

55  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-  
ALFA (TNF- $\alpha$ ) EN LA EXPRESION DE MOLECULAS  
DE ADHESION EN CULTIVOS PRIMARIOS DE  
CELULAS ENDOTELIALES HUMANAS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G A**

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

**ADRIANA            ESTRADA            BERNAL**

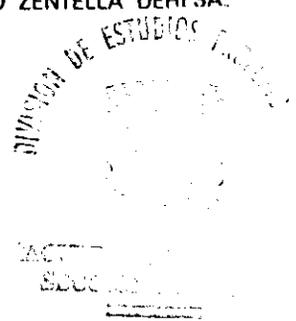


**DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA.**

**1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**258378**





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"EFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ) EN LA EXPRESION DE MOLECULAS  
DE ADHESION EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS ENDOTELIALES HUMANAS"

realizado por ADRIANA ESTRADA BERNAL

con número de cuenta 9350465-8 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Propietario Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña  
Propietario Dra. Luisa Alba Lois  
Suplente Dra. Georgina Garza Ramos  
Suplente M. en C. Víctor Manuel Valdés López

*Alejandro Zentella Dehesa*  
*Ma. Luisa Fanjul Peña*  
*Luisa Alba Lois*

*Georgina Garza Ramos*  
FACULTAD DE CIENCIAS  
*Víctor Manuel Valdés López*

*Alejandro Martínez Mena*  
Consejo Departamental de Biología  
M. en C. ALEJANDRO MARTÍNEZ MENA



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología  
Celular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM,  
bajo la dirección del  
Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Durante la realización de este trabajo se contó  
con el apoyo económico del CONACyT  
al proyecto 400346-5-3161PN

Durante la realización de este trabajo  
Adriana Estrada Bernal  
contó con el apoyo económico del  
Programa de Becas para Tesis de Investigación  
(PROBETEL) de la Coordinación  
de Programas Académicos, UNAM

“El verdadero acto del descubrimiento no consiste en encontrar nuevas tierras, sino en ver con otros ojos”

MARCEL PROUST

## **A DIOS**

que me ha dado la fortaleza  
para terminar este ciclo e iniciar  
un nuevo camino.....

## **A MIS PADRES**

por que sin sus enseñanzas, apoyo  
y sobretodo su amor, no hubiera podido  
llegar hasta este momento..... simplemente  
GRACIAS....

## **A MIS HERMANAS**

por su cariño y su presencia en  
cada momento de mi vida....indispensable  
para seguir caminando....

## **A RICARDO**

gracias por el apoyo,  
el cariño, la confianza...  
pero sobretodo....por siempre estar ahí...

## AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por su apoyo incondicional.....

Al amigo (Gaby), las manas (Susana y Laura Elena) y la mamá postiza Susana... por siempre estar ahí para compartir tantos momentos de mi vida...

A Fa, Carlos y Andrea por su cariño, apoyo y los largos fines de semana.....

A todos mis compañeros de la Facultad, que hicieron la estancia mucho más placentera y divertida...en especial a Leo, Anita, Alejandro, Lina, Petus, Roger, Gerardo, Moisés y Anarella.

Al Dr. Alejandro Zentella, por meterme el gusanito de la investigación y por aceptar guiar mis pasos en este camino....

A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Zentella..en particular a la Madre, por las largas pláticas y las largas horas de trivias....a Pilar, por siempre contar con ella...a José Luis, sin cuya asesoría técnica no hubiera podido terminar, pero también por su apoyo y amistad....a Rebe, por su apoyo y por enseñarme el fascinante mundo del hospital y los cordones umbilicales...a Rocio C. por su apoyo siempre....

A Rocío Alcántara, por su apoyo y amistad....gracias.....

A toda la gente del IFC que de alguna manera influyó para que este trabajo pudiera ser terminado...a Alma por la lata....a Tere y Erika por las porras....a Ere por emocionarse con este trabajo....

A la Unidad de Computo del IFC en especial al amiguito Juan Barbosa, que sin su ayuda las horas en la computadora hubieran sido largas...y las imagenes nunca se hubieran terminado....

A Humberto por el apoyo en el análisis de los geles...

A las compañeras del curso de milagros...cuyas experiencias hicieron más fácil el inicio a este nuevo camino....

A los sinodales:

Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña

Dra. Luisa Alba Lois

Dra. Georgina Garza Ramos

M. en C. Víctor Valdez López

por aceptar ser parte de este logro y por sus valioso comentarios

## INDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )	4
Estructura y origen	4
Efectos biológicos	6
Transducción de la señal	7
Efectos del TNF- $\alpha$ en las células endoteliales	8
Moléculas de Adhesión	10
Selectinas	10
Superfamilia de Inmunoglobulinas	12
Integrinas	14
Función de los receptores de adhesión en el tráfico de leucocitos	17
TNF- $\alpha$ , células endoteliales y la expresión de moléculas de adhesión	20
Moléculas de adhesión y metástasis	26
JUSTIFICACIÓN	30
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y METODOS	32
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	59
CONCLUSION GENERAL	68
BIBLIOGRAFÍA	70
APÉNDICE	81

## ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELAM-1	Molécula de adhesión endotelial de leucocitos 1
G1	Fase gap 1 del ciclo celular
H7	1-(5-isoquinolinsulfonil)-2-metilpiperazine
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
I $\kappa$ B	Inhibidor del factor de transcripción nuclear de la cadena $\kappa$ de anticuerpos de células B
NF $\kappa$ B	Factor de transcripción nuclear de la cadena $\kappa$ de anticuerpos de células B
S	Fase de síntesis de DNA del ciclo celular
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR1	Receptor del TNF tipo 1
TNFR2	Receptor del TNF tipo 2
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares

## RESUMEN

Durante el proceso inflamatorio los macrófagos circulantes liberan factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) cuyo primer blanco son las células endoteliales, induciendo entre otras respuestas la expresión de moléculas de adhesión. El reclutamiento de leucocitos de la sangre es una de las respuestas celulares al daño tisular y a la inflamación, y es central para el tráfico fisiológico de linfocitos de la sangre a través de la monocapa del endotelio vascular a los tejidos. Las moléculas de adhesión regulan y ayudan a dirigir este tipo de interacción leucocito-endotelio, sin embargo, este proceso de adhesión y extravasación puede ser utilizado también por células tumorales malignas durante la metástasis. En éste estudio empleamos células endoteliales humanas de vena umbilical, como modelo, para determinar la participación de las moléculas de adhesión y del TNF- $\alpha$  en la adhesión de la línea celular U937, derivada de un mieloma humano.

Se montaron cultivos primarios de células endoteliales derivadas de cordones umbilicales humanos que fueron tratados con TNF- $\alpha$  por distintos períodos, evaluando niveles de RNAm y de proteína de tres moléculas de adhesión (selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1). También se evaluó la adhesión de la línea promielocítica U937 a cultivos endoteliales tratados con TNF- $\alpha$ .

Se demostró que el TNF- $\alpha$  induce aumentos en los transcritos de las tres moléculas de adhesión estudiadas. El porcentaje de adhesión aumentó a mayores concentraciones de TNF- $\alpha$  llegando a triplicar la adhesión basal; sin embargo, éste efecto es transitorio ya que a tiempos largos de tratamiento el porcentaje de adhesión disminuye. Esta adhesión pudo bloquearse con anticuerpo neutralizantes dirigidos contra selectina-E o VCAM-1, así como por un inhibidor de seriltreonil cinasas.

En conjunto estos resultados muestran que el TNF- $\alpha$  puede promover adhesión de promielocitos humanos a endotelios primarios y que éste proceso requiere de seriltreonil cinasas y de la expresión endotelial de selectina-E y VCAM-1, apoyando la hipótesis de que la activación endotelial mediada por TNF- $\alpha$  puede participar en el proceso de metástasis *in vivo*.

## INTRODUCCIÓN

Las células endoteliales recubren el interior de los vasos y constituyen la interfase física y fisiológica entre el torrente sanguíneo y los tejidos, funcionando como transmisoras o intermediarias de las señales entre los dos medios.

Más de  $10^{12}$  células endoteliales se encuentran recubriendo todos los vasos sanguíneos cubriendo un área de más de  $1000 \text{ m}^2$ . No sólo son los elementos estructurales básicos de los vasos, que proporcionan una superficie antitrombogénica, sino que además participan en numerosas funciones metabólicas incluyendo la coagulación y la trombosis, el control de la dilatación vascular y la presentación de antígenos. El endotelio está constituido por una población heterogénea de células que no sólo varía de órgano a órgano sino también en vasos de distintos calibres dentro de un mismo órgano.

En el adulto normal las células endoteliales están en un estado latente con una actividad metabólica muy baja (Risau, 1995), a estas células se les identifica como el fenotipo constitutivo; sin embargo, éste fenotipo no es permanente ya que se puede perder cuando las células son sacadas de su microambiente (Fig. 1). Fisiológicamente, las células endoteliales salen de su estado latente cuando son activados por diversos estímulos. Esta activación está asociada a diversos cambios fenotípicos que les permiten adaptarse a las funciones locales requeridas. Uno de estos estados de activación permite la angiogénesis, proceso en el que las células se pueden separar de vasos existentes para entrar a una compleja cascada morfogénica que lleva a la formación de nuevos vasos con células endoteliales maduras. Otro estado de activación es inducido por endotoxinas bacterianas y citocinas como  $\text{TNF-}\alpha$  ó  $\text{IL-1}$ , durante el proceso de inflamación, fenómeno que lleva a una secuencia de sucesos caracterizados por la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular, como la selectina-E (o ELAM-1), ICAM-1 y VCAM-1. Estas moléculas de adhesión permiten la adhesión laxa entre leucocitos y células endoteliales facilitando la migración sobre la superficie endotelial, proceso

denominado "rolling", al cual siguen la adhesión firme y la migración de leucocitos a través de la monocapa endotelial (Augustine, 1994).

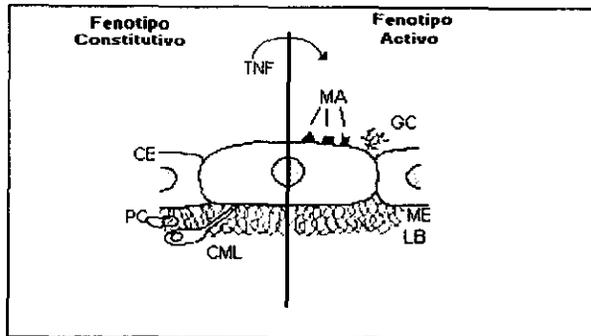


Fig 1. Inducción del fenotipo activo por el TNF- $\alpha$ . **Fenotipo constitutivo** (izquierda): mantenido por regulación paracelular mediada por pericitos, células del músculo liso, hepatocitos o atrociitos. Este fenotipo es modulado por la matriz extracelular. **Fenotipo activo** (derecha): inducido por citocinas como TNF- $\alpha$ , caracterizado por la expresión de moléculas de adhesión, agiogénesis asociada a cambios en la expresión de glicoproteínas, expresión de receptores de factores de crecimiento, cambios en el balance proteolítico y la inducción de genes de estrés. CE: célula endotelial; PC: pericito; CML: célula de músculo liso; MA: moléculas de adhesión; GC: glicoproteínas; ME: matriz extracelular; LB: lámina basal; TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa. (Modificado de Augustin et al, 1994).

El fenómeno de activación endotelial se presenta principalmente en la capa microvascular (precapilares, capilares y venulas postcapilares) y requiere de cambios de expresión génica. A pesar de la heterogeneidad entre las células endoteliales, los mecanismos de activación y regulación de las moléculas de adhesión y otros genes característicos de éste estado de activación endotelial son los mismos. Se ha propuesto que estos distintos estados de activación representan diferentes estados de diferenciación del endotelio (Risau, 1995).

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es una citocina que tiene un papel clave en la respuesta inflamatoria, induciendo un amplio espectro de actividades proinflamatorias tanto en las células endoteliales como en leucocitos (Fig. 2), y ha sido implicado en el desarrollo de varias enfermedades entre las

que destacan los procesos reumatoides (Sherry et al, 1990). La localización estratégica del endotelio en la interfase entre la sangre y los tejidos lo convierte en un importante blanco primario del TNF- $\alpha$  y otras citocinas.

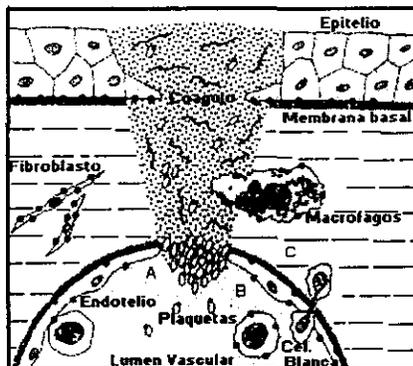


Fig. 2. Participación del endotelio en procesos inflamatorios. A) El esquema representa un daño tisular y vascular que inicialmente presenta un coágulo. Los macrófagos residentes y fibroblastos locales secretan factores tisulares y citocinas, que llevan a una secuencia de activación del endotelio y de las células blancas; B) Adhesión y extravasación de leucocitos a el área dañada C) Las citocinas liberadas por macrófagos se acumulan en este sitio de daño ocasionando una regulación positiva de los receptores de adhesión, promoviendo la migración de más leucocitos al sitio lesionado. (tomado de Albelda et al, 1990)

La liberación local del TNF- $\alpha$  activa los procesos antes mencionados, pero cuando ésta citocina se libera sistémicamente durante el desarrollo de septicemias es capaz de producir choque séptico que puede llevar a la muerte. Entre las principales alteraciones que se presentan durante el choque séptico se encuentran la hipotensión, la disminución en la resistencia del sistema vascular, elevación del índice cardíaco y depresión miocárdica. El TNF- $\alpha$  también puede ser secretado cuando el organismo sufre traumatismos que producen daño tisular y/o vascular tales como una herida o durante la arteriosclerosis y desórdenes de angiogénesis incluyendo neovascularización y microangiopatía diabética, en los cuales la célula endotelial juega un papel central. En estos procesos, los macrófagos migran al lugar del desorden donde se activan y

secretan TNF- $\alpha$  al torrente sanguíneo teniendo su efecto más significativo sobre las células endoteliales de la microvasculatura.

### **FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )**

El TNF- $\alpha$  pertenece a la familia de las citocinas y es un mediador pleiotrópico con actividades pro-inflamatorias e inmunoregulatoras importantes para la defensa del organismo. Recientemente también se ha demostrado que juega un papel esencial en el desarrollo de estructuras en los órganos linfoides (Von Boehmer, 1997). Existen dos tipos de TNF, la molécula alfa y la molécula beta (TNF- $\beta$ ), codificados por dos genes que se expresan en diferentes linajes de leucocitos. Ambas formas de TNF tienen propiedades y funciones muy similares, sólo que el TNF- $\alpha$  es producido por macrófagos activados y el TNF- $\beta$  por linfocitos activados (Aiyer et al, 1988).

#### **Estructura y origen**

El TNF- $\alpha$  es un polipéptido de 157 aminoácidos de 17 kDa, que fue aislado a homogeneidad como una glicoproteína a partir de medio condicionado por células de la línea promielocítica HL-60, las cuales habían sido previamente tratadas con ésteres de forbol (Aggarwal, 1985; Ayres, 1988). Después de haber sido sintetizada, la proteína pasa por distintos estadios de glicosilación (Sherry et al, 1990), sin que aun se conozca la relevancia fisiológica del último estado de glicosilación ya que el TNF- $\alpha$  recombinante producido en bacterias posee una actividad biológica similar al nativo. La estructura primaria del TNF- $\alpha$  fue determinada a partir de la proteína pura y la secuencia obtenida es idéntica a la que predice la secuencia de nucleótidos del RNAm (Pennica et al, 1988). Se ha encontrado una forma de TNF de 26 kDa unido a la membrana plasmática; este pre-TNF posee una secuencia de 76 residuos de aminoácidos altamente hidrofóbicos, lo que sugiere que esta le sirve como secuencia señal al TNF para insertarse en la membrana y posteriormente ser liberado en su forma de 17kDa (Kriegler et al, 1988). En estudios in vitro con la línea celular de macrófagos

murinos RAW309 se ha identificado una proteasa asociada a la membrana celular que en respuesta a los estímulos con ésteres de forbol hidroliza al pre-TNF liberando la forma activa de la molécula (Pandiella & Masagué, 1993).

En su forma activa el TNF- $\alpha$  es un homotrímero de aproximadamente 45 kDa y cada subunidad tiene un peso de 17 kDa. Estudios cristalográficos han corroborado su naturaleza trimérica, la cual resulta de un arreglo en hojas  $\beta$ -plegadas antiparalelas. El TNF- $\alpha$  es muy sensible a la actividad de proteasas, perdiendo su actividad biológica rápidamente, lo que sugiere una estructura terciaria poco compacta. (Arakawa et al, 1987; Goeddel et al, 1986).

El TNF- $\alpha$  es producido principalmente por macrófagos activados, aunque también puede ser secretado por células asesinas naturales (NKs), células linfoblásticas B, astrocitos, células de la granulosa y ciertos tipos de tumores de ovario y de mama (Garret et al, 1987; Ayrer et al, 1988; Goeddel et al, 1986). La producción *in vivo* de TNF- $\alpha$  es desencadenada por una amplia variedad de estímulos, entre los que destacan los lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas, antígenos virales y de protozoarios, mitógenos, algunas citocinas, antígenos y/o productos solubles de células tumorales y ésteres de forbol (Cuturi et al, 1987).

El TNF- $\alpha$  se enlaza a receptores específicos presentes sobre las membranas celulares en la mayoría de los tejidos (Stauber et al, 1988). Existen 2 tipos de receptores diferentes entre sí, que enlazan al TNF- $\alpha$  con alta afinidad: uno de 55 kDa (p55) y otro de 70-80 kDa (p75) (Hohmann et al, 1989)(Fig. 3) A estos receptores también se puede unir con gran afinidad la linfoxina alfa ( $L\alpha$ ), un homotrímero de TNF- $\beta$  (Von Boehmer, 1997). Se ha propuesto que p55, también denominado receptor a TNF tipo I (TNFR I), tiene una papel crítico en la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ , por lo que se considera que es el encargado de regular la citotoxicidad (Heller et al, 1992), mientras que el receptor p70 o TNFR II, juega un papel decisivo en la defensa del organismo contra microorganismos patógenos (Pfeffer et al, 1993).

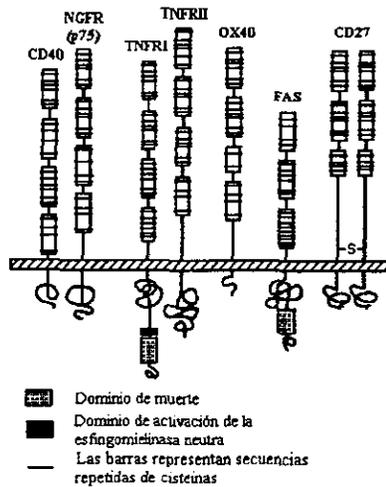


Fig. 3. Familia de receptores de TNF- $\alpha$ . Los receptores a TNF son el receptor tipo I (TNFR1) y el tipo II (TNFR2). El receptor FAS comparte el dominio de muerte con el TNFR1. Otros miembros de la familia son los antígenos CD40 y CD27 así como OX40. En base a la presencia de repeticiones de cisteínas el receptor al factor de crecimiento neural (NGFR) p75 también se agrupa dentro de ésta familia.

### Efectos Biológicos

El interés original del TNF- $\alpha$  deriva de estudios de una actividad antitumoral presente en el suero de animales con infecciones sistémicas (Carswell et al, 1975). Como ya se ha mencionado el TNF- $\alpha$  es un mediador primario endógeno, responsable de la patogénesis que acompaña a la infección sistémica, y que sirve como un mediador crucial en el choque séptico o endotóxico (Beutler, 1992). Paradójicamente, también participa en procesos benéficos de la defensa del organismo y en el mantenimiento de la homeostasis del tejido (Tracey et al, 1989). Induce una gran variedad de respuestas celulares: promueve o inhibe la proliferación, induce citotoxicidad y es capaz de inducir o prevenir la diferenciación celular (Donato et al, 1989; Marino et al, 1989). *In vitro*, el TNF- $\alpha$  estimula la proliferación de fibroblastos diploides normales; sin embargo, en líneas celulares transformadas, como la A-439,

inhibe la proliferación mientras que en otras líneas como MCF-7 o L-929 induce citotoxicidad (Sugarman et al, 1985; Gómez et al, 1996).

### **Transducción de la señal**

La secuencia de sucesos que siguen a la interacción del TNF- $\alpha$  con sus receptores aún no se entiende completamente. Observaciones recientes en varias líneas celulares sugieren la participación de 4 etapas:

1) La formación de complejos proteicos que incluyen los receptores tipo I y II (p55 y p75), proteínas acopladoras como FADD, TRADD y proteínas cinasas como RIP o proteasas de la familia de las caspasas como FLICE. Recientemente se ha determinado que en esta primera etapa es en donde se enciende más de una vía de transducción. Una asociada a la muerte celular por apoptosis que depende de FLICE, y una asociada a los cambios de expresión génica que depende de RIP. Se ha identificado a una proteína denominada FAN cuya unión al receptor tipo I media la activación de una esfingomielinasa.

2) Un aumento del recambio de esfingolípidos de membrana que da origen a segundos mensajeros como la ceramida.

3) La rápida activación de cascadas de transducción en las que participan proteínas cinasas como JUNK y la proteasa cinasa dependiente de ceramida CAPK, proteínas fosfatasa del tipo 2A y proteasas solubles de la familia de la convertasa de interleucina 1 (ICE).

4) La activación de transcripción mediada por factores de transcripción como NF $\kappa$ B y AP-1 que llevan a cambios en la expresión génica.

5) Paralelo a estos cambios de la fisiología celular se produce un aumento en la producción de radicales libres y consecuentemente estrés oxidativo. La cadena respiratoria mitocondrial es un componente importante para la generación de éste estrés, aunque también se ha reportado la activación de oxidasas citoplasmáticas. Se ha propuesto que este estrés también forma parte de la transducción de la señal dependiente del receptor tipo I. (Fig. 4)

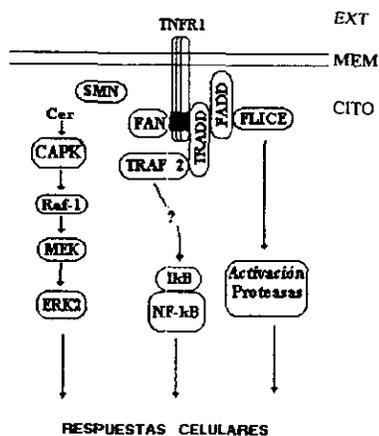


Fig. 4. Representación esquemática de las señales de transducción desencadenadas por el receptor p55 de TNF (TNFR1). SMN, esfingomielinasa neutra; Cer, ceramida; MEK, proteína cinasa de MAPK (mitogen activated protein kinase; NFκB, factor de transcripción de la cadena κ de anticuerpos producidos por células B; FLICE, proteasa de la familia de las caspasas que presenta un dominio de muerte; TRAF2, factor asociado al receptor tipo II de TNF; CAPK, proteína cinasa dependiente de ceramida; FAN, factor asociado al dominio de SMN; ERK2, proteína cinasa regulada por señales; IκB, inhibidor de NFκB; FADD, proteína asociada al dominio de muerte de FAS; TRADD, proteína asociada al dominio de muerte del receptor de TNF tipo I; CITO, citoplasma; MEM, membrana; EXT, extracelular.

### Efectos del TNF-α en las células endoteliales

La célula endotelial juega un papel importante en la regulación de la permeabilidad e integridad de los vasos sanguíneos, consecuentemente cambios en la función de éstas células modifican las características morfológicas y funcionales de la vasculatura (Bevilacqua et al, 1986; Detmar et al, 1990). Se han realizado análisis por citometría de flujo que demuestran que las células endoteliales presentan los dos tipos de receptores para el TNF-α (Slowik et al, 1993): por lo que se asume que todos los efectos del TNF-α sobre la célula endotelial están mediados a través de ellos. El TNF-α promueve el proceso pro-inflamatorio y de neovascularización (Haliday et al, 1991). Es capaz

de inducir cambios en la distribución y densidad de filamentos de actina y redistribución en la red de las fibras (Molony-Armstrong, 1991), cambios que podrían estar asociados a los cambios morfológicos necesarios para permitir la extravasación de linfocitos (Modur et al, 1996). Por otro lado el TNF- $\alpha$  induce la expresión de factores procoagulantes, como el factor procoagulante del tejido (TF) (Tijburg, et al, 1991), el inhibidor del activador de plasminógeno tipo I (PAI) (Van Hinsberg et al, 1990), y el factor activador de plaquetas (PAF) (Aderka, 1991); por otra parte, regula la trombosmodulina por lo que previene la formación de proteína C. También es capaz de inhibir la producción del activador de plasminógeno de tejidos (t-PA), por lo que altera los mecanismos normales anticoagulantes.

Cuando las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) son tratadas con TNF- $\alpha$  aumentan la expresión de transcritos que codifican los componentes de NF $\kappa$ B, 50/p105 y p65, así como del proto-oncogen c-rel (Read et al, 1994), la enzima MnSOD (superóxido dismutasa dependiente de manganeso) (Wong-Goeddel, 1988). También induce la expresión de moléculas de adhesión celular, como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), selectina-E, antes también llamada molécula de adhesión endotelial de leucocitos1 (ELAM-1), la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) (Heyward et al, 1995) y los antígenos de histocompatibilidad PMN (Cdw18) y HLA-DR (Ritchie et al, 1991; Aderka, 1991; Detmar et al, 1990; Doukas-Pober, 1990) así como la expresión de proteínas de estrés como Hsp70 y A20 (Wolf et al, 1992; Krikos et al, 1992).

Es importante mencionar que el TNF- $\alpha$  interfiere con la proliferación de células endoteliales humanas (Wong-Goeddel, 1988; López-Marure et al, 1997; Sato et al, 1986.); mientras que en cultivos primarios de células endoteliales de bovino, induce muerte masiva produciendo cambios ultraestructurales característicos de apoptosis (Robaye et al, 1991), induce retracción celular, activación de fosfolipasa A2 y síntesis de eicosanoides (Clark et al, 1988).

## MOLECULAS DE ADHESIÓN

### Selectinas

La familia de selectinas está formada por tres moléculas de superficie íntimamente relacionadas: selectina-L (MEL-14, LAM-1, CD62L), selectina-E (ELAM-1, CD62E), y selectina-P (PADGEM, CMP-140, CK62P). Todas ellas comparten como característica particular de la familia, un dominio de lectina dependiente de calcio en el amino-terminal, un dominio semejante al del factor de crecimiento epidérmal (EGF) y de dos a nueve secuencias repetitivas consenso (SCR), que son unidades homólogas a dominios encontrados en las proteínas complementarias (Fig. 5).

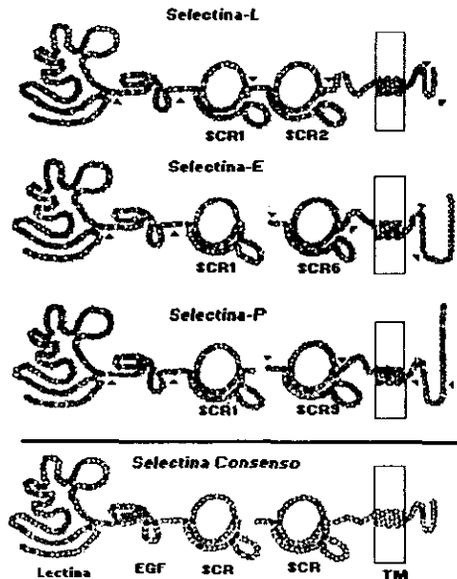


Fig. 5. Conservación de la estructura general de la familia de selectinas. Se muestran los dominios de lectina, el dominio semejante al factor de crecimiento epidérmal (EGF), pequeñas secuencias consenso repetitivas (SCR) y el dominio transmembranral (TM). Las flechas indican los bordes de los dominios determinados por la unión de los exones. Sólo el primero y el últimos de los SCR de las selectinas P y E se muestran con la estructura presente en humanos (Tomado de Tedder, 1995).

La estructura cristalográfica de los dominios de lectina y EGF de la selectina-E humana han sido determinados, mostrando que son dominios distintos con asociaciones limitadas entre sí. Sin embargo, los dominios de EGF y SCR juegan un papel importante en la adhesión celular, mientras que los dominios de lectina y el EGF determinan la especificidad en la unión del ligando. La acción cooperativa de los dos dominios puede explicar el hecho de que los ligandos y la especificidad de las selectinas sean diferentes. Se sugiere que los dominios SCR contribuyen indirectamente a la adhesión sirviendo como elementos estructurales necesarios para la presentación de los dominios EGF-lectina. El número de dominios SCR varía según el tipo de selectina. Por ejemplo, las selectinas humanas difieren de la siguiente manera: la selectina-L tiene dos dominios SCR, la selectina-E tiene seis y la selectina-P tiene nueve (Tedder, 1995) (Fig 5).

Varias observaciones sugieren que en el reconocimiento de los ligandos de las selectinas participa una molécula de carbohidrato. La presencia de un dominio de lectina en el NH<sub>2</sub> terminal de la selectina facilita el acceso a las moléculas de carbohidratos presentes en los leucocitos. Las interacciones lectina-carbohidrato generalmente son dependientes de calcio como son las interacciones mediadas por selectinas. La gran variedad de estructuras determinadas por los carbohidratos contribuyen al alto grado de especificidad de las interacciones célula-célula (Larsen, 1995; McEver et al, 1995).

Por otra parte, la expresión de selectina-L está limitada a las células hematopoyéticas, mientras que la selectina-P se encuentra constitutivamente en los cuerpos de Weibel-Plade de las células endoteliales y en plaquetas. La producción de selectina-E por parte de las células endoteliales es inducida de manera rápida e intensa por una variedad de mediadores inflamatorios, incluyendo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interferón- $\gamma$ , sustancia P y lipopolisacáridos.

De particular interés resulta el estudio de la selectina-E siendo la única que es inducida por citocinas durante los procesos inflamatorios; la selectina-E

regula la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular activado y puede funcionar como un receptor local específico para las células T (Tedder, 1995).

### **Superfamilia de Inmunoglobulinas**

La superfamilia de receptores de inmunoglobulinas esta definida por la presencia de un dominio de inmunoglobulina, que está compuesto de 70 a 100 aminoácidos arreglados en una estructura característica. Este grupo de receptores es muy variado, y comprende desde receptores solubles del antígeno de las células T o receptores unidos a membrana, hasta moléculas de adhesión de una sola cadena. En este trabajo nos enfocaremos principalmente sobre ICAM-1 y VCAM-1 que se ha demostrado participan en la adhesión firme de los leucocitos a la célula endotelial y en su entrada a los tejidos (Fig. 6).

La distribución de estas moléculas está asociado a su función en la adhesión específica célula-célula. ICAM-1 se expresa constitutivamente sólo en algunos tipos celulares; por el contrario, en los lugares donde existe una respuesta inflamatoria ICAM-1 es inducida de manera transitoria en una variedad de tipos celulares. Siendo el receptor de las integrinas de los leucocitos, LFA-1 y Mac-1, la inducción de ICAM-1 tiene un importante significado en el reclutamiento de leucocitos en sitios de inflamación. LFA-1 se une principalmente al primer dominio de inmunoglobulina mientras que Mac-1 se une al tercero. ICAM-2, una molécula muy relacionada a ICAM-1 presenta dos dominios de inmunoglobulinas y es otro ligando para LFA-1, ICAM-2 se expresa constitutivamente en células endoteliales y en células sanguíneas. A esta familia también pertenecen los receptores ICAM-3 e ICAM-R que han sido clonados recientemente, pero que no son expresados por células endoteliales.

La expresión de VCAM-1 es inducida por algunos estímulos similares a los que inducen ICAM-1, aunque la expresión de VCAM-1 puede ser selectivamente inducida por la citocina IL-4. VCAM-1 funciona como receptor para los antígenos de superficie VLA-4 de los leucocitos cuya interacción también juega un papel importante en el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación.

Otra molécula de la superfamilia de inmunoglobulinas que participa en la interacción leucocito-célula endotelial es CD31 (molécula de adhesión plaqueta-endotelial-1:PECAM-1), que contiene seis dominios homólogos de inmunoglobulinas y secuencias putativas de unión a proteoglicanos. Estudios recientes han demostrado que PECAM-1 es esencial para el reclutamiento de *neutrófilos*, aunque su papel aún no se ha entendido con precisión (Jones, 1995).

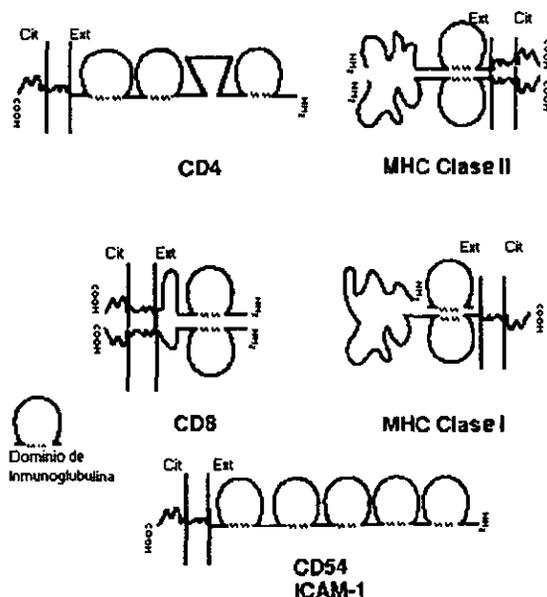


Fig. 6. Representación de la estructura de algunos miembros de la super-familia de inmunoglobulinas. Estos miembros se caracterizan por dominios de 90 a 100 aminoácidos conocidos como dominios de inmunoglobulina, que se encuentran unidos por enlaces disulfuro, tienen un segmento citoplásmico pequeño (COOH) y un segmento extracelular muy grande(NH<sub>2</sub>), las líneas verticales representan la membrana celular.

## **Integrinas**

El nombre de esta familia se refiere al hecho de que estas moléculas generalmente integran al medio extracelular con los componentes del citoesqueleto intracelular uniendo moléculas a la matriz extracelular o uniendo la superficie de otras células (Edelman, 1995).

Miembros de ésta familia de receptores de adhesión son expresados en casi todos los tipos celulares y participan en las interacciones de las células con su matriz extracelular (fibronectina y colágena principalmente) y algunas veces en la adhesión célula-célula. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la unión de las integrinas a sus ligandos como las moléculas de adhesión, activa una cascada de señales que son traducidas a través de los receptores de integrinas (Meuer, 1994).

La relevancia de las integrinas en los procesos de adhesión de los leucocitos queda de manifiesto cuando se presenta la pérdida de la expresión de integrinas en leucocitos, que lleva a graves defectos en la adhesión, característicos de un síndrome clínico conocido como Deficiencia en Adhesión de Leucocitos (LAD por sus siglas en inglés) (Meuer, 1994).

Las integrinas son heterodímeros formados de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  unidas no covalentemente, que regulan tanto la adhesión célula-sustrato como la adhesión célula-célula. De acuerdo a su descripción original las integrinas se dividen en tres subfamilias, cada una con una subunidad  $\beta$  común, capaz de asociarse con un grupo específico de subunidades  $\alpha$ . Estudios recientes han demostrado que existen subunidades  $\beta$  antes desconocidas ( $\beta_p$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$ ) por lo que ahora se propone la existencia de seis diferentes subfamilias  $\beta$ , y que ciertas subunidades  $\alpha$  pueden combinarse con más de una subunidad  $\beta$ , burlando las relaciones familiares propuestas originalmente (Dustin, 1991; Springer, 1990)(Fig. 7).

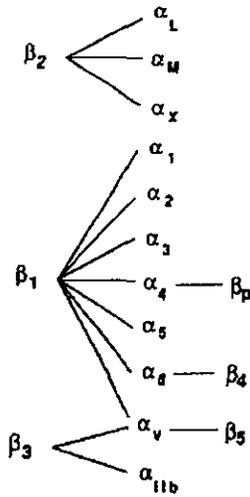


Fig. 7. Asociaciones de las subunidades de las integrinas. Evidencia reciente muestra que cierta subunidad  $\alpha$  puede asociarse con diferentes subunidades  $\beta$ .

El conocimiento de la estructura de las integrinas se basa principalmente en estudios bioquímicos del complejo de glicoproteína gpIIb/IIIa de la membrana de las plaquetas (Phillips, 1988) y en el hecho de que la secuencia de DNA de la mayoría de las integrinas es conocida. Se sugiere que existe una asociación del dominio globular amino terminal de las dos subunidades para formar la regiones de unión al ligando del receptor (Fig. 8). La posición relativa de 56 residuos de cisteínas se conserva en casi todas las subunidades  $\beta$ , la mayoría organizadas en cuatro unidades repetitivas, de ahí que se sugiera que la porción amino terminal de la molécula está doblada en una asa o "loop" que se estabiliza con enlaces disulfuro entre las cisteínas que se encuentran cerca del amino terminal.

La subunidad  $\beta$  típica posee un dominio transmembranal y un pequeño dominio citoplásmico en el carboxilo terminal de la molécula. Las subunidades  $\alpha$  presentan una estructura semejante a la de las subunidades  $\beta$ , un pequeño

carboxilo terminal citoplásmico, una región transmembranal y un dominio globular extracelular, que contiene regiones de unión a calcio.

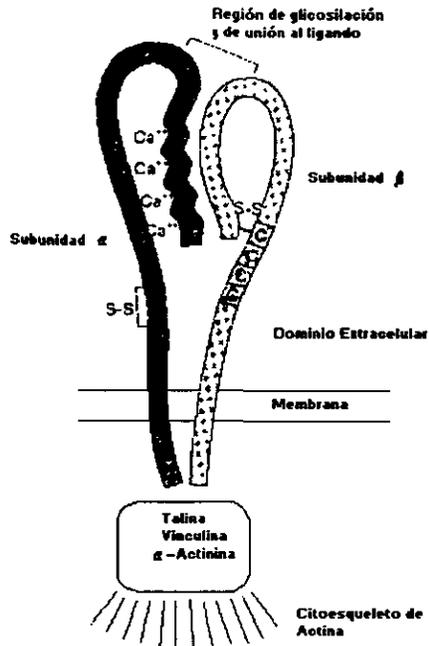


Fig. 8. Estructura esquemática de un integrina típica. Las integrinas están compuestas de dos subunidades asociadas no covalentemente designadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Ambas subunidades son glicoproteínas integrales de membrana. Los dominios extracelulares contienen los sitios de unión al ligando. La subunidad  $\alpha$  contiene dominios de unión al calcio. La subunidad  $\beta$  contiene cuatro repeticiones ricas en cisteínas (C). El asa del amino terminal del dominio extracelular de la subunidad  $\beta$  es estabilizada por un enlace bisulfuro intracadena. Los dominios citoplasmáticos de las dos subunidades son relativamente pequeños y contienen regiones capaces de unirse a elementos del citoesqueléticos como talina y vinculina que media la interacción entre las integrinas con la actina el citoesqueleto.

De particular interés es la subfamilia  $\beta_2$ , también conocida como LEU-CAMs o antígenos CD18, que consiste de tres receptores de adhesión de leucocitos: LFA-1, MAC-1 y GP150,95, que comparten la subunidad  $\beta_2$  y cuya expresión está restringida sólo a células blancas. LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) es expresada en casi todos los tipos de células blancas donde participa en la interacción leucocito-leucocito y en la adhesión leucocito-célula endotelial, esta molécula también participa en la interacción monocito-célula endotelial (Staunton et al, 1988).

### ***FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADHESIÓN EN EL TRÁFICO DE LEUCOCITOS***

El reclutamiento de leucocitos de la sangre es una de las respuestas celulares al daño tisular y a la inflamación, y es central para el tráfico fisiológico de linfocitos. La extravasación de leucocitos se regula *in vivo* por mecanismos de reconocimiento selectivo de los receptores de adhesión de leucocitos y células endoteliales, el cual puede mostrar una especificidad extraordinaria en relación con el estímulo inflamatorio, el estado de la respuesta inflamatoria y el tejido u órgano involucrado (Ben Baruch et al, 1995).

Sin embargo, los receptores participan de manera individual en múltiples interacciones que son reguladas independientemente *in vivo*. Por ejemplo, la selectina-E media la unión a neutrófilos o a células T de la piel, sin embargo, se sabe que existe un reclutamiento selectivo de neutrófilos durante procesos inflamatorios agudos y de células T durante procesos inflamatorios crónicos en la piel (Picker, 1991). Se ha propuesto un modelo general en el que el reconocimiento es visto como un proceso activo que requiere cuatro etapas: a) el contacto inicial, b) "rolling", c) adhesión firme y d) la migración. (Fig. 9)

El contacto inicial con el endotelio es ayudado por el tamaño del capilar y venas (siendo éstos los principales sitios de extravasación de leucocitos) y por el aumento de permeabilidad vascular en los sitios de inflamación lo que ocasiona una salida de plasma y un aumento en la cuenta celular circulante del sitio de

inflamación que cambia las características de flujo a través del vaso permitiendo un contacto más frecuente entre los leucocitos y la pared vascular.

Los leucocitos que llegan al punto en el que el diámetro del vaso ha aumentado su tamaño son forzados a las paredes del vaso por los eritrocitos que son concavos y tienen mayor flexibilidad. Si el par apropiado de moléculas de adhesión-ligando se encuentra expresado tanto en las células circulantes como en el endotelio, el leucocito forma uniones débiles con la pared vascular. La fuerza causada por el flujo de la sangre ocasiona que estas uniones del leucocito se rompan mientras que la célula es empujada hacia adelante ocasionando la formación de nuevas uniones. Esta formación y rompimiento de uniones, mientras que la célula es empujada, resulta en un rodamiento o "rolling" sobre la superficie endotelial en dirección del flujo sanguíneo (Rossiter et al, 1997).

Se cree que este rodamiento sobre el endotelio mantiene a las células blancas en contacto cercano con el endotelio de manera que los leucocitos pueden ser estimulados por sustancias liberadas localmente durante la inflamación desencadenando la expresión de moléculas necesarias para una adhesión más firme.

Se ha demostrado que el contacto inicial y el "rolling" de los neutrófilos y probablemente de monocitos y linfocitos al endotelio estimulado es mediado por las selectinas, con una expresión secuencial, iniciada por la selectina-P seguida de la selectina-L o la selectina-E. Los linfocitos usan las subunidades  $\alpha_4$  de las integrinas (particularmente  $\alpha_4\beta_7$ ) para mediar el comportamiento de "rolling" bajo condiciones de flujo. El proceso de "rolling" mediado por la selectina y la subunidad  $\alpha_4$  de las integrinas sobre el endotelio ocurre sin la activación de los leucocitos; esta adhesión inicial es temporal y reversible (Staunton et al, 1988).

La adhesión firme sigue a la interacción del "rolling", esta fase está mediada por integrinas y opera en condiciones de flujo lento o después de un contacto prolongado con la pared del vaso. Generalmente esta activación local de leucocitos ocurre a través de un mecanismo dependiente de un

quimioatrayente específico o de contacto celular, mediante señales capaces de disparar la expresión de otros receptores de adhesión cuya función es dependiente de activación. Una vez estabilizada, esta adhesión mediada por integrinas es muy fuerte, deteniendo totalmente al leucocito.

En el paso final, las células se aplanan y desarrollan pseudópodos que se insinúan entre las uniones intercelulares por medio de un mecanismo que involucra moléculas de adhesión y sustancias quimioatrayentes. Se ha propuesto que la migración de los leucocitos sigue gradientes de estas sustancias, gradientes de moléculas de adhesión o la combinación de ambos.

Eventualmente, la célula entera pasa del flujo sanguíneo al tejido perivascular, donde son sometidos a gradientes de quimioatrayentes que los dirigen al sitio de inflamación o del proceso infeccioso. De esta manera el leucocito esta ahora en posición para responder al antígeno (Hogg, 1995).

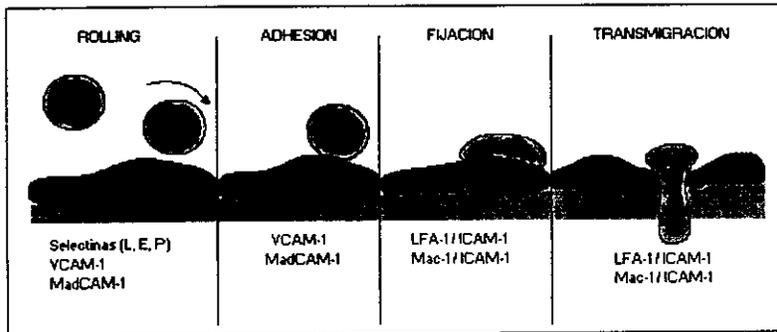


Fig. 9. Diagrama mostrando la secuencia de interacciones del leucocito con el endotelio bajo la guía de la cascada de adhesión\*. (Tomado de Hogg & Berlin, 1995).

Podrían existir pasos o sucesos adicionales en el reconocimiento de células endoteliales aparte de los cuatro mencionados anteriormente. Por ejemplo, podrían existir similitudes en las señales de transducción entre receptores activados o receptores dependientes de activación, permitiendo un disparo independiente de integrinas específicas para diferentes señales activadoras. Estos mecanismos permitirían una mayor diversidad durante el reconocimiento leucocito-endotelio, dadas las distintas combinaciones entre las moléculas de adhesión de la célula endotelial y las integrinas de leucocitos (Fig. 10).

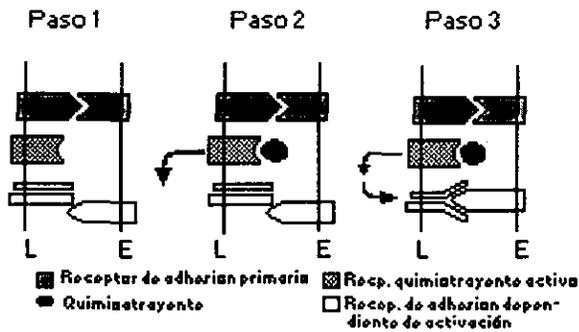


Fig. 10. Modelo de reconocimiento leucocito-endotelio que media el proceso de activación. En el paso 2, un factor quimioatrayente soluble es necesario, pero las moléculas de la superficie endotelial pueden mediar esta activación. E, endotelio; L, leucocito (tomado de Campbell et al, 1996).

### **TNF- $\alpha$ , CÉLULAS ENDOTELIALES Y LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN**

Una de las funciones efectoras más importantes del TNF- $\alpha$  radica en su habilidad para inducir profundos cambios funcionales en el endotelio vascular. Como punto central del proceso inflamatorio está el aumento dramático en la expresión de moléculas de superficie como ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1, las cuales permiten la adhesión de leucocitos sanguíneos como se ilustró en las figuras 9 y 10. Como se mencionó anteriormente, las funciones del TNF- $\alpha$  son

iniciadas por la interacción con dos receptores de superficie distintos: p55 y p75. Estudios hechos por Neumann et al (1996) en ratones transgénicos, proveen evidencia de que la inducción de estas moléculas y la infiltración de leucocitos está regulada por el receptor p55. Esta inducción está mediada por la rápida activación y subsecuente movilización del factor de transcripción nuclear NFκB (Weber et al, 1995; Neumann et al, 1996; Scholz et al, 1996). Los estudios realizados por Weber en 1995 mencionan que la inducción de las moléculas de adhesión está regulada por un mecanismo susceptible a antioxidantes, lo que sugiere que en la activación de células endoteliales inducida por TNF-α, es necesaria la generación de radicales libres que regulan la liberación de NFκB.

El factor de transcripción nuclear NFκB es un regulador pleiotrópico de muchos genes involucrados en las respuestas inmunes e inflamatorias, incluyendo las moléculas de adhesión. Esta familia de factores de transcripción diméricos consiste del monómero p50 (NFκB1) que es generado por procesamiento proteolítico de p105, y de otro monómero de la familia denominado p65, que tiene un potente dominio transactivador. En células no proliferantes, estos heterodímeros se encuentran en una forma citosólica inactiva, formando complejos con miembros de una familia de proteínas inhibitoras conocidas como IκB (del inglés: inhibitors of the kappa B transcription factor) las cuales se unen a la subunidad p65 de NFκB evitando su transporte al núcleo. Después de la activación celular, IκB es fosforilado por una seriltreonil cinasa y subsecuentemente degradado, esta fosforilación aparentemente no resulta en la disociación del complejo inactivo NFκB-IκB, sino que permite que IκB sea blanco de un sistema de proteasas para su degradación (Miyamoto et al, 1994; Finco et al, 1994; Johnson et al, 1996). La separación de NFκB de IκB permite que el dímero activo se transloque y se acumule en el núcleo, donde puede unirse a su secuencia blanco en las regiones promotoras del DNA por las que tiene gran afinidad. Este proceso resume la participación de NFκB en la activación de la transcripción. Son muy

diversos los genes que contienen secuencias capaces de unir al factor NFκB como parte de las señales que activan su transcripción. Es interesante notar que uno de los genes que se transcriben en respuesta a NFκB es precisamente su inhibidor IκB, resultando en un reabastecimiento de la poza citoplasmática del inhibidor de IκB. Reestablecida la expresión de IκB la activación de NFκB disminuye y por ende la expresión de los genes dependientes de κB (Fig. 11).

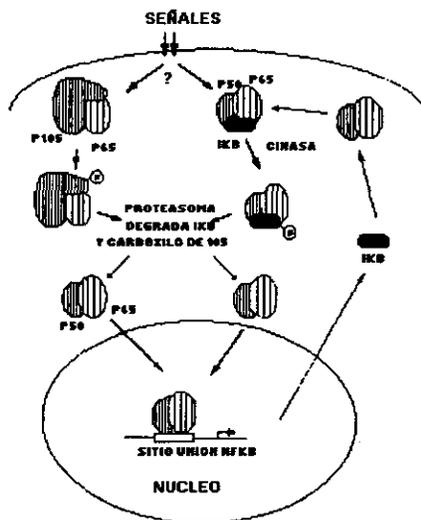


Fig. 11. Esquema del sistema autoregulatorio de NFκB/IκB y la participación del proteasoma. El factor de transcripcional NFκB inactivo es mantenido en el citoplasma ya sea por la asociación con IκB o por la asociación de p65 con p105. Múltiples señales extracelulares activan la fosforilación de IκB o de p105. IκB es degradado por el proteasoma, o cual resulta en la liberación de un p50-p65 funcional que puede ser translocado al núcleo. En paralelo, el carboxilo terminal de p105 es degradado por el proteasoma para generar la subunidad p50 del heterodímero p50-p65. El NFκB heterodimérico entra y se acumula en el núcleo activando la expresión de genes relevantes para la función del endotelio. (Tomado de Collins et al, 1995)

Entre los genes cuya expresión es dependiente del factor NFκB se encuentran varias moléculas de adhesión como la selectina E, ICAM-1 y VCAM-1.

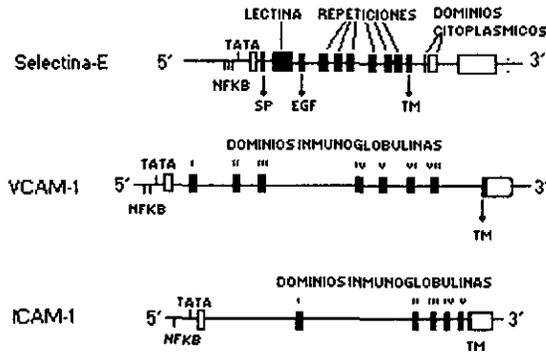


Fig. 12. Organización estructural de los genes la selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1. En cada gen, la posición de los exones correlaciona con los dominios estructurales de la proteína. En los tres genes, los exones están indicados con cajas. Los intrones al igual que los extremos 5' y 3' están representados con líneas. Las regiones no transcritas están representadas por cajas vacías. Se representa la posición de unión de elementos transcripcionales NFκB en el extremo 5'. Para los genes de VCAM-1 e ICAM-1 se indican con números romanos los dominios semejantes a inmunoglobulinas. (Tomado de Collins et al, 1995).

El gen de la selectina-E humana contiene 14 exones y se extiende a lo largo de 13 Kb de DNA (Fig. 12). Los elementos regulatorios requeridos por la activación de citocinas han sido localizados en los primeros 160 pb inmediatamente antes del sitio de inicio de transcripción. Se han definido 4 dominios de regulación positiva (PD) en el promotor. Un elemento con las secuencias consenso κB y un sitio con una secuencia semejante a ATF (Activating Transcription Factor) que fueron designados PDI y PDII respectivamente, PDIII y PDIV fueron recientemente descritos. La inducción de selectina-E requiere la unión del factor de transcripción NFκB en PDI, PDIII y PDIV. En PDII se cree que se unen los factores de transcripción ATF-2 y/ó HMG1 (High Motility Group) que son esenciales para la activación transcripcional

mediada por la citocina. Estos 4 sitios deben actuar cooperativamente para inducir la transcripción (Fig. 13).

El RNAm de VCAM no es expresado en células no proliferantes, pero se ha demostrado una regulación positiva de la expresión al ser expuestas a citocinas.

El gen de VCAM-1 se extiende cerca de 25 kb de DNA y contiene 9 exones que correlacionan con los 9 dominios funcionales de la proteína (Fig. 12). Para este gen la organización de los elementos reguladores requeridos para la inducción de la expresión de VCAM por citocinas sólo ha sido parcialmente definido. Se ha encontrado que la activación transcripcional del gen requiere de dos sitios NF $\kappa$ B en tandem localizadas en el promotor en la posición -73 y -58, ambos necesarios para la respuesta transcripcional mediada por citocinas. Existe una interacción cooperativa entre los dos dímeros de NF $\kappa$ B unidos en tandem en el promotor de VCAM-1. Se ha localizado también un sitio Sp1.

El análisis del promotor ha revelado la existencia de la secuencia GAAATAGAAA, que es un miembro de la familia de activadores transcripcionales llamado factor regulador dependiente de interferón (IRF). Existen evidencias de que éste sitio IRF es importante para la expresión de este gen inducida por citocinas.

El análisis de los promotores tanto de VCAM-1 como de selectina-E revelan pequeñas regiones con capacidad de respuesta a citocinas con varios elementos NF $\kappa$ B que deben interactuar cooperativamente para inducir la transcripción.

ICAM-1 facilita las interacciones celulares selectivas, es un receptor inducible para diversas integrinas  $\beta$ 2 de leucocitos. La adhesión de ICAM-1 a las integrinas de leucocitos juega un papel importante en una variedad de interacciones celulares que incluyen el tráfico de leucocitos y la iniciación de las respuestas inmuno específicas.

Las células endoteliales expresan ICAM-1 durante las respuestas inflamatorias donde los niveles de la proteína se incrementan. El TNF- $\alpha$  y el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) actúan simultáneamente para potenciar la expresión de ICAM-1 en células endoteliales.

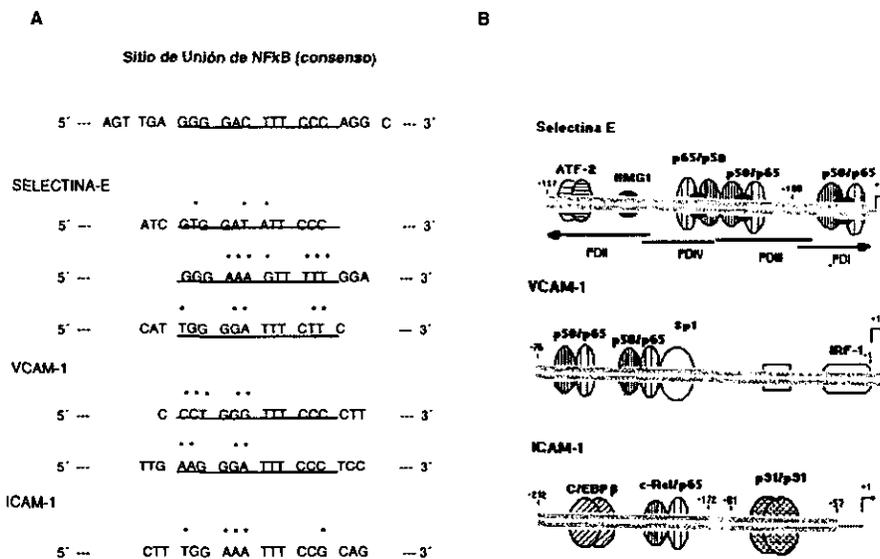


Fig. 13. A) Secuencias del promotor de las moléculas de adhesión que contienen el sitio de unión para el factor de transcripción NF $\kappa$ B. Comparación de la organización de los promotores de los genes de ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 humanos. (Tomado de Collins et al, 1995).

Esta molécula es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y tiene cinco dominos semejantes a inmunoglobulinas, una región transmembranal y un pequeño dominio citoplasmático.

El gen de ICAM-1 contiene siete exones, cinco de los cuales contienen un dominio de inmunoglobulina (Fig 12). La organización de los elementos regulatorios requeridos tanto para la expresión basal como para la expresión inducida por citocinas han sido bien definidos (Hou, 1994). Los elementos

regulatorios responsables de la expresión basal están localizados a -115, -60 y -40 pares de bases antes del sitio de inicio de la transcripción.

Los elementos reguladores que dirigen la respuesta a TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se encuentran a -190 y -90 pares de bases respectivamente antes del sitio de inicio de transcripción. Los distintos elementos regulatorios dentro del promotor de ICAM-1 median la inducción transcripcional en respuesta a los mediadores de la inflamación (Fig. 13). Esta respuesta requiere tanto de los elementos de respuesta al TNF- $\alpha$  como de los de respuesta al IFN- $\gamma$ , sin embargo, las bases moleculares del mecanismo que activa la transcripción aún no es claro.

En conclusión, el sistema endotelial NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B juega un papel importante en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos inducida por citocinas. El factor de transcripción NF $\kappa$ B puede ser activado en células endoteliales por las citocinas asociadas con el aumento de expresión de moléculas de adhesión. Después de la exposición a citocinas, los niveles citoplasmáticos del inhibidor de NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B, decaen rápidamente ya que es degradado por la vía del proteasoma; paralelamente existe una acumulación en NF $\kappa$ B en el núcleo. NF $\kappa$ B y otros factores de transcripción participan en el ensamblaje de complejos de transcripción que activan múltiples genes endoteliales, incluyendo el gen del inhibidor I $\kappa$ B. El subsecuente aumento en la expresión de I $\kappa$ B disminuye la activación de NF $\kappa$ B y disminuye la expresión de genes dependientes de NF $\kappa$ B.

### **MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y METÁSTASIS**

Las células endoteliales no sólo forman la barrera mecánica de los componentes celulares de la sangre, sino que también al cambiar a un estado de activación facilitan la extravasación de células linfoides permitiendo la formación de respuestas inflamatorias en áreas de infección o trauma. El mismo mecanismo molecular probablemente es usado por células tumorales las cuales han sufrido un proceso de selección para la estrategia de diseminación más eficiente (Stoelket et al, 1996).

La interacción entre células tumorales y endoteliales esta considerada como un paso crucial en la metástasis de tumores. Las células tumorales parecen entrar al flujo sanguíneo a través de los vasos linfáticos y de nuevos vasos asociados al tumor. Estas células pueden circular individualmente, en pequeños grupos o en forma de agregados con plaquetas hasta que se adhieren a la vasculatura en un sitio secundario (Tözeren et al, 1995). Esta interacción es mediada por moléculas de adhesión de la superficie celular expresadas tanto en el endotelio como en las células tumorales. Se ha sugerido que la retracción del endotelio vascular en el sitio secundario causado por la adhesión tumoral o la lesión inducida por neutrófilos facilita la salida de las células tumorales del flujo ya que la retracción deja expuesta la membrana basal.

Los trabajos de Tözeren sugieren que las células metastásicas se adhieren y ruedan, apoyando la hipótesis de que las células tumorales se adhieren al endotelio en un proceso muy semejante al utilizado por leucocitos. Sin embargo, Thorlacius (1997), sugiere que no existe un rodamiento de las células metastásicas in vivo, argumentando que los trabajos anteriores han sido hechos in vitro y no se alcanzan las velocidades que existen realmente en los postcapilares, velocidades 3 o 4 veces menores a las reportadas en otros trabajos por lo que el propone un modelo basado en el tamaño de los capilares y de las células metastásicas: con el diámetro de los capilares y el gran tamaño de las células tumorales (comparadas con el de los leucocitos) es razonable considerar el anclaje mecánico como la principal causa del arresto inicial del tumor, posteriormente hay una activación de receptores de adhesión.

Las citocinas como el TNF- $\alpha$  e IL-1 aumentan la adhesión de células tumorales a través de la inducción o aumento de la expresión de diversas moléculas de adhesión en el endotelio activado. Se ha reportado que muchos melanomas secretan citocinas y por lo tanto tienen mayor adherencia al endotelio que aquellos que no las secretan (Chiviri et al, 1996). Incluso se ha demostrado que citocinas producidas por el hospedero en respuesta a estímulos inflamatorios pueden aumentar metástasis experimentales; sin embargo, en

ausencia de inflamación, el endotelio vascular también puede ser activado por citocinas liberadas por el tumor, ya sea directamente o a través de la inducción de otras citocinas.

La utilización de antagonistas de citocinas ha probado que éstas regulan las interacciones del endotelio con las células tumorales durante el proceso metastásico. Es importante mencionar que estos antagonistas evitan el aumento de la expresión de moléculas de adhesión (Chiviri et al, 1993). También se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que si se utilizan inhibidores de la activación de NF $\kappa$ B se presenta una disminución en la adhesión de células metastásicas (Tozawa et al, 1995).

Células tumorales de varios orígenes histológicos expresan moléculas que han sido identificadas en leucocitos como proteínas críticas para la interacción adhesiva con el endotelio microvascular y estructuras de matriz extravascular (Thorlacius et al, 1997). La expresión diferencial en los distintos órganos de las moléculas de adhesión constitutivas e inducidas podría explicar porque las células metastásicas pueden adherirse a diferentes sitios en la vasculatura, explicando en parte las consecuentes metastasis *in vivo* (Lafrenie et al, 1994).

Estudios recientes involucran a la selectina-E, como un mediador de la adhesión de algunas células de carcinoma de colon (Tözeren et al, 1995). Cabe mencionar que la selectina-E es inducida por citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1, sin embargo, esta no es la única molécula de adhesión relevante en el proceso metastásico, ya que se ha demostrado la participación de otras moléculas de adhesión en diversos tipos tumores.

El ligando de la selectina-E son carbohidratos de los grupos sialil Lewis X y A (SL-X y SL-A) y se ha demostrado que muchas de las células cancerosas o metastásicas expresan grandes cantidades de estos carbohidratos (Groves et al, 1993). Los estudios de Allen y colaboradores demuestran que la cantidad de antígenos de carbohidratos expresados (incluyendo los ligandos de selectina-E) en una variedad de tumores puede estar relacionada con la progresión de la

enfermedad y que ésta progresión y expresión de carbohidratos permite distinguir depósitos metastásicos de tumores primarios (Allen et al, 1996).

En resumen, un paso esencial durante la metástasis es la adhesión de las células tumorales malignas al endotelio vascular en los órganos blanco de este proceso invasivo. Esta interacción está mediada por las mismas moléculas de adhesión que participan en la adhesión de leucocitos durante la reacción inflamatoria, aunque también intervienen otras variantes de estas moléculas.

## JUSTIFICACIÓN

Como se pudo observar en la revisión anterior, poco es conocido acerca de los mecanismos de adhesión que utilizan células provenientes de tumores metastásicos como es el caso de linfomas o de mielomas. Se ha propuesto que estas células utilizan un sistema semejante al que utilizan los leucocitos para su extravasación mediado por moléculas de adhesión. El TNF- $\alpha$  es un importante mediador de respuestas inflamatorias, caquexia y el choque séptico, siendo su principal blanco las células endoteliales. Por ello, se consideró de gran importancia el evaluar: 1) como afecta el TNF- $\alpha$  la expresión de moléculas de adhesión, 2) como afecta el TNF- $\alpha$  la capacidad de las células endoteliales de adherir células del mieloma U937 humano, 3) la participación de las moléculas en la adhesión del mieloma y 4) la posible participación de seriltreonil cinasas en la respuesta.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento de la posible participación del TNF- $\alpha$  y de las moléculas de adhesión en la metástasis de tumores.

## **OBJETIVO GENERAL**

Valorar el papel del TNF- $\alpha$  en la inducción y fisiología de las moléculas de adhesión: selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en cultivos primarios de células endoteliales provenientes de cordones umbilicales humanos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1.- Obtener cultivos primarios de células endoteliales realizando una disgregación enzimática de la vena de cordones umbilicales humanos y caracterizando a los cultivos por medio de inmunocitoquímica.

2.- Establecer cultivos asincrónicos y sincrónicos evaluados por el contenido de DNA utilizando citometría de flujo.

3.- Evaluar el efecto del TNF- $\alpha$  en los niveles de RNAm de las moléculas de adhesión: selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 por medio de reacciones de transcripción reversa y PCR en cultivos asincrónicos y sincrónicos.

4.- Evaluar el efecto del TNF- $\alpha$  en los niveles de proteína de las moléculas de adhesión: ICAM-1 y selectina-E utilizando inmunoanálisis en cultivos asincrónicos y sincrónicos.

5.- Montar un sistema que permita evaluar la adhesión de células promielocíticas humanas de la línea U937 a células endoteliales.

6.- Evaluar si el tratamiento de los endotelios con TNF- $\alpha$  es capaz de modificar la adhesión de las células U937.

7.- Evaluar la participación de las moléculas estudiadas en la adhesión del promieloma utilizando anticuerpos contra estas moléculas.

8.- Estudiar la posible participación de seril-treonil cinasas en la respuesta de adhesión utilizando inhibidores de la misma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de células

Las células endoteliales fueron obtenidas a partir de cordones umbilicales humanos provenientes de partos eutócicos y cesáreas de acuerdo al procedimiento descrito por Jaffe en 1973 (Jaffe, 1973). Los cordones se colectaron en solución salina de Hepes (Sigma), se limpiaron con gasas estériles y se les canuló la vena umbilical con la finalidad de lavarla y eliminar residuos sanguíneos. La vena fue sometida a disgregación enzimática con una solución de tripsina 0.1% (Sigma) preparada en una solución de verseno, durante 15 minutos a una temperatura de 37 °C. La solución disgregante fue colectada en tubos estériles y centrifugada a 1000 rpm durante 10 min. El botón celular obtenido de 3-12 cordones fue sembrado de acuerdo a las condiciones de cultivo celular.

Las células promielocíticas humanas de la línea U937 fueron adquiridas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC).

### Condiciones de cultivo celular

Células endoteliales humanas.

Las células endoteliales fueron mantenidas en medio de cultivo 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), mezcla de antibiótico y antimicótico al 1% (GIBCO, BRL) y 10% de suero fetal de bovino (SFB) (In vitro, México). En algunos casos se cubrieron las cajas con gelatina al 0.2% para posteriormente sembrar las células. Una vez sembradas, las células fueron mantenidas a 37 °C con una humedad relativa del 100% y una atmósfera de 5% bióxido de carbono-95% aire. Las células fueron utilizadas para los ensayos experimentales entre los pasajes 1 y 2; sembrándose a una densidad de  $20 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^2$ . Estos cultivos fueron tratados con TNF a diferentes tiempos y concentraciones y fueron empleados para las extracciones de proteína y RNA total.

### *Células U937*

Las células U937 fueron mantenidas en medio RPMI (GIBCO, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, USA) y antimicótico al 1% (GIBCO, USA). Ya que se trata de células que crecen en suspensión el cambio de medio consistía en retirar aproximadamente 9/10 del volumen del medio utilizado y sustituirlo con medio fresco. Para evitar dañar las células nunca se sometieron a centrifugación, y para prevenir su activación por endotoxinas sólo se empleó material estéril nuevo en el cultivo de estas células.

### **Caracterización de células endoteliales**

Las células fueron identificadas como endotelio por su morfología típica en confluencia y por medio de la identificación de antígeno específicos de estas células por inmunofluorescencia. Las células endoteliales fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio, después de 48 hr las células se fijaron con una solución de glutaraldehído al 4% durante 30 minutos para después permeabilizarlas con tritón al 1% y ser incubadas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor Von Willebrand (DAKO, USA), que actúa como un acarreador del factor VIII de coagulación una proteína sintetizada por las células endoteliales. Un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína se utilizó para revelar la presencia del anticuerpo primario. Las células con los anticuerpos se incubaron nuevamente por una hora a 37 °C. Para reconocer individualmente a las células, los núcleos celulares fueron teñidos con colorante Hoescht (Molecular Probes, USA). Esta doble tinción permite contar todas las células presentes en un campo utilizando la tinción nuclear y evaluando la tinción por el factor Von Willebrand es posible determinar la fracción de la población positiva. Este procedimiento nos proporcionó el porcentaje de células endoteliales obtenidas en los cultivos primarios, que durante los primeros dos pasajes siempre fue mayor al 99%.

### **Sincronización celular**

Con el propósito de obtener cultivos en los que la mayoría de las células se encontraran en diferentes etapas de la fase G1 del ciclo celular, las células fueron cultivadas hasta alcanzar confluencia y permanecieron así sin cambio de medio durante tres días más. Este procedimiento resultó en un arresto del grueso de la población en un estadio G0 y/o G1 temprano. La sincronización fue evaluada midiendo el contenido de DNA teñido con ioduro de propidio, utilizando un sistema de citometría de flujo.

### **Marcado de las células U937**

Las células U937 fueron crecidas en medio completo suplementado con  $1\mu\text{Ci}$  por mililitro de timidina tritiada (New Englan Nuclear), por 48 horas. Posteriormente las células marcadas fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en medio M199 para ponerlas en contacto con las células endoteliales.

### **Citometría de flujo**

La cantidad de DNA presente en las células fue determinada usando citometría de flujo de acuerdo al método del CycleTESTPLUS DNA Reagent Kit (Beckton & Dickinson, CA). Las células se lavaron en una solución amortiguadora que contiene citrato de sodio, sacarosa y dimetil sulfóxido (DMSO) y se centrifugaron por 5 min a  $300 \times g$  a temperatura ambiente, este procedimiento se repitió dos veces. Las células se resuspendieron en la solución amortiguadora y se contaron para ajustar la concentración de células a  $10^6$  por ml. Se centrifugaron una vez más, para posteriormente decantar el sobrenadante y agregar  $250\mu\text{l}$  de la solución A (que contiene tripsina en una solución amortiguadora de detergente de tetrahidrocloreuro de espermina para la disgregación enzimática de los fragmentos de tejido sólido y la digestión de membranas celulares y citoesqueleto). La suspensión se mezcló suavemente y se dejó reposar por 10 min. Sin retirar la solución A se agregaron  $200\mu\text{l}$  de la

solución B (inhibidor de tripsina y ribonucleasa A en una solución amortiguadora estabilizadora de citrato con tetrahidrocloruro de espermina para inhibir la actividad de la tripsina y digerir el RNA) mezclando suavemente dejando otros 10 min. Se agregaron 200µl de la solución C fría (que contiene yoduro de propidio y una solución amortiguadora de citrato con tetrahidrocloruro de espermina, el primero se une estequiométricamente al DNA a una concentración final de al menos 125 µg/ml) y se incubó por otros 10 min en la oscuridad. Por último, la muestra se filtra a través de una membrana de nylon de 50 µm y queda preparada para analizarse en el citómetro (FACScalibur, Becton Dickinson). Se adquirieron de 10 a 100 x 10<sup>3</sup> eventos para análisis de fluorescencia utilizando el programa Cell Quest. El ajuste de las fases G0/G1, S, G2/M se hizo manualmente comparando controles y células tratadas.

### **Inmunoanálisis**

La cantidad de proteína expresada se determinó por inmunoanálisis. La proteína total fue extraída utilizando una solución de lisis conteniendo Tris (50mM), NaCl (120mM), NP-40 (0.5%), NaF (100mM), Vanadato de sodio (200 µM) e inhibidores de proteasas como aprotinina (70 IU/ml), fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF, 0.58mM) y leupeptina (10µg/ml). Las células fueron lavadas con una solución de PBS y lisadas con 350 µl de solución de lisis por plato por 15 min sobre hielo. La proteína extraída fue colectada en tubos eppendorf con la ayuda de un gendarme para después ser centrifugada a 1400 rpm durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante fue guardado en congelación a -20°C. La cantidad de proteína obtenida por muestra fue determinada por el método de Bradford (Bio-Rad, USA). Posteriormente, entre 25µg y 100 µg de proteína de cada muestra fueron sometidos a electroforesis en un gel desnaturante de poliacrilamida al 7.5%, usando como marcador de peso molecular estándares de bajo peso y β-galactosidasa preteñida de un peso de 116 KDa. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Hybond) la cual se bloqueó con una solución de leche al 6% en TBS-Tween durante 2 horas y se incubó durante

15 hrs con un anticuerpo monoclonal contra I-CAM o selectina-E humana (Santa Cruz y APSA Biotek, USA) a una dilución 1:200. Como anticuerpo secundario se adicionaron IgGs de ratón acopladas a biotina (DAKO, USA) a una dilución de 1:2500. La presencia del complejo fue detectada usando un conjugado de avidina-biotina y peroxidasa (DAKO, USA). Las señales se obtuvieron por autorradiografía revelando la actividad de peroxidasa con luminol (Reactivo de ECL, Amersham).

### **Transcriptasa reversa (TR) y PCR**

*Extracción de RNA.* El RNA total fue extraído por el método de tiocianito de guanidinio y fenol-cloroformo empleando el reactivo TRI (Molecular Research Center, USA). Para ello, las monocapas de células fueron homogenizadas con 1 ml de TRI por cada caja de petri de 100 mm de diámetro. El lisado celular se colectó con la ayuda de un gendarme y se pasó a un tubo donde se le adicionaron 200µl de cloroformo por cada muestra, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se colocó en hielo durante 15 min más, después se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4 °C. Se colectó la fase acuosa (superior) donde el RNA permanece soluble. Para la precipitación del RNA se adicionaron a la fase acuosa 500µl de isopropanol y se mantuvo a las muestras a 4 °C por 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 12000 x g por 15 min y el botón de RNA fue lavado con 1 ml de etanol al 75% a 4 °C. El precipitado fue centrifugado nuevamente y secado para posteriormente disolverlo en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma). La cantidad de RNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm y su calidad se determinó corriendo las muestras en geles de agarosa-formaldehido buscando la presencia de las bandas de RNA ribosomal no degradado.

*Transcripción reversa y Amplificación por PCR.* Se tomó aproximadamente 1 µg de RNA total siguiendo el protocolo que presenta el juego de reactivos de TR y PCR (PekinElmer); para la reacción de transcripción reversa se utilizó oligodT

como iniciador para síntesis de cDNA. Esta reacción se realizó como se describe a continuación: 15 min a 42 °C, 5 min a 99 °C y por último 5 min a 5 °C; para la reacción de PCR se sintetizaron oligonucleótidos específicos reportados por Meagher y colaboradores (1994), para la amplificación de cada una de las moléculas de adhesión. Para cada una de las reacciones de amplificación se usó el promedio de la Tm de los oligos utilizados. Para cada reacción se empleó el siguiente protocolo: 2 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C y 1 min al promedio de la Tm. Al terminar los 35 ciclos se llevó a cabo una extensión por 7 min a 72 °C. Del producto de la reacción de PCR se tomaron 10 µl y se corrieron en un gel de agarosa al 3%.

<b>OLIGONUCLEÓTIDO</b>	<b>Tm(°C)</b>	<b>x(Tm °C)</b>	<b>TAMAÑO DEL PRODUCTO ESPERADO (pb)</b>
Selectina E (Sentido) CTCTGACAGAAGAAGCCAAG	60	60	254
Selectina E(Antisentido) ACTTGAGTCCACTGAAGCCA	60		
ICAM-1 (Sentido) TATGGCCAACGACTCCTTCT	56	60	195
ICAM-1 (Antisentido) CTGTACCTCGGTCCCTTCT	64		
VCAM-1 (Sentido) ATGACATGCTTGAGCCAGG	58	58	259
VCAM-1 (Antisentido) GTGTCTCCTTCTTTGACACT	58		

Los geles fueron digitalizados y analizados utilizando el programa photoshop (Macquintosh) que permitió conocer el número de veces que se aumento de expresión basandose en el aumento de densidad de la imagen.

### **Experimentos de adhesión**

Se trató a las células endoteliales con TNF- $\alpha$  a diferentes tiempos y concentraciones. Posteriormente, se adicionaron los promielocitos U937 previamente marcadas con timidina tritiada en tal cantidad que cubrieran por completo la monocapa de células endoteliales (aproximadamente un millón de células U937 por cada  $\text{cm}^2$ ). Después de los tiempos establecidos se hicieron tres lavados con PBS y posteriormente las células se lisaron con 500  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.2 N, para hidrolizar el DNA de las células U937, marcado con timidina tritiada. Después de 15h esta solución alcalina se mezcló con 3 ml de tritosol y fueron cuantificadas en un contador de centelleo. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico.

### **Análisis de los Datos**

Los experimentos se realizaron al menos tres veces y cada uno de ellos por triplicado, para homogenizar los datos obtenidos se transformaron en porcentajes de sus propios controles y en base a los porcentajes obtenidos se calculó el promedio y la desviación estandar.

Utilizando la desviación estandar el número de experimentos individuales se aplicó la prueba estadística de T de student para obtener el valor de p.

Por ultimo se calculó el error estandar que aparece en las gráficas.

## RESULTADOS

### Caracterización de Células Endoteliales

Uno de los principales problemas en el uso de cultivos primarios de células endoteliales es la posible contaminación con otros tipos celulares como: fibroblastos, miocitos y adipocitos derivados de tejido conectivo y células musculares. De ahí, la importancia de establecer la pureza de los cultivos, para evitar que la presencia de células no endoteliales alterara los resultados y la interpretación de los mismos.

Para asegurar la pureza de los cultivos obtenidos, se realizó un análisis de inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor Von Willebrand acoplado a un segundo anticuerpo conjugado con rodamina. El factor Von Willebrand es una proteína asociada al factor VIII del sistema de coagulación que se expresa de manera exclusiva en células endoteliales y en células cebadas. Las preparaciones también fueron sometidas a una tinción con Hoechst para identificar los núcleos celulares, como un control del número total de células. De esta manera se pudo determinar el porcentaje de células con tinción positiva para el factor Von Willebrand (células endoteliales). El resultado de este análisis mostró que un 99% de las células obtenidas inicialmente son células endoteliales y que esta proporción se conserva durante los primeros dos pasajes. En base a lo anterior, en todos los experimentos realizados se utilizaron cultivos primarios en los pasajes 1 y 2.

## **Efecto del TNF- $\alpha$ sobre los niveles de RNA mensajero de las moléculas de adhesión: selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1.**

Con el objetivo de medir cambios en la expresión del mensajero de las moléculas de adhesión en respuesta al TNF- $\alpha$  se aisló RNA total de cultivos asincrónicos tratados con la citocina por distintos tiempos. La relativa escases de RNA total y por ende de mensajero para cada una de las condiciones nos hizo considerar el uso de la técnica de TR y PCR sobre el análisis de "northern" como método de comparación de los niveles de expresión para cada una de las moléculas de adhesión. Para que la técnica de TR y PCR pueda ser empleada como una herramienta comparativa e incluso cuantitativa, es necesario que la reacción de amplificación no alcance saturación; si esto ocurriera, las diferencias en los niveles de mensajero podrían ser minimizadas. Por lo tanto es importante que las reacciones de amplificación se detengan dentro del rango lineal de amplificación para que las diferencias en los niveles de mensajero puedan reflejarse en la intensidad de las bandas de los productos de PCR. El que todas nuestras reacciones de PCR cumplieran con este criterio nos permitió establecer que las diferencias de expresión de los RNAm fueran confiables. La utilización de este método nos permitió identificar los tiempos críticos de expresión transitoria, para que pudieran ser analizados posteriormente empleando técnicas más directas como el "northern".

Se ha reportado que al tratar a las células endoteliales con TNF- $\alpha$  se induce expresión de diversos genes, como las moléculas de adhesión: ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E (Heyward et al, 1995). Para comprobar esta inducción, se cultivaron células endoteliales y se trataron con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  por 12 h para después hacer una extracción de RNA total el cual se utilizó para hacer reacción de TR y posteriormente PCR como se describe en materiales y métodos.

En la figura 14 podemos observar que VCAM-1 y la selectina-E tienen niveles basales de sus mensajeros independiente al tratamiento (carriles sin

TNF $\alpha$ :(-)). Sin embargo, cuando las células son tratadas con TNF- $\alpha$  el análisis de intensidad de la señal muestra que se duplica la producción de ambos transcritos. Para ICAM-1 los niveles basales de mensajero son apenas detectables pero, al ser expuestas al TNF- $\alpha$  la cantidad de transcrito llega casi a triplicarse.

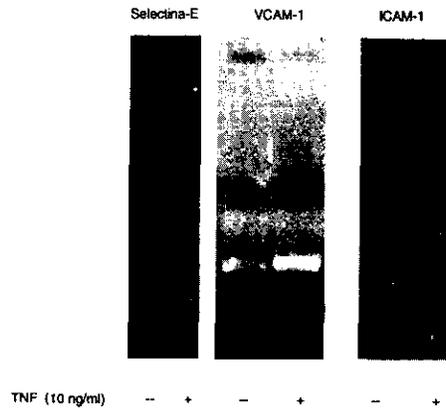


Fig. 14. Cambios en los niveles de RNAm de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en respuesta al TNF- $\alpha$ . Cultivos de endotelios fueron tratados con (+) y sin (-)TNF- $\alpha$  por 12 h, después se realizó una extracción de RNA total posteriormente la cantidad del transcrito fue evaluada por TR y PCR de acuerdo a materiales y métodos.

Con la finalidad de saber si la inducción del mensajero de moléculas de adhesión por TNF- $\alpha$  constituía un cambio permanente o era un evento transitorio, células endoteliales fueron tratadas con o sin TNF- $\alpha$  y los RNAm fueron extraídos a las 1, 3, 6, 12, 18 y 24 h con los que posteriormente se realizó TR y PCR.

Los resultados muestran que la transcripción de la selectina-E es inducida rápidamente estando presente desde 1 h y alcanzando el máximo de expresión entre las 3 y las 6 h, representando el doble de lo obtenido en 1 h, para después declinar sin llegar a desaparecer a las 24 h (Fig. 15B). Para ICAM-1 se observa una cinética de inducción diferente, con un pico máximo a las 12 h, siendo el triple del basal, que disminuye a las 24 h (Fig. 15D). En el caso de VCAM-1 se

nota un aumento muy ligero desde las 3 h, para continuar aumentando hasta las 6 h donde el contenido de transcrito es seis veces el obtenido en 1 h posteriormente disminuye paulatinamente hasta casi desaparecer a las 24 h (Fig. 15C).

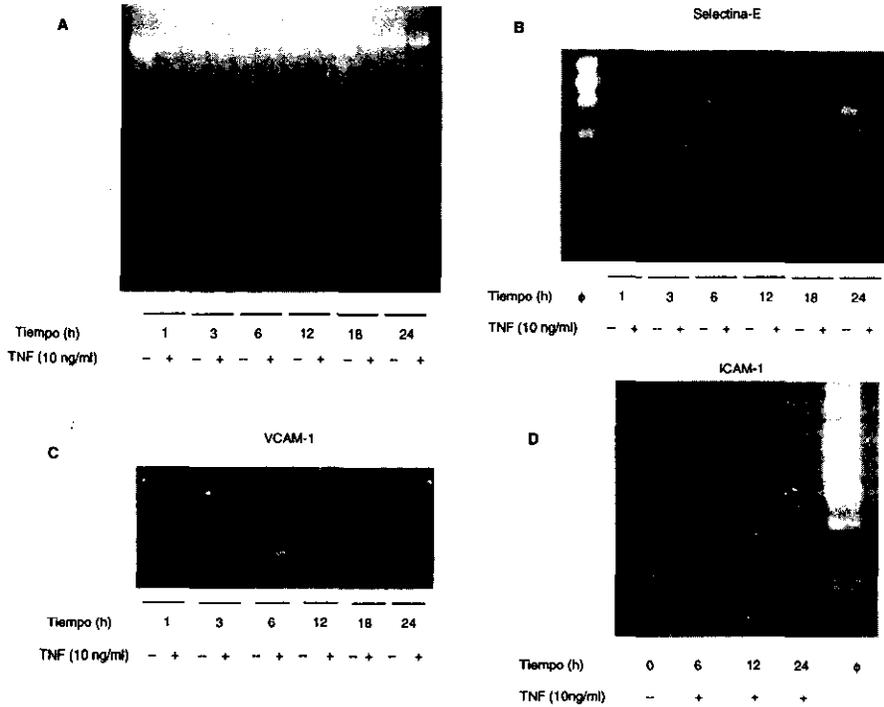


Fig. 15. Aumento transitorio en los niveles de RNAm de selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 mediados por TNF- $\alpha$ . Cultivos de células endoteliales fueron tratados con (+) y sin (-) TNF- $\alpha$  por los tiempos indicados, mismos en los cuales se extrajo el RNA total para posteriormente hacer TR y PCR de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se muestran el RNA total del que se partió para las reacciones de TR y PCR(A), y el producto de las reacciones obtenidos utilizando los oligonucleótidos para selectina-E (B), VCAM-1 (C) e ICAM-1 (D).  $\phi$  corresponde al marcador de peso molecular.

## **Efecto del TNF- $\alpha$ sobre los niveles de RNAm de selectina-E en cultivos de células endoteliales sincrónicas**

La mayoría de las respuestas celulares se dan cuando las células están en la fase G1 del ciclo celular, haciendo que en un cultivo asincrónico sólo una fracción de las células pueda responder a estos estímulos. De manera que en los experimentos anteriores, realizados en cultivos asincrónicos, sólo una fracción de la población endotelial debería de estar en la etapa de G1 en la que las células pudieran responder al TNF- $\alpha$ .

Los resultados obtenidos hasta este momento sugieren que la selectina-E es la molécula que se induce más rápido; para obtener una población homogénea de células en la que se pudiera establecer el tiempo de respuesta más corto, se sincronizaron cultivos para posteriormente hacer extracciones de RNAm a los tiempos establecidos.

### **Sincronización celular**

La sincronización se evaluó utilizando citometría de flujo como se describe en materiales y métodos. Células asincrónicas y sincrónicas fueron analizadas a las 24 h, momento en el que las células se encuentran en la fase G1 según lo reportado por Lopez-Marure y colaboradores (López-Marure et al, 1997).

El análisis mostró que en cultivos sincronizados a las 24h casi el 90% de la población celular se encuentran en la región correspondiente a la fase G1 y solo un 5% en S y un 6% en G2/M (Fig. 16A), en comparación con cultivos no sincronizados, donde se obtuvo un 59% de la población celular en G1, 11% en S y 30% en G2/M (Fig. 16B).

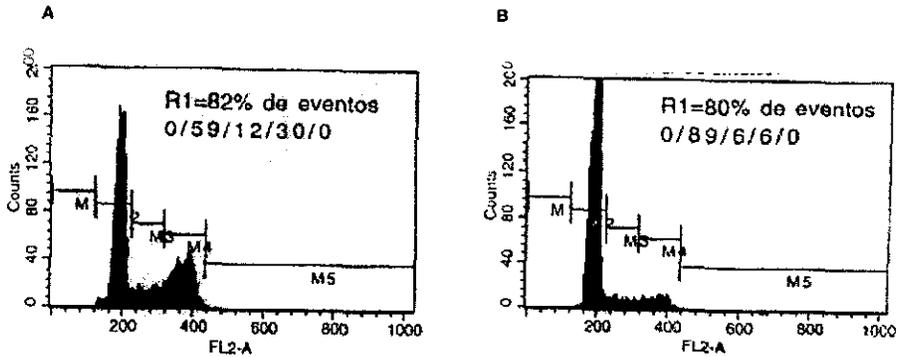
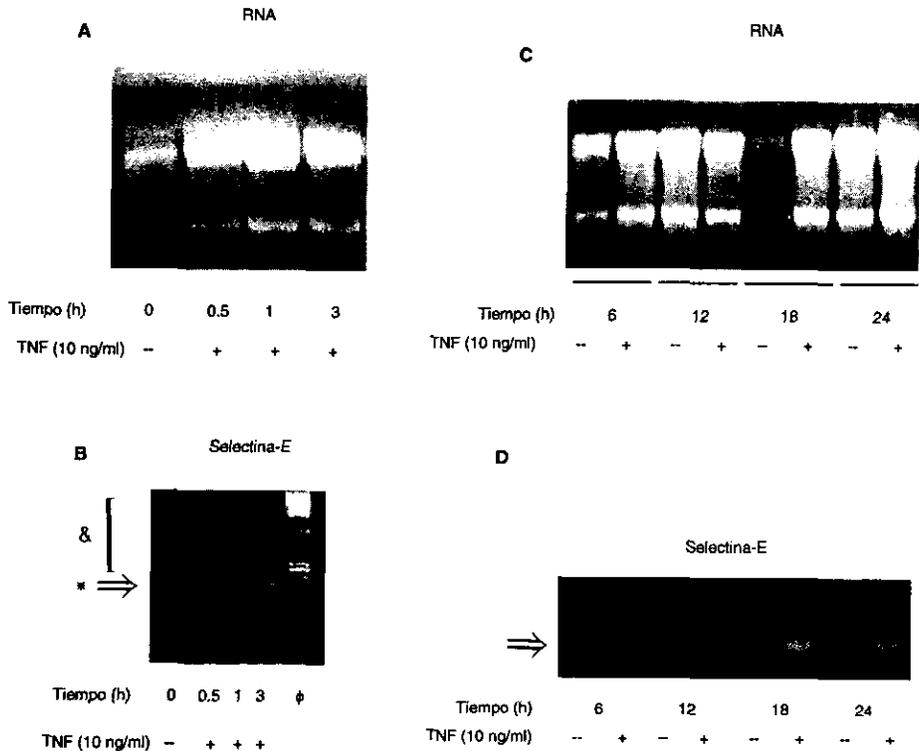


Fig. 16. Sincronización de cultivos endoteliales. A) Citometría de flujo de cultivos asincrónicos; B) Citometría de flujo de cultivos sincrónicos; después de 24 h de ser sembradas. R1, porcentaje del total de eventos que se utilizaron para las gráficas; Los números corresponden al porcentaje de núcleos en cada una de las regiones M1, M2, M3, M4 y M5. Las regiones M2, M3 y M4 corresponden a las fases G1, S y G2/M del ciclo celular.

### Aumento en los niveles de RNAm de selectina-E en cultivos sincrónicos

Para la extracción de RNA total, cultivos de células endoteliales sincrónicas fueron tratadas con o sin TNF- $\alpha$ , los RNAm fueron extraídos 0.5, 1, 3, 6, 12, 18 y 24 h, después de adicionar el TNF- $\alpha$  y se evaluó la cantidad de transcrito por TR y PCR. En la fig. 17, podemos observar que a la media hora de tratamiento se observa una familia de productos de PCR entre los que destacan por su abundancia 3 bandas de mayor tamaño comparado con el producto esperado de 254 pb; después de una hora de tratamiento ya no se observa la banda más pesada y se ve una menor cantidad de las otras dos y un aumento en la intensidad del producto final; a las 3h sólo se observa la banda correspondiente al producto esperado que es más intensa que en los tiempos anteriores. Siguiendo la expresión a las 6, 12, 18 y 24h podemos notar que el punto máximo de expresión se obtiene a las 18h. En células no tratadas no se pudo detectar productos de PCR al tiempo 0 y niveles bajos a los tiempos 6, 12, 18 y 24h.



**Fig. 17.** Aumento transitorio en los niveles de selectina-E mediada por TNF- $\alpha$ . Cultivos de células endoteliales sincrónicas fueron tratados con (+) y sin (-)TNF- $\alpha$  por los tiempos indicados, mismos en los cuales se extrajo el RNA total para posteriormente hacer TR y PCR. A) y C) Muestran el RNA total; B) y D) el producto de las reacciones utilizando los oligonucleótidos para selectina-E. \* Producto esperado de la PCR específica para selectina-E, & productos de PCR que probablemente representan productos de maduración del RNAm de selectina-E.

### Efecto del TNF- $\alpha$ los niveles proteicos de las moléculas de adhesión ICAM-1 y selectina-E.

Para definir si el efecto del TNF- $\alpha$  sobre los niveles de RNAm también se extendía a la expresión de las proteínas de adhesión se realizaron inmunoanálisis utilizando anticuerpos monoclonales contra las proteínas: selectina-E e ICAM-1.

Los resultados muestran que para la selectina-E se observa una inducción desde las 3h, alcanzando un pico máximo de expresión a las 12h para después decaer paulatinamente. ICAM-1 presenta una cinética de inducción diferente, que se hace evidente a las 6h con la máxima expresión a las 18h para posteriormente disminuir. Sin embargo la cantidad de ICAM-1 expresada es menor que la cantidad de selectina-E que se observa (Fig. 18)

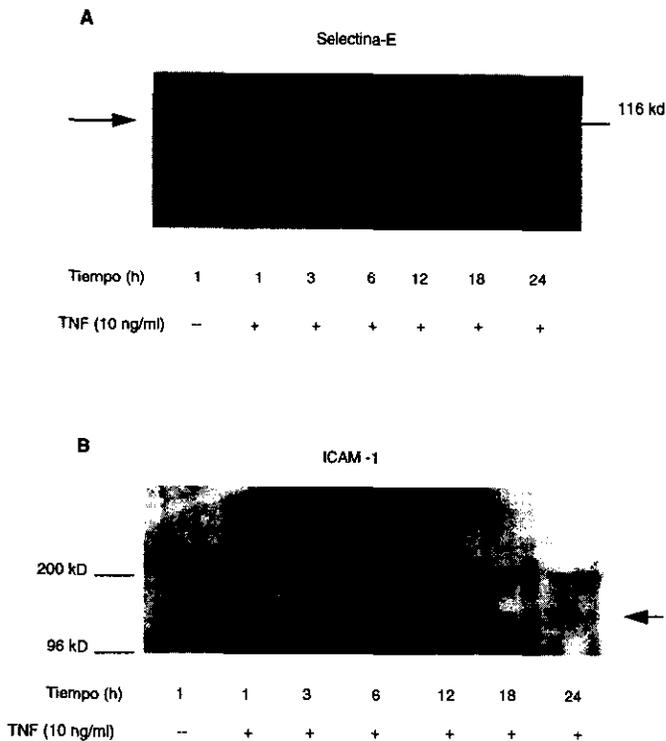


Fig. 18. Inmunoanálisis de la expresión de ICAM-1 y selectina-E inducidas por TNF- $\alpha$ . Cultivos de células endoteliales asincrónicos fueron tratados con (+) y sin (-)TNF- $\alpha$  por los tiempos indicados, mismos en los cuales se hizo una extracción total de proteína para hacer inmunoblots con anticuerpos monoclonales para selectina-E (A) y para ICAM-1 (B). La flecha corresponde al peso molecular esperado para las proteínas de selectina-E e ICAM-1 respectivamente.

Teniendo como antecedente la rápida elevación del RNAm de selectina-E e ICAM-1 se evaluó la expresión de proteína en cultivos sincrónicos control o tratados con TNF- $\alpha$  por inmunoanálisis. Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que para selectina-E se alcanza el valor más alto a las 12h de tratamiento con TNF- $\alpha$  mientras que para ICAM-1 se encuentra a las 24h (Fig. 19).

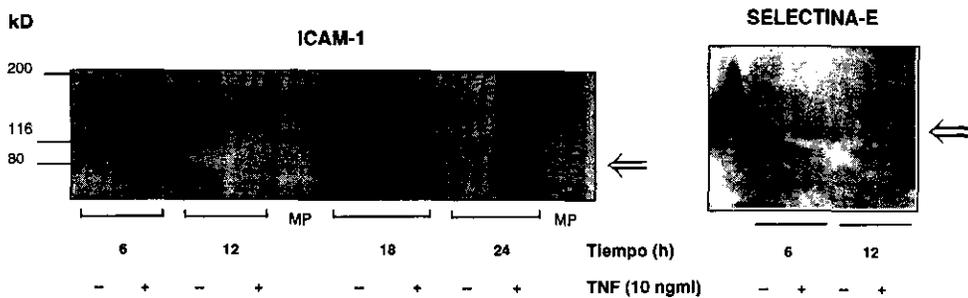


Fig. 19. Expresión de la selectina-E en cultivos de células endoteliales sincronizados. Cultivos de células endoteliales sincronizados fueron tratados con (+) o sin (-) TNF- $\alpha$  por los períodos indicados, al término de los cuales se hizo una extracción de proteína total para inmunoanálisis. Posiciones de ICAM-1 y selectina-E en los geles ( ).

### Adhesión de células promielocíticas U937 a células endoteliales tratadas con TNF- $\alpha$ .

Las moléculas ICAM-1, VCAM-1 y la selectina-E participan en la respuesta inflamatoria mediando la adhesión de leucocitos al endotelio vascular; también se ha reportado que estas moléculas juegan un papel importante en la metástasis de tumores ya que se ha sugerido que estos utilizan un sistema semejante al de los leucocitos para adherirse a las células endoteliales. Además, se ha reportado la participación de citocinas en proceso de adhesión de células metastásicas al endotelio.

Una vez demostrado que el TNF- $\alpha$  induce la expresión de éstas moléculas, se quiso ver el efecto de esta inducción en la adhesión de células mieloides de la línea U937, para lo que se montaron experimentos *in vitro* que nos permitieran estudiar la adhesión del mieloma.

En vista de que las moléculas que analizamos aumentan sus expresión a partir de las 3 h de tratamiento con TNF- $\alpha$ , se decidió medir la adhesión a ese tiempo de incubación con la citocina.

El primer paso consistió en conocer cual era el tiempo necesario para obtener la mayor adhesión posible, por lo que para estandarizar el tiempo adhesión se puso a las células promielocíticas sobre los endotelios tratados con TNF- $\alpha$  por 3 h y a partir del momento en el que se estableció el contacto con los endotelios se midió la adhesión a distintos tiempos.

Los resultados obtenidos sugieren un aumento transitorio en la adhesión. En la figura 20 se muestra un aumento estadísticamente significativo desde los 15 min que incrementa hasta alcanzar un máximo de adhesión entre las 2 y las 3h; por lo que el tiempo de coincubación de U937 y endotelio para medir la adhesión se estandarizo en 3h (Fig. 20).

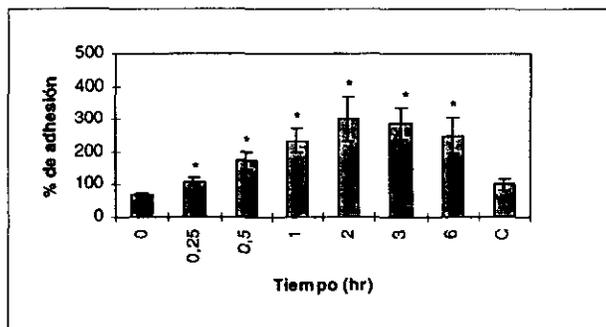


Fig. 20. Curva de adhesión de U937 de acuerdo al tiempo de contacto con las células endoteliales. Cultivos asincrónicos de células endoteliales se trataron con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) por 3 h y se pusieron en contacto con las U937 por distintos tiempos. La adhesión se evaluó de acuerdo a lo establecido en materiales y métodos. \* Las diferencias con respecto al control son significativas ( $p < 0.005$ ).

Los resultados de las reacciones de TR y PCR, de los inmunoblots y los anteriores sugieren que las moléculas de adhesión tienen una cinética de expresión transitoria, de manera que si estas moléculas participan en la

adhesión de células U937 la adhesión de éstas células debería ser un fenómeno transitorio; para lo cual, se hizo una curva en el tiempo tratando a las células con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$ .

Para el experimento se trataron a las células de la siguiente manera:

C	=	Sin TNF- $\alpha$
3	=	1.5h con TNF- $\alpha$ y 1.5h con U937
6	=	3h con TNF- $\alpha$ y 3h con U937
12	=	3h con TNF- $\alpha$ y 9h con U937
32	=	23h con TNF- $\alpha$ y 9h con U937

En la figura 21 se puede observar que hay un aumento de siete veces en la adhesión con respecto al control (sin TNF- $\alpha$ ) a las 3h que alcanza un máximo a las 6h aumentando ocho veces en relación al control; a las 12h la adhesión decae a la mitad, manteniéndose constante hasta las 32h. Es importante notar que la adhesión entre las 12 y las 32h es cuatro veces mayor al control. Estos resultados confirman los resultados obtenidos por TR y PCR, y los inmunoblots demostrando que la adhesión tiene un aumento transitorio.

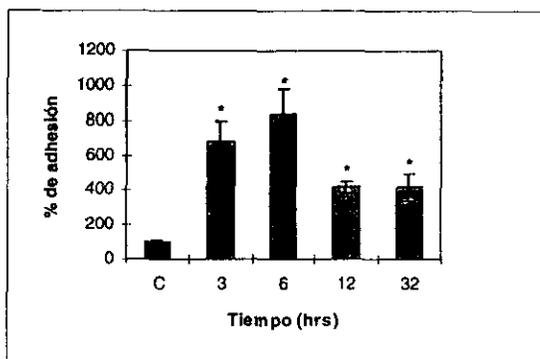


Fig. 21. Curva de adhesión de células U937 a distintos tiempos a endotelios tratados con TNF- $\alpha$ . Cultivos de células endoteliales asincrónicas fueron tratados sin (C) y con TNF- $\alpha$  por los tiempos indicados en el texto y posteriormente la adhesión se evaluó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Las diferencias con respecto al control sin TNF- $\alpha$  fueron significativas con  $p < 0.005$  \*.

En la serie de resultados anteriores la adhesión a las 6h fue mayor que la obtenida a las 12h, para corroborar esta diferencia y para ver si la respuesta era dosis dependiente se hicieron curvas de concentraciones TNF- $\alpha$  a las 6 y 12 h. Para las 6h se trató 3h con TNF- $\alpha$  y 3h en contacto con U937 mientras que para 12h fueron 3h con TNF- $\alpha$  y 9h en contacto con las U937. Los resultados mostraron nuevamente que la adhesión es mayor a las 6h (Fig. 22A) que a las 12h (Fig. 22B); sin embargo para los dos casos la respuesta es dosis dependiente, obteniendo el máximo con 1 ng/ml de TNF- $\alpha$  ya que con 10 ng/ml se obtiene casi la misma respuesta.

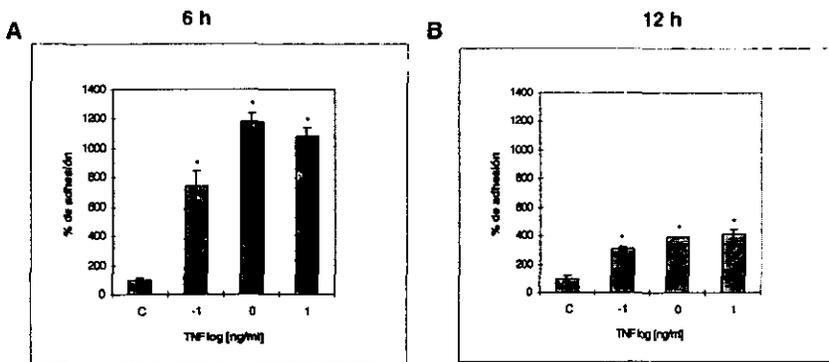


Fig. 22. Curva dosis/respuesta a TNF- $\alpha$  a 6 (A) y 12h(B). Cultivos asincrónicos de células endoteliales se trataron sin (C) y con distintas concentraciones de TNF- $\alpha$  a los tiempos indicados fueron procesados como se indicó en materiales y métodos. Las diferencias con respecto al control sin TNF- $\alpha$  fueron significativas con  $p < 0.005$  \*.

En los experimentos anteriores de 12h las U937 se dejaron en contacto con el endotelio 9h, pero habiendo establecido las 3h como tiempo máximo de adhesión (Fig. 20) y dado que a las 12h se pueden seguir diferentes protocolos que pudieran variar los resultados obtenidos, se hicieron curvas de 12h con los siguientes protocolos:

- B.- 3.6.3 = 3h con TNF- $\alpha$ , 6h sólo medio y 3h con U937
- C.- 3.9 = 3h con TNF- $\alpha$  y 9h con U937 (Fig. 23C)

D.- 9.3 = 9h con TNF- $\alpha$  y 3h con U937 (Fig. 23D)

Se tomó como control un experimento de 6h, que además ratificaría que la adhesión a 6 h es mayor que la obtenida a las 12h.

La figura 23 muestra que los porcentajes de adhesión obtenidos en los distintos protocolos de 12h es menor que la de 6h, sin embargo, en el protocolo en el que los endotelios estuvieron 6h con medio (Fig. 23B) se nota una menor adhesión que en los otros dos protocolos que tienen exposición continua ya sea a las células o al TNF- $\alpha$  (Fig. 23 C y D).

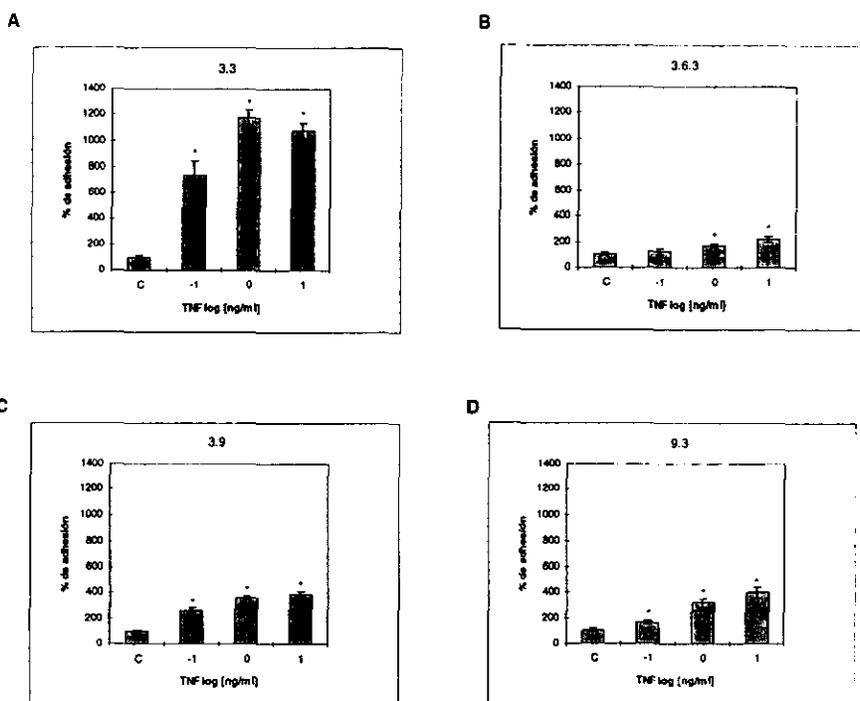


Fig. 23. Curva dosis respuesta a TNF- $\alpha$  a 6 h y 12 h. Cultivos asincrónicos de células endoteliales se trataron con las mismas concentraciones de TNF- $\alpha$  de la figura 22 siguiendo distintos protocolos para las 12h: B) 3h con TNF- $\alpha$ , 6h con medio y 3h en contacto con U937; C) 3h con TNF- $\alpha$  y 9h en contacto con U937 y D) 9h con TNF- $\alpha$  y 3h en contacto con U937. Las células se procesaron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los controles sin TNF- $\alpha$  están marcados con una "C", las diferencias con respecto al control sin TNF- $\alpha$  fueron significativas con  $p < 0.005$  \*.

Con los resultados anteriores se estableció un protocolo de incubación de 6 h: 3 h de tratamiento con TNF- $\alpha$  y 3 h con las U937, con el cual obtenemos la máxima respuesta de adhesión. Todos los experimentos posteriores se hicieron siguiendo éste protocolo.

### **Efecto de la densidad endotelial sobre la adhesión**

Los resultados presentados anteriormente fueron hechos sembrando a las células a una densidad de 20,000 células por  $\text{cm}^2$ , que corresponde a un 50% de confluencia; sin embargo, en su estado normal las células endoteliales se encuentran formando el recubrimiento de los vasos sanguíneos a una confluencia del 100%. Para valorar si la densidad causaba un efecto sobre la adhesión se sembraron células endoteliales a dos densidades: a 20,000 células por  $\text{cm}^2$  como en los experimentos anteriores y a 150,000 células por  $\text{cm}^2$  donde las células quedaban a una confluencia del 100%.

Los porcentajes de adhesión obtenidos con los endotelios sembrados a baja densidad (Fig. 24A) son casi tres veces más altos que los obtenidos cuando las células estaban en confluencia (Fig. 24B), al igual que en otros experimentos, la respuesta para ambos casos es dosis dependiente.

En estos experimentos se cuantificó la marca incorporada en las células U937 tal como se ponían sobre los endotelios (1'000,000 de U937), lo que nos permitió establecer la relación de cuantas células U937 se pegaban por endotelio (Fig. 24 C y D). Se observa que existe una mayor adhesión en células sembradas a baja densidad, sin embargo, cuando se hace la relación con el número total de endotelios 20,000  $\text{cm}^2$  y 150,000  $\text{cm}^2$ , el número total de U937 adherido al endotelio es el mismo en ambos casos (Fig. 24 C y D).

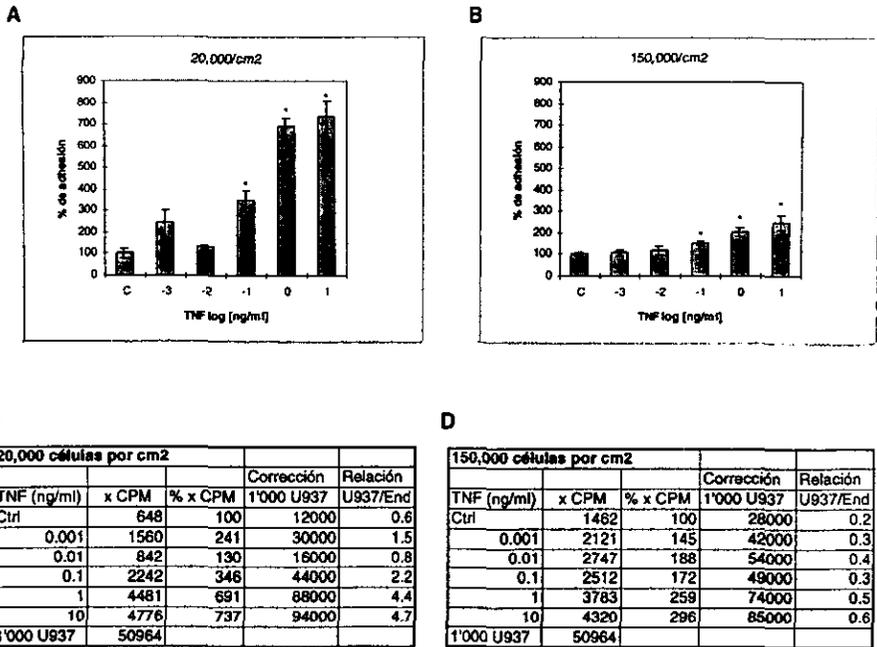


Fig. 24. Efecto de la densidad sobre la adhesión de células U937 a células endoteliales. Se sembraron cultivos asincrónicos de células endoteliales a dos densidades: 20,000 células por cm<sup>2</sup> (A) y 150,000 células por cm<sup>2</sup> (B) y se trataron sin (C) TNF- $\alpha$  o concentraciones crecientes de TNF- $\alpha$  por 6h y se procesaron según lo descrito en materiales y métodos. En C y D relación de células U937 por endotelio, calculada por la corrección del número total de células U937. Las diferencias con respecto al control sin TNF- $\alpha$  fueron significativas con  $p < 0.005$ .

Habiendo hecho amplificación de RNAm e inmunoblot de cultivos sincrónicos, se quiso saber que efecto tendría la sincronización celular sobre la adhesión de células U937; para lo cual se sincronizaron cultivos endoteliales se resembraron a una densidad del 80% y se trataron de la siguiente manera:

B.-Resiembra (T0) a las 6h se puso TNF- $\alpha$  por 3h, y después las células se añadieron por 3h más con para dar un total de 12h (G1 temprano)(Fig. 25B).

C.-Resiembra (T0) a las 30h se puso TNF- $\alpha$  por 3h y 3h con U937, para un total de 36 h (G1 tardío)(Fig. 25C).

Se utilizó un cultivo asincrónico como control (Fig. 25A).

Paralelamente se hizo un análisis de sincronización por citometría de flujo, en el que se observó que en a las 12h un 93% de las células se encontraba en G1 y a las 36h el 91% de la población estaba en la fase G1 del ciclo (Fig. 25A y B).

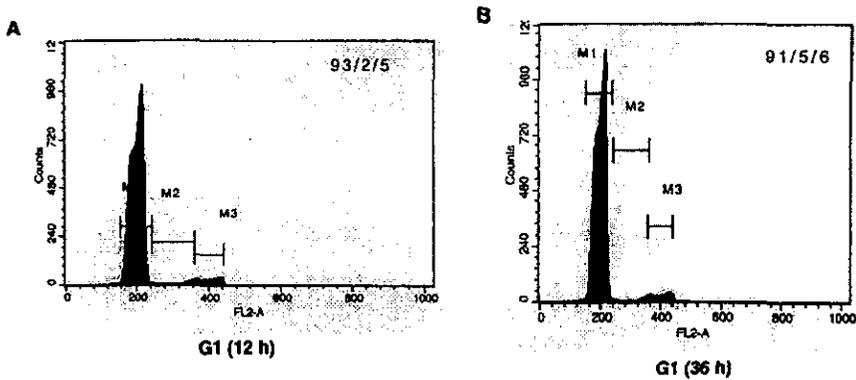


Fig. 25. Citometría de flujo de cultivos sincronizados después de las 12 y 36h de resiembra. La región marcada con M1 representa la fase G1, la M2 es la fase S (síntesis de DNA) y M3 representa a las células que se encuentran en G2/M.

Los resultados muestran que la adhesión es menor en células que se encuentran la fase temprana de G1 (Fig. 26B), mientras que las que están en G1 tardío (Fig. 26C) responden igual que el control asincrónico (Fig. 26A); cabe hacer notar que la repuesta a las 36h se satura con la concentración mínima de TNF- $\alpha$  a diferencia de los otros dos casos en los que se mantiene la curva dosis repuesta.

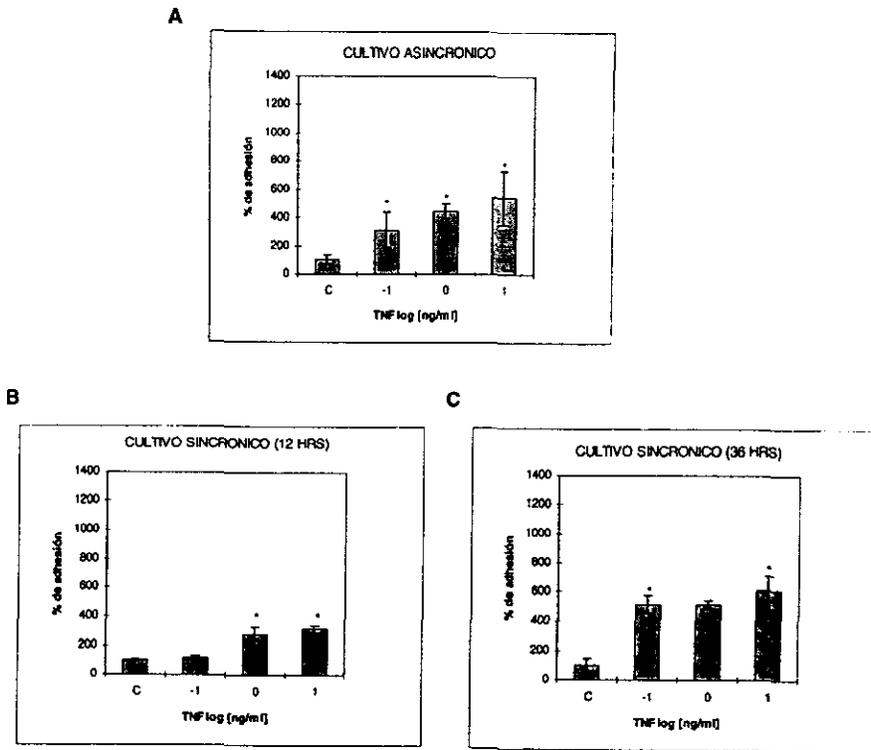


Fig. 26. Adhesión de células U937 a cultivos endoteliales sincrónicos. Cultivos sincrónicos de células endoteliales fueron resembrados y tratados con TNF- $\alpha$  como se indica en el texto, las muestras fueron procesadas como se indica en materiales y métodos. A) Cultivo asincrónico; B) Cultivos sincrónico 12h después de la siembra; C) Cultivo sincrónico 36h después de siembra. En las gráficas los controles se indican con una "C". Las diferencias con respecto al control sin TNF- $\alpha$  fueron significativas con una  $p < 0.005$  \*.

### Participación de la Selectina-E y VCAM-1 en la adhesión de U937 a endotelios

Una vez demostrado que el TNF- $\alpha$  induce un aumento en la adhesión y de que este aumento es transitorio lo que correlaciona con los resultados obtenidos en las reacciones de PCR y por inmunoblot; se quiso valorar la participación de las moléculas de adhesión: selectina-E y VCAM-1 en la

adhesión de las células promielocíticas, para lo cual se utilizaron anticuerpos neutralizantes de la función de éstas moléculas.

La figura 27 muestra que cuando las células endoteliales son pretratadas por 2h con un anticuerpo monoclonal (0.01 ng/ml) ya sea anti-selectina-E (Fig. 27A) o anti-VCAM-1 (Fig. 27B) la respuesta de adhesión se abate a pesar de la presencia del TNF- $\alpha$  (10 ng/ml).

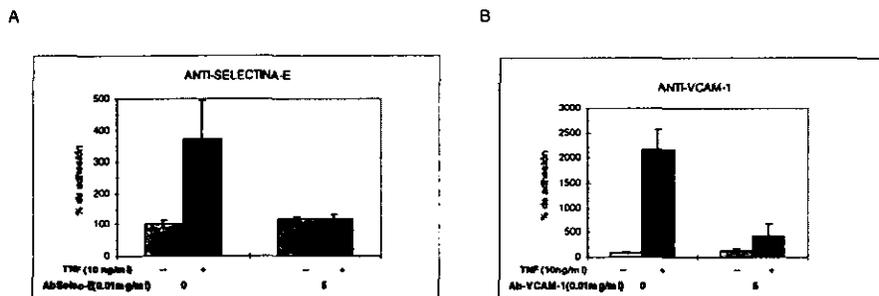


Fig. 27. Inhibición de la adhesión por anticuerpos neutralizantes de moléculas de adhesión. Cultivos asincrónicos de células endoteliales fueron pretratados 2h con anticuerpos: A) Antiselectina-E y B) Anti-VCAM-1, posteriormente se siguió el protocolo establecido (3h con TNF- $\alpha$  y 3h con U937) y se procesaron como lo indicado en materiales en métodos. Las diferencias con respecto al control sin TNF- $\alpha$  fueron significativas con  $p < 0.005$  para los casos tratados sólo con TNF- $\alpha$ .

### **Efecto del inhibidor de seril-treonilcinasas (H7) y de dexametasona (agonista de glucocorticoides)**

Se ha sugerido que en la vía de expresión de las moléculas de adhesión es necesaria la participación de proteínas cinasas que fosforilan al inhibidor del factor de transcripción NF $\kappa$ B, conocido como I $\kappa$ B, en residuos de seril-treonil. Para confirmar la participación de éste tipo de cinasas y de esta vía de activación en el proceso de adhesión, se pretrató a los endotelio con un inhibidor inespecífico (H7) de éstas proteínas cinasas y se midió el efecto que tiene sobre la adhesión de células U937.

Los resultados obtenidos nos mostraron que la adhesión basal no se vio alterada por la presencia del inhibidor; sin embargo, cuando las células se trataron con el inhibidor y en presencia de TNF- $\alpha$  la adhesión disminuyó regresando a la adhesión basal cuando se utiliza la concentración más alta de inhibidor (10  $\mu$ M) (Fig 28).

H7

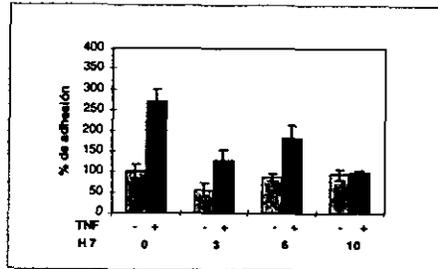


Fig. 28. Efecto del inhibidor de seril-treonil cinsas (H7) en la adhesión de células U937. cultivos asincrónicos de células endoteliales fueron pretratados 2h con H7 para después continuar con el protocolo de adhesión establecido (3h TNF- $\alpha$  + 3h U937), la adhesión se analizó como se describe en materiales y métodos.

Otra manera de medir la participación del factor transcripcional NF $\kappa$ B, en la adhesión fue se utilizar dexametasona, cuya actividad antiinflamatoria induce la expresión de I $\kappa$ B evitando la translocación de NF $\kappa$ B y por tanto la inducción de los genes dependientes de él.

La figura 29 muestra que el tratamiento de dexametasona no causa ningún efecto sobre el cultivo endotelial por lo que se mantiene la adhesión basal, sin embargo, cuando los cultivos se pretratan con dexametasona y después con TNF- $\alpha$  se observa una pequeña disminución en la adhesión la cual es independiente de la concentración de dexametasona.

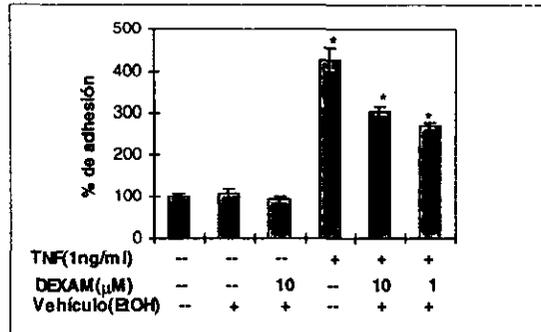


Fig. 29. Efecto de la dexametasona en la adhesión de U937 a endotelios. Cultivos asincrónicos de células endoteliales fueron pretratados 2h con dexametasona y posteriormente con (+) y sin (--) con TNF- $\alpha$ . y después se continuo con el protocolo de adhesión establecido (3h TNF- $\alpha$  y 3h U937), la adhesión se proceso según lo reportado en materiales y métodos. La dexametasona se disolvió en etanol (vehículo) del cual se presenta también un control.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

### **Pureza de los cultivos.**

En éste estudio hemos caracterizado la capacidad del TNF- $\alpha$  de inducir cambios moleculares y funcionales relacionados con la adhesión de promielocitos U937 a cultivos primarios de células endoteliales. Dado que durante el proceso de preparación de éstos cultivos primarios no se utiliza ningún sistema de selección o enriquecimiento de las células endoteliales y que se parte de una digestión protéica de vena umbilical, es posible que los cultivos de células endoteliales tuvieran además distintas proporciones de fibroblastos, mioblastos y pericitos. La presencia de éstos tipos celulares podría afectar de manera directa o indirecta la activación endotelial mediada por TNF- $\alpha$ . Por ejemplo, se ha descrito que los fibroblastos son capaces de responder al TNF- $\alpha$  liberando al medio distintas citocinas que pueden modificar la función endotelial. Por estas razón resultó favorable obtener cultivos primarios de células endoteliales que presentaran una contaminación no mayor al 1% con otros tipos celulares y que éste grado de pureza se conservara durante los primeros dos pasajes. La solidez de éstos resultados se fundamenta en que la expresión del factor Von Willebrand está limitada a células endoteliales y células cebadas, éstas últimas presentes solo en órganos hematopoyéticos.

La ausencia de células contaminantes en los cultivos primarios de células endoteliales, permite concluir que los efectos observados se deben a la acción directa del TNF- $\alpha$  sobre las células endoteliales.

### **Incrementos en los niveles RNAm de moléculas de adhesión.**

El tratamiento con TNF- $\alpha$  aumentó los niveles de RNAm de las tres moléculas de adhesión ensayadas de manera transitoria; sin embargo, estos aumentos tuvieron diferencias en magnitud y en la cinética con la que alcanzaron sus niveles máximos.

Los resultados de TR y PCR de la figura 15 muestran que en el caso de selectina-E alcanza el nivel máximo de expresión (2 veces lo obtenido en 1h) después de 3h de tratamiento con TNF- $\alpha$ . El comportamiento del mensajero de VCAM-1 alcanzó su nivel máximo a las 6h después de iniciado el tratamiento (6 veces con respecto al obtenido después de 1h de tratamiento). El mensajero de ICAM-1 alcanzó su valor máximo (3 veces el valor obtenido a 6h) a las 12h.

Estos resultados nos permiten concluir que la inducción de éstas moléculas mediada por TNF- $\alpha$  es un proceso transitorio como ya había sido reportado (Haliday et al, 1991). La secuencia de inducción observada (selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1) correlaciona con el número de sitios de unión de reconocimiento para NF $\kappa$ B en cada uno de los promotores (3 para selectina-E, 2 para VCAM-1 y 1 para ICAM-1). Sin embargo, esto no excluye la participación de otros factores de transcripción cuyas secuencias también se encuentran presentes en los promotores de estas moléculas (Fig. 13), ya que solo la diferencia en el número de sitios NF $\kappa$ B no puede explicar la expresión secuencial de los genes.

### **Incrementos en los niveles de proteína de moléculas de adhesión.**

Con el objetivo de correlacionar la inducción de RNAm inducida por TNF- $\alpha$  y los niveles de expresión de proteína de cada una de las moléculas de adhesión, se analizaron los extractos proteicos en inmunoblots, utilizando anticuerpos monoclonales comerciales para ICAM-1 y selectina-E, el análisis de VCAM-1 no pudo ser realizado por no contar con el anticuerpo de reconocimiento

a esta proteína. Ambos anticuerpos reaccionaron positivamente con más de una banda, por lo que la identidad de ICAM-1 y selectina-E se determinó por el peso molecular esperado. La señal generada por el anticuerpo anti-selectina-E fue más específica que la obtenida con el anticuerpo contra ICAM-1 que dió una señal relativamente ambigua.

El tratamiento con TNF- $\alpha$  aumentó los niveles de las proteína analizadas de una manera transitoria; la selectina-E alcanza su nivel máximo de expresión a las 12h de tratamiento, mientras que ICAM-1 tiene su máximo a las 18h.

Al comparar las cinéticas de expresión de RNAm y de proteína para selectina-E encontramos que mientras que el mensajero alcanzó su nivel máximo a las 3h la proteína lo alcanza a las 12h. Los niveles de RNAm de selectina-E en los controles fue variable (Fig. 14 y 15) pero siempre menor a las muestras tratadas con TNF- $\alpha$  que concuerdan con la señal más tenue de proteína obtenida en el inmunoblot de la figura 18A. Por lo tanto concluimos que las células endoteliales tienen un nivel basal de expresión de mensajero que correlaciona con un nivel reducido de proteína.

Para ICAM-1 el mensajero alcanzó su máximo a las 12h mientras que la proteína lo hizo a las 18h, este desfase en el tiempo entre el mensajero y la proteína (6h) es más corto que el observado para selectina-E (9h) y concuerda con el principio de que los cambios en los niveles de mensajero deben preceder a los de proteína.

Después de 6h de tratamiento con TNF- $\alpha$  es posible distinguir niveles muy bajos para ICAM-1 (Fig. 15D), estos niveles posiblemente representan una expresión basal que se encuentra en el límite de detección de nuestro ensayo. Dada la ambigüedad de la señal del anticuerpo contra ICAM-1 no podemos descartar la señal obtenida en los controles sin TNF- $\alpha$  (Fig. 18B, carril 1h sin TNF- $\alpha$ ).

El orden de inducción entre las proteínas de selectina-E e ICAM-1 correlacionan con el obtenido para los mensajeros correspondientes, a pesar de carecer del inmunoanálisis para VCAM-1 los antecedentes predicen que la

expresión proteica alcanzaría su nivel máximo entre las 12h (selectina-E) y las 18h (ICAM-1).

Los resultados de expresión proteica no son informativos con respecto a la cantidad de proteína funcional expresada en la membrana celular y sólo indican la síntesis de nueva proteína en respuesta al TNF- $\alpha$ . Quedaba por determinar si esos cambios de expresión proteica están asociados a la fisiología de la adhesión.

### **Caracterización de la adhesión de promielocitos a células endoteliales.**

Durante los procesos inflamatorios se lleva a cabo la adhesión al endotelio y la extravasación de leucocitos utilizando moléculas de adhesión expresadas en ambos tipos celulares. Existen reportes de que este mismo mecanismo es utilizado por células tumorales con capacidad metastásica y así adherirse al endotelio y posteriormente invadir sus tejidos blanco (Stoelckel et al, 1996). Ya que los ganglios linfáticos son sitios frecuentemente invadidos por tumores metastásicos se ha postulado que citocinas presentes en estos ganglios, como el TNF o la IL-1 pueden mediar activación endotelial y promover la invasión metastásica. De aquí se desprende la importancia de estudiar si la adhesión de un mieloma humano puede ser mediada por la expresión de moléculas de adhesión en la superficie del endotelio en respuesta al TNF- $\alpha$ .

Habiendo demostrado que el TNF- $\alpha$  induce la expresión de las proteínas de adhesión en cultivos primarios de células endoteliales humanas, se montó un sistema que permitiera caracterizar la adhesión de promielocitos humanos de la línea U937 a estos cultivos.

El primer paso consistió en encontrar un procedimiento que permitiera marcar a las células U937, lo que se logró adicionando timidina tritiada a los cultivos. Este marcaje fue posible gracias a que esta línea promielocítica prolifera normalmente cuando se cultiva *in vitro*, con un tiempo de duplicación de 24h. Después de marcadas las células, la timidina tritiada fue diluida con dos

lavados para finalmente resuspender las células marcadas en el medio en el que se hace el ensayo de adhesión.

La figura 20 muestra que la cantidad de radioactividad adherida al plato aumentó sólo en los pozos que recibieron TNF- $\alpha$ , y que este aumento alcanzó su máximo después de 2h, el hecho de que el ensayo de adhesión mostrara un cambio estadísticamente significativo a los 15 minutos de coincubación sugiere que el proceso que lleva a una interacción fuerte entre los promielocitos y el endotelio es muy rápido. Dado que la concentración de timidina tritiada presente durante el ensayo de adhesión debe haber disminuido por lo menos 1000 veces (en base a la dilución del medio), y que las células endoteliales tienen un tiempo de duplicación de 48h la cantidad de marca incorporada al DNA de las células endoteliales está por debajo del nivel de detección de la técnica. Por tanto consideramos que la cantidad de radioactividad adherida es directamente proporcional a la cantidad de células adheridas.

Al seguir la adhesión a lo largo del tiempo después de haber dado un estímulo inicial del TNF- $\alpha$  observamos que la adhesión aumentaba de manera transitoria, alcanzando su nivel más alto (8 veces la adhesión basal) a las 6h para después caer (Fig. 21). Sin embargo, la adhesión después de 32h aún seguía siendo cuatro veces la adhesión basal. Ya que el TNF- $\alpha$  se mantuvo a lo largo de estos ensayos, este resultado podría ser explicado por una activación subsecuente mediada por TNF- $\alpha$ . Alternativamente, este resultado podría sugerir que la activación endotelial mediada por TNF- $\alpha$  no es totalmente inactivada dejando una activación constante pero de menor magnitud. Esta última posibilidad es interesante por las implicaciones fisiológicas de una activación persistente para una invasión metastásica. Queda por determinar si en la adhesión después de 32h de tratamiento participan las mismas moléculas de adhesión que a tiempos más cortos (3 y 6h).

El efecto transitorio en la adhesión queda demostrada en las curvas de dosis respuesta realizadas 6 y 12h después de adicionar el TNF- $\alpha$  (Fig.22). Vale la pena notar que mientras que 0.1 ng de TNF- $\alpha$  /ml producen una adhesión

intermedia a las 6h este efecto se pierde 6h más tarde. Con el propósito de valorar si el tiempo de exposición al TNF- $\alpha$  o de coincubación con las células U937 pudieran ser responsables de esta caída en la adhesión a las 12h se realizaron varios protocolos experimentales a las 12h (Fig 23). Ya que todos ellos dieron resultados similares, concluimos que el incremento en adhesión mediado por el TNF- $\alpha$  es transitorio.

### **Efectos de la densidad celular y la etapa G1 del ciclo celular sobre la adhesión.**

En los estudios anteriores la adhesión se evaluó en cultivos proliferantes, que se alejan de la condición normal de un endotelio en un vaso sanguíneo, en el que se encuentran sin proliferar y en la fase G1 del ciclo celular. Con el propósito de tratar de acercarse a la condición fisiológica normal de las células endoteliales probamos la adhesión en cultivos sembrados a alta densidad para asegurar que las células estuvieran haciendo contacto en ellas (Fig. 24 B y D). La respuesta de adhesión a diferentes dosis de TNF- $\alpha$  de células sembradas a alta densidad (100% de densidad = 1500,000 células/ cm<sup>2</sup>) fue mucho menor a la observada en cultivos donde las células no se tocaban (50% = de densidad 20,000 células/ cm<sup>2</sup>). Más aún, al comparar el número de células U937 adheridas por cada célula endotelial resultó que los cultivos con un 50% de densidad tuvieron entre 5 y 7 veces más células U937 adheridas por célula endotelial (comparación de la relación U937/End en la figura 24 C y D).

Ya que *in vivo* las células endoteliales se encuentra en las fases G0 o G1 del ciclo celular decidimos probar la activación endotelial en cultivos sincronizados. Los resultados muestran que tanto el RNAm de selectina E (Fig.17) como la proteína de selectina E (Fig. 19) aumentan en respuesta al TNF- $\alpha$ . Paralelamente, la adhesión en cultivos sincrónicos fue menor durante las primeras horas de G1, aumentando en una etapa tardía de G1 (Fig26 B y C). Al comparar las curvas dosis respuesta medidas en cultivos asincrónicos (Fig.

26A) y cultivos sincrónicos en una etapa tardía de G1 (Fig. 26 C) se pudo observar que en los cultivos sincrónicos la respuesta máxima se alcanzó con la concentración más baja de TNF- $\alpha$  de 0.1 ng/ml, pero la magnitud de la adhesión no fue mayor a la alcanzada en cultivos asincrónicos. Este corrimiento de la curva hacia la izquierda sugiere que en los cultivos sincrónicos las células pasan de un estado con baja capacidad de respuesta durante G1 temprana a uno de mayor sensibilidad durante G1 tardía.

Si la activación endotelial fuera igual en cultivos asincrónicos de baja densidad y en cultivos de alta densidad o sincronizados en la fase G1, la adhesión debería ser equivalente. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la alta densidad o la sincronización a etapas tempranas de G1 tienen un efecto negativo sobre la adhesión mediada por TNF- $\alpha$ , aunque no es claro el mecanismo por el cual esto sucede. A este respecto, es posible medir la translocación del Factor NF $\kappa$ B en respuesta al TNF- $\alpha$  en cultivos de alta y baja densidad o en cultivos en distintas etapas de G1. Esta translocación puede servir como un índice del acoplamiento entre el sistema de receptores a TNF- $\alpha$  y el primer paso de transducción asociado a la expresión de moléculas de adhesión.

### **Participación de selectina-E y VCAM-1 en la adhesión.**

La adhesión intercelular requiere de antígenos específicos en los dos tipos celulares que participan en la adhesión y su expresión constituye la base molecular de una gran variedad de procesos celulares como la adhesión de leucocitos o de células tumorales a las células endoteliales. Con el propósito de determinar el tipo de moléculas que permiten la adhesión de las células U937 a las células endoteliales se añadieron anticuerpos neutralizantes contra selectina E o contra VCAM-1 (Fig. 27). Si bien ambos anticuerpos interfirieron con la adhesión, no es clara la manera en que se genera esta interferencia. Normalmente, la unión mediada por selectina-E es muy débil y representa sólo

un paso intermedio hacia una adhesión más firme en la que es esencial la participación de VCAM-1 (Fig. 9). De manera que el anticuerpo contra selectina-E probablemente no permitió el tránsito hacia una adhesión más firme, haciendo que las células U937 se perdieran durante el lavado. Por otra parte, la interferencia mediada por el anticuerpo contra VCAM-1 probablemente haya permitido la formación del enlace con selectina-E pero no la formación de una interacción más fuerte, capaz de resistir el lavado. Por tanto el anticuerpo neutralizante contra selectina-E debiera haber interferido con una fase temprana, mientras que el de VCAM-1 con una fase tardía de la adhesión. Si esta hipótesis es cierta, la adición tardía de anticuerpos contra selectina-E no interferiría con la adhesión ya que esta estaría en una etapa más firme.

Finalmente, de ensayarse la participación de ICAM-1 en el proceso de adhesión, es predecible que la respuesta sería semejante a la de VCAM-1, mediando una adhesión firme. El mensajero de ICAM-1 se expresa después que el mensajero de VCAM-1 (Fig 9 y Fig.15) por lo que podría ser el último elemento que participa en la adhesión firme antes de la extravasación.

Es importante notar que ninguno de los dos anticuerpos pudo abatir la unión basal, implicando que ninguna de estas dos moléculas de adhesión participan en la adhesión basal. Esta observación es relevante para procesos metastásicos ya que sugiere que la adhesión de los promielocitos U937 puede ocurrir a través de mecanismos distintos a los que aquí describimos.

### **Interferencia de la adhesión por un inhibidor de seriltreonil cinasas y por dexametasona.**

La expresión de moléculas de adhesión es dependiente de la activación y translocación del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B (Fig.11, Collins et al, 1995). El control de este factor sobre la expresión de las moléculas de adhesión radica en la presencia de secuencias NF $\kappa$ B en los promotores de los genes que codifican para estas proteínas (Fig 12 y Fig 13). En el laboratorio se ha

demostrado que el TNF- $\alpha$  puede producir la translocación de NF $\kappa$ B en los primeros treinta minutos de tratamiento (datos de Lucia N. López, no publicados). Un paso crucial para esta activación es la fosforilación y subsecuente degradación del inhibidor I $\kappa$ B, por lo que la adición de H7, un inhibidor competitivo de seril- treonilcinasas podría interferir con la activación de NF $\kappa$ B. Los resultados de la figura 28 muestran que H7 tiene un efecto inhibitorio de la adhesión.de manera dosis dependiente,

Una segunda aproximación para explorar la importancia de NF $\kappa$ B en el proceso de adhesión consistió en tratar a las células con dexametasona un agonista de los glucocorticoides con actividad antiinflamatoria. Recientemente se ha demostrado que su efecto antiinflamatorio está mediado por la sobreproducción de I $\kappa$ B, neutralizando así cualquier estímulo que active NF $\kappa$ B. Los resultados de la figura 29 muestran que la preincubación por 2h con concentraciones saturantes de dexametasona puede disminuir parcialmente la adhesión de células U937.

Estos dos experimentos apoyan la hipótesis que la adhesión es dependiente de la activación de NF $\kappa$ B. Queda por demostrar que el tratamiento con H7 o con dexametasona interfiera con la translocación de NF $\kappa$ B al núcleo.

## CONCLUSIÓN GENERAL

La adhesión de promielocitos U937 a células endoteliales aumenta de manera transitoria y dosis dependiente en presencia de TNF- $\alpha$ . La figura 30 presenta de manera esquemática los eventos asociados a este fenómeno.

El tratamiento con TNF- $\alpha$  induce rápidamente la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B, el cual al activarse se transloca al núcleo y favorece la expresión de genes, entre los que se encuentran los genes de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, selectina-E e I $\kappa$ B, que responden aumentando la producción de RNAm. El aumento en el mensajero ocasiona que la expresión de estas proteínas se incremente lo cual se refleja en un aumento en la adhesión de células U937 a los endotelios. Suponemos que estos cambios van acompañados de la síntesis de I $\kappa$ B, inhibidor de NF $\kappa$ B, que al aumentar su síntesis comienza a asociarse con el NF $\kappa$ B y por lo tanto disminuyen los efectos dependientes de su activación, determinando el comportamiento transitorio de la respuesta al TNF- $\alpha$ .

Podemos concluir que el mieloma humano de la línea U937 utiliza las mismas moléculas de adhesión que utilizan los leucocitos para adherirse al endotelio, lo que sugiere que éstas moléculas podrían participar directamente en la metástasis de tumores.

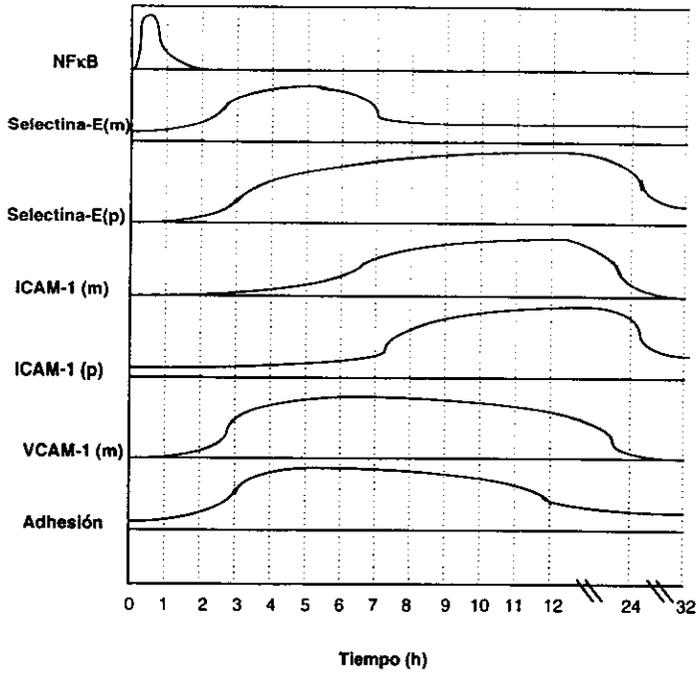


Fig. 30. Distribución temporal de la participación de los componentes de la vía de adhesión analizada. m: mensajero; p: proteína.

## BIBLIOGRAFÍA

Aderka, D. 1991. Role of tumor necrosis factor in the pathogenesis of intravascular coagulopathy of sepsis: potential new therapeutic implications. *Isr J Med Sci*, 27:52-69.

Aggarwal, B. B., y Khor, W. H. 1985. Human tumor necrosis factor. *Methods in Enzymology: Immunochemical techniques*, Vol 116 ed G. DiSabato, Academic Press, New York, p 448.

Aiyer, R. A. y Aggarwal, B. B. 1988. Tumor necrosis factors. En: *CRC handbook on cytolytic lymphocytes and complement. Effectors of the immune system*. Podack, E. R. (De), CRC Press, Boca Ratón, Fla, pp 105-132.

Albelda, S. M. y Buck, C. A. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4:2868-2880.

Allen, M. H., Robinson, M. K., Stephens, P. E., MacDonald, D. M. y Barker, J. N. W. N. 1996. E-selectin binds to squamous cell carcinoma and keratinocyte cell lines. *J Invest Dermatol*, 106:611-615.

Arakawa, T. y Yphantis, D. A. 1987. Molecular weight of recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 262:7484.

Augustine, H. G., Kozian, D. H. y Johnson, R. C. 1994. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays* 16(12):901-906.

Ben-Baruch, A., Michielis, F. y Oppenheim, J. J. 1995. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 270(20):11703-11706.

Beutler, B. 1992. Tumor necrosis factors. The molecules and their emerging role in medicine. Raven Press, New York.

Bevilacqua, M. P., Pober, J. S. y Majeau, G. R. 1986. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:9238-9242.

Butcher, E. C. 1991. Leucocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 50, 1033-1036.

Campbell, J. J., Qin, S., Bacon, K. B., Mackay, C. R. y Butcher, E. C. 1996. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J. Cell Biol* 134(1):255-266.

Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L. Green, S., Fiore, N. y Williamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72:3666-3670.

Chiviri, R. G. S., Chiodoni, C., Musiani, P., Garofalo, A., Bernasconi, S., Colombo, M. P. y Giavazzi R. 1996. IL-1 $\alpha$  gene-transfected human melanoma cells increase tumor-cell adhesion to endothelial cells and their retention in the lung of nude mice. *Intl J Cancer*, 67:856-863.

Chiviri, R. G. S., Garofalo, A., Martin Padura, I., Mantovani, A. y Giavazzi, R. 1993. Interleukin 1 receptor antagonist inhibits the augmentation of metastasis induced by interleukin 1 or lipopolysaccharide in a human melanoma/nude mouse system. *Cancer Res*, 53:5051-5054.

Clark, A. M., Chen, J. M. Crooke, T. S. y Bomalaski, S. J. 1988. Tumor necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2-activating protein in endothelial cells. *Biochem J*, 250:125-132.

Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D. y Maniatis, T. 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 9, 899-909.

Cuturi, M. C., Murphy, M., Costa-Giomi, M. P., Weimann, R., Perussia, B. y Trinchieri, G. 1987. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 165:1581.

Detmar, M., Imcke, E., Ruzsaczak, Z. y Orfanos, C. E. 1990. Effects of recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$  on cultured microvascular endothelial cells derived from human dermis. *J Invest Dermatol*, 95:2195-2225.

Donato, N., Gallick, G. E., Steck, P. A. y Rosenblum, M. G. 1989. Tumor necrosis factor modulates epidermal growth factor receptor phosphorylation and kinase activity in human tumor cells. *J Biol Chem* 264:20474-20481.

Dustin, M. L. y Springer, T. A. 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* 9:27-66.

Edelman, J. M., Di Milla, P. A. y Albelda, S. M. 1995. The integrin cell adhesion molecules. En *Principles of cell adhesion*. Ed. Peter D. Richardson y Manfred Steiner. CRC Press. USA. p 163-186.

Fino, T. S., Beg, A. A. y Baldwin, A. S. Jr. 1994. Inducible phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  is not sufficient for its dissociation from NF $\kappa$ B and is inhibited by protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:11884-11888.

Garret, I. R., Durie, B. G. M., Nedwin, G. E., Gillespie, A., Bringman, T., Sabatini, M., Bertolini, D. R. y Mundy, G. R. 1987. Production of lymphotoxin, a bone-resorbing cytokine, by cultures myeloma cells. *N Engl J Med* 317:526.

Goeddel, D. V., Aggarwal, B. B., Gray, P. W., Leung, D. W. Nedwin, G. W., Palladino, M. A., Patton, J. S., Pennica, D., Shepard, H. M., Sugarman, D. J. y Wong, G. H. W. 1986. Tumor necrosis factor: gene structure and biological activities, *Cole Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:597.

Gómez, E. O. Mendoza-Milla, C., Ibarra-Sanchez, M. de J., Ventura-Gallegos, J. L. y Zentella, A. 1996. Ceramide reproduces late appearance of oxidative stress during TNF-mediated cell death in L929 cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 228:505-509.

Groves, R. W., Allen, M. H., Ross, E. L., Ahsan, G., Barker, J. N. W. N. y MacDonald, D. M. 1993. Expression of selectin ligands by cutaneous squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*, 143:1220-1225.

Haliday, E. M., Ramesha, C. S. y Ringold, G. 1991. TNF induces c-fos via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to a lipoxygenase metabolite. *EMBO J*, 10:109-115.

Heller, R. A., Song, K., Fan, N. y Chang, D. J. 1992. The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* 70, 47-56.

Heyward, S. A., Dubois-Stringfellow, N., Rapoport, R. y Bautch V. L. 1995. Expression and inducibility of vascular adhesion receptor in development. *FASEB J.* 9, 956-962.

Hogg, N. y Berlin, C. 1995. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol Today* 16(7):327-330.

Hohmann, H. P., Remy, R., Brockhaus, M. y Van Loon, A. P. G. M. 1989. Two different cell types have different mayor receptors for human tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). *J Biol Chem* 264:14927-14934.

Hou, J., Baichwal, V. y Cao, Z. 1994. Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding ICAM-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1641-1645.

Jaffe, E. A., Nachmen, R. L., Becker, G. C. y Minick, C.R. 1973. Culture of Human Endothelial Cells from umbilical veins. *J Clin Invest* 52:2745-2756.

Johnson, D. R., Douglas, Y., Jahnke, A., Ghosh, S. y Pober, J. S. 1996. A sustained reduction in I $\kappa$ B- $\beta$  may contribute to persistent NF $\kappa$ B activation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 271(27):16317-16322.

Jones, D. A., Wayne Smith, C. y McIntire, L. V. 1995. Flow effects of leukocyte adhesion to vascular endothelium en *Principles of cell adhesion*. Ed. Peter D. Richardson y Manfred Steiner. CRC Press. USA. p 143-160.

Kriegler, M., Pere, C., DeFay, K., Albert, Y. y Lu, S. D. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembran protein: ramifications for complex physiology of TNF. *Cell* 53, 45.

Krikos, A., Laherty, C. D. y Dixit, V. M. 1992. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 267(18):12424-12427.

Lafrenie, R. M., Gallo, S., Podor, T. J., Buchanan, M. R. y Orr, F. W. 1994. The relative roles of vitronectin receptor, E-selectin and  $\alpha_4\beta_1$  in cancer cell adhesion to interleukin-1-treated endothelial cells. *Eur J Cancer*, 30A(14):2151-2158.

Larsen, E. 1995. The Selectine family of adhesion molecules en Principles of cell adhesion. Ed. Peter D. Richardson y Manfred Steiner. CRC Press. USA. p 203-218.

Lopez-Marure, R., Estrada, B. A. y Zentella, A. 1997. Interference with c-myc expression and RB phosphorylation during TNF-mediated growth arrest in Human Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Comm* 236(3):819-824.

Marino, M. W., Pteffer, L. M., Guidon, P. T. y Donner, D. 1989. Tumor necrosis factor induce phosphorylation of a 28 Kda mRNA cap-binding protein in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:8417-8421.

Massague, J. y Pandiella, A. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62:515-541.

McEver, R., Moore, K. L. y Cummings, R. D. 1995. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 270(19):11025-11028.

Meuer, S. T. 1994. Accessory receptors: Regulators of the local immune response. En: *The handbook of immunopharmacology: Adhesion molecules*. Ed Craig D. Wegner. Academic Press. Great Britain. p 9-28.

Meagher, L., Mahiouz, D., Sugars, K., Burrows, N., Norris, P., Yarwood, H., Becker-Andre, M. y Haskard, D. O. 1994. Measurement of mRNA for E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 by reverse transcription and the polymerase chain reaction. *J Immunol Meth* 175, 237-246.

Miyamoto, Sh., Maki, M., Schimtt, M. J., Hatanaka, M. J. y Verma, I .M. 1994. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  is a signal for its degradation buy no dissociation from NF $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:12740-12744.

Modur, V. Zimmermann, G. A., Prescott, S. M. y McIntyres, T. M. 1996. Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J Biol Chem* 271(22):13094-13102.

Molony, L. y Armstrong, L. 1991. Cytoskeletal reorganizations in human umbilical vein endothelial cells as a result of cytokine exposure. *Exp Cell Res*, 196:40-48.

Neumann, B., Machleidt, T., Lifka, A., Pfeffer, K., Vestweber, D., Mak, T. W., Holzmann, B. y Krönke, M. 1996. Crucial role of 55-Kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J Immunol* 156: 1587-1593.

Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. F., Seeburg, P. H. y Palladino, M. A. 1988. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724.

Pfeffer, K., Matsuyama, T. y Kundig, T. M. 1993. Mice deficient for de 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet sucumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73: 457-467.

Phillips, D. R., Charo, I. F., Parise, L. V. y Fitzgerald, L. A. 1988. The Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71:841-43.

Picker, L. J., Kishimoto, T. K., Smith, C. W., Warnock, R. A. y Butcher, E. L. 1991. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 349:796-799.

Read, M. A., Whitley, M. Z., Williams, A. J. y Collins T. 1994. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med*, 179:503-512.

Risau, W. 1995. Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 9, 926-933.

Ritchie, A. J., Johnson, D. R., Ewunstein, B. M. y Pober, J. S. 1991. Tumor necrosis factor induction on endothelial cell surface antigens is independent of protein kinase C activation or inactivation. Studies with phorbol myristate acetate and staurosporine. *J Immunol*, 146:3056-3062.

Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J. E. y Galand, P. 1991. Tumor necrosis factor induce apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells *in vitro*. *Am J Pathol*, 138:447-453.

Rossiter, H., Alon, R. y T. S. Kupper. 1997. Selectins, T-cell rolling and inflammation. *Mol Med Today* 214-222.

Sato, N., Goto, T., Harakana, K., Satomi, N., Nariuchi, H., Mano-Hirano, Y. y Sawasaki, Y. 1986. Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *JNCI* 76(6):1113-1121.

Scholz, D., Devaux, B., Hirche, A., Pötzsch, B., Kropp, B., Schaper, W. y Schaper, J. 1996. Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res* 284:415-423.

Sherry, B., Jue, D., Zentella, A. y Cerami, A. 1990. Characterization of high molecular weight glycosylated forms of murine tumor necrosis factor. *Biochem. Biophys Res Com* 173:1072-1078.

Slowik, M. R., De Luca, L. G., Fiers W. y Pober, J. S. 1993. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am J Pathol*, 143:1724-1730.

Springer, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.

Stauber, G. B., Aiyer, R. A. y Aggarwal, B. B. 1988. Human tumor necrosis factor-alpha receptor; purification by immunoaffinity chromatography and initial characterization. *J Biol Chem* 264:19098-19104.

Staunton, D. E., Marlin, S. D., Stratowa, C., Dustin, M. L. y Springer, T. A. 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and Integrin supergene families. *Cell* 52, 925-933.

Stoelcket, B., Hafner, M., Orosz, P., Nieswandt, B., y Männel, D. N. 1996. Role of adhesion molecules and platelets in TNF-induced adhesion of tumor cells to endothelial cells: implications for experimental metastasis. *J Inflamm*, 46:155-167.

Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Has, P. E., Figari, Y., Palladino, M. y Shepard, H. M. 1985. Recombinant tumor necrosis factor alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Nature*, 230:943-945.

Tracey, K. J., Vlassara, H. y Cerami, A. 1989. Peptide regulatory factors: cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet*: 1122-1126.

Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A., y Engel, P. 1995. The selectines: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9, 866-873.

Thorlacius, H., Prieto, J., Raud, J., Gautam, N., Patarroyo, M., Hedqvist, P. y Lindbom, L. 1997. Tumor cell arrest in the microcirculation: lack of evidence for a leukocyte-like rolling adhesive interaction with vascular endothelium *in vivo*. *Clin Immunol Immunopathol*, 83(1):68-76.

Tijburg, P. N., Ryan, J. y Stern, D. M. 1991. Activation of the coagulation mechanism on tumor necrosis factor-stimulated cultured endothelial cells and their extracellular matrix. The role of flow and factor IX/IXa. *J Biol Chem*, 266:12067-12074.

Tozawa, K., Sakurada, S., Kohri, K. y Okamoto, T. 1995. Effects of anti-nuclear factor  $\kappa$  B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer Res*, 55:4162-4167.

Tözeren, A., Kleinman, H. K., Grant, D. S., Morales, D., Mercurio, A. M. y Byers, S. W. 1995. E-selectin-mediated dynamic interactions of breast-and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int J Cancer*, 60:426-431.

Van Hinsberg, V. W., Van der Berg, E. A., Fiers, W. y Dooijewaard, G. 1990. Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. *Blodd*, 75:1991-1998.

Von Boehmer, H. 1997. *Lymphotoxins: From cytotoxicity to lymphoid organogenesis*. Proc Natl Acad Sci USA, 94:8926-8927.

Weber, C., Negrescu, E., Erf, W., Pietsch, A., Frankenberger, M., Ziegler-Heitbrock, H. W., Siess, W., y Weber, P. C. 1995. Inhibitors of protein tyrosine kinase suppress TNF-stimulated induction of endothelial cell adhesion Molecules. *J Immunol* 155: 445-451.

Wolf, F. W., Marks, R. M., Sarma, V., Byers, M. G., Katz, R. W., Shows, T. B. y Dixit, V. M. 1992. Characterization of a novel tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial primary response gene. *J Biol Chem* 267(2):1317-1326.

Wong, G. y Goeddel, D. V. 1988. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor, possible protective mechanism. *Nature*, 242:941-944.

## APENDICE

### REACTIVOS

#### Solución salina de HEPES 10x pH 7.5

88 g de NaCl  
3.3 g de KCl  
26.18 g de HEPES  
22 g de glucosa

Aforar a 1 lt con agua desionizada

#### Verseno pH 7.7

8 g de NaCl  
0.4 de KCl  
0.2 g de EDTA  
3.04 g de Tris HCl

Aforar a 1 lt con agua desionizada

#### Solución de tripsina

1 g de tripsina  
1 lt de verseno

#### Solución de Lisis EBC (para extracción de proteína total en inmunoanálisis)

50 mM de Tris pH 8.0  
120 mM de NaCl  
0.5% de NP-40  
100 mM de NaF  
200  $\mu$ M de Vanadato de Sodio

En el momento de usar agregar:

1-3  $\mu$ g/ml de aprotinina  
10  $\mu$ g/ml de leupeptina  
10  $\mu$ g/ml de PMSF

#### TBS pH 8.0

3 g de Tris HCl  
8 g de NaCl  
0.2 g de KCl

Aforar con 1 lt de agua desionizada

### **Gel de Poliacrilamida al 7.5%**

	<b>Separador</b>	<b>Concentrador</b>	
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	8.4	-	ml
acrilamida-bisacrilamida (30% : 0.8%)	8.4	5	ml
agua	16.9	17.1	ml
SDS 10%	337	300	$\mu$ l
persulfato de amonio 10%	139	300	$\mu$ l
TEMED	15	30	$\mu$ l
Tris 0.5 M pH 6.8	-	7.5	ml

El TEMED y el persulfato de amonio se agregan al momento de cargar el gel.

### **Avidina-biotina conjugadas con peroxidasa**

50  $\mu$ l de estreptavidina

50  $\mu$ l de biotina con peroxidasa

5 ml de TBS

### **Gel de agarosa al 1% (RNA)**

2.5 g de agarosa

50 ml de MOPS 50x pH 7

158 ml de agua

41.5 ml de formaldehído (37% en solución)

### **MOPS 50x**

0.2 M de MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico) pH 7.0

50 mM de acetato de sodio

5 mM de EDTA pH 8.0

### **Solución de corrida para el RNA (muestra)**

glicerol 50%

1 mM de EDTA

0.4% de azul de bromofenol

0.4% de cianol xileno

**Gel de agarosa al 1% (DNA)**

0.9 g de agarosa  
600  $\mu$ l de TAE 50x  
29.4 ml de agua  
1  $\mu$ l de bromuro de etidio (10mg/ml)

**TAE 50x (1 litro)**

242 g de Tris HCl  
57.1 ml de ácido acético  
100 ml de 0.5M EDTA pH 8.0

**Buffer de corrida para DNA (muestra)**

glicerol 20%  
xilen cianol 0.25%  
azul de bromofenol 0.25%  
agua

Deseo agradecer especialmente a todo el personal del Hospital de Gineco-Obstetricia de Tlatelolco y del Hospital de Zona de Troncoso, IMSS, por su gran ayuda y colaboración en la obtención de cordones umbilicales.

“El nacimiento y la muerte de las hojas forma parte de  
ese ciclo superior que se mueve entre las estrellas”

RABINDRANATH TAGORE