estudio sobre cambios en la expresión del mensajero de estas moléculas en tiempos complementarios de 0.5, 1, 3 y 6 h que son los tiempos del ensayo de adhesión completo. Restaría medir algunas otras moléculas como Selectina P y citocinas como TNF e IL-1 así como las enzimas eNOS e iNOS relacionados al endotelio activado en todos estos tiempos y probablemente, colocar el FILM más de una hora antes para intentar neutralizar la activación endotelial del TNF. Por último, si el FILM es capaz de afectar directamente al endotelio podemos medir el efecto que pueda tener sobre el sistema de NF- $\kappa$ B ligado a la inflamación sobre el endotelio.

REFERENCIAS

1. Adriana EB. (1998). Efectos del TNF en la expresión de moléculas de adhesión en cultivos primarios de células endoteliales humanas. *Tesis de Maestría Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.*
2. Agustin ET, Febre E, Brody GM, Liamez A & Cunha BA. (1994). Clostridium septicum syndrome. *Annals of emergency medicine* **24**, 988-989.
3. Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, Tsujimoto H, Osada S, Takayama E, Seki S & Hiraide H. (2000). Activation of monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical stress. *World journal of surgery* **24**, 10-16.
4. Badimon L & Martinez-Gonzalez J. (2002). [Endothelium and vascular protection: an update]. *Revista española de cardiología* **55 Suppl 1**, 17-26.
5. Beacham DA, Wise RJ, Turci SM & Handin RI. (1992). Selective inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) binding site in von Willebrand factor by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* **267**, 3409-3415.
6. Bicknell AB, Savva D & Lowry PJ. (1996). Pro-opiomelanocortin and adrenal function. *Endocrine research* **22**, 385-393.
7. Carman CV, Jun CD, Salas A & Springer TA. (2003). Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1. *J Immunol* **171**, 6135-6144.
8. Casale TB, Erger RA & Little MM. (1993). Platelet-activating factor-induced human eosinophil transendothelial migration: evidence for a dynamic role of the endothelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **8**, 77-82.
9. Cockerill GW, Meyer G, Noack L, Vadas MA & Gamble JR. (1994). Characterization of a spontaneously transformed human endothelial cell line. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **71**, 497-509.
10. Coleman JW. (2001.). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* **Vol.1**, p.p. 1397-1406.
11. Collins M, Smith AA & Parker MI. (1998). Characterization of two distinct families of transcription factors that bind to the CCAAT box region of the human COL1A2 gene. *Journal of cellular biochemistry* **70**, 455-467.



12. Chan TM, Li FK, Tang CS, Wong RW, Fang GX, Ji YL, Lau CS, Wong AK, Tong MK, Chan KW & Lai KN. (2000). Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. Hong Kong-Guangzhou Nephrology Study Group. *The New England journal of medicine* **343**, 1156-1162.
13. Chang MC, Jeng JH, Cheong TC & Huang TF. (1995). The morphologic change of endothelial cells by anicrod-generated fibrin is triggered by alpha v beta 3 integrin binding and the subsequent activation of a G-protein coupled phospholipase C. *Biochimica et biophysica acta* **1269**, 115-121.
14. Chen H, Wu L, Chen Y & Wang B. (2001). [Effects of laminar shear stress on IL-8 mRNA expression in endothelial cells]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi* **18**, 64-67.
15. Chen Y, Chen H & Wu L. (2000). [Effect of lysophosphatidylcholine on endothelial cell surface expression of adhesion molecules]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi* **17**, 139-142.
16. Eshel R, Zanin A, Kapon D, Sagi-Assif O, Brakenhoff R, van Dongen G & Witz IP. (2002). Human Ly-6 antigen E48 (Ly-6D) regulates important interaction parameters between endothelial cells and head-and-neck squamous carcinoma cells. *International journal of cancer* **98**, 803-810.
17. Estrada AMMA, Mendoza-Milla Griselda, Zentella Dehesa Alejandro. (2003). Acetyl salicylic acid impedes human endothelial cell activation mediated by soluble products derived from a human lymphoma *Rev Oncol* **5 (8)**, 458-464.
18. Estrada BA. (1998). Efectos del TNF en la expresión de moléculas de adhesión en cultivos primarios de células endoteliales humanas. *Tesis de Maestría Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.*
19. Estrada BA. ( 2002). Productos solubles secretados por células tumorales inducen una activación endotelial dependiente de NFκB. *Tesis Doctorado, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.*
20. Feutren G & Bach JF. (1987). [Cyclosporin and autoimmune diseases. 1: Experimental bases]. *La Revue de medecine interne / fondee* **8**, 91-98.
21. Fleisher TA & Bleesing JJ. (2000). Immune function. *Pediatric clinics of North America* **47**, 1197-1209.

## REFERENCIAS

22. Frias GS. (2007). Caracterización de la adhesión de células metastásicas humanas a cultivos endoteliales humanos activados por factores solubles derivados de células tumorales. *Tesis de maestría en ciencias biológicas, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM.*
23. Fu Y, Filler SG, Spellberg BJ, Fonzi W, Ibrahim AS, Kanbe T, Ghannoum MA & Edwards JE, Jr. (1998). Cloning and characterization of CAD1/AAF1, a gene from *Candida albicans* that induces adherence to endothelial cells after expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Infection and immunity* **66**, 2078-2084.
24. Fukuda D, Yoshiyama M, Shimada K, Kawarabayashi T, Tanaka A, Ehara S, Nakamura Y, Akioka K, Takeuchi K & Yoshikawa J. (2004). Long-term beneficial effect of infarct-related artery patency in acute anterior myocardial infarction in patients with poor myocardial viability in the region-at-risk. *Circ J* **68**, 1110-1116.
25. Galicia G. (2007). Establecimiento de cultivos primarios de tumores de glándula mamaria derivados de lesiones primarias y secundarias: Caracterización Fenotípica y análisis de la interacción célula tumoral-endotelio. *Tesis de maestría en ciencias bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.*
26. Gao Y, Camacho LH & Mehta K. (2007). Retinoic acid-induced CD38 antigen promotes leukemia cells attachment and interferon-gamma/interleukin-1beta-dependent apoptosis of endothelial cells: implications in the etiology of retinoic acid syndrome. *Leukemia research* **31**, 455-463.
27. Garbacki N, Kinet M, Nuscgens B, Desmecht D & Damas J. (2005). Proanthocyanidins, from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. *Journal of inflammation (London, England)* **2**, 9.
28. Gibbs L, Carollo MG, Damazo AS, Oliani SM & Perretti M. (2002). Time-dependent expression of annexin 1 in a model of chronic granulomatous inflammation. *Inflamm Res* **51**, 300-306.
29. Gilchrist CA & Petri WA. (1999). Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Current opinion in microbiology* **2**, 433-437.
30. Gimenez-Scherer JA, Arenas E, Diaz L, Rico G, Fernandez J & Kretschmer R. (2000). Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* on the expression of cell adhesion molecules (CAMs) in the skin of guinea pigs. *Archives of medical research* **31**, S92-93.
31. Gimenez-Scherer JA, Cardenas G, Lopez-Osuna M, Velazquez JR, Rico G, Isibasi A, Maldonado Mdel C, Morales ME, Fernandez-Diez J & Kretschmer RR. (2004). Immunization with a tetramer derivative of an

## REFERENCIAS

- anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* protects gerbils (*Meriones unguiculatus*) against experimental amoebic abscess of the liver. *Parasite immunology* **26**, 343-349.
32. Gimenez Scherer JA, Rico G, Fernandez-Diez J & Kretschmer RR. (1997). Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNBC in guinea pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Archives of medical research* **28 Spec No**, 237-238.
33. Griffoni C, Spisni E, Strillacci A, Toni M, Bachschmid MM & Tomasi V. (2007). Selective inhibition of prostacyclin synthase activity by rofecoxib. *Journal of cellular and molecular medicine* **11**, 327-338.
34. Grubb BD, Riley RC, Hope PJ, Pubols L & Duggan AW. (1996). The burst-like firing of spinal neurons in rats with peripheral inflammation is reduced by an antagonist of N-methyl-D-aspartate. *Neuroscience* **74**, 1077-1086.
35. Grubb K, Gagandeep S, Chatzoulis G, Basa N, Palmer S, Correa A & Jabbour N. (2005). Surgical clips: a nidus for foreign body reaction after hepatic resection. *Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques* **15**, 363-365.
36. Hawiger J. (2001). Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunologic research* **23**, 99-109.
37. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG & Minick CR. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation* **52**, 2745-2756.
38. Key NS, Vercellotti GM, Winkelmann JC, Moldow CF, Goodman JL, Esmon NL, Esmon CT & Jacob HS. (1990). Infection of vascular endothelial cells with herpes simplex virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7095-7099.
39. Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, Lopez-Osuna M, Lecuona M, Castro EM & Arellano J. (1985). Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*. *Parasite immunology* **7**, 527-543.
40. Kretschmer R, Rico G & Gimenez JA. (2000). Isolation and structural studies of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica*. *Archives of medical research* **31**, S76-77.
41. Kretschmer RR, Castro EM, Pacheco G, Rico G, Diaz-Guerra O & Arellano J. (1991). The role of mannose in the receptor of the monocyte

## REFERENCIAS

- locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitology research* **77**, 374-378.
42. Kretschmer RR, Rico G & Gimenez JA. (2001). A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* **112**, 201-209.
  43. Laferriere J, Houle F & Huot J. (2004). Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin beta4. *Clinical & experimental metastasis* **21**, 257-264.
  44. Langston W, Chidlow JH, Jr., Booth BA, Barlow SC, Lefer DJ, Patel RP & Kevil CG. (2007). Regulation of endothelial glutathione by ICAM-1 governs VEGF-A-mediated eNOS activity and angiogenesis. *Free radical biology & medicine* **42**, 720-729.
  45. Lehman TJ & Onel K. (2000). Intermittent intravenous cyclophosphamide arrests progression of the renal chronicity index in childhood systemic lupus erythematosus. *The Journal of pediatrics* **136**, 243-247.
  46. Lopez-Marure R, Bernal AE & Zentella A. (1997). Interference with c-myc expression and RB phosphorylation during TNF-mediated growth arrest in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **236**, 819-824.
  47. Lopez-Marure R, Huesca-Gomez C, Ibarra-Sanchez Mde J, Zentella A & Perez-Mendez O. (2007). Dehydroepiandrosterone Delays LDL Oxidation In Vitro and Attenuates Several oxLDL-Induced Inflammatory Responses in Endothelial Cells. *Inflammation & allergy drug targets* **6**, 174-182.
  48. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Tanabe T, Irukayama-Tomobe Y, Goto K, Yamaguchi I & Matsuda M. (2002). Involvement of endogenous endothelin-1 in exercise-induced redistribution of tissue blood flow: an endothelin receptor antagonist reduces the redistribution. *Circulation* **106**, 2188-2193.
  49. Mateo T, Abu Nabah YN, Abu Taha M, Mata M, Cerda-Nicolas M, Proudfoot AE, Stahl RA, Issekutz AC, Cortijo J, Morcillo EJ, Jose PJ & Sanz MJ. (2006). Angiotensin II-induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different CC chemokines. *J Immunol* **176**, 5577-5586.
  50. Medzhitov JCJ. (2000). Advances in Immunology: Innate Immunity. *N Eng J Med* **343**, 338-344.
  51. Mendez-Cruz AR, Paez A, Jimenez-Flores R, Reyes-Realí J, Varela E, Cerbulo-Vazquez A, Rodriguez E, Lopez-Marure R, Masso FA, Flores-Romo L & Montano LF. (2007). Increased expression of inflammation-

- related co-stimulatory molecules by HUVECs from newborns with a strong family history of myocardial infarction stimulated with TNF-alpha and oxLDL. *Immunology letters* **111**, 116-123.
52. Millan J, Williams L & Ridley AJ. (2006). An in vitro model to study the role of endothelial rho GTPases during leukocyte transendothelial migration. *Methods in enzymology* **406**, 643-655.
53. Mok CC, Wong RW & Lau CS. (1999). Lupus nephritis in Southern Chinese patients: clinicopathologic findings and long-term outcome. *Am J Kidney Dis* **34**, 315-323.
54. Muller WA. (2002). Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **82**, 521-533.
55. Muller WA. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology* **24**, 327-334.
56. Nachman RL & Jaffe EA. (2004). Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *The Journal of clinical investigation* **114**, 1037-1040.
57. Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, Masuda H, Nitta N, Asahara T & Isobe M. (2007). Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 512-518.
58. Onat D, Jelic S, Schmidt AM, Pile-Spellman J, Homma S, Padeletti M, Jin Z, Le Jemtel TH, Colombo PC & Feng L. (2007). Vascular Endothelial Sampling and Analysis of Gene Transcripts: a New Quantitative Approach to Monitor Vascular Inflammation. *J Appl Physiol*.
59. Oppliger A, Naciri-Graven Y, Ribi G & Hosken DJ. (2003). Sperm length influences fertilization success during sperm competition in the snail *Viviparus ater*. *Molecular ecology* **12**, 485-492.
60. Otsuka G, Nagaya T, Saito K, Mizuno M, Yoshida J & Seo H. (1999). Inhibition of nuclear factor-kappaB activation confers sensitivity to tumor necrosis factor-alpha by impairment of cell cycle progression in human glioma cells. *Cancer research* **59**, 4446-4452.
61. Perez-Tamayo R, Martinez-Villegas JE & Perez-Montfort R. (1986). [Effect of cellular immunity on the interaction between the peritoneal cell and the ameba in vitro]. *Archivos de investigacion medica* **17 Suppl 1**, 259-267.
62. Perretti M, Chiang N, La M, Fierro IM, Marullo S, Getting SJ, Solito E & Serhan CN. (2002a). Endogenous lipid- and peptide-derived anti-

- inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nature medicine* **8**, 1296-1302.
63. Perretti M, Ingegnoli F, Wheller SK, Blades MC, Solito E & Pitzalis C. (2002b). Annexin 1 modulates monocyte-endothelial cell interaction in vitro and cell migration in vivo in the human SCID mouse transplantation model. *J Immunol* **169**, 2085-2092.
64. Prasad CK & Krishnan LK. (2007). Regulation of endothelial cell phenotype by biomimetic matrix coated on biomaterials for cardiovascular tissue engineering. *Acta Biomater.*
65. Rico G, Diaz-Guerra O, Gimenez-Scherer JA & Kretschmer RR. (1992). Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. *Archives of medical research* **23**, 157-159.
66. Rico G & Kretschmer RR. (1997). The monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica* fails to affect the locomotion and the respiratory burst of human eosinophils in vitro. *Archives of medical research* **28 Spec No**, 233-234.
67. Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenez J & Kretschmer R. (2000). The effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon nitric oxide production by human leukocytes. *Archives of medical research* **31**, S90-91.
68. Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenez JA & Kretschmer RR. (2003). The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitology research* **90**, 264-267.
69. Ryan US & Ryan JW. (1984). Cell biology of pulmonary endothelium. *Circulation* **70**, III46-62.
70. Shiff SJ & Rigas B. (1999). Aspirin for cancer. *Nature medicine* **5**, 1348-1349.
71. Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S & Aggarwal BB. (2003). Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I $\kappa$ B kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer research* **63**, 4375-4383.
72. Sibbald B. (2006). Ibuprofen redux. *Cmaj* **175**, 858.

73. Smith JD, Yacoub MH & Rose ML. (1998). Endothelial cell activation by sera containing HLA antibodies is mediated by interleukin-1. *Transplantation* **66**, 1229-1237.
74. Soszynski D. (2004). ["Sickness behavior"--mechanisms of origin and significance]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* **58**, 74-82.
75. Spellberg B & Edwards JE, Jr. (2001). Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* **32**, 76-102.
76. Stankova J, Rola-Pleszczynski M & D'Orleans-Juste P. (1995). Endothelin 1 and thrombin synergistically stimulate IL-6 mRNA expression and protein production in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* **26 Suppl 3**, S505-507.
77. Stoclet JC, Andriantsitohaina R, L'Heureux N, Martinez C, Germain L & Auger F. (1996). Use of human vessels and human vascular smooth muscle cells in pharmacology. *Cell biology and toxicology* **12**, 223-225.
78. Tanaka R, Yoshikawa N, Kitano Y, Ito H & Nakamura H. (1993). Long-term ciclosporin treatment in children with steroid-dependent nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **7**, 249-252.
79. Underhill DMyAO. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* **20**, 825-852.
80. Utrera-Barillas D, Velazquez JR, Enciso A, Cruz SM, Rico G, Curiel-Quesada E, Teran LM & Kretschmer RR. (2003). An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. *Parasite immunology* **25**, 475-482.
81. Vane JR, Anggard EE & Botting RM. (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England journal of medicine* **323**, 27-36.
82. Watson R. (2006). European Medicines Agency gives favourable ruling on NSAIDs. *BMJ (Clinical research ed)* **333**, 873.
83. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, Jackson CG, Lange M & Burge DJ. (1999). A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *The New England journal of medicine* **340**, 253-259.
84. Zhang X, Wojcikiewicz EP & Moy VT. (2006). Dynamic adhesion of T lymphocytes to endothelial cells revealed by atomic force microscopy. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* **231**, 1306-1312.

## REFERENCIAS

85. Zohlnhofer D, Brand K, Schipek K, Pogatsa-Murray G, Schomig A & Neumann FJ. (2000). Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1beta-dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**, 353-359.