



11281
11
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

ACTIVACION DEPENDIENTE DE NF- κ B DE CELULAS
ENDOTELIALES HUMANAS TRATADAS CON PRODUCTOS
SOLUBLES DERIVADOS DE LINFOMAS HUMANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
BIOL. ADRIANA ESTRADA BERNAL

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico o impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Adrián Esteban Bernal

FECHA: 25 FEB. 2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

El proyecto fue parcialmente financiado por DGAPA (IN223498) y CONACYT (3161PN). Además se contó con el apoyo de una beca para estudios de Doctorado del CONACYT y dos donativos por parte de la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM (PAEP-102318).

Agradezco especialmente a todo el personal del Hospital de Zona de Troncoso del Instituto Mexicano del Seguro Social, por su gran ayuda y colaboración en la obtención de cordones umbilicales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

No hay que confundir nunca el conocimiento con la sabiduría. El primero nos sirve para ganarnos la vida; la sabiduría nos ayuda a vivir.

S. Carey

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Ricardo, por todo... por ser él.

A mis papas, Vicente y Martha, porque ésto
es tan mío como suyo.... por su amor, comprensión,
enseñanzas y por mi vida. Los quiero.

A mis hermanas, Lau y Vero, por estar siempre ahí
conmigo, por su amor y apoyo incondicional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Pocas veces tenemos la oportunidad de dar las gracias a todas las personas que de alguna manera han influido en nuestro caminar por el mundo, sea pues éste un testimonio de esos agradecimientos.

A toda mi familia y amigos que siempre me han apoyado y me han hechado porras para seguir adelante.

A Nacho y a David, porque a pesar del poco tiempo dentro de mi vida, son parte importante del camino a seguir.

A Alejandro Zentella, por permitirme estar tantos años en su laboratorio, por el apoyo, la confianza, el cariño y por todas las enseñanzas tanto académicas como personales. Por que a donde quiere que vaya siempre seré: Adriana del Dr. Zentella.

A los miembros de mi comité tutorial: Edgar Zenteno y Luis Vaca, por las sugerencias y el apoyo durante el desarrollo de mi trabajo.

A los miembros del jurado de examen que leyeron esta tesis, sus recomendaciones y su disposición al revisar éste trabajo.

A Lina, por todo un camino compartido, por siempre estar ahí, por el apoyo, la ayuda, el hombro, las porras, las confidencias, la compañía... en fin por todo... Sin embargo, Riego, el camino continua..... A Fernando, por saber que cuento con él, por la amistad, las pláticas, el tequila y por haberme permitido invadir su espacio, en toda la extensión de la palabra.

A Alma por la fortaleza de la amistad, las largas pláticas de pasillo y la comprensión en cada momento... gracias amiga.....

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Juan, por el apoyo siempre presente, por escuchar, por aguantar tanta guerra, por el amigo incondicional... sin tu ayuda jamás hubiera terminado.

A Martín, Juan, Alma, Lina y Fernando, las comidas, el futbol, el boliche, el cine, en fin... todo lo "extra" compartido...

A Melchor y Fernando, por enseñarme que una amistad no se construye a través de años sino de momentos compartidos.... por siempre hacerme reír, por los bailes, los paseos, las desveladas, por dejarme invadir su mundo y aprender de él.

A todos los miembros del laboratorio del Dr. Zentella, que de alguna manera han puesto su granito de arena para mi crecimiento: Erika, las pláticas; Cris, por el apoyo mutuo en ésta etapa; Katy, Lucía, Salvador; a mis "hijos": Delina, Josué, Noemí, Gina y Marco que sin darse cuenta me han enseñado muchísimas cosas; a mamá Mina, por siempre estar pendiente.

A José Luis, porque desde le principio me brindó su amistad incondicional y su apoyo tanto en lo personal como en lo académico. Gracias amiguito por siempre saber que podía contar contigo, de verdad muchas gracias.

A Rocío Camarillo, por las confidencias, por escuchar, por siempre estar dispuesta a ayudar, a apoyar y a hechar porras...

A Rocío Alcantará, porque a pesar de la distancia siempre ha estado ahí, gracias por tu amistad.

A los miembros de la Unidad de Computo del IFC: Gerardo, Ana, Ivette y Juan, que más que asesores son amigos de siempre. Gracias por todo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Laura Ongay, Lupita y Mine, la Unidad de Biología Molecular, por soportar tanta guerra y por siempre encontrar una sonrisa, gracias.

A mis amigos de siempre: Leo, Anita, Anarella, Moisés, Alejandro, Hugo, Fer, Polo... por el largo camino recorrido.

A Marychuy, Pilar, Silvia, Poncho, Efraín, por que a pesar del tiempo y la distancia siempre seguirán conmigo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Universidad, por darme más de lo que pude esperar y por que a donde quiere que vaya siempre será parte de mí.

A todos.....GRACIAS!!!!...

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	1
INDICE DE TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	7
RESUMEN EN INGLÉS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
1. Proceso metastásico.....	10
2. Interacciones entre las células tumorales y las células endoteliales...	20
3. El fenotipo endotelial.....	26
4. Factor de transcripción NF- κ B.....	31
5. Participación de las citocinas en la metástasis.....	41
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	44
OBJETIVOS.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
RESULTADOS.....	56
DISCUSIÓN.....	88
CONCLUSIONES.....	101
PERSPECTIVAS.....	102
RESULTADOS PUBLICADOS.....	103
REFERENCIAS.....	114

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Fases del proceso metastásico	11
Figura 2. Transmigración de células tumorales a través de la monocapa endotelial	24
Figura 3. Fenotipo endotelial	28
Figura 4. Proteínas NF- κ B	33
Figura 5. Vía clásica de NF- κ B	38
Figura 6. Proteínas G que activan NF- κ B	40

RESULTADOS

Figura 7. Evaluación de los productos secretados por las células tumorales	57
Figura 8. Efecto de los productos secretados por las células tumorales sobre la capacidad de adhesión de células endoteliales	58
Figura 9. Efecto de los productos secretados por las células tumorales sobre el factor de transcripción NF- κ B	59
Figura 10. Efecto del inhibidor BAY 11-7085 sobre la translocación de NF- κ B en células endoteliales	60
Figura 11. Efecto del inhibidor BAY 11-7085 sobre la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales	61
Figura 12. Translocación de NF- κ B con BAY 11-7085 5 μ M	62
Figura 13. Translocación de NF- κ B en células HMEC-1	63
Figura 14. Especificidad del efecto de los productos secretados por las Células tumorales	64
Figura 15. Inmunoblot de I κ B α	65
Figura 16. Inmunoblot de Akt	66
Figura 17. Expresión de selectina-E en HUVECs	67
Figura 18. Cinética de expresión de selectina-E en HUVECs	68
Figura 19. Efecto del BAY 11-7085 sobre la expresión de	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS

selectina-E	69
Figura 20. Participación de selectina-E en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales	70
Figura 21. Efecto de los productos secretados por las células tumorales sobre el RNAm de las moléculas de adhesión endotelial	72
Figura 22. Expresión de ICAM-1 en HUVECs	73
Figura 23. Cinética de expresión de ICAM-1	75
Figura 24. Efecto del BAY 11-7085 sobre la expresión de ICAM-1	76
Figura 25. Participación de TNF- α e IL-1 β en la adhesión inducida por los productos secretados por células tumorales	78
Figura 26. Análisis de la presencia de TNF-a con actividad citotóxica en los productos secretados por células tumorales	78
Figura 27. Efecto del NGF sobre los HUVECs	81
Figura 28. Participación del NGF en la adhesión inducida por los productos secretados por células tumorales	82
Figura 29. Efecto de los productos secretados por células de cáncer cervico-uterino sobre HUVECs	83
Figura 30. Efecto del ácido acetil salicílico sobre la translocación de NF- κ B	84
Figura 31. Efecto del ácido acetil salicílico sobre la adhesión inducida por los productos secretados por células tumorales	85
Figura 32. Efecto del ácido acetil salicílico sobre la expresión de ICAM-1	86
Figura 33. Participación de la vía del ácido araquidónico en la adhesión Inducida por TNF- α	87

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Moléculas de adhesión que participan en el proceso Metastásico	13
Tabla 2. Proteínas asociadas a la metástasis	17
Tabla 3. Secuencias kB	31
Tabla 4. Citocinas que participan en el proceso metastásico	43

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos para reacciones de PCR y Southern	51
---	----

RESULTADOS

Tabla 6. Análisis de ELISA de los productos secretados por las células tumorales	79
Tabla 7. Presencia de RNAm de otros activadores de NF- κ B	80

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

12(S)HETE	Acido 12(S)-hidroxieicosatetraico
DNA	Acido desoxiribonucleico
Akt	PKB; Cinasa de proteina tipo B
AMP	Adenosina 5' monofosfato
ATP	Adenosina 5' trifosfato
bFGF	Factor basico de crecimiento fibroblastico
CEA	Antigeno carcino-embriónico
COX	Ciclo-oxigenasa
CREB	Proteina de unión a elementos de respuesta a AMPc
DCC	Deletado en cáncer de colon
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas
EMSA	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética
ESM-1	Molécula específica de células endoteliales
FAS-L	Ligando de FAS
Fik-1	Receptor 2 del VEGF
HGF/SF	Factor de crecimiento de hepatocitos, factor dispersador
HLH	Hélice-asa-hélice
HMEC-1	Células endoteliales de microvasculatura humana
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana
I: F.	Intensidad de fluorescencia
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IGF	Factor de crecimiento semejante a insulina
IKK	Cinasa de I κ B
IL-10	Interleucina diez
IL-18	Interleucina dieciocho
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina dos
IL-6	Interleucina seis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INOS	Sintetaza de óxido nítrico inducible
IkB	Inhibidor del factor de transcripción nuclear de la cadena k de inmunoglobulinas de las células B
LPS	Lipopolisacárido
Lu-ECAM-1	Molécula de adhesión endotelial específica de pulmón
Mad-CAM-1	Adesina de la mucosa
MAPK	Cinasa activada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MUC-18	Mel-CAM, MCAM, CD146; Molécula de adhesión de melanomas
N-CAM	Molécula de adhesión neural
NF-κB	Factor de transcripción nuclear de la cadena κ de inmunoglobulinas de células B
NGF	Factor de crecimiento neural
NIK	Cinasa inducible de NF-κB
NSAIDs	Drogas anti-inflamatorias no esteroideas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adhesión celular plaquetas/endotelio
PI ₃ K	Fosfoinositido 3 cinasa
PKA	Cinasa de proteína de tipo A
PKC	Cinasa de proteína de tipo C
PLC-β	Fosfolipasa C tipo beta
RNA _m	Acido ribonucléico, mensajero
SFB	Suero fetal bovino
TGF-α, β	Factor de crecimiento transformante alfa o beta
TIMP	Inhibidores de las metaloproteinasas tejido específicos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TR/PCR	Transcripción reversa acoplada a una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF
uPA	Activador de plasminógeno tipo urocinasa

VCAM-1 Molécula de adhesión vascular-1
VE-cadherina Cadherina del endotelio vascular
VEGF Factor de crecimiento del endotelio vascular

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El aumento en la adhesión de leucocitos en forma dependiente de NF- κ B es característico de las células endoteliales activadas por citocinas proinflamatorias. Se ha postulado que, de manera similar, el aumento en la adhesión de células tumorales a endoteliales podría jugar un papel importante durante la metástasis, sin embargo, la participación del factor de transcripción NF- κ B en este proceso no ha sido estudiada.

En este trabajo reportamos que células de linfomas metastáticos humanos secretan factores solubles que aumentan la capacidad de las células endoteliales para adherir células U937 *in vitro*. Este fenómeno depende de la activación del factor de transcripción NF- κ B ya que el uso de inhibidores específicos para éste factor, como el BAY 11-7085 o la aspirina, interfieren con la adhesión inducida por los medios condicionados de las células tumorales.

El tratamiento con los productos secretados por las células tumorales no inducen la expresión de selectina-E pero sí la de ICAM-1 en la membrana de las células endoteliales.

Se descartó la presencia de TNF- α y de IL-1 β entre los productos secretados por las células del linfoma usando anticuerpos neutralizantes y análisis por ELISA.

El fenotipo de activación endotelial evocado por los productos secretados por las células tumorales se asemeja al inducido por citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β . Esta activación converge en la translocación de NF- κ B induciendo un aumento en la capacidad de adherir células tumorales, lo que sugiere un papel para este factor de transcripción en el endotelio vascular durante los procesos metastáticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

An NF- κ B-dependent increase in cell adhesion of leucocytes is characteristic of the activated endothelial cell phenotype induced by proinflammatory cytokines. It has been postulated that a similar increase in cell-adhesion to endothelial cells plays a critical role during metastasis; nevertheless, the participation of NF- κ B in this process has not been explored. We report that cells from a human metastatic lymphoma release soluble factors that increase the ability of endothelial cells to adhere U937 cells *in vitro*, linked to the activation of the transcription factor NF- κ B. This phenotype resembles the one induced by proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alfa (TNF- α) or interleukin 1 beta (IL-1 β). TNF- α or soluble factors secreted by tumor cells treatment lead to increased expression of ICAM-1 on the surface of the endothelial cells, suggesting a role for this protein in the adhesion of U937 cells to the endothelium.

Both BAY 11-7085 and aspirin (specific inhibitors of NF- κ B activation), interfered with the increased adhesion of U937 cells to endothelial cells pretreated with TNF- α or with tumor derived soluble factors, stressing the importance of NF- κ B in this response. The presence of TNF- α or IL-1 β among the soluble products secreted by lymphoma cells was discarded using neutralizing antibodies and ELISA. Other human lymphomas and cervical adenocarcinoma cell lines also secreted products that increased endothelial cell adhesion capacity.

Hence, these lymphoma cells secrete products different to TNF- α or IL-1 β that promote NF- κ B dependent cell adhesion. We postulate that endothelial activation by proinflammatory cytokines and by tumor-derived products converge on NF- κ B activation, suggesting a role for endothelial NF- κ B activation during metastasis.

TESIS
FALLA DE ORIGEN[®]

INTRODUCCIÓN

La proliferación celular es un proceso cuidadosamente regulado, que responde a necesidades específicas de los diferentes tejidos del organismo variando a lo largo de su desarrollo y respondiendo a múltiples condiciones ambientales. En un animal joven la proliferación celular es mayor a la muerte celular, así el organismo puede aumentar de tamaño; sin embargo, en un adulto el número de células que nacen es igual al número de células que mueren, por lo que se establece un equilibrio que se refleja en un aparente estado estático.

Ocasionalmente, los controles celulares que regulan la proliferación se alteran y las células comienzan a crecer y a dividirse sin que el organismo tenga necesidad de esto. Esta pérdida de control, es el resultado de una acumulación de errores en los sistemas de regulación celular que se refleja en una división celular descontrolada generando neoplasias y eventualmente tumores.

En la mayoría de los casos, los tumores son monoclonales, esto es, provienen de una sola célula progenitora que ha sufrido un cambio permanente y heredable a toda su progenie, proceso conocido como transformación neoplásica. A pesar de que los tumores inicialmente son clonales en proceso de alteración graduada, la célula progenitora presenta las alteraciones suficientes para desencadenar el proceso conocido como progresión tumoral.

Estas alteraciones se presentan en la población de células que forman al tumor y pueden ser epigenéticas, esto es, cambios en el patrón de expresión de genes, sin que se altere la secuencia de DNA. Algunas de estas mutaciones confieren ventajas selectivas a las células, como puede ser el presentar un ciclo de proliferación rápido. Así, este tipo de cambios permiten que su progenie celular sea dominante dentro de la población tumoral. Este proceso es conocido como selección clonal, ya que se ha formado una nueva clona de células cancerosas que tienen características que le confieren una ventaja sobre las otras células. La selección clonal continúa durante el desarrollo del tumor, originando un tumor con una mayor capacidad de crecimiento y con mayor potencial de invasividad.

Un tumor maligno es capaz de invadir los tejidos adyacentes y diseminarse por todo el organismo a través del sistema linfático o vascular, proceso conocido

como metástasis. La capacidad metastásica de un tumor es el principal problema que afronta la oncología clínica. Actualmente, se estudian las diferentes fases del proceso metastásico, lo que permitirá establecer tratamientos específicos para tratar de contrarrestar la metástasis de diferentes maneras.

1. PROCESO METASTÁSICO

La metástasis es un proceso complejo y dinámico en el cual, las interacciones célula-célula, tanto entre aquellas que forman el tumor, como entre las células tumorales y diversos tipos de células del hospedero, juegan un papel central.

Este proceso puede ser dividido en varios pasos secuenciales cuya regulación es sólo parcialmente comprendida.

En un inicio, células tumorales solitarias se separan del tumor primario, proceso llamado "disociación de células tumorales". Las células disociadas se infiltran en el estroma circundante (invasión) y entran a la vasculatura o al sistema linfático (intravasación). Gracias al flujo sanguíneo o linfático, las células tumorales son distribuidas pasivamente a distintos órganos, donde se propone que se detienen en las vénulas postcapilares de los órganos blanco.

Subsecuentemente, las células tumorales dejan la vasculatura (extravasación) e invaden el órgano blanco (invasión secundaria). Sin embargo, la invasión del órgano blanco no resulta necesariamente en el desarrollo de una metástasis clínica aparente, ya que el desarrollo metastásico puede ser limitado o incluso eliminado por el sistema inmune, pudiendo permanecer "silencioso" por varios años, estado al que se le conoce como tumor en estado latente. Después de diferentes periodos, las células tumorales latentes pueden ser estimuladas por distintas condiciones micro-ambientales como procesos infecciosos o de remodelación tisular que reactivan su proliferación y permiten el establecimiento de masas tumorales secundarias (Engers et al., 1999) (Fig. 1).

En lo que respecta a células tumorales individuales, la cascada metastásica siempre procede siguiendo una regla de todo o nada. Una formación metastásica sólo será exitosa si una sola célula es capaz de sobrevivir cada uno

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de los pasos de la cascada. Sin embargo, esto solo es logrado por un número pequeño de células tumorales, lo que significa que la metástasis, cuando se refiere a una sola célula tumoral, se puede considerar por tanto como un evento ineficiente. Se ha demostrado que a pesar de que se liberan millones de células tumorales a la circulación, la frecuencia de metástasis es igual o menor al 0.05% (Nicolson, 1991). Cabe considerar que la constante repetición de la cascada metastásica proveerá suficientes células tumorales capaces de sobrepasar todas las barreras y establecer exitosamente una y por lo general varias metástasis clínicas (Engers y Gabbert, 2000).

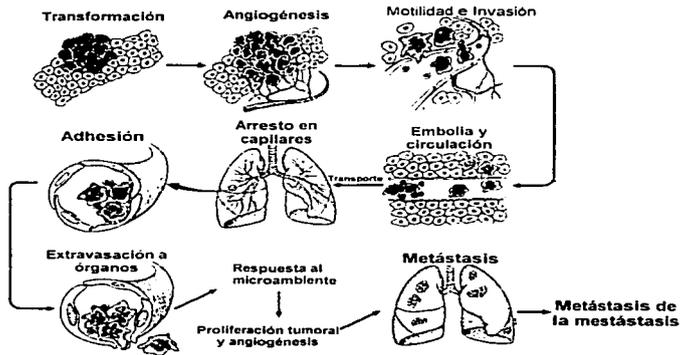


Figura 1. Fases del proceso metastásico. (Tomado de Fidler, 1990).

1.1 Invasión

1.1.1 Disociación y diferenciación de células tumorales

Este paso requiere que una célula se disocie del tumor primario y tenga la capacidad de interactuar con el tejido que la rodea; estas interacciones incluyen

locomoción activa, adhesión célula-célula, adhesión célula-matriz y proteólisis de la matriz extracelular. Este es el paso inicial y el más importante en la formación de metástasis. La capacidad de las células tumorales para disociarse y migrar activamente depende de su grado de progresión hacia un fenotipo invasivo, lo cual es evidente por el hecho de que las células que se encuentran en el frente invasivo son células con características morfológicas distintas a las del resto del tumor, resultando en la separación de células individuales o de pequeñas masas de células que invaden el tejido circundante (Gabbert et al., 1985). La importancia de la capacidad de disociación de las células tumorales es evidente si se considera la correlación entre esta capacidad y la prognosis general del tumor.

La integridad del tumor es mantenida por interacciones homotípicas entre las células del tumor, las cuales son mediadas por moléculas de adhesión. A nivel molecular, la disociación tumoral requiere la pérdida de estas adhesiones homotípicas entre las células del tumor, estas adhesiones son mediadas por dos grupos de moléculas de adhesión (Engers y Gabbert, 2000) (Tabla 1):

- 1) Súper familia de inmunoglobulinas: Participan en la adhesión célula-célula independiente de calcio. Se ha observado que moléculas como: N-CAM (molécula de adhesión neural), CEA (antígeno carcinoembrionario), DCC (deletado en cáncer de colon) y MUC-18, miembros de esta superfamilia, participan en la invasión de tumores (Rosales et al., 1995; Yoshioka et al., 1998). Se ha demostrado que MUC-18 se encuentra presente en melanomas humanos y que participa en la agregación homotípica de las células tumorales (Johnson, 2000). Estudios hechos en carcinoma cístico adenoide de glándulas salivales, muestran que el bloqueo de N-CAM interrumpe el proceso invasivo, demostrando que ésta molécula se requiere para la invasión de tejidos durante la progresión metastásica (Franca et al., 2001).
- 2) Familia de cadherina: Moléculas que median la adhesión célula-célula dependiente de calcio. De esta familia, el miembro que más ha sido estudiado en procesos metastásicos es la cadherina-E. Se ha observado que muchos carcinomas humanos disminuyen o pierden la expresión y/o

función de la cadherina-E, siendo este un cambio temprano durante el desarrollo de la progresión metastásica. Esta disminución facilita que las células tumorales se liberen de los controles de adhesión de las células vecinas y les permite separarse de la masa tumoral primaria (Birchmeier et al., 1994; Johnson, 2000). Estudios realizados *in vitro* han mostrado que la pérdida de la expresión de cadherina-E está asociada al aumento en la actividad invasiva en geles de colágena y en cultivos de órganos, y que esta actividad es reversible con la transfección de cadherina-E a las células (Vlemingckx et al., 1991). Paradojicamente, los tumores en etapas más avanzadas muestran una recuperación de la expresión de la cadherina-E en melanocitos (Silye et al., 1998).

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN EL PROCESO METASTÁSICO

Cadherinas		
Cadherina-E	Voura et al., 1998	
VE-Cadherina	Voura et al., 1998	
Cadherina N	Sandig et al., 1997	
Selectinas		
Selectina-P	Stone et al., 1993; Borsig et al., 2001	
Selectina-E	Krause et al., 1999	
SialII Lewis X/A	Shirota et al., 2001; Sato et al., 1995; Borsig et al., 2001	
Super-familia de Inmunoglobulinas		
ICAM-1	TamakI et al., 1995	
VCAM-1	Voura et al., 1998	
Lu-ECAM-1	Goetz et al., 1996	
Integrinas		
$\alpha v \beta 3$	Voura et al., 1998	
$\alpha 4 \beta 1$	Mareel et al., 1993	
$\alpha 2$	Jiang et al., 1998	
$\alpha 5$	Jiang et al., 1998	
Otras		
L1	Duczmal et al., 1997	

Tabla 1. Moléculas de adhesión cuya participación ha sido reportada en diferentes fases del proceso metastásico.

1.1.2 Locomoción Activa

Un requisito para que las células tumorales puedan invadir los tejidos circundantes y la matriz extracelular es tener capacidad de locomoción activa.

definida como un proceso de varios pasos cíclicos, que carece de un punto de inicio fijo. Las células extienden un borde (pseudopodo o lamelipodio) que se adhiere al sustrato a través de receptores específicos, generándose fuerzas que jalan a esta parte de la célula hacia delante. Subsecuentemente, se lleva a cabo una contracción que va acompañada por la separación de las moléculas de adhesión y sus ligandos en la matriz extracelular en la parte posterior (o parte final) de la célula, resultando en el desplazamiento de la célula. Las moléculas de adhesión liberadas son recicladas por endocitosis, transporte vesicular y/o por movimiento en la superficie de la célula (Sheetz et al., 1999).

1.1.3 Adhesión célula-sustrato

Para poder migrar a través de la matriz extracelular, las células tumorales tienen que establecer contactos temporales con componentes de la matriz extracelular (MEC). Estos contactos se realizan a través de receptores específicos de sustratos (moléculas de adhesión), entre los que las integrinas juegan un papel predominante. Experimentos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han aportado evidencia de la participación de integrinas de la familia beta 1 en la progresión tumoral y en la metástasis. Se ha observado una reducción en la expresión o una distribución alterada de las integrinas que actúan como receptores de colágena y de laminina en cáncer de colon, pulmón, páncreas y de glándula mamaria (Stallmach et al., 1992; Roussel et al., 1994; Weinl et al., 1995; Gui et al., 1996). En modelos experimentales de metástasis, donde las células tumorales son inyectadas de manera intravenosa y la metástasis se evalúa contando las lesiones pulmonares, se ha demostrado que el bloqueo de la interacción VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$)/VCAM-1 usando anticuerpos específicos inhibió la formación de metástasis de melanomas humanos (Okahara et al., 1993).

Los receptores de colágena y de laminina juegan un papel importante en la adhesión de células a su membrana basal. Los estudios realizados sugieren que la pérdida de adhesión con la membrana basal es importante para el desarrollo del tumor. La migración dependiente de integrinas puede ser afectada por diversos factores como la densidad de los componentes de matriz extracelular que sirven

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

como sustrato-ligando, los niveles de expresión de las integrinas, y la afinidad de las integrinas por sus ligandos (Palecek et al., 1997). Todos estos parámetros varían dependiendo de la localización anatómica tisular y pueden ser modulados por citocinas (Kim et al., 1997), influyendo sobre la malignidad de los tumores de una manera tumor-específica (Engers et al., 2000).

1.1.4 *Proteólisis*

Durante el proceso de invasión, las células tumorales tienen que cruzar la matriz intersticial que está compuesta de proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas filamentosas. Se ha observado que muchos tumores tienen altos niveles de actividad proteolítica, por lo que se piensa que la degradación proteolítica de la matriz extracelular es un requisito para que un tumor invada exitosamente el tejido que lo rodea (Crawford et al., 1994). Las proteasas que participan en la invasión y la metástasis se dividen en 4 grupos: metaloproteinasas de matriz (MMPs), proteinasas de serinas, proteinasas de cisteínas y proteinasas de aspartato; siendo las más estudiadas las MMPs.

Las MMPs representan una familia de proteasas entre las cuales la MMP-2 y la MMP-9 juegan un papel importante en la degradación de matriz extracelular para la invasión (Ray et al., 1994). La mayoría de las MMPs son secretadas como zimógenos o pro-enzimas que son activadas extracelularmente por un corte proteolítico. La actividad de estas enzimas es balanceada por inhibidores de las metaloproteinasas tejido específicos (TIMPs), de los cuales se conocen 4 isoformas (Gómez et al., 1997). Estos inhibidores se pueden asociar e inhibir a varias MMPs, sin embargo, se asocian específicamente a una sola pro-enzima ó zimógeno de MMPs, evitando así su activación. Se piensa que cuando se rompe el balance entre pro-MMPs/MMPs y los TIMPs se determina el fenotipo invasivo (Engers et al., 1999), de hecho, se ha observado en varios modelos que la sobre-expresión de cualquier isoforma de TIMP o la aplicación de proteínas TIMPs recombinantes inhiben la invasión tumoral (Gomez et al., 1997; Wang et al., 1994; Baker et al., 1999).

Recientemente se ha investigado la participación de varias proteinasas en pacientes con cáncer (Tabla 2). En particular, en carcinoma de mama se ha encontrado una relación inversa (estadísticamente significativa) entre la sobre-expresión de catepsina D y la supervivencia de pacientes (Foekens et al., 1993). Un efecto similar se ha observado en estudios realizados con el plasminógeno tipo urocinasa (uPA), donde la sobre-expresión de este factor disminuye la posibilidad de supervivencia de pacientes con carcinoma de mama y de esófago (Duggan et al., 1995; Torzewski et al., 1997).

1.1.5 Invasión tumoral como una propiedad temporal

Como se mencionó anteriormente, el pseudopodo de diferenciación en el frente invasivo de los tumores malignos es un requisito esencial para el proceso de invasión por locomoción activa. Sin embargo, este bloque contiene células tumorales que aún no tienen un fenotipo invasivo que pueden modificarse durante la progresión tumoral (Gabbert, 1985). Consecuentemente, no todas las células de tumores malignos pueden ser consideradas invasivas, pero muchas forman parte de un reservorio o "pool" invasivo, sin embargo, este paso es reversible por lo que algunas células tumorales pueden dejar el reservorio invasivo y re-diferenciarse en complejos tumorales no invasivos (Engers et al., 2000).

1.1.6 Inducción de diferenciación

En la actualidad, no es claro como se regula el cambio fenotípico del reservorio en el frente invasivo. El hecho es que este fenómeno está restringido al frente invasivo, sugiriendo un papel importante del microambiente de los tejidos que se encuentran rodeando y en contacto directo con el tumor. Por lo que se ha propuesto que el cambio de un fenotipo invasivo a uno no invasivo podría estar regulado por la inducción de señales del tejido hospedero que afectan epigenéticamente el programa genético de una manera positiva o negativa.

TESIS
FALLA DE ORIGEN

METALOPROTEINASAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO METASTÁSICO

Metaloproteinasas de matriz	Colagenasa intersticial (MMP-1) Colagenasa neutrofilica (MMP-8) Colagenasas-3 (MMP-13) Gelatinasa A (MMP-2) Gelatinasa B (MMP-9) Estromelisinina-1 (MMP-3) Estromelisinina-2 (MMP-10) Estromelisinina-3 (MMP-11) Matrilisinina (MMP-7) MT-1-MMP (MMP-14) MT-2-MMP (MMP-15) MT-3-MMP (MMP-16) MT-4-MMP (MMP-17)
Proteinasas de serina	Activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) Activador de plasminógeno tisular (tPA) Elastasa Plasmina Catepsina G
Proteinasas de cisteínas	Catepsina B Catepsina L
Proteinasas de aspartato	Catepsina D
Otras	Tiol Proteinasas Heparinasas Hialuronidasas

Tabla 2. Proteinasas asociadas a la metástasis. (Engers et al., 2000)

Como consecuencia de ésto, la invasión tumoral debe ser vista como una propiedad biológica-temporal que depende de dos factores principales: 1) la determinación genética pre-existente de todas las subpoblaciones dentro de un tumor maligno; 2) los factores epigenéticos, que proveen de un microambiente adyacente al tumor que es capaz de modular el potencial invasivo al inducir el cambio temporal del fenotipo tumoral (Engers et al., 2000).

1.2 Intravasación, arresto de la célula tumoral y extravasación

Después de haber invadido exitosamente la matriz extracelular, las células tumorales entran al sistema vascular para diseminarse por el cuerpo, paso conocido como metástasis. Este paso requiere una secuencia coordinada de

proteólisis y locomoción activa. El análisis estructural de tumores primarios sugiere que las células tumorales llegan al flujo sanguíneo a través de pequeñas venas o a través de neovasculatura sinusoidal de los tumores parentales. Dentro del vaso sanguíneo, las células tumorales circulantes interactúan con los constituyentes celulares y humorales de la sangre y con las células endoteliales de los vasos (Hellman, 1991; Sugino et al 1993). Estas interacciones tienen una influencia significativa en el destino de las células metastásicas y el desarrollo del proceso de diseminación e invasión. En varios estudios se ha encontrado que la eficiencia de invasión vascular tiene un gran impacto en el pronóstico del curso que sigue la progresión metastásica. Esto es, pacientes en los que durante la cirugía se detecta invasión de vasos sanguíneos o linfáticos tienen una peor prognosis que aquellos en los que esta invasión no es detectada (Gabbert et al., 1992). Después de haber entrado a la vasculatura, las células tumorales se diseminan en el flujo sanguíneo hasta llegar a los órganos filtradores como el hígado y el pulmón. En esta etapa, las células tumorales necesitan evadir la respuesta inmune, esto es, adquirir la capacidad de evitar la acción de linfocitos T, neutrófilos, macrófagos y células asesinas (NK).

Existe un consenso general en que el arresto de células tumorales circulantes se lleva a cabo en el sistema de venulas postcapilares, y que una parte del fenómeno depende del arresto mecánico debido a la restricción de tamaño (Thoriaci et al., 1997). Evidencia morfológica indica que una sola célula tumoral puede entrar y detenerse en los capilares, mientras que un tapón multicelular tiende a detenerse en vasos más grandes, en los que la presión y la turbulencia afecta su viabilidad de manera adversa.

Sin embargo, también es posible que el paso de una sola célula y su arresto en el capilar no sea por un efecto mecánico, sino que ocurra porque la célula metastásica encuentra las condiciones necesarias para adherirse. Para que esto se lleve a cabo se requiere que el endotelio se encuentre activado, lo que le permite expresar en su superficie las moléculas de adhesión necesarias para resistir el arresto mecánico del flujo sanguíneo y que sirve de base para la extravasación.

El sitio de arresto de la célula tumoral es uno de los factores que contribuyen a la metástasis de órganos específicos, observado en varios tipos de cáncer (Weiss, 1985) y se ha pensado que involucra interacciones específicas entre la superficie de la célula tumoral circulante y el endotelio o el sub-endotelio. También se ha propuesto que la especificidad se debe a las diferencias antigénicas entre distintas partes del árbol vascular en varios órganos (Auerbach et al., 1985; Pressman et al., 1964). Sin embargo, no se puede asegurar que la especificidad de la metástasis en ciertos órganos se deba sólo a la capacidad de adhesión, sino que también involucra la expresión de factores atrayentes, de sobrevivencia y/o proliferación que contribuyen a crear un microambiente específico que resulta favorable para el desarrollo del tumor.

Después del contacto inicial con el endotelio, las células tumorales se extienden a lo largo de la pared vascular (Chambers et al., 1995), para posteriormente extravasarse, proceso que involucra la degradación de la membrana basal del vaso por acción de enzimas liberadas por las células tumorales, entre las que se encuentran los activadores de plasminógenos que sirven para activar a la colagenasa tipo IV, a la catepsina-B y a las endoglicosidasas de heparán-sulfato (Meyer et al., 1998). Los leucocitos, los fibroblastos y las células endoteliales contribuyen a este proceso de degradación, el cual es balanceado por la actividad de inhibidores de estas enzimas, incluyendo TIMPS, derivados de los tejidos alrededor del tumor (Khokha et al., 1995). Posteriormente, existe una interacción con el sustrato y una locomoción activa, procesos que se llevan a cabo de la misma manera como se realizaron durante el proceso de intravasación e interacción con la matriz extracelular (Engers et al., 2000).

1.2.1 *Quiescencia Tumoral*

Por observaciones clínicas, se sabe que la metástasis distante puede surgir años después de haber removido el tumor primario (Callaway et al., 1989). Como se mencionó anteriormente, investigaciones recientes han demostrado que más del 80% de las células tumorales circulantes se extravasaban exitosamente pero el

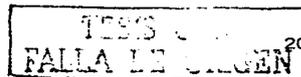
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

número de metástasis que surgen de estas células es mucho menor del esperado (Chambers et al., 1995). Esto debido a que las células tumorales después de extravasarse entran a una fase de retardamiento del crecimiento que es equivalente al fenómeno de micrometástasis silenciosa o de tumor en latencia. Esta micrometástasis puede tener alta actividad proliferante, que es balanceada por una apoptosis activa (Racila et al., 1996; Vitetta et al., 1997). Eventualmente, muchas de las células del tumor se detienen en la fase G0 del ciclo celular (Marches et al., 1998), lo que resulta importante desde el punto de vista clínico ya que las células detenidas en esta fase del ciclo no son susceptibles ni a quimioterapia ni a radioterapia. Sin embargo, como resultado de los cambios microambientales, estas células son susceptibles de re-ingresar al ciclo celular en cualquier momento y como consecuencia establecer una metástasis distante, aún muchos años después de que el tumor primario haya sido removido (Engers et al., 2000). A la fecha se desconocen la señal o señales que rompen este estado de letargo y despierta el crecimiento de la masa tumoral secundaria.

2. INTERACCIONES ENTRE LAS CÉLULAS TUMORALES Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

El sistema vascular es un órgano único, con una lámina basal que forma un límite físico entre los compartimentos intra- y extravasculares. Originalmente las células endoteliales fueron consideradas como una barrera inerte; sin embargo, actualmente se sabe que éstas células tienen una participación activa en la regulación de un gran número de procesos homeostáticos y patológicos, entre los que se encuentran: la embriogénesis, la regulación del tono vascular, mantenimiento del equilibrio pro y anticoagulante, la fibrinólisis, la arterogénesis, la isquemia y la inflamación tanto aguda como severa (Hill et al., 1997).

La investigación de las interacciones entre las células cancerosas y la pared vascular ha llevado al reconocimiento de que existen mecanismos compartidos entre la fase hematogena de la metástasis del cáncer y la patofisiología de este proceso.



De muchas maneras, el contacto inicial y la transmigración de células tumorales se asemeja a lo que realizan los leucocitos durante la reacción inflamatoria (Muller et al., 1995).

2.1 El contacto inicial

Al igual que con los leucocitos, las células tumorales tienen que interaccionar con las paredes vasculares para disminuir su velocidad y poder adherirse al endotelio y extravasarse. Los contactos iniciales entre las células tumorales y el endotelio son débiles y temporales, y se basan principalmente en interacciones carbohidrato-carbohidrato presentados por moléculas de adhesión en ambos tipos celulares. Se postula que esta interacción inicia la activación tanto del endotelio como de las células tumorales a través de citocinas, radicales libres, lípidos bioactivos y factores de crecimiento. Estos mediadores causan la expresión de moléculas de adhesión inducibles en ambos tipos celulares reforzando las uniones iniciales, subsecuentemente, mediadores humorales y/o vías de transducción relacionadas a las integrinas llevan a cabo la retracción del endotelio, el movimiento y la migración transvascular de las células tumorales.

En este estado, los contactos con las células endoteliales juegan un papel importante pero aún no se ha determinado con claridad la identidad de las moléculas que participan. Sin embargo, existen candidatos potenciales como: las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, moléculas de adhesión vascular (VCAMs), moléculas de adhesión endotelial (ECAMs), moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), las selectinas P y E, así como un grupo de moléculas portadoras de un complejo de glicosilación conocido como sialil-Lewis (Mareel et al., 1993; Jiang et al., 1998) (Tabla 1). Algunas de estas moléculas son inducibles bajo la influencia de señales extracelulares como las citocinas o por radicales libres (Orr, 2000).

Estudios *in vitro* han mostrado evidencia de la participación de selectina E en la metástasis de varios tipos de tumores, entre los que se encuentran: carcinoma de colon, carcinoma de mama, leucemia, linfomas, carcinoma gástrico, carcinoma pancreático, carcinoma renal, sarcomas y melanomas (Krause et al., 1999). Varios de estos trabajos mostraron que a pesar de que las células

tumorales muestran una adhesión basal a las células endoteliales no activadas, la adhesión aumenta cuando las células endoteliales son estimuladas con citocinas proinflamatorias y cuando las células tumorales expresan el complejo de glicosilación denominado sialil Lewis a y x. Resultados semejantes se han obtenido en estudios en los que se ha analizado la participación de ICAM-1 en la adhesión de células de gliomas (Tamaki et al., 1995) y de VCAM-1 en la adhesión de melanomas, para ambos casos es necesaria la expresión de las integrinas que funcionan como co-receptores específicos para estas moléculas (Voura et al., 1998).

Se ha mostrado que la expresión de integrinas está involucrada en la fase vascular de la metástasis; lo que apoya la teoría de un proceso bifásico, en el que las selectinas son las responsables del arresto inicial y las integrinas regulan la adhesión tardía. Péptidos con secuencia GRGDS, homóloga al sitio de unión de integrinas RGD, puede bloquear la adhesión de diversas líneas tumorales a monocapas endoteliales estimuladas (Lafrenie et al., 1994; Lauri et al., 1990).

2.2 La migración transendotelial

La monocapa de células endoteliales que recubre los vasos sanguíneos y linfáticos es en realidad un epitelio modificado, por lo que presenta las características estructurales comunes de un epitelio. La integridad del endotelio vascular depende principalmente de la organización de sus uniones intercelulares. Estas uniones están formadas por la interacción homotípica de los dominios extracelulares de una proteína transmembranal conocida como cadherina del endotelio vascular (VE-cadherina), la cual a través de su dominio citoplásmico, se asocia a una red de proteínas intracelulares como α , β y γ -catenina. Se ha sugerido que proteínas adicionales como la vinculina y la α -actinina unen al complejo VE-cadherina-catenina con el citoesqueleto de actina. Durante el procesos de metástasis, las células tumorales circulantes tienen que interrumpir estas uniones intercelulares para poder extravasarse.

Voura y colaboradores (1998) montaron un sistema que permite medir la interacción de las células endoteliales y células de melanoma durante la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

transmigración. Estos estudios presentan evidencia de que la migración transendotelial de células de melanoma puede subdividirse en 5 pasos secuenciales (Fig. 2). Las células de melanoma se asientan sobre el endotelio en los primeros 30 min de coincubación, una hora después se puede observar un penetración parcial que ocurre preferencialmente en las uniones interendoteliales. Después de 5 h de co-cultivo, el 50% de las células de melanoma, que originalmente tenían una forma esférica, muestran una morfología aplanada y extendida en la matriz que se localiza debajo de las células endoteliales, indicando que el proceso de transmigración ha concluido.

Trabajos de Lewalle (1997), Sandig (1997) y de Voura (1998), han mostrado evidencia que sugiere la participación activa de los dos tipos celulares (endotelio y tumorales), caracterizado por la reorganización del citoesqueleto de actina, cambios dinámicos en la forma de la célula y la expresión alterada de VE-cadherina en las células endoteliales. La penetración es iniciada por pseudopodos en la parte basal de la célula tumoral, ocasionando la formación de microfilamentos en el citoplasma de la célula endotelial y que surgen de las zonas de contacto con las células tumorales (Fig. 2, etapa 1). Estas interacciones adhesivas llevan a una redistribución de VE-cadherina y de PECAM-1, a pesar de que tanto la VE-cadherina como la N-cadherina están ausentes en los contactos entre las células tumorales y las células endoteliales, otros miembros de la familia de cadherinas están presentes en los sitios de contacto, lo cual es evidenciado por el uso de anticuerpos para pan-cadherina en ensayos de inmunocitoquímica (Sandig et al., 1997). La permanencia de pan-cadherina en los contactos heterotípicos sugiere que las cadherinas proveen de una sustrato favorable para la transmigración de las células tumorales. Sin embargo, se desconoce la especie o especies particulares de cadherina(s) que están involucradas en este proceso.

Los pseudópodos o protusiones se extienden lateralmente de la parte basal de las células de melanoma. Normalmente, no se observan protusiones membranales de menos de 1 μm de diámetro, lo que sugiera que su formación puede ser inducida por interacciones entre las células de melanoma y el endotelio. Estas protusiones, al igual que otros tipos de espículas o microvellosidades

contienen F-actina, aumentando el área de contacto entre los dos tipos celulares, lo que lleva a una adhesión más fuerte (Fig. 2, etapa II).

Las células endoteliales presentan "nudos" de microfilamentos que se extienden hacia arriba y terminan donde las protrusiones del melanoma entran en contacto con la célula endotelial. Esta organización de las fibras de actina sugiere que existen interacciones activas entre las células endoteliales y las células del melanoma (Fig. 2, etapa III).

La penetración de los pseudópodos a la región localizada entre dos células endoteliales, lleva a la retracción de las células endoteliales para proveer el espacio necesario para que la célula tumoral se mueva; esta retracción no separa a la célula tumoral de la monocapa endotelial. La evidencia experimental sugiere que las membranas celulares de ambas células permanecen en contacto estrecho durante todo el proceso de trans migración, probablemente a través de interacciones heterotípicas entre las células (Fig. 2, etapa IV).



Figura 2. Dibujo esquemático de los pasos secuenciales en la trans migración de células tumorales (T) a través de la monocapa endotelial (E), hasta hacer contacto con la lámina basal (LB). (Tomado de Voura et al., 1998)

El mecanismo por el que se induce la retracción de las células endoteliales aún se desconoce, sin embargo, es posible que el contacto inicial a través de las moléculas de adhesión ocasione la disolución de las uniones interendoteliales. Por otro lado, reportes recientes sugieren la formación de uniones espaciadas "gap" que se forman en los sitios de contacto entre las células endoteliales y las células tumorales (el-Sabban et al., 1991, 1994; Honn et al., 1994). Se cree que el ácido 12(S)-hidroxieicosatetraenoico (12(S)-HETE), un metabolito producto de la actividad de la lipoxigenasa sobre el ácido araquidónico, pasa a través de uniones

comunicantes tipo "gap" de la célula tumoral a la célula endotelial, lo que eventualmente lleva a la retracción del endotelio. Se sabe que el 12(S)-HETE afecta la redistribución de PECAM-1 y de la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Tang et al., 1993), disparando un rearrreglo del citoesqueleto de actina dependiente de la cinasa de proteínas PKC (Tang et al., 1995; 1993). Cabe mencionar, que los metabolitos de lipoxigenasa también son capaces de facilitar la trans migración de monocitos (Sultana et al., 1996).

Una vez unidas a la matriz subendotelial, las células tumorales comienzan a extenderse; proceso que requiere de integrinas que se unen a los componentes de la matriz extracelular. Para sellar el hueco dejado por la célula tumoral, las células endoteliales adyacentes reorganizan su citoesqueleto de actina y proyectan lamelipodios que contienen gran cantidad de fibras de estrés que se extienden sobre la superficie apical de las células tumorales. La VE-cadherina y PECAM-1 reaparecen cuando la célula endotelial comienza el proceso para re-establecer sus uniones intercelulares (Voura et al., 1998) (Fig. 2, etapa v).

Estos eventos parecen estar relacionados con las respuestas de un endotelio activado. Se ha mostrado que el contacto entre las células tumores y la monocapa endotelial induce un rápido aumento transitorio de calcio intracelular [Ca^{2+}], en las células endoteliales que parece ser dependiente de un mecanismo de contacto célula-célula muy específico (Lewalle et al., 1997). Este proceso involucra cinasas de residuos de tirosina asociadas a receptores, si esta fosforilación es bloqueada se inhibe la separación endotelial y la migración transendotelial (Lewalle et al., 1998). También, el mecanismo que regula la expresión de VE-cadherina, vinculina y los componentes de los complejos cadherina/catenina parece ser dependiente del estado de fosforilación de estas proteínas.

3. EL FENOTIPO ENDOTELIAL

3.1 *El fenotipo constitutivo*

Las células endoteliales dentro de los vasos sanguíneos y linfáticos son estructural y funcionalmente heterogéneas. Anteriormente, se mencionó que los eventos que suceden durante la metástasis parecen estar relacionados con las respuestas de un endotelio activado. Sin embargo, normalmente las células endoteliales se encuentran en un estado que se conoce como fenotipo constitutivo o en reposo, que presenta una actividad metabólica muy baja, acompañada de una pobre capacidad para adherir componentes celulares (neutrófilos, polimorfonucleares y plaquetas).

Las células endoteliales quiescentes o en reposo forman una población heterogénea que varía no solo entre órganos sino dentro de vasos de distintos calibres dentro de un mismo órgano. La heterogeneidad de estas células es evidente al analizar los diferentes morfotipos endoteliales presentes en diferentes órganos: así por ejemplo los endotelios pueden estar formando una monocapa continua y sellada en los órganos donde realizan funciones de barrera como en el cerebro o en los pulmones; o pueden estar formando una capa discontinua con espacios intercelulares o fenestradas intercelularmente, como ocurre en el hígado. Esta heterogeneidad estructural de las células endoteliales ejemplifica la capacidad de adaptación de estas células a su microambiente.

Poco se sabe acerca de las moléculas que regulan el fenotipo constitutivo de las células endoteliales (Fig 3). Muchos estudios han caracterizado este fenotipo utilizando patrones de unión a lectinas, mostrando especificidad en diferentes órganos, especies, calibre del vaso. Incluso, a diferentes edades en un mismo órgano existen variaciones, lo que sugiere un perfil diferencial en la expresión de glicocjugados en distintas poblaciones de endotelios (Gumkowski et al 1985; Mills et al., 1986). Para una mejor comprensión del fenotipo se necesitará la identificación de marcadores específicos de subpoblaciones de células endoteliales que puedan ser usados para seguir vías particulares de diferenciación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De los marcadores endoteliales que actualmente se conocen solo la molécula de adhesión endotelial específica de pulmón (Lu-ECAM-1) tiene una expresión específica y se localiza en vénulas capilares del pulmón. En algunas vénulas del bazo. Se ha observado que esta molécula de adhesión participa en la metástasis de ciertos tumores que preferentemente invaden el pulmón (Zhu et al., 1991). La principal función de esta molécula de adhesión parece estar asociada a la metástasis y sus funciones primarias no han sido caracterizadas, sin embargo, la preferencia de metástasis en ciertos órganos y la expresión específica de esta molécula, sirven como ejemplo de como las células endoteliales pueden contribuir a la regulación de la compartimentalización de los órganos y en general del cuerpo (Augustin et al., 1994).

Una molécula de expresión heterogénea en las poblaciones endoteliales es Mad-CAM-1. Esta molécula de adhesión es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa de manera constitutiva en vénulas de alto calibre en los parches de Peyer del intestino. Normalmente, se puede unir a integrinas $\alpha\beta_7$ y a la selectina-L expresadas por diferentes subpoblaciones de linfocitos (Springer, 1994).

El microambiente ejerce cierto control sobre el fenotipo endotelial, por ejemplo, Lu-ECAM-1 puede ser inducida por los componentes de matriz extracelular de los pulmones. Cuando las células endoteliales derivadas de aorta se cultivan sobre matriz extracelular derivada de pulmón se induce la expresión de Lu-ECAM-1, lo que refleja que la matriz induce un proceso de transdiferenciación para que adquieran un fenotipo similar al que presenta las células endoteliales de los capilares de pulmón (Zhu et al., 1991; Augustin-Voss et al., 1991).

Otro elemento importante del microambiente endotelial está constituido por las células que rodean al endotelio que también son capaces de afectar el fenotipo endotelial. Se ha observado que cuando los pericitos entran en contacto directo con las células endoteliales ejercen sobre ellas un efecto inhibitorio, manteniéndolas en estado quiescente (Orlidge et al., 1987).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2 Activación endotelial: Transdiferenciación del fenotipo constitutivo

La adquisición del fenotipo activado es, en muchos aspectos, similar a la diferenciación de las células hematopoyéticas, con una gran diferencia: la diferenciación de las células hematopoyéticas es unidireccional, esto es, las células se comprometen a un cierto linaje y no pueden revertir el fenotipo. En cambio, si bien el fenotipo constitutivo de las células endoteliales puede pasar a un estado activado, después de 12 a 24 h las células endoteliales regresan al fenotipo constitutivo (Fig. 3).

3.3 El fenotipo activado

La habilidad de diferentes tipos celulares para transdiferenciarse muestra la capacidad para adaptarse a los requerimientos locales y así ampliar el rango de funciones metabólicas y fisiológicas que pueden realizar.

La activación endotelial está asociada a distintos cambios fenotípicos que, de una manera semejante al proceso de transdiferenciación del fenotipo constitutivo, sirve para que la célula se adapte localmente a los requerimientos funcionales que se necesitan durante condiciones como daño tisular, la presencia local de agentes infecciosos o cambios en las condiciones de perfusión. Normalmente, se considera que las células endoteliales están activadas cuando están proliferando o cuando permiten la adhesión de células sanguíneas (Fig. 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

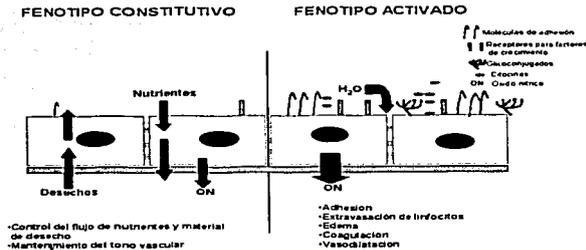


Figura 3. Principales diferencias entre el fenotipo constitutivo y el fenotipo activo de las células endoteliales. Se indican los procesos en los que participa en cada uno de los fenotipos. (Modificado de Augustin et al., 1994).

En años recientes, el fenotipo de activación endotelial inducido por citocinas durante la inflamación, ha sido caracterizado extensamente tanto *in vivo* como *in vitro*. Uno de los primeros pasos en la cascada inflamatoria es la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E (CD62E), selectina-P (CD62P), VCAM-1 (CD106) e ICAM-1 (CD54). La expresión de estas moléculas es dependiente de citocinas proinflamatorias como TNF- α o IL-1 β y permite que las células circulantes se adhieran al endotelio activado y lleguen al sitio de inflamación.

Otro modo de activación endotelial es la angiogénesis, disparada por mecanismos parácrinos y autócrinos, que permite a las células endoteliales separarse de vasos pre-existentes y entrar a una cascada morfogenética que lleva a la formación de nuevos vasos con células endoteliales maduras. Estas células que están migrando sufren varios cambios entre los que se encuentran alteraciones de: sus propiedades adhesivas, los patrones de glicosilación de sus antígenos de superficie, la producción de citocinas, la expresión de los receptores de factores de crecimiento, su capacidad de proteolizar diferentes componentes

de la matriz extracelular y su comunicación intercelular (Augustin-Voss et al., 1992; Hauser et al., 1993).

La capacidad de respuesta de las células endoteliales a los factores de crecimiento angiogénicos depende de la expresión de los receptores para cada uno de ellos. Se ha demostrado que receptores, que son fosforilados en residuos de tirosina, se expresan diferencialmente en las células endoteliales angiogénicas, contribuyendo a la heterogeneidad del fenotipo activado del endotelio (Agustin et al., 1994).

El fenómeno de activación se lleva a cabo principalmente en la microvasculatura (precapilares, capilares y venas postcapilares) e involucra la expresión de genes de "activación" en células endoteliales de diferentes tejidos y órganos, que *per se* son heterogéneas en su morfología, fisiología y función. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados *in vitro* analizando la activación endotelial se han efectuado con células endoteliales primarias derivadas de grandes vasos como la aorta de bovino o la vena umbilical de humanos. Así, los "genes de activación" se enciendan sin afectar a los genes de diferenciación, esta combinación de diferentes grupos de genes expresados simultáneamente permite tener una microvasculatura heterogénea (Risau, 1995). Sin embargo, una clara diferencia entre los genes que se expresan en el estado activado y aquellos que definen el estado diferenciado de las células endoteliales radica en que la expresión de los primeros es un fenómeno transitorio, en donde la magnitud y la duración de su expresión es dependiente de señales microambientales, como puede ser la presencia de citocinas proinflamatorias. En algunos casos patológicos, como la formación de placas ateroscleróticas, la constante presencia de señales proinflamatorias transforman una respuesta endotelial transitoria en permanente, contribuyendo al desarrollo de una condición patológica.

Si bien, son muchos los elementos de regulación transcripcional que participan en la transición del estado endotelial quiescente al estado activado, recientemente, se ha reconocido que uno de los encargados centrales de encender los genes del estado de activación es el factor de transcripción NF- κ B, del cual depende la expresión de diversas moléculas de adhesión, citocinas y

algunos factores de crecimiento en cuyos promotores se han identificado secuencias reconocidas por este factor.

4 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B

En 1986, Sen y Baltimore describieron a NF- κ B como un factor nuclear que se une al promotor del gen que codifica la cadena κ de la molécula de inmunoglobulina en células B. En el mismo año, estos investigadores mostraron que NF- κ B puede ser activado en otras células al exponerlas a estímulos como ésteres de forbol y que esta activación era independiente de la síntesis de proteína. En los siguientes años se encontró que los promotores de muchos genes contienen sitios de unión para este factor de transcripción.

Actualmente, se sabe que NF- κ B/Rel es una familia de factores de transcripción formada por proteínas estructuralmente relacionadas por presentar un dominio homólogo conservado denominado Rel que tiene la capacidad de formar homo- y heterodímeros (Chen et al., 1999). En vertebrados, esta familia incluye a p50/p105, p52/p100, Rel A (p65), c-Rel y a Rel B, que se pueden unir a sitios en el DNA de aproximadamente 10 pares de bases, que en conjunto se llaman sitios κ B. El estudio comparativo de las secuencias κ B presentes en la región promotora de una gran cantidad de genes ha permitido agruparlos en dos grandes familias: las secuencias que responden al estímulo por citocinas y las secuencias que responden a factores de crecimiento.

SECUENCIAS κ B EN LOS PROMOTORES

Citocinas	hGGAmYYCC
Factores de crecimiento	nGGmYYCC
Donde:	h: A, C, T. r: purinas (G o A) y: pirimidinas (T o C) n: cualquier nucleótido (A, G, T, C)

Tabla 3. Secuencias conocidas como κ B, presentes en los promotores de genes que responden a NF- κ B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La mutación sistemática de cada nucleótido en las secuencias κ B ha revelado que basta con un cambio de G por C en la posición dos de cualquiera de las dos familias para alterar la estabilidad entre los complejos NF- κ B y las secuencias κ B. El resultado es una disminución en la eficiencia transcripcional.

Cómo ya se mencionó, estas proteínas comparten un dominio llamado "homólogo a Rel" (RH), que está compuesto por dos sitios semejantes a inmunoglobulinas que tiene varias funciones: la dimerización de dos subunidades, la unión al DNA a través de un dominio básico, el control de su destino nuclear por medio de una secuencia de localización nuclear (NLS) y más importante para su regulación, el sitio para la unión con los inhibidores de NF- κ B, denominados I κ Bs (Karin, 1999). Sin embargo, basados en las secuencias del extremo carboxilo, la familia de NF- κ B puede ser dividida en dos clases; los miembros de la primera clase son p105, p100 y "Relish" de *Drosophila* que presentan un extremo carboxilo más largo, que además contiene múltiples copias de repeticiones de ankirinas, cuya función es la inhibición de estas moléculas. Los homodímeros formados por los miembros de esta clase generalmente no son activadores de la transcripción; sin embargo, ésto cambia cuando forman dímeros con miembros de la segunda clase de factores de transcripción NF- κ B en cuyo caso son activadores transcripcionales muy eficientes. La segunda clase incluye a c-Rel, Rel B, Rel A (p65), Dorsal y Dif. Estas proteínas contienen un dominio de activación en el carboxilo terminal, cuya secuencia no está conservada entre especies a pesar de que pueden activar la transcripción entre especies (Gilmore, 1999) (Fig. 4).

Todas las proteínas Rel de vertebrados pueden formar homodímeros o heterodímeros, excepto Rel B, que sólo forma heterodímeros. Esta diversidad de combinaciones contribuye a la regulación de una variedad de genes. A pesar de que pueden ser redundantes, cada dímero tiene especificidad para variantes de los sitios de unión κ B. Normalmente, cuando se habla de NF- κ B, se refiere al heterodímero formado por las subunidades p50 y Rel A (p65), porque éste es uno de los dímeros más comunes y el más abundante en las células analizadas hasta el momento. Sin embargo, es importante resaltar que algunas respuestas transcripcionales pueden ser dependientes de otros heterodímeros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los IκBs forman una familia pequeña de proteínas que comparten un dominio de 6 o más repeticiones de ankirina, el extremo amino que funciona como dominio regulador y el extremo carboxilo que contiene un dominio PEST que está involucrado en la regulación negativa del inhibidor (Fig. 4).

En ausencia de estímulos externos, la mayoría de los complejos transcripcionales de NF-κB están presentes en un estado inactivo en el citoplasma, al encontrarse asociados al inhibidor IκB. Esta interacción mantiene oculto al péptido de localización nuclear (NLS) presente en el dominio homólogo REL (RHD), evitando así la translocación al núcleo del factor de NF-κB.

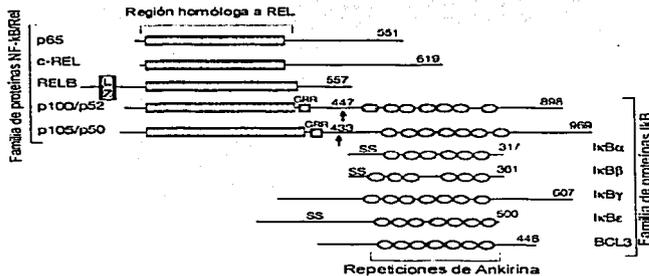


Figura 4. Proteínas NF-κB e IκB. Todas las proteínas NF-κB presentan un dominio homólogo llamado REL (RHD), el cual regula la dimerización y la unión al DNA. En este dominio también se localiza la señal de localización nuclear (NLS), la cual es reconocida por las proteínas IκB. Todas las proteínas IκB contienen 6-7 repeticiones de ankirina, las cuales regulan su unión con el RHD. IκBα, IκBβ e IκBε contienen un dominio regulador en el extremo amino en el cual se encuentran dos serinas conservadas (SS). La fosforilación en estos sitios marcan a los IκB para su degradación dependiente de ubiquitinización. Los extremos carboxilos de p105 y p100 son similares en secuencia, estructura y función a los IκBs, estas porciones previenen la entrada de estas proteínas al núcleo y son eliminadas por degradación dependiente de ubiquitinización. GRR: región rica en glicina; LZ: cierre de leucina. La flecha señala los residuos del extremo carboxilo de p50 y p52 (después del procesamiento de p105 y p100 respectivamente) (Tomado de Karin et al., 2002).

Para que NF- κ B pueda llegar a su sitio de acción en el núcleo, el complejo citoplásmico NF- κ B:I κ B tiene que disociarse; de hecho, la activación del factor NF- κ B dimérico consiste en favorecer la separación de su inhibidor. Se sabe que la activación puede ser inducida por el tratamiento con ésteres de forbol, con citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , con lipopolisacárido bacteriano y ciertos virus. La disrupción del complejo se logra a través de una vía común que se basa en la fosforilación y degradación de los I κ Bs. Si bien en todos los casos indicados anteriormente, la activación de NF- κ B requirió de la ocupación y activación de receptores de membrana, NF- κ B también puede activarse por procesos inespecíficos como un incremento en estrés oxidativo, sin que se sepa que media ésta activación. Ciertos I κ B, como el I κ B α , tienen péptidos señal de localización nuclear y secuencias de exportación nuclear (NES), de manera que la señal de activación de NF- κ B al núcleo pueda ser abatida por I κ B α recién sintetizado que puede entrar al núcleo y capturar a los dímeros de NF- κ B que se encuentran unidos al DNA. La consecuencia de esto es la remoción del factor de transcripción del núcleo, regresando al citoplasma en forma de complejo NF- κ B/I κ B gracias a su secuencia de exportación nuclear (Fig. 5) (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Sachdev et al., 1998).

En pocos minutos, activadores potentes de NF- κ B como TNF- α o IL-1 β , ocasionan la casi completa degradación de los I κ Bs (especialmente de I κ B α). Este proceso es mediado por el proteasoma 26S y depende de la fosforilación de dos residuos de serina conservadas en el extremo amino de I κ B α , I κ B β y en I κ B ϵ (S32 y S36 en I κ B α humano). La importancia de la fosforilación de estos dos residuos de serina queda de manifiesto cuando son sustituidos por glicinas, lo que resulta en una mutación dominante negativa que previene la activación de NF- κ B. Una vez fosforilados, los I κ Bs aún unidos a NF- κ B sufren una segunda modificación post-transduccional: la poliubiquitinización (Alkalay et al., 1995; DiDonato et al., 1995; 1996) (Fig. 5).

La poliubiquitinización ocurre a través de una cascada de reacciones enzimáticas. La primera, dependiente de ATP, es llevada a cabo por la enzima de

TESIS CON
FALLA DE OÍ

activación de ubiquitina-E1 y tiene como resultado la formación de un tioester-E1-ubiquitinado. La segunda reacción es catalizada por enzimas que conjugan ubiquitina o un aceptor intermedio: ubiquitina-E2, la cual recibe a la ubiquitina activada de E1. Cabe mencionar que existe solo una enzima E1, mientras que existen varias E2 responsables de la ubiquitinización de diversos sustratos. El último paso en la cascada de ubiquitinización es la transferencia de ubiquitina activada del sustrato intermedio E2 al sustrato final, lo cual es catalizado por proteínas ligasas de ubiquitina-E3. El grupo de proteínas E3 es aún más grande y heterogéneo que el grupo de las E2 y la mayoría de sus miembros no han sido bien caracterizados (Hershko et al., 1998).

Yaron y colaboradores (1998) encontraron un componente del complejo de activación E3 que es responsable del reconocimiento del κB fosforilado. Esta proteína, llamada E3RS ^{κB} , forma parte de la familia "F-box WD-repeat", familia que participa en la degradación de proteínas.

Como ya se ha mencionado, el paso que determina que el complejo NF- κB / κB se rompa es la fosforilación de dos residuos específicos de serina en κB . Sin embargo, existen varias excepciones a esta vía, una de ellas es la activación de NF- κB en respuesta a radiaciones de luz UV, en la que se observa degradación de κB sin que éste se encuentre fosforilado (Bender et al., 1998; Li et al., 1998); una segunda excepción es la anoxia, en este caso se estimula la fosforilación de $\kappa\text{B}\alpha$ en el residuo de tirosina 42 (Imbert et al., 1996). Se ha sugerido que el $\kappa\text{B}\alpha$ fosforilado en tirosina se une al dominio SH2 de la cinasa PI3K, separándolo del dímero NF- κB (Beraud et al., 1999). Sin embargo, este residuo de tirosina no está conservado en otros κB , así que la "universalidad" de esta vía está en duda. También, se ha reportado una vía de activación independiente de la fosforilación de los κB s, en cuyo caso estos son degradados por calpaína (Pianetti et al., 2001).

El control de la fosforilación de κB en respuesta a estímulos activadores de NF- κB recae en la cinasa de κB , llamada IKK. La actividad de esta enzima es específica de residuos de serina y responde a un gran número de activadores de

NF- κ B, incluyendo a TNF- α , el cual estimula su actividad mostrando una cinética que correlaciona con la degradación de I κ B α (DiDonato et al., 1997).

IKK es un complejo formado por al menos tres proteínas fuertemente asociadas. Dos de estos polipéptidos, IKK α (también conocida como IKK1) e IKK β (IKK2) funcionan como las unidades catalizadoras de la cinasa (DiDonato et al., 1997), mientras que el tercer polipéptido, IKK γ (también llamado NEMO o IKKAP1) funciona como unidad regulatoria (Mercurio et al., 1999) (Fig. 5).

IKK α también ha sido aislada como una proteína que interactúa con la cinasa de la cinasa de MAPK (MAP3K), llamada NIK (cinasa inductora de NF- κ B) (Réginer et al., 1997). En experimentos de sobre-expresión, se ha observado que NIK actúa como un potente activador tanto de IKK como de NF- κ B, lo que ha llevado a proponer que el sustrato primario de NIK es IKK α (Karin et al., 1998).

Las estructuras primarias de IKK α e IKK β son muy similar (52% de identidad), contiene dominios de cinasas en su porción amino terminal, cierres de leucina (LZ) y motivos helice-asa-helice (HLH) en el carboxilo terminal. Hasta la fecha, a IKK γ no se le ha reconocido un dominio catalítico, pero está compuesta principalmente de tres regiones con α -helices, incluyendo un cierre de leucina. La forma predominante de IKK es un heterodímero IKK α :IKK β asociado a un dímero o trímero de IKK γ (Rothwarf et al., 1998). Una cuarta proteína conocida como IKAP, que no se ha detectado como un constituyente del complejo IKK, podría estar involucrada en la activación del complejo IKK aunque su importancia fisiológica y funcional todavía no es clara (Cohen et al., 1998). Estudios en levaduras sugieren que IKAP es una proteína nuclear, por lo que es difícil que continuamente forme parte del complejo citoplásmico IKK.

Las actividades de cinasa de IKK α e IKK β y su capacidad de ser activadas dependen de la dimerización a través de sus dominios LZ y HLH; mutaciones en cualquiera de estos disminuye la actividad de cinasa sobre I κ B (Zandi et al 1997; Delhase et al., 1999). La actividad de la cinasa también depende de la presencia de la subunidad IKK γ ; su importancia en la vía queda de manifiesto en el hecho de que ni el complejo de IKK α /IKK β ni NF- κ B pueden ser activados en células

deficientes de IKK γ , estudios recientes han dado pruebas de la importancia de IKK γ en la activación de NF- κ B y además sugieren que su extremo carboxilo es necesario para el reclutamiento de activadores que se encuentran río arriba, como lo podrían ser cinasas de IKK como NIK (Li et al., 1999).

La activación de IKK depende de la fosforilación de las tres subunidades de IKK. IKK α e IKK β se fosforilan exclusivamente en residuos de serina, mientras que IKK γ se fosforila tanto en residuos de serina como de treonina. Dos de los residuos de serina de IKK β que pueden ser fosforilados se localizan en el asa de activación, en un segmento del dominio de cinasa que es semejante al que se encuentra presente en otros tipos de cinasas. Generalmente, el asa de activación no fosforilada se encuentra doblada sobre el dominio de cinasa e interfiere con la entrada de ATP y del sustrato al sitio catalítico. La fosforilación mueve el asa de activación y la retira del sitio catalítico, permitiendo la entrada y la unión de los sustratos (Delhase et al., 1999; Johnson et al., 1996). Estudios recientes muestran diferencias entre las subunidades catalíticas, esto es, los activadores pueden activar solo a la subunidad IKK β y no IKK α o viceversa.

La fosforilación también puede resultar en una regulación negativa de la actividad de IKK. Además de su asa de activación, IKK β puede ser fosforilado en residuos de serina localizados entre el motivo HLH y el carboxilo terminal. La fosforilación de estos residuos de serina depende de la actividad de autofosforilación de la enzima y posiblemente ocurre de manera subsecuente a la fosforilación en el asa de activación. Cuando se fosforilan al menos 9 de los residuos de serina presentes en el carboxilo terminal, la enzima alcanza un estado de actividad muy bajo; una vez en este estado IKK se vuelve sensible a la inactivación por acción de las fosfatasas, especialmente cuando la señal de activación ha desaparecido. Los sitios de autofosforilación se encuentran localizados muy cerca del dominio HLH, por lo que, se ha sugerido que la inactivación se alcanza por un cambio en la conformación del sitio catalítico de la enzima (Karin, 1999).

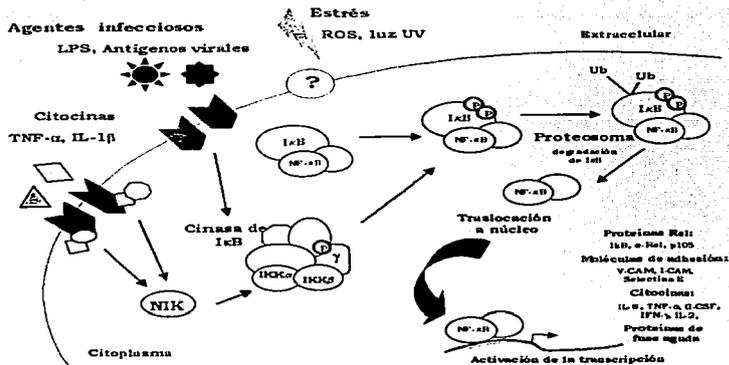


Figura 5. Vía clásica de activación de NF-κB. De izquierda a derecha, activación dependiente de los receptores de citocinas ($TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$), activación por lipopolisacáridos (LPS) o por antígenos virales, o por estímulos inespecíficos como estrés oxidativo, radicales libres (ROS) o luz ultravioleta (UV).

Recientemente, se han realizado estudios para saber si la vía de activación de NF-κB mencionada anteriormente es la vía "universal" de activación; sin embargo, los resultados muestran que éste factor de transcripción puede ser activado por al menos una vía más. Trabajos realizados por Romashkova y colaboradores (1999) sugieren que el PDGF es capaz de activar NF-κB a través de la activación del oncogen Ras, que a su vez activa a la vía de PI_3K/Akt que involucra la activación consecutiva de Akt y de IKK y la translocación de NF-κB a través de un mecanismo independiente de la degradación de IκB. Paralelamente, Nidal-Ozes y colaboradores (1999) reportan que en células 293, el $TNF-\alpha$ induce la activación de NF-κB a través de la fosforilación de IKK en la treonina 23; esta fosforilación es llevada a cabo por Akt, el cual fue previamente activado por acción de la PI_3K fosforilada por asociación con el receptor 1 de TNF (TNFR1). De igual

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

manera, Nidai (1999) demuestra que la activación de NF- κ B dependiente de TNF- α requiere de la activación de Akt.

También se ha observado que los receptores de quimiocinas en monocitos, neutrofilos y linfocitos activan una vía dependiente de las proteínas G, que llevan a la activación de factores de transcripción. Sin embargo, se ha encontrado que otros tipos celulares, no hematopoyéticos, pueden presentar estos receptores, lo que sugiere que las quimiocinas pueden regular el crecimiento y la diferenciación de otros tipos celulares a través de la activación de factores de transcripción. Además de las quimiocinas, otros agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés G coupled protein receptors), incluidas las proteasas, neuropéptidos y mediadores de lípidos pueden regular la actividad transcripcional en una gran variedad de células. En particular, se ha observado que estos receptores pueden llevar a la activación o inhibición de NF- κ B, dependiendo de cuál de las diferentes proteínas G está involucrada en la señalización (Ye, 2001).

Cuando la proteína G que se activa es de la clase s, (Gs), la activación del receptor causa elevación de AMP cíclico y la activación de la proteína cinasa A (PKA). Estos eventos llevan a la fosforilación de CREB (del inglés cAMP response element binding protein), el reclutamiento de CREB resulta en una disminución en la disponibilidad de otros factores de transcripción, afectando negativamente la activación de NF- κ B. De hecho los agonistas de receptores β -adrenérgicos, que están asociados a éste tipo de proteína G, aumentan la producción de I κ B α , por lo que inhiben la activación de NF- κ B (Fig. 6) (Sheppard et al., 1999; Farmer et al., 2000).

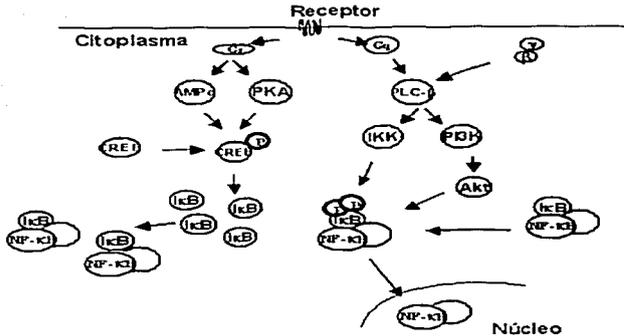


Figura. 6. Efecto de receptores acoplados a proteínas G sobre NF-κB.

Los miembros de la familia Gq agrupan a un gran número GPCRs, que activan a la PLC-β. Cuando esta vía se enciende, NF-κB es activado. Sin embargo, en varios experimentos, se ha mostrado que inhibidores de la PKC pueden bloquear la activación de NF-κB, lo que sugiere que la PKC que participa en esta vía puede estar involucrada en la activación del factor de transcripción mediada por GPCRs (Rahman et al., 2001). De hecho, en la activación de NF-κB mediada por proteínas Gq participan las cinasas de IκB (IKK) y puede ser bloqueada por represores de IκBα (Xie et al., 2000). Inhibidores de la PI3K, así como dominantes negativos de PI3K y su efector Akt (PKB) bloquean parcialmente la activación de NF-κB mediada por Gq; lo que sugiere el uso de dos vías para la activación del factor de transcripción: una dependiente de PI3K y otra de PLC-β (Fig. 6) (Ye, 2001).

Se ha reportado que miembros de los receptores acoplados a proteínas G de la familia Gi, regulan la activación de varios factores de transcripción entre los que se encuentra NF-κB. Sin embargo, se sabe que estas proteínas G inhiben las

adenilato ciclasas y no activan efectores como la PLC- β , por lo que no se sabe el mecanismo por el que estas proteínas G puedan activar a NF- κ B (Hsu et al., 1999).

Después de la activación, las subunidades $G_{\beta\gamma}$ se separan de la $G\alpha$ e independientemente estimulan a la PLC- β y pueden unirse a la subunidad reguladora de la PI_3K activando a ésta cinasa de lípidos (Hawes et al., 1996). Recientemente, se ha observado que en distintos tipos celulares, las subunidades $G_{\beta\gamma}$ son capaces de activar a NF- κ B. Se ha sugerido que esta activación ocurre a través de la subunidad regulatoria p101 de la PI_3K , que tiene un sitio de unión para $G_{\beta\gamma}$ (Krugmann et al., 1999). Varios estudios han sugerido que la cinasa Akt juega un papel en la estimulación de NF- κ B a través de GPCRs, aunque aún no se conoce completamente la vía de activación (Murga et al., 1998; Ye, 2001) (Fig 6).

5. PARTICIPACIÓN DE LAS CITOCINAS EN LA METASTÁSIS

La comunicación entre las células cancerosas y el endotelio involucra moléculas producidas por ambos tipos celulares y por otras células que se encuentran en el lecho vascular. Estos estímulos tienen el potencial para promover la adhesión y la extravasación de células cancerosas y por lo tanto, promover la metástasis.

Las citocinas son factores que regulan el crecimiento y la proliferación celular, y pueden ser producidas tanto por las células del sistema inmune como por las células tumorales. La diferencia entre los dos tipos es que la producción de citocinas por células tumorales es un proceso constitutivo o sujeto a una regulación aberrante (Ardestani et al., 1999).

Actualmente se estudia la participación y regulación de las citocinas en la progresión de varios tipos de tumores (Tabla 3); la regulación autócrina de las células tumorales involucra la producción endógena de la citocina que actúa en los receptores específicos de las células productoras estimulando la proliferación celular. Las citocinas producidas por las células tumorales pueden tener efectos parácrinos sobre las células que se encuentran alrededor del tumor, de igual

manera las células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, monocitos, linfocitos y granulocitos pueden producir factores activadores o inhibidores de la proliferación celular. Estos factores parácrinos pueden favorecer el crecimiento del tumor, la angiogénesis, la adhesión o motilidad, promover la diseminación, inhibir el crecimiento del tumor o causar diferenciación. De hecho, algunas citocinas tienen una doble regulación, de ser un inhibidor parácrino puede pasar a ser un estimulador autócrino para inducir la proliferación del tumor (Lázár-Molnár, 2000).

Dada su participación en procesos metastáticos algunas citocinas han sido estudiadas más a fondo y se ha podido caracterizar algunos de sus efectos tanto parácrinos como autocrinos.

El TGF- β es expresado constitutivamente en la mayoría de las células de melanoma en cultivo y puede ser utilizado como marcador biológico de la progresión de melanomas. Se sabe que induce angiogénesis y es capaz de potenciar la acción angiogénica del FGF β (Shih et al., 1993). Sin embargo, se ha identificado como una molécula inmunosupresora en glioblastomas, adenocarcinomas protácticos, carcinomas colorectales de pecho, endometriales y tiroideos (Derynck et al., 1987).

Los subtipos de IL-1 han mostrado tener un efecto antiproliferativo sobre algunos melanomas y sobre ciertos tipos de leucemia (Ardestani et al., 1999). Se ha mostrado que algunos tipos de cáncer de mama, carcinoma pancreático y melanomas secretan IL-1 α y que la interacción con su receptor en fibroblastos que rodean al tumor es capaz de activar al factor de transcripción NF- κ B. Estos análisis han mostrado también, una posible correlación entre el aumento en la expresión de la citosina y la metástasis a nódulos linfáticos (Bhal-Nakshatri et al., 1998; Chiviri et al., 1996).

El crecimiento de melanomas en estadios tempranos son inhibidos por IL-6 secretada por fibroblastos, sin embargo, melanomas metastásicamente competentes y melanomas en estados avanzados son resistentes al efecto antiproliferativo de la IL-6 (Sun et al., 1996). Los elevados niveles de IL-6 en el suero correlacionan con progresión tumoral, resistencia a la terapia quimioendocrina y con un rango de supervivencia bajo por la metástasis extensiva

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en pacientes que sufren de carcinoma renal metastásico, cáncer de mama y cáncer de pulmón (Yanawa et al., 1995).

Se ha observado que la IL-10 favorece la proliferación de las células tumorales de una manera autócrina (Feng et al., 1997).

La IL-18 y el PDGF, entre otras citocinas pueden activar al factor de transcripción NF- κ B lo que permite la expresión de algunas moléculas de adhesión que pueden tener un efecto pro-metastásico (Matsumoto et al., 1997; Olashaw et la., 1992).

La IL-2 funciona como agente inmunoestimulante al interactuar con receptores específicos de las células NK, linfocitos B y T (Caliguri et al., 1990).

El FGFb tiene propiedades angiogénicas y mitogénicas, paralelamente activa enzimas que degradan matriz extracelular brindando una capacidad invasiva a las células tumorales (Shi et al., 1993).

CITOCINAS PRODUCIDAS POR TUMORES

TGF- α	Melanomas, hepatomas	Shih et al 1993; Lee et al., 1995
TGF- β	Melanomas	Rodeck et al., 1994
IL-1 α/β	Melanomas, mama	Ardestani et al., 1999; Nosaki et al., 2000
IL-2	Melanomas	Caliguri et al., 1990
IL-6	Melanomas, mielomas Carcinoma renal, mama, Pulmón	Sun et al., 1992 ; Leavy et al., 1991 Yanagawa et al., 1995; Derynck et al., 1987
IL-10	Melanomas	Feng et al., 1997
IL-18	Melanomas	Vidal-Vanaclocha et al., 2000
PDGF A y B	Melanomas	Albino et al., 1991
FGFb	Melanomas	Dotto et al., 1988; Shih et al., 1993

Tabla 4. Citocinas que participan en el proceso metastásico

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tipos celulares que participan en la defensa contra agentes externos se encuentran circulando en la sangre; sin embargo, durante una reacción inflamatoria éstas células tienen que moverse rápidamente de la sangre al tejido lesionado. Este movimiento es conocido como extravasación, el cual requiere la formación y el rompimiento de contactos célula-célula entre los leucocitos y las células endoteliales de los vasos. Estos contactos están mediados por moléculas de adhesión presentes en ambos tipos celulares.

La activación endotelial involucra un cambio en la fisiología de las células endoteliales que se refleja en cambios en la expresión génica dependiente del factor de transcripción NF- κ B y asociado a un aumento en la capacidad adhesiva que correlaciona con la expresión de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1

Se ha propuesto que para que las células tumorales puedan producir metástasis es necesaria la activación endotelial. Esto sugiere que es necesaria la presencia de un estímulo que lleve a la activación del factor de transcripción NF- κ B en las células endoteliales para inducir la expresión de moléculas de adhesión que permitan la adhesión y extravasación de las células tumorales.

HIPÓTESIS

La activación de NF- κ B es esencial para el cambio en el fenotipo endotelial inducido por citocinas proinflamatorias, proponemos que ésta activación es importante para la interacción con células tumorales que muestren un fenotipo metastásico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si los productos secretados por las células tumorales son capaces de activar a las células endoteliales de forma dependiente de NF- κ B.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar si los productos secretados por las células tumorales inducen la activación de las células endoteliales, reflejada en un aumento en la capacidad de adherir células U937.
2. Evaluar si la activación endotelial inducida por los productos secretados por las células tumorales correlaciona con la activación del factor de transcripción NF- κ B.
3. Determinar la importancia de NF- κ B en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales.
4. Comparar los elementos de la vía de activación de NF- κ B por TNF- α y los productos secretados por las células tumorales.
5. Determinar la participación de las moléculas de adhesión endotelial selectina-E e ICAM-1 en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales.
6. Analizar de los productos secretados por las células tumorales:
 - 6a) presencia de citocinas proinflamatorias
 - 6b) presencia de activadores de NF- κ B pertenecientes a la familia de TNF- α .
7. Analizar el efecto de la aspirina sobre la activación de NF- κ B y sobre la adhesión inducida por los productos secretados por células tumorales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y METODOS**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). Brevemente, la vena fue sometida a disgregación enzimática con una solución de tripsina 0.1% (Sigma, St Louis MO, USA) preparada en una solución de verseno (NaCl 136 mM, KCl 5.36×10^{-3} , EDTA 5.26×10^{-4} , Tris 28 mM; pH 7.7), durante 15 min 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. La pureza de los cultivos fue evaluada por medio de la expresión del factor asociado al factor VIII de coagulación (factor Von Willebrand), siendo mayor al 99%.

Las células promielocíticas humanas de la línea U937, los fibroblastos murinos L929 y las células HeLa fueron adquiridas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC).

La línea celular EUHE se aisló de una lesión metastásica en el cuello de una paciente con mal de Hodgkin en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del Hospital General de México, S.S.A, por el grupo del Dr. Enrique Miranda. La línea EUHE expresa antígeno CD15, marcador de linfomas de Hodgkin, y adicionalmente los antígenos CD19, CD20 y CD23 (Miranda et al., 1999). La línea celular Eusebia fue obtenida de lesiones metastásicas en ratones desnudos NIH que fueron inyectados con la línea celular original EUHE.

Las líneas Calo e INBL fueron aisladas establecidas a partir de dos tumores cervico-uterinos que fueron retirados quirúrgicamente de pacientes diagnosticadas con carcinoma cervical epidermoide compuesto de células no queratinizadas de un tumor metastásico (INBL) y de un no metastásico (Calo) (Caceres-Cortes, et al., 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Condiciones de cultivo celular

Células endoteliales humanas. Las células endoteliales fueron mantenidas en medio de cultivo M199 suplementado con glutamina 200 mM (ambos de GIBCO BRL, Rockville, MD), 0.1 mg/ml de factor de crecimiento endotelial (Biomedical Technologies Inc. Stoughton, MA), 0.1 mg/ml de heparina (Sigma, St. Louis, MO), mezcla de antibióticos (penicilina 100 U/ml; streptomicina 100 µg/ml) y antimicótico (anfotericina 0.25 µg/ml) (GIBCO, Rockville MD, USA) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, Rockville MD, USA). En algunos casos, las cajas se cubrieron 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 5% CO₂. Para los ensayos experimentales las células fueron utilizadas entre los pasajes 1 y 2, sembrándose a una densidad de 2x10⁴ células por cm². Los cultivos fueron tratados con TNF-α (R&D, Minneapolis MN, USA) a diferentes tiempos y concentraciones y las células se emplearon para las extracciones de proteína y RNA total.

Células U937. Las células de la línea promielocítica U937 fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (GIBCO, Rockville MD, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, Rockville MD, USA) y antimicótico al 1% (GIBCO, Rockville MD, USA); fueron mantenidas a 37°C con humedad relativa del 100% y 5% CO₂. Para prevenir su activación por endotoxinas sólo se empleó material plástico para el cultivo de estas células.

Células EUHE y Eusebia. Ambas líneas celulares crecen adheridas a placas y fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (sin rojo fenol), suplementado con 10% de SFB (GIBCO, Rockville MD, USA).

Células CaLo, InBl y HeLa. Las tres líneas celulares crecen adheridas a placa y fueron cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 5% SFB (GIBCO, USA) y 5% suero de ternera (In vitro, México).

Células L929. La línea de fibroblastos murinos L929 fue mantenida en medio MEM suplementado con 5% SFB (GIBCO, USA) y 5% suero de ternera (In vitro, México).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Medio condicionado de las células tumorales.

Las células de los diferentes linomas se sembraron en frascos de cultivo de 150 cm². Cuando las células alcanzaron 100% de confluencia, la monocapa se lavó 10 veces con 10 ml de PBS suplementado con CaCl₂ (3 mM) y MgCl₂ (5 mM) para remover los componentes del suero. Posteriormente, los frascos fueron incubados con 25 ml de medio sin suero. Después de 48 h de incubación, el medio fue colectado, centrifugado y liofilizado. El polvo resultante fue resuspendido en 1/10 del volumen original y dializado dos veces consecutivas con una membrana de ultrafiltración de PM-10 contra una solución de PBS, pH7. El contenido en proteínas fue determinado con el reactivo comercial de Bradford (BioRad, Hercules, CA). Muestras de diferentes preparaciones de medio condicionado se analizaron en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Todas las preparaciones utilizadas dieron el mismo patrón de bandeo.

Medio condicionado de macrófagos activados.

Una densidad de 5×10^5 células U937 se sembraron en cajas de Petri de 100 mm de diámetro y se estimularon con PMA (0.1 μ M) (Sigma) en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino por 12 h. Después de la incubación las células se lavaron 3 veces con PBS y se les agregó medio RPMI suplementado con 10% SFB. De esta manera se mantuvo el cultivo por 48 h, siendo éste el tiempo necesario para permitir la diferenciación de las células a macrófagos. Posteriormente, las células fueron estimuladas con LPS de *E. coli* (0.1 μ g/ml) (Sigma, Rockville MD, USA) por 20 min y lavadas 3 veces con 10 ml de PBS para reducir el LPS residual. Después se les agregó medio fresco y fueron incubadas por 3 h, una vez transcurrido este tiempo el medio fue colectado, centrifugado y filtrado, utilizando membranas de 0.22 μ m.

Anticuerpos.

Para la citometría se utilizó un anticuerpo biotinilado contra selectina-E (Pharmigen, San Diego, CA) a una dilución de 1:1600. Para su detección se utilizó streptavidina acoplada a ficoeritrina (Pharmigen, San Diego, CA) a una dilución de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1:3000. Para ICAM-1 se utilizó un anticuerpo acoplado a fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO) a una dilución de 1:50. Todas las diluciones se realizaron en PBS-BSA 5%.

El anticuerpo neutralizante para selectina-E (BD, San Jose, CA) se utilizó a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$.

Los anticuerpos contra $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, Akt y el secundario, una inmunoglobulina acoplada a peroxidasa (Pierce, Rockford, IL), para el western fueron utilizados a una dilución de 1:1000. Las incubaciones se realizaron en TBS/Tween.

Los anticuerpos para el análisis de ELISA de TNF- α (Pharmigen, San Diego CA, USA) y de IL-1 β (R&D, Minneapolis MN, USA) se utilizaron a una dilución de 2 $\mu\text{g/ml}$ para el de captura y a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la detección.

Ensayo de adhesión.

El ensayo de adhesión se hizo siguiendo los principios técnicos publicados con algunas modificaciones (McEvoy, 1996). Las HUVECs se sembraron en placas de 48 pozos (con una superficie de 1 cm^2/pozo) y se dejaron crecer hasta alcanzar 100% de confluencia y formar una monocapa continua. Posteriormente, se estimularon con TNF- α , IL-1 β (R & D Systems, Minneapolis MN) o con los medios condicionados por 3 h. Paralelamente, células U937 fueron marcadas con timidina tritiada (NEN, Boston MA) (2×10^5 células/ml con 1 $\mu\text{Ci/ml}$) por 48 h, una vez transcurrido el tiempo se lavaron con PBS suplementado con CaCl_2 (0.9 mM) y MgCl_2 (0.4 mM) para retirar la timidina tritiada no incorporada. Se agregó 250 μl de una suspensión de células U937 (equivalentes a 2×10^5 células) se agregó a cada uno de los pozos que contenía las HUVECs pretratadas con: i) las citocinas, ii) los medios condicionados o iii) medio como control. Ambos tipos celulares se co-incubaron por 3 h a 37°C. Después de esta incubación, las células no adheridas se removieron con 2 lavados con PBS suplementado con CaCl_2 (0.9 mM) y MgCl_2 (0.4 mM). Las células que se mantuvieron adheridas se lisaron con 500 μl de NaOH 0.2 M y se incubaron toda la noche a 37°C con 100% de humedad. Los lisados se mezclaron con 3 ml de líquido de centelleo y la radiactividad incorporada se cuantificó en un contador de emisiones β (modelo

LS6000SC, Beckman, Palo Alto, CA.). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células adheridas en relación al total de células agregadas al pozo. Los anticuerpos neutralizantes y los inhibidores fueron agregados 1 h antes que el tratamiento con citocinas o medio condicionado.

Citometría de flujo.

Las células endoteliales fueron crecidas a 80% de confluencia y tratadas por 4 h o los tiempos indicados con los medios condicionados, TNF- α o medio como control. La monocapa fue lavada con PBS suplementado con CaCl₂ (0.9 mM) y MgCl₂ (0.4 mM) para remover los componentes del suero. Las células fueron incubadas con anti-selectina-E o anti-ICAM-1 por 30 min a 4°C. Posteriormente, el anticuerpo fue removido y para el caso de selectina-E las células fueron lavadas e incubadas con streptavidina por otros 30 min a 4°C. Una vez terminado el tiempo de incubación, las células se despegaron utilizando EDTA 4 mM y sé resuspendieron en 500 μ l de PBS. El análisis se realizó utilizando el citofluorómetro modelo FACScalibur (Beckton Dickinson, San Jose, CA). Los datos son presentados como histogramas de la intensidad de fluorescencia a 560 nm, el valor promedio de la intensidad de fluorescencia relativa (FI) es presentado en cada histograma.

RT-PCR.

El RNA total de las HUVECs o de las células tumorales fue aislado utilizando el reactivo Tripure® (Roche, Germany). A partir 1 μ g del RNA total se sintetizó el cDNA utilizando la transcriptasa reversa MuLV y un cebador poli-dT (Perkin Elmer, Branchlurg, NJ). Con la ayuda del programa Oligo (Molecular Biology Insights, Cascade CO, USA) se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos sentido y antisentido para el cDNA de cada una de las moléculas que se analizó; excepto por los oligonucleótidos contra selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 cuya secuencia se obtuvo del trabajo de Meagher y colaboradores (1994). Los pares de oligonucleótidos se diseñaron para tener valor de Tm que no difirieran en más de un grado centígrado. Todas las reacciones se realizaron utilizando 40 ciclos y el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

protocolo para las mezclas de reacción y los reactivos del estuche comercial Basic RNA-PCR (Perkin Elmer)(Tabla 5). Durante la fase de alineación se utilizó la Tm específica del par de oligonucleótidos.

	SENTIDO	ANTISENTIDO	Tm (°C)	Tamaño Del producto	INTERNO
E-SEL	5-CTC-TGA-CAG-AAG-AAG-CCA-AG	5-ACT-TGA-GTC-CAG-TGA-AGC-CA	60	254	5'-GAT-GGT-CTC-TAC-ACA-TTC-AC (Meagher et al., 1994)
β -ACTIN	5'-GTG-GGG-CGC-CCC-AGG-CAC-CA	5'-AAA-TGC-TGC-GTG-ACA-TTA-AGG-AG	55	548	5'-GGG-CAT-GGG-TCA-GAA-GGA-TTC-AT
TRAJL	5'-TGG-CAT-TGC-TTG-TTT-CTT-AAA-	5'-CCC-CCT-TGA-TAG-ATG-GAA-TAG	52.9	561	5'-CCC-CTA-GTG-AGA-GAA-AGA-GGT
FAS-L	5'-TGG-GCT-GTA-CTT-TGT-ATA-TTC	5'-CAG-GCA-CTA-AGA-TGA-CTG-TAG	52.5	581	5'-GAG-GAA-CTC-TAA-GTA-TCC-GCA
NGF	5'-AGG-CGG-AAC-CAC-ACT-CAG-AGA	5'-CGG-CAC-TTG-GTC-TCA-AAA-AAG	58.8	489	5'-ACC-CGG-AAC-ATT-ACT-GTG-GAC
CD40L	5'-CTG-CGC-ATC-AGC-ATG-AAA-ATT	5'-TCC-CGA-TTG-GAA-CAG-AAG-GTG	53.5	497	5'-GCC-GCA-ATT-TGA-GGA-TTC-TGA
IL-18	5'-GCC-TCT-ATT-TGA-AGA-TAT-GAC	5'-CCT-TGG-TAT-GAT-GAA-GAT-TCA	58	285	5'-ATG-GCT-GTA-ACT-ATC-TCT-GTG
ICAM-1	5'-GCT-TCG-TGT-CCT-GTA-TGG	5'-GAA-ACC-GAA-CAC-ACA-AGC	55	419	5'-ATC-GGG-GAA-TCA-TGT-CT
VCAM-1	5'-ATG-ACA-TGC-TTG-AGC-CAG-G	5'-GTG-TCT-CCT-TCT-TTG-ACA-CT	58	259	5'-TTG-GAG-TAA-CTT-GGA-TAA-TT(Meagher et al., 1994)
ESM-1	5'-CGG-CTG-TGA-TTT-CTG-AGA-G	5'-AGG-GGT-TTT-CTG-GTT-GTT-T	50.9	522	5'-CCG-CAG-TGA-GTC-AAA-TTA-G
Fractalcina	5'-CGG-GGG-AAT-GGA-CGA-GTC-TGT	5'-GGG-CGT-CAG-GGA-CAG-GAG-TGA	63.3	629	5'-CGG-GCG-TGA-CTG-GTT-CCT-CAG

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación y el southern de las distintas moléculas estudiadas.

Marcaje del oligonucleótidos para análisis tipo "Southern"

El marcaje de los oligonucleótidos se realizó utilizando T4 cinasa (Roche), la reacción de marcaje contenía: 100 ng de DNA en 1 μ l, 1 μ l del amortiguador correspondiente de la enzima concentrado 10x, 0.5-1 μ l de γ -P³²-ATP, 1 μ l de la enzima y 6 μ l de agua. La reacción se incubó 30 min a 37°C y posteriormente se inactivó la enzima a 65°C por 15 min. El oligonucleótido marcado fue filtrado en una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m en solución de hibridación para eliminar al ³²P no incorporado (Challberg et al., 1980).

Ensayo de hibridación tipo "Southern"

10 μ l de la reacción de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1%. El gel fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon (Osmonics, Westborough MA, USA). La pre-hibridación se realizó con una solución constituida por: 1x de solución de Denharst (100x: 10 g Ficoll 400, 10 g polivinilpirrolidona, 10 g albúmina), 6x de SSC (SSC 20x: NaCl 3M; Citrato de Na 0.3 M, pH 7), 0.05% de pirofosfato de sodio, 0.5% de SDS, 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón por 5 h a 37°C. La hibridación se llevó a cabo toda la noche a 37°C en una solución que contenía: 6x de SSC, 1x de Denharst, 20 mg/ml de tRNA (Roche, Indianápolis IN, USA), 0.05% de pirofosfato de sodio más el oligonucleótido interno marcado radiactivamente (Tabla 5) (Suggs et al., 1981). Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 15 min cada uno, con 6x SSC, 0.05% de pirofosfato de sodio. La membrana se expuso en una pantalla intensificadora de fluor y se visualizó con la ayuda de un analizador de imágenes PhosphorImager, la intensidad de la señal fue evaluada por el programa Image Quant (Molecular Dynamics, San Francisco CA, USA).

Extractos nucleares

Las HUVECs fueron lavadas con PBS frío y despegadas en 1 ml de PBS utilizando una espátula de plástico, posteriormente, se centrifugaron en refrigeración por 5 min a 3000 rpm. La pastilla celular fue congelada utilizando un baño de hielo seco y etanol por 1 min, se resuspendió en 100 μ l de una solución hipotónica amortiguadora "A" [10mM HEPES (pH 8.0), 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 1mM DTT]. El lisado se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. La pastilla, formada mayoritariamente por los núcleos celulares, fue resuspendida en 30 μ l de una solución amortiguadora de alta fuerza iónica "C" (10 mM HEPES (pH 7.9), 0.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25% glicerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) y fue incubado a 4°C por 30 min con agitación constante para extraer las proteínas unidas al DNA. La muestra fue centrifugada en refrigeración (4°C) por 20 min a 1400 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló en una proporción de 1:1 (v/v) con el amortiguador D [20 mM HEPES (pH 7.9), 50 mM KCl, 25% glicerol, 0.2

mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF]. La concentración de proteína en los extractos nucleares fue determinada con el reactivo de Bradford (Biorad, Hercules CA) (Dignam et al., 1983).

Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Un oligonucleótido de 21 pares bases de doble cadena, conteniendo 10 bases con una secuencia consenso para el sitio de unión de NF- κ B: 5'-AGT-TGA-GGG-GAC-TTT-CCC-AGG (subrayada aparece la secuencia consenso) (Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA) fue marcado con [γ - 32 P]ATP (NEN, Boston MA, USA) usando cinasa T4 (Boehringer Mannheim, Germany). Las reacciones de unión entre el oligonucleótido y las proteínas nucleares se realizaron en un volumen total de 20 μ l que contenían: 10 μ g de la proteína nuclear, solución amortiguadora de unión [20 mM HEPES (pH 7.9), 50 mM KCl, 25% glicerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 μ g/ μ l polydI-dC, 10 mg/ml BSA, 1 M DTT] y el oligonucleótido marcado (0.5 ng). La reacción se incubó 20 min a temperatura ambiente, posteriormente los complejos de DNA-proteína y el oligonucleótido libre se separaron en un gel de poliacrilamida al 4% bajo condiciones no desnaturalizantes. Los gels fueron secados y se visualizaron con autoradiografía con la ayuda de un analizador de imágenes Phosphorimager, la intensidad de la señal fue evaluada por el programa Image Quant (Molecular Dynamics, San Francisco CA, USA) (Fried, 1989).

Inmunoblots

Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con 500 μ l de una solución de 50 mM Tris pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 100 mM NaF, 5 μ g/ml aprotinina, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptina. La proteína se cuantificó usando el reactivo de Bradford (Biorad, Hercules CA, USA). En un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% se cargaron 30 μ g de proteína para su migración electroforética, el gel se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa (Osmonics, Westboroug, MA). La membrana se bloqueó con leche descremada (Carnation) al 5% en una solución amortiguadora de TBS/Tween por

1 h (TBS: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Tris 3.0 g; pH 8 suplementado con Tween al 0.1%). El anticuerpo primario se incubó en TBS/Tween con albumina al 1% por 2 h. Las membranas se lavaron y se trataron con el anticuerpo secundario diluido en TBS/Tween con 1% de albumina por 2 h. Las bandas de las proteínas se visualizaron con un estuche comercial de quimioluminiscencia (Pierce) y películas de autoradiografía (Kodak, Rochester NY, USA)(Laemmli, 1970; Burnette, 1981).

Bioensayo de citotoxicidad para TNF- α

El ensayo se realizó como previamente se describió por Kramer (1986). Brevemente, en una placa de 96 pozos se sembraron 9×10^3 células en 100 μ l por pozo. Al día siguiente se le agregó medio completo suplementado con 1 μ g/ml de actinomicina D y 100 μ g/ml de proteína del medio condicionado en diluciones seriadas. Después de 12 h, las células remanentes se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.1% por 15 min. Después de varios lavados con agua corriente, la tinción fue disuelta en ácido acético al 10% (200 μ l) y se determinó la densidad óptica (DO) a 595 nm utilizando un lector de ELISA (Biotek, Winooski VT, USA). Como curva patrón en cada uno de los experimentos se realizó una curva standard de TNF- α recombinante humano (R&D Systems, Minneapolis MN, USA). Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de viabilidad con respecto al control.

ELISA

50 μ l del anticuerpo de captura (2 μ g/ml en 0.1 M de Na_2HPO_4 pH 9.0) se agregaron a los pozos y se incubó toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (0.05% v/v), posteriormente los pozos fueron tratados con 300 μ l de solución de bloqueo (PBS con 10% de suero fetal bovino) por 2 h a temperatura ambiente y de nuevo fueron lavados 3 veces con PBS-Tween. Se agregaron 100 μ l por pozo de las muestras o de las soluciones patrón con TNF- α recombinante humano (Pharmigen, San Diego CA, USA) e IL-1 β (R&D, Minneapolis MN, USA) y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron 3 veces con PBS-Tween y se trataron secuencialmente con 100 μ l del

anticuerpo biotinilado ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en TBS-Tween) y $100\mu\text{l}$ de una solución de streptavidina acoplada a fosfatasa alcalina (1:1000 en PBS-Tween) en cada caso seguidos de 3 lavados con PBS-Tween. Finalmente, se agregaron $100\mu\text{l}$ de p-nitrofenil-fosfato ($1\text{ mg}/\text{ml}$ en 10 mM de dietanolamida pH 9.5 con 0.5 mM de MgCl_2) por cada pozo. La placa fue incubada por 30 min, y se midió la densidad óptica a 405 nm usando un lector de ELISA (Biotek, Winooski VT, USA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Evaluación de los medios condicionados.

Los medios condicionados de las células EUHE y Eusebia utilizados en los experimentos se obtuvieron de diferentes lotes; para establecer que el contenido proteico los medios era similar, se migraron electroforéticamente en geles de poliacrilamida y se tiñeron con nitrato de plata. Todos los lotes utilizados tuvieron el mismo patrón de bandeo. En la figura 7A, se muestra un gel con 2 lotes de cada uno de los medios que se utilizaron donde se observa que el patrón de las bandas es similar.

La polimixina-B es un potente antibiótico aislado de *Bacillus polymyxa* cuyo efecto radica en su capacidad de unirse a la porción lipido-A del lipopolisacrido (LPS). Esta interacción está mediada por fuerzas iónicas entre los grupos amino de la polimixina B y los grupos fosfato y carboxilo de la región lipido-A-Kdo. Bajo ese principio, la polimixina se ha usado para remover endotoxina (LPS) de soluciones (Issekutz, 1983). El LPS puede activar a las células endoteliales e iniciar una respuesta semejante a la que se obtiene durante la reacción inflamatoria (Cines et al., 1998). En la Figura 7B se muestra que el LPS es capaz de incrementar el porcentaje de adhesión alcanzando un punto máximo de 55% con 10 ng/ml de LPS. Sin embargo, el pretratamiento con polimixina B abate el incremento de esta adhesión. La producción de los medios condicionados por las células tumorales requiere varios pasos en los que se vuelven susceptibles de contaminación con LPS. Basándonos en los resultados de la figura 7B, los medios condicionados fueron pretratados con polimixina B (15 µg/ml) para descartar cualquier respuesta dependiente de LPS y sólo observar la respuesta dependiente de los componentes de los medios condicionados. La adición de 15 µg/ml de polimixina B no tuvo ningún efecto sobre la adhesión inducida por el medio condicionado por las células tumorales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto del pretratamiento de células endoteliales con productos solubles secretados por los linfomas EUHE y Eusebia sobre la adhesión de células U937

Comparamos la adhesión de las células U937 a HUVECs pretratadas con TNF- α , con productos secretados por macrófagos activados con lipopolisacárido (LPS) o con los productos solubles derivados de los linfomas EUHE o Eusebia.

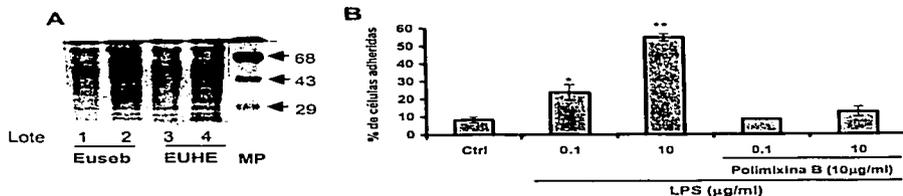


Figura 7. A) Tinción con nitrato de plata del gel de poliacrilamida-SDS con dos lotes distintos de los productos secretados por las células EUHE (Lote 1 y 2) y Eusebia (Lote 3 y 4). MP: Marcador de peso molecular. B) Adhesión de células U937 a células endoteliales pretratadas con LPS o con LPS pretratado con polimixina B. El ensayo se realizó como se reporta en materiales y métodos. * $p < 0.05$. ** $p > 0.00005$.

El TNF- α aumentó la adhesión de las células U937 de una manera dosis dependiente (Fig. 8), incluso, 10 $\mu\text{g/ml}$ fueron suficientes para inducir el doble de adhesión con respecto al control ($p < 0.05$). La adhesión inducida por el TNF- α alcanza un valor máximo de 34% utilizando 1 ng/ml , lo cual no aumentó aún cuando la concentración de TNF- α se incrementó 100 veces. Esto sugiere que los mecanismos de activación endotelial en lo que respecta a su capacidad de adhesión inducida por TNF- α , han alcanzado su nivel de respuesta máximo. Como un control positivo de medios condicionados, se realizaron ensayos utilizando los productos secretados por células U937 diferenciadas en macrófagos activados con LPS, que se sabe secretan citocinas proinflamatorias capaces de activar al

endotelio. El pretratamiento con este medio condicionado, aumentó la adhesión de una manera dosis dependiente, alcanzando un máximo de 40% semejante a lo obtenido con TNF- α (Fig. 8B).

Los productos solubles derivados de los dos linfomas también fueron capaces de aumentar la adhesión de una manera dosis-dependiente (Fig. 8C), sin embargo, uno de ellos (EUHE) alcanzó un máximo de 55%, siendo esto 19% superior a la adhesión máxima inducida con TNF- α o con el medio condicionado de los macrófagos.

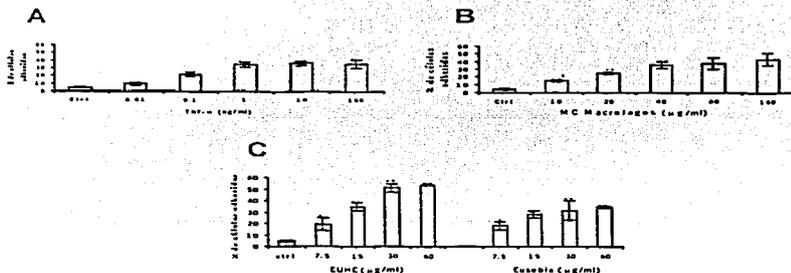


Figura 8. El pretratamiento de HUVECs con productos secretados por las células del linfoma EUHE o Eusebia induce de manera dosis dependiente un aumento en la adhesión de células. A) Curva dosis-respuesta de TNF recombinante humano, B) Curva dosis-respuesta de la adhesión inducida por medio condicionado por macrófagos U937 estimulados con LPS (MC Macro). C) Curva dosis respuesta obtenida con los medios condicionados de las células EUHE (izquierda) o Eusebia (derecha). En todos los casos se incluye un control no estimulado (Ctrl). La adhesión fue evaluada como se describe en materiales y métodos Las barras indican la desviación standard del promedio, las diferencias con respecto al control fueron significativas con * = $p < 0.05$ ó ** = $p < 0.01$.

La activación endotelial correlaciona con la activación del factor de transcripción NF- κ B

Utilizando ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), se evaluó la activación de éste factor. Después de 20 min de tratamiento con TNF- α

TESIS DE
FALLA DE GRADO

(10 ng/ml) se indujo una translocación de NF- κ B 6 veces mayor a la del control. De manera similar, el medio condicionado por las células Eusebia (60 μ g/ml) indujo un aumento de 6 veces, sin embargo, los productos secretados por las células EUHE (60 μ g/ml) inducen una activación aún mayor, alcanzando 8 veces con respecto al control (Fig. 9).

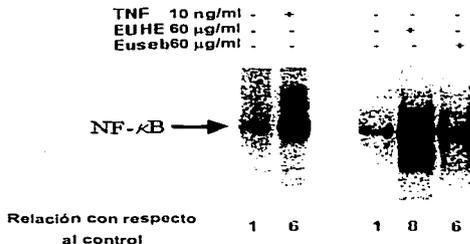


Figura 9. Activación del factor de transcripción NF- κ B en células endoteliales. Las células endoteliales fueron tratadas con 60 μ g de los productos secretados por células tumorales, con 10 ng/ml de TNF- α o con medio como control. Después de 20 min se hizo una extracción de proteínas nucleares. Se muestran la relación con respecto al control.

Participación de NF- κ B en el aumento de la adhesión celular inducida por los productos secretados por células tumorales.

Con el objetivo de evaluar la participación del factor de transcripción NF- κ B en el aumento de la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales, se utilizó al inhibidor BAY11-7085, el cual, interfiere con la activación de NF- κ B al bloquear específicamente la fosforilación de I κ B α .

Los resultados mostraron que con 15 μ g/ml del medio condicionado de las células EUHE se obtiene una translocación 3.6 veces por arriba del control

(células con medio de cultivo), sin embargo en presencia del inhibidor BAY11-7085 (1 μ M) la translocación disminuye a solo 1.6 veces sobre el control (Fig. 10). Se observó un efecto similar en los cultivos de células endoteliales tratados con los productos secretados por las células Eusebia (15 μ g/ml) donde hay un aumento en la translocación de NF- κ B de 1.6 que se reduce a 0.8 veces (Fig. 10).

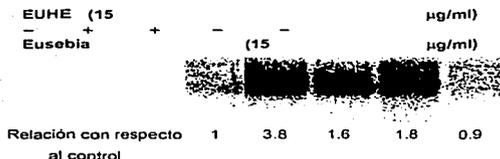


Figura 10. Efecto de Bay11-7085 sobre la translocación de NF- κ B. HUVECs fueron tratadas por 1 h con el BAY11-7085 (1 μ M) posteriormente se estimularon con los productos secretados por las células tumorales El EMSA se realizó de cómo se reporta en materiales y métodos. En la parte inferior se muestra la relación con respecto al control.

Es importante notar que la concentración recomendada por el fabricante para inhibir el 50% de la respuesta mediada por el TNF- α es de 10 μ M. Sin embargo, para las células endoteliales esa concentración resulto ser tóxica, por lo que se analizó el efecto a 5 μ M siendo ésta la dosis más alta a la que las células respondieron sin que llegara a ser tóxica. Por tanto y con el fin de asegurar la detección de un posible efecto de este inhibidor de la activación de NF- κ B sobre el ensayo de EMSA también se redujo la dosis de los productos secretados por las células tumorales. Por lo que el efecto del BAY 11-7085 se evaluó contra 7.5 y 15 μ g/ml de la proteína secretada por las células tumorales, que de acuerdo a la figura 8 aún produce un claro aumento en la adhesión.

En presencia de 5 μ M del inhibidor la adhesión en células tratadas con TNF- α se observó una reducción del 88%, mientras que en células tratadas con el medio condicionado de las células EUE y Eusebia disminuyó en un 54% y un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

44% respectivamente. Como control, en endotelio estimulado con los productos secretados por los macrófagos activados se obtuvo una reducción del 92% (Fig. 11).

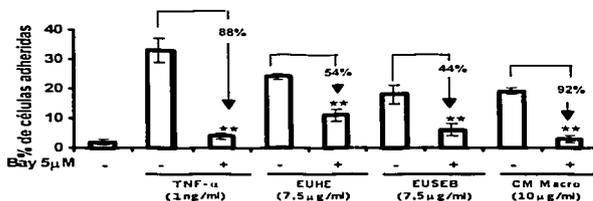


Figura 11. Efecto del inhibidor BAY11-7085 sobre la adhesión inducida por los productos secretados por células tumorales. Las células endoteliales fueron tratadas por 1 h con el inhibidor (5 μ M) y posteriormente se adicionó el medio condicionado de las células EUHE (7.5 μ g/ml), o de Eusebia (7.5 μ g/ml), TNF- α o los productos secretados por macrófagos activados por 3 h más. Por último se adicionaron las células U937 y se coincubaron con las células endoteliales por 3 h más.

Paralelamente, se realizaron ensayos de retardo en la movilidad electroforética utilizando 5 μ M del inhibidor. En la figura 12 se puede observar que la presencia del inhibidor disminuye a la mitad la translocación de NF- κ B inducida por TNF- α y una cuarta parte en la inducida por los productos secretados por la línea tumoral EUHE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TNF (10 ng/ml)	-	+	+	-	-	-
BAY (5µM)	-	-	+	-	-	+
EUHE (15 µg/ml)	-	-	-	-	+	+



Relación con respecto al control	1	4.3	2.8	1	2.1	1.5
----------------------------------	---	-----	-----	---	-----	-----

Figura 12. Efecto del BAY 11-7085 sobre la translocación de NF-κB inducida por los productos secretados por las células EUHE. EMSA de células endoteliales 20 min después de estimuladas con TNF-α (10 ng/ml) o con los productos secretados por las células de la línea EUHE (15 µg/ml). Los extractos y el ensayo se realizaron como se reporta en materiales y métodos. Veces de aumento con respecto al control no tratados.

Los resultados presentados anteriormente muestran que 5 µM no es suficiente para interferir con la translocación inducida por el TNF-α. Para evaluar si era posible abatir este efecto se utilizó la línea HMEC-1 (línea de células endoteliales de microvasculatura), que ha demostrado ser más resistente a los efectos tóxicos del inhibidor BAY 11-7085 que las células endoteliales primarias.

Las células HMEC-1 fueron tratadas con 10 µM de BAY 11-7085 y con TNF-α siguiendo el mismo protocolo que en los experimentos anteriores. Se puede observar que la presencia del inhibidor disminuye los niveles basales de NF-κB presente en el núcleo. El TNF-α aumentó la translocación 2.4 veces con respecto al control y, cuando las células fueron pretratadas con el inhibidor y estimuladas con el TNF-α, la translocación se redujo hasta los niveles del control, lo que nos sugiere un completo bloqueo de la translocación de NF-κB inducida por TNF-α, confirmando que la inhibición parcial observada en los cultivos de endotelios primarios es debida a un problema de concentración y no a un defecto del inhibidor para bloquear la activación del factor de transcripción (Fig. 13).

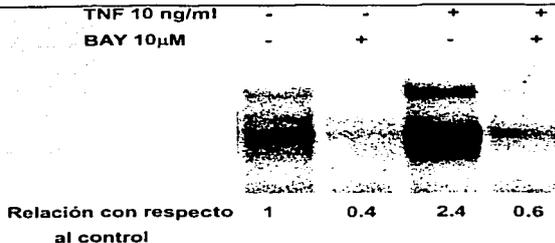


Figura 13. Efecto del BAY 11-7085 sobre la translocación de NF- κ B en células HMEC-1. EMSA de células HMEC-1 pretratadas con BAY 11-7085 (10 μ M) y estimuladas con TNF- α por 20 min. Los extractos nucleares y los gels de retardo se realizaron como se describe en materiales y métodos. En la parte inferior de la imagen se muestra las veces de aumento con respecto al control.

Especificidad de la estimulación de los productos secretados por las células tumorales y el inhibidor BAY 11-7085 sobre NF- κ B

Para evaluar la especificidad de los complejos DNA/proteína formados por efecto de los productos secretados por las células tumorales se realizaron ensayos de retardo utilizando anticuerpos contra las subunidades p65, p50 y como competidor el mismo oligonucleótido frío. Los datos muestran que en presencia de los anticuerpos los complejos formados se desestabilizan indicando la presencia de las dos subunidades en los complejos inducidos por los medios condicionados por células tumorales (Fig. 14A). De igual manera, al usar el oligonucleótido frío se observa la desaparición del complejo, confirmando que el complejo que se forma en los EMSA es NF- κ B.

Para analizar la especificidad del efecto de los productos secretados por las células tumorales sobre NF- κ B se evaluó el contenido nuclear del factor de transcripción Sp-1. La figura 14B muestra que ni el TNF- α ni los medios condicionados de las células tumorales en presencia o ausencia del inhibidor BAY 11-7085 inducen cambios nucleares de éste factor de transcripción. Lo que

confirma que el efecto de los productos solubles secretados por las células tumorales al igual que el de TNF- α es mediado por NF- κ B.

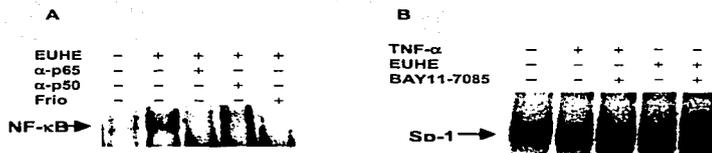


Figura 14. Especificidad del efecto de los productos secretados por células tumorales sobre NF- κ B. A) Análisis de los complejos de NF- κ B usando el oligonucleótido para NF- κ B con extractos nucleares de HUVECs tratadas con 60 μ g de los productos secretados por las células EUHE y preincubados con anticuerpos contra las subunidades p50 o p65 del factor o compitiendo con el mismo oligonucleótido frío. B) Ensayo de retardo utilizando un oligonucleótido para el factor de transcripción Sp-1 con extractos nucleares de HUVECs tratadas con 60 μ g del medio condicionado de las células EUHE o 10 ng/ml de TNF- α .

Participación de I κ B α en la activación del factor de transcripción NF- κ B mediada por los productos secretados por células tumorales.

Con el objetivo de determinar si los productos secretados por las células tumorales utilizan la misma vía de activación de NF- κ B que el TNF- α se analizó la degradación de I κ B α en extractos de proteína total. Mientras que el tratamiento con TNF- α por 20 min indujo degradación significativa de I κ B α , los factores solubles derivados de células tumorales no afectaron el contenido de ésta isoforma (Fig. 15) y sugiere que el mecanismo de activación de NF- κ B es distinto del de TNF- α .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

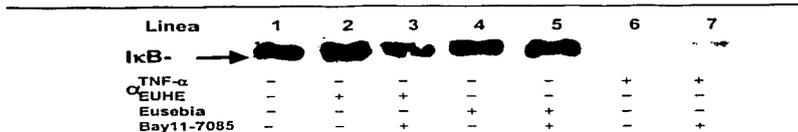


Figura 15. Inmunoblot de IkB α en células endoteliales tratadas con los productos secretados por las células tumorales. Las células HUVECs fueron estimuladas con TNF- α (10 ng/ml) o con los productos secretados por las células tumorales EUHE o Eusebia (60 mg/ml) por 20 min, posteriormente se realizó una extracción total de proteína. Se corrieron 30 μ g de proteína en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, posteriormente la membrana se incubo con anticuerpo anti-IkB α y se reveló por quimioluminiscencia.

Participación de Akt en la activación del factor de transcripción NF- κ B mediada por los productos secretados por células tumorales.

Recientes estudios han demostrado que para la activación de NF- κ B por estímulos tan diversos como TNF- α o el PDGF es necesaria la activación de la PI $_3$ K, que a su vez activa a Akt/PKB al fosforilarla (Romashkova et al., 1999; Nidal-Ozes et al 1999). Para evaluar la participación de elementos de ésta vía en la activación de NF- κ B se realizaron inmunoblots utilizando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de Akt. La figura 16 muestra que tanto el TNF- α como el medio condicionado de las células EUHE aumentan la fosforilación de Akt; sin embargo, los niveles obtenidos con los productos secretados por las células tumorales son mayores que los obtenidos con TNF- α . Estos resultados sugieren que el medio condicionado de las células EUHE activa más esta vía que el TNF- α . Para ambos estímulos el uso del inhibidor disminuye los niveles de Akt fosforilado a los niveles basales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 16. Inmunoblot de Akt fosforilado de HUVECs tratadas con el medio condicionado de las células EUHE. Células HUVECs fueron tratadas con TNF- α (10 ng/ml) o con los productos secretados por las células del linfoma EUHE (57.5 μ g/ml) por 20 min, posteriormente se realizó una extracción de proteína total, 30 μ g de proteína se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la membrana se incubó con un anticuerpo anti-Akt fosforilado y se reveló por quimioluminiscencia.

Efecto de los productos solubles secretados por las células tumorales en la expresión de la selectina-E

Se ha reportado que el aumento en la adhesión de células U937 inducida por la activación endotelial mediada por TNF- α requiere de un aumento en la expresión de al menos tres moléculas de adhesión endoteliales: selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1, todas dependientes del factor de transcripción NF- κ B (Estrada-Bernal, 1998). De estas moléculas, la selectina-E es la primera en ser transcrita y sintetizada, por lo que los niveles membranales de proteína se eleva en las células endoteliales durante las primeras horas después del tratamiento. Uno de los marcadores más comunes para la activación de sitios NF- κ B en respuesta a citocinas proinflamatorias, es el promotor del gen de selectina-E (Stoelcker et al., 1996; Vidal-Vanaclocha et al., 2000). Por esta razón, se evaluó la expresión de selectina-E en la superficie de las células endoteliales después de haber sido tratadas con los factores solubles derivados de las células tumorales, TNF- α o con los productos derivados de macrófagos activados con LPS. La intensidad de la fluorescencia basal detectada con el análisis de citometría de flujo no cambió en las células control con o sin anticuerpo anti-selectina-E marcado con ficoeritrina. Después de 4 h de estimulación con TNF- α , la intensidad de fluorescencia aumentó más de 100 veces en el 90% de la población celular, un fenotipo similar se observó con el tratamiento con el medio derivado de macrófagos. Sin embargo, sólo el 10% de la población endotelial tratada con los productos solubles derivados

de las células tumorales mostró un aumento equivalente en la intensidad de fluorescencia (Fig. 17). Este pequeño aumento en la expresión de selectina-E es contrastante con el aumento en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales (Fig. 8).

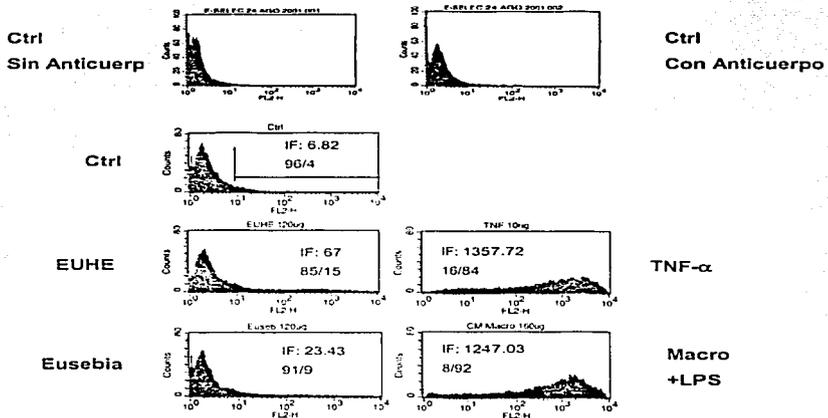


Figura 17. Niveles de expresión de selectina-E en la superficie de células endoteliales. HUVECs fueron tratadas con TNF- α (10 ng/ml), medio condicionado de macrófagos activados (Macro+LPS 160 μ g/ml) y los productos secretados por células tumorales (120 μ g/ml). Las células HUVECs fueron tratadas con 4 h por los diferentes activadores. Posteriormente, se realizaron incubaciones con el anticuerpo primario biotinilado y con streptavidina derivatizada con ficoeritrina (PE).

Dado que la diferencia en la expresión de selectina-E en membrana entre el TNF- α y los medios condicionados podría resultar de diferencias en la cinética de expresión de este antígeno de superficie, se realizó un seguimiento de la

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

presencia de selectina-E hasta 8 horas, que es el tiempo máximo en el que se realiza el ensayo de adhesión. La intensidad promedio de fluorescencia relativa (IF) aumentó de 6 en células control a 750 en células tratadas con TNF- α por 3 h, éste parámetro alcanzó un máximo de 893 después de 4 h para después decaer a 748 h a las 8 h (Fig. 18). Sin embargo, a pesar de que la expresión de selectina-E es modesta con el tratamiento de los productos secretados por las células tumorales, la intensidad de fluorescencia aumentó 5 veces a las 4 h alcanzando un valor máximo de 21 y cayendo a 4 a las 8 h (Fig. 18).

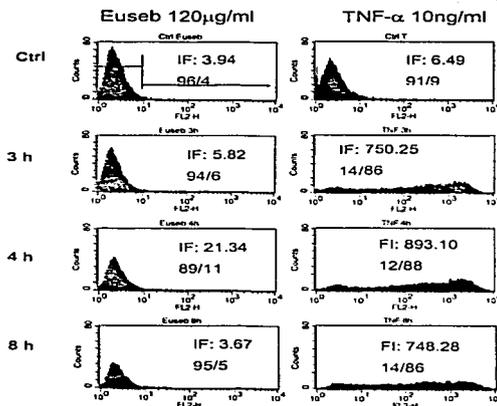


Figura 18. Cinética de expresión de selectina-E. HUVEC fueron tratadas con TNF- α (10 ng/ml) o con los productos secretados por las células Eusebia por 3, 4 y 8 h.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto del inhibidor BAY 11-7085 en la expresión de selectina-E.

Los datos obtenidos anteriormente muestran que nuestros resultados siguen la cinética que previamente se había reportado, esto es, el punto máximo en la expresión de selectina-E se encuentra a las 4 h de tratamiento con TNF- α , se quiso evaluar el efecto del inhibidor BAY 11-7085 sobre la expresión de selectina-E en la superficie de la membrana celular.

Los resultados muestran que en las células tratadas con el inhibidor antes de estimular con TNF- α (10ng/ml), el aumento en la expresión que induce el TNF- α se previene por completo; en el caso del medio condicionado por células Eusebia (120 μ g/ml), el pequeño aumento observado también fue bloqueado por la presencia del inhibidor (Fig. 19).

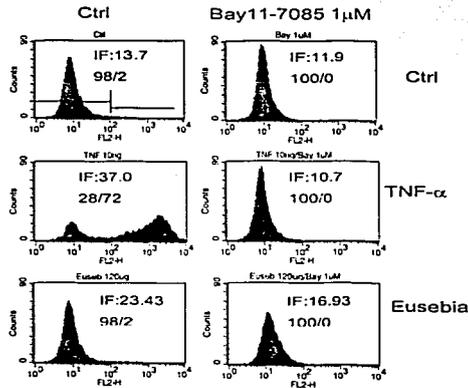


Figura 19. Efecto del inhibidor BAY11-7085 sobre la expresión de selectina-E. Células endoteliales HUVEC fueron pretratadas por 1 h con el inhibidor y después fueron estimuladas por 4 h más con TNF- α (10ng/ml) o los productos secretados por las células Eusebia (120 μ g/ml).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Participación de la selectina-E en la adhesión de células U937 activados con los productos secretados por las células tumorales.

Si bien los productos secretados por células tumorales solo inducen un pequeño aumento en la expresión de selectina-E en comparación con la respuesta al TNF- α , no podía descartarse que este pequeño aumento en la expresión de selectina-E inducido por los productos secretados por las células tumorales fuera suficiente para participar significativamente en la adhesión de las células U937. Por tanto se evaluó el efecto de anticuerpos neutralizantes contra selectina-E en un ensayo de adhesión. El uso de los anticuerpos neutralizantes redujo la adhesión dependiente de TNF- α en un 36%; en contraste, cuando las células endoteliales fueron estimuladas con el medio condicionado de EUHE, los anticuerpos no tuvieron efecto y no interfirieron con la adhesión de las células U937 (Fig. 20). Los resultados muestran que esta molécula no participa en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales.

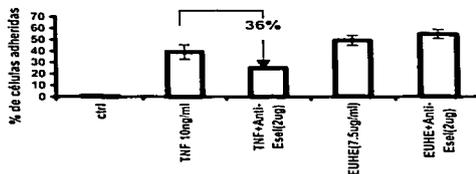


Figura 20. Efecto de anticuerpos neutralizantes contra selectina-E en la adhesión inducida por TNF- α o los productos secretados por las células tumorales. HUVECs fueron incubadas 1 h con el anticuerpo neutralizante contra selectina-E, posteriormente se estimuló con TNF- α o los medios condicionados de las células tumorales y se continuó con el protocolo del ensayo de adhesión.

Efecto de los productos secretados por las células tumorales sobre los niveles de RNAm de moléculas de adhesión de células endoteliales.

Se sabe que las moléculas de adhesión: selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 se expresan durante la reacción inflamatoria gracias a la acción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β (Rosales et al., 1995). Sin embargo, existen otras moléculas de adhesión que no participan directamente en la reacción inflamatoria y cuya expresión también pueden ser influenciada por citocinas, tal es el caso de la fractalquina y la molécula específica de células endoteliales (ESM-1) ambas expresadas sólo en células endoteliales activadas (Bécharde et al., 2001; Fong et al., 1998).

Para evaluar cuál o cuáles moléculas de adhesión pudieran participar en la adhesión inducida por los factores secretados por células tumorales EUHE o Eusebia se realizaron reacciones de transcripción reversa y PCR que permitieron evaluar si la expresión del RNA mensajero de algunas moléculas de adhesión es influenciada por los productos secretados por las células tumorales.

Comparados con el control, los niveles de ESM-1, VCAM-1, fractalquina y selectina-E no variaron en presencia de los medios condicionados por las células tumorales (Fig. 21 A, B, C). La única molécula que presentó un ligero aumento fue ICAM-1 cuyo mensajero se incrementó al doble con respecto al control. Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con el TNF- α o con el medio condicionado de macrófagos activados, se observó un incremento en los niveles de todas las moléculas exceptuando a ESM-1 que mantuvo un nivel constante en todos los tratamientos (Fig. 21 A, B, C). Estos resultados permiten confirmar el efecto de las citocinas proinflamatorias sobre la expresión de moléculas de adhesión. Los resultados obtenidos sugieren analizar más profundamente la posible participación de ICAM-1 en el incremento de adhesión mediada por los medios condicionados de las células tumorales.

RESULTADOS

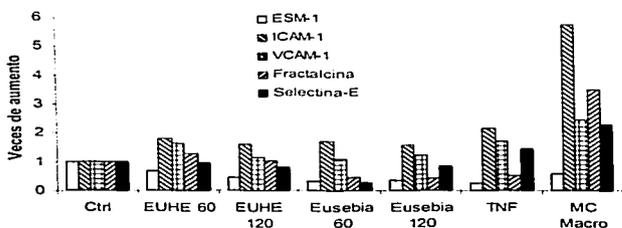
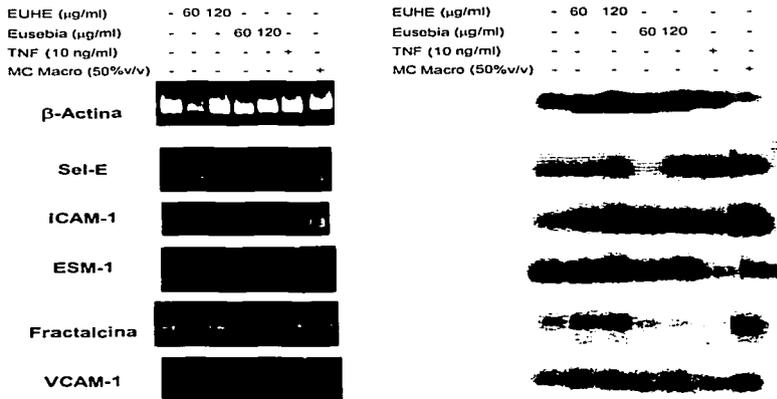


Figura 21. Efecto de los productos secretados por las células de linfoma sobre la expresión de RNAm de moléculas de adhesión endotelial. HUVECs fueron tratadas con los productos secretados por las células tumorales por 4 h, posteriormente se realizó una extracción de RNA total, del cual se tomaron 0.5 μg para las reacciones de RT-PCR y el southern. En la figura se muestra el producto de PCR, la hibridación con oligonucleótidos internos específicos para cada producto de PCR y la gráfica resultado de la corrección por cargado.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Efecto de los productos solubles secretados por las células tumorales en la expresión de la ICAM-1

El análisis por RT-PCR mostró que sólo el RNA mensajero de ICAM-1 tiene un pequeño incremento por efecto de los medios condicionados de las células tumorales. Por lo que se evaluaron los niveles de ICAM-1 en la membrana de HUVECs estimuladas con TNF- α , los productos secretados por las EUHE y el medio de macrófagos activados con LPS como control. La citometría muestra que el TNF- α y el medio de macrófagos aumenta la expresión de ésta molécula de adhesión 100 veces con respecto al control, mientras que el medio condicionado de las EUHE aumenta la expresión de ICAM-1 solo 10 veces; sin embargo es importante notar que si hay un aumento en los niveles de esta proteína mientras que con selectina-E sólo se observó un efecto mínimo (Fig. 22).

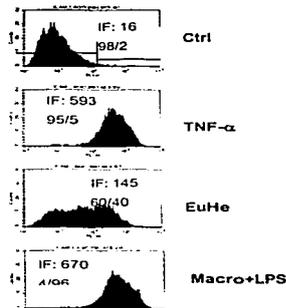


Figura 22. Efecto de los productos secretados por las células EUHE sobre la expresión de ICAM-1. Células endoteliales HUVECs fueron estimuladas por 4 h con TNF- α (10ng/ml), los productos secretados por las células EUHE (60 μ g/ml) o con el medio condicionado de macrófagos activados con LPS (50% v/v). Posteriormente se realizó el análisis por citometría como se describió previamente.

Se sabe que la expresión de ICAM-1 alcanza niveles máximos de expresión entre las 6 y 8 h después del estímulo (Simiantonaki et al., 2002). El experimento

anterior se realizó a las 4 h siguiendo el protocolo que se había establecido para selectina-E, por lo que se procedió a evaluar si dentro del tiempo en el que se realiza el ensayo de adhesión la cinética de expresión de ésta molécula es distinta entre los medios condicionados y el TNF- α , lo que puede reforzar la sugerencia de su participación en el proceso. Con este objetivo, se realizó un análisis de citometría para evaluar la expresión de ICAM-1 durante el tiempo. La figura 23 muestra los niveles de ICAM-1 a las 3, 4 y 8 h después del estímulo con TNF- α o con los productos secretados por las células tumorales, se observa que desde las 3 h la expresión de la proteína ya ha aumentado para ambos tratamientos, es importante notar que este aumento continúa a lo largo del tiempo. La existencia de un aumento en la expresión de la molécula desde las 3 h, sugiere su participación en la adhesión de las células U937 al HUVECs estimuladas con TNF- α o con los productos secretados por las células del linfoma.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

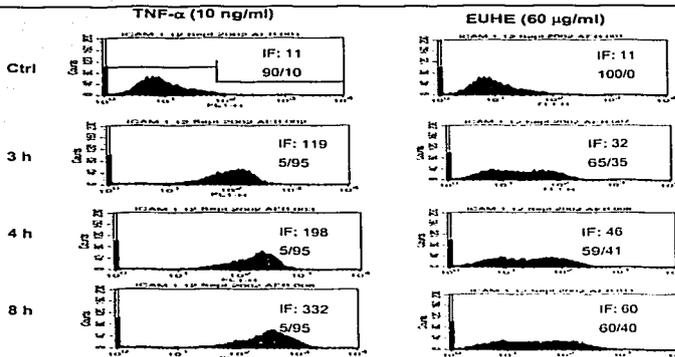


Figura 23. Niveles de expresión de ICAM-1 en HUVECs estimuladas con TNF- α o los productos secretados por las células del linfoma EUHE. HUVEC fueron estimuladas por los tiempos indicados con TNF- α (10ng/ml) o con los productos secretados por las células EUHE (60 µg/ml). Posteriormente se realizó el análisis por citometría como se describió previamente.

Efecto del inhibidor BAY 11-7085 en la expresión de ICAM-1.

El aumento en los niveles de ICAM-1 sugiere que esta molécula podría estar participando en la adhesión inducida por los medios condicionados de las células tumorales; si esta hipótesis es cierta, el inhibidor BAY 11-7085 que bloqueó la translocación de NF- κ B y la adhesión, debería ser capaz de bloquear la expresión de esta molécula de adhesión. La figura 24 muestra que el tratamiento con el inhibidor previene la inducción de ICAM-1 inducida por los productos secretados por las células tumorales, manteniéndola en los niveles basales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

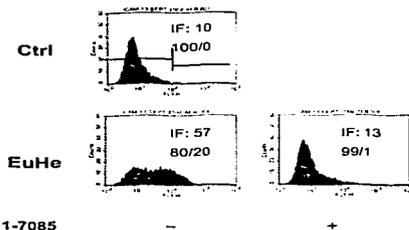


Figura 24. Efecto del inhibidor BAY 11-7085 sobre la expresión de ICAM-1. Células endoteliales HUVEC fueron pretratadas por 1 h con el inhibidor y después fueron estimuladas por 8h más con los productos secretados por las células EuHe (50 μ g/ml). Posteriormente se realizó el análisis por citometría como se describió anteriormente.

Participación de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β en la activación de las células endoteliales mediada por los productos secretados por células tumorales.

La activación endotelial inducida por los productos secretados por las dos líneas de células tumorales podría deberse a la presencia en el medio de una variedad de factores entre los cuales las citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β son los candidatos más fuertes. Para definir la posible participación de estas moléculas se utilizaron anticuerpos neutralizantes contra estas citocinas, esto permitiría bloquear su actividad biológica en caso de estar presentes entre los productos solubles secretados por las células tumorales.

Para mejorar la eficiencia en el bloqueo, se utilizaron las concentraciones mas bajas en las que el TNF- α , la IL-1 β y los medios condicionados indujeron una respuesta. El anticuerpo contra TNF- α interfirió con la inducción en la adhesión reduciéndola un 75% con respecto a las células tratadas sólo con TNF- α (0.1 ng/ml) (Fig. 25A). Una comportamiento similar se obtuvo con el anticuerpo anti IL-

1β , en el que la adhesión se redujo un 68% con respecto a su control (0.1 ng/ml) (Fig. 25A).

Como se esperaba, cuando los anticuerpos neutralizantes fueron agregados al medio condicionado de los macrófagos activados con LPS, hubo una interferencia parcial de la adhesión; los resultados muestran que la adhesión disminuye un 58% cuando el medio fue tratado con el anticuerpo anti-TNF- α , y redujo un 42% con el anticuerpo contra IL- 1β . Con estos resultados se confirma la presencia de éstas citocinas en los productos secretados por los macrófagos activados con LPS (Fig. 25B).

Ninguno de los dos anticuerpos pudo interferir con la adhesión inducida por los factores secretados por las células tumorales, aún cuando el tratamiento se redujo a 7.5 $\mu\text{g/ml}$, que fue la concentración más baja utilizada en la que se obtuvo una respuesta en la adhesión (Fig. 25C).

Para evaluar la presencia del TNF- α en los productos secretados por las células tumorales, se realizaron ensayos que permiten evaluar al TNF- α biológicamente activo. Se sabe que el TNF- α es capaz de inducir muerte celular en varias líneas celulares, incluyendo a la línea de fibroblastos de pulmón de ratón conocida como L929. La figura 26, muestra que ninguno de los dos medios condicionados evaluados (EUHE y Eusebia) tuvieron efectos citotóxicos, aun cuando se usaron concentraciones relativamente altas de proteína (100 $\mu\text{g/ml}$). Como referencia se realizó una curva de citotoxicidad con TNF- α recombinante, la cual mostró un efecto dosis dependiente después de 24 h. Bajo estas condiciones la viabilidad de las células tratadas con 0.5 ng/ml de TNF- α alcanzó el 50%. A las 48 h, la viabilidad a esta concentración fue del 0%. El medio condicionado de los macrófagos activados con LPS presentó una toxicidad similar, manteniendo una respuesta dosis dependiente en la que con 32 $\mu\text{g/ml}$ se alcanzó el 50% de la viabilidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

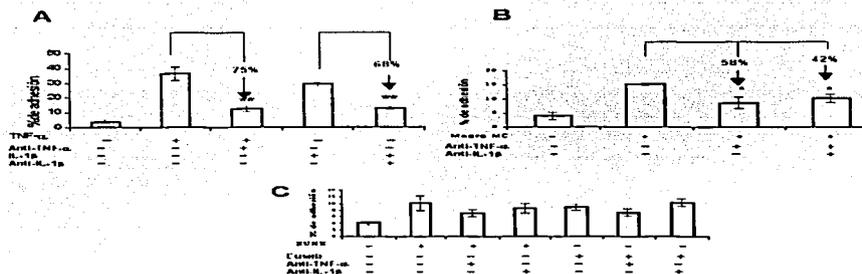


Fig. 25. Participación de TNF- α e IL-1 β en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales. A) Efecto de anticuerpos neutralizantes de TNF- α e IL-1 β en la adhesión inducida por estas citocinas. B) Efectos de los anticuerpos en la adhesión mediada por los productos secretados por macrófagos activados con LPS. C) Efecto de los anticuerpos sobre la adhesión regulada por los productos secretados por las células tumorales.

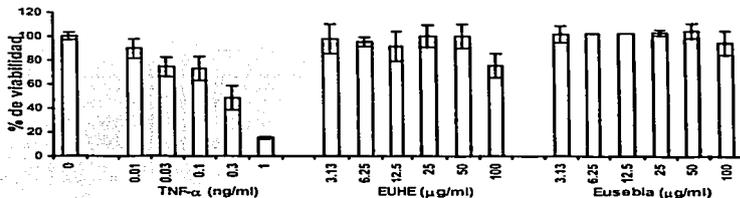


Fig. 26. Análisis de la presencia de TNF- α con actividad citotóxica en los productos secretados por las células tumorales. Células de línea L929 fueron tratadas con TNF- α o con los medios condicionados de las células EUHE o Eusebia, posteriormente se evaluó la viabilidad con cristal violeta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para confirmar la ausencia de TNF- α y de IL-1 β en los medios condicionados de las células tumorales, se realizaron ensayos de ELISA para analizar la presencia tanto de TNF- α como de IL-1 β en los productos secretados por las células tumorales. La tabla 6 muestra que no se detectó TNF- α en los medios condicionados de las células EUHE ni Eusebia y que sólo se encontraron pequeñas cantidades de IL-1 β (0.5 y 3.9 pg/ml). Considerando que en los experimentos se utilizaban aproximadamente 50 μ l del medio condicionado para obtener una dosis de 60 μ g/ml de proteína total, la concentración estimada de IL-1 β en este volúmen es de 0.04 pg/ml, que se encuentra por abajo del mínimo requerido (10 pg/ml) para obtener una respuesta fisiológica.

IL-1 β ng/ml	OD	TNF- α pg/ml	OD
0.003	0.027	9.76	0.019
0.007	0.056	19.53	0.078
0.015	0.102	39.06	0.18
0.031	0.205	156.25	1.508
0.062	0.45	EUHE	ND
0.125	0.782	Eusebia	ND
0.25	1.709		
0.5	2.544	pg/ml	
EUHE (92 μ g)	0.035	3.88	
Eusebia(58 μ g)	0.005	0.55	

Tabla 6. Análisis de ELISA de los productos secretados por las células tumorales. 100 μ l de los medios condicionados de las células tumorales EUHE o Eusebia fueron analizados por ELISA para evaluar la presencia de TNF- α e IL-1 β . ND: no detectado.

¿Quién activa al endotelio?

Los resultados anteriores muestran que ni el TNF- α , ni la IL-1 β se encuentran presentes entre los productos secretados por las células tumorales, de ahí que la activación endotelial dependa de otro u otros factores. Una hipótesis al respecto es que otros miembros de la familia de TNF- α puedan ser los responsables de la activación endotelial; recientemente se publicó una revisión donde se presentan los activadores de NF- κ B conocidos hasta este momento

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

entre los que se encuentran algunos miembros de esta familia (Pahl, 1999). Con este antecedente, se diseñaron oligonucleótidos específicos para algunas de estas moléculas y se realizaron análisis de RT-PCR y acoplados a un ensayo de hibridación tipo "Southern" partiendo del RNA total de las células EUHE y Eusebia en condiciones de crecimiento (medio suplementado con 10% de SFB) y otra en las condiciones de colección de medio condicionado (48 h en ausencia de SFB, condición descrita como CM en la tabla 7). Esta aproximación mostró que no existen productos de PCR para CD40L, FAS-L, TRAIL, IL-18 ni para IL-6. Sólo se detectó una señal positiva para NGF en ambas líneas celulares. Para las células EUHE, bajo condiciones de crecimiento (10% SFB) se detectó un claro producto de amplificación (*), esta amplificación aumentó cuando el RNAm fue aislado de células en condiciones de ausencia de suero (**) (Tabla. 7).

	FAS-L	TRAIL	NGF	IL-18	CD40L	IL-6
EUHE	--	--	*	--	--	--
EUHE CM	--	--	**	--	--	--
Eusebia	--	--	**	--	--	--
Eusebia CM	--	--	**	--	--	--

Tabla 7. Presencia de RNAm de otros activadores de NF- κ B. Se realizó una extracción de RNA total de células tumorales en condiciones de crecimiento (10% SFB) o en condiciones en las que se obtuvo el medio condicionado (48 h de privación de SFB). Se realizaron reacciones de TR-PCR con oligonucleótidos específicos para cada uno de las moléculas y posteriormente un análisis de southern con oligonucleótido interno marcado radiactivamente.

Para evaluar si el NGF presente en los productos secretados por las células tumorales era el responsable de la activación endotelial, se realizaron ensayos de adhesión celular y ensayos de retardo en la movilidad electrofóretica del DNA.

Los resultados muestran que el NGF induce sólo un pequeño incremento en la adhesión, el cual no alcanza los niveles que se obtienen con la mezcla de productos secretados por las células tumorales (Fig. 27A). De igual manera, los gels de retardo muestran que la translocación de NF- κ B inducida por el NGF es muy pequeña comparada con el efecto de los medios condicionados de las células EUHE, apenas por arriba de los niveles basales (Fig. 27B).

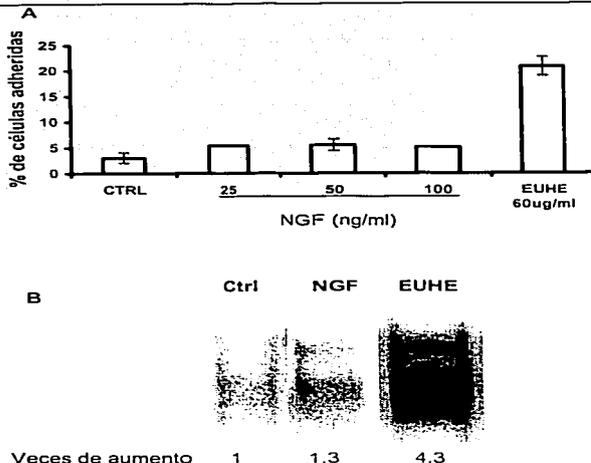


Figura 27. Efecto del NGF sobre las células HUVECs. A) Efecto del NGF sobre el incremento en la capacidad de adhesión de células endoteliales humanas. B) Translocación de NF- κ B inducida por NGF. Células HUVECs fueron tratadas con 100 ng/ml de NGF o con 60 μ g/ml de el medio condicionado de las células EUHE por 20 min. Posteriormente, se realizó el EMSA como se reporta en materiales y métodos. En la parte inferior de la figura se muestran las veces de aumento con respecto al control.

Los resultados anteriores sugieren que la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales no depende de NGF; sin embargo, es posible que el NGF contribuya a la respuesta general; por lo cual se evaluó el efecto de anticuerpos neutralizantes contra NGF en la adhesión mediada por los medios condicionados por las células tumorales. En la figura 28 se puede observar que en presencia del anticuerpo a dos concentraciones (1=2 μ g/ml, 2=4 μ g/ml) la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales no se ve afectada.

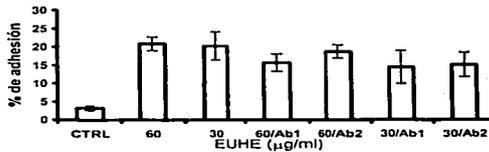


Figura 28. Participación del NGF en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales. El medio condicionado de las células EUHE fue preincubado con dos concentraciones (1=2 µg/ml; 2=4 µg/ml) de anticuerpos neutralizantes para NGF por 1 h a temperatura ambiente, posteriormente fue utilizado en un ensayo adhesión siguiendo el protocolo ya establecido.

Efecto del pretratamiento de células endoteliales con productos solubles secretados por otras líneas celulares sobre la adhesión de células U937.

Los resultados anteriores mostraron que los productos secretados por las células de los linfomas fueron capaces de activar al endotelio, sin embargo, no se sabe si este comportamiento pueda ser generalizado a otros tipos de tumores, en particular, tumores sólidos. Para evaluar lo mencionado anteriormente, se realizaron ensayos de adhesión utilizando los medios condicionados de tres líneas provenientes de tumores cérvico-uterino: CaLo, HeLa e InBl.

La figura 29 muestra que los productos secretados por las células CaLo y las células InBl alcanzan una adhesión de 50%, mientras que el medio condicionado de las células HeLa induce 20% de adhesión. Los productos secretados por Calo e INBL inducen una adhesión semejante a los niveles alcanzados con los productos secretados por el linfoma Eusebia o por TNF- α , lo que sugiere un mecanismo general para la mayoría de las células tumorales.

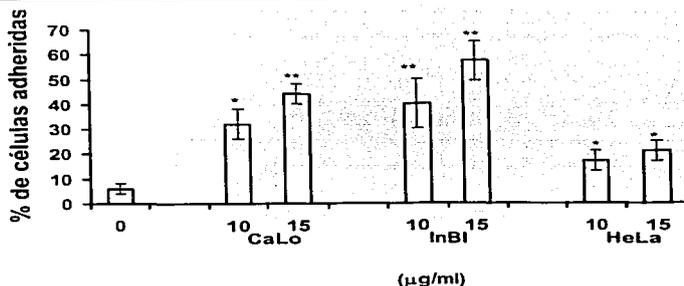


Figura 29. Efecto de productos secretados por células derivadas de tumores cervico-uterinos sobre la capacidad de adhesión de HUVECs. HUVECs fueron pretratadas con el medio condicionado de 3 diferentes líneas de cáncer cervico-uterino (CaLo, InBI y HeLa) por 3 h, posteriormente fueron coincubadas con las células U937. * $p > 0.05$, ** $p < 0.005$.

Efecto del Acido Acetil Salicílico en la adhesión de células U937 a endotelios tratados con TNF- α y con los productos secretados por los linfomas EUHE y Eusebia.

Los datos presentados anteriormente demuestran que los productos secretados por células tumorales pueden aumentar la capacidad de adhesión del endotelio a través de la translocación y activación del factor de transcripción NF- κ B, esto sugiere que este factor puede ser un blanco terapéutico para prevenir el desarrollo de metástasis. Sin embargo, los inhibidores de la activación de NF- κ B, como el BAY 11-7085, son moléculas que no pueden ser usadas *in vivo* por su toxicidad extrema.

Los trabajos de Yin y colaboradores (1998) mostraron que el ácido acetil salicílico, componente activo de la aspirina, inhiben la activación de la cinasa β de I κ B lo que tiene como consecuencia que el factor de transcripción NF- κ B permanezca en el citoplasma y no haya expresión de los genes dependientes de la activación del factor. Por lo que se evaluó el efecto del ácido acetil salicílico en

la activación del factor de transcripción NF- κ B en las HUVECs tratadas con los productos secretados por las células EUHE o con TNF- α . Se observa que en presencia de la aspirina hay una reducción en la translocación de NF- κ B (Fig. 30), lo que correlaciona con lo reportado en la literatura y demuestra que en las células endoteliales, la aspirina funciona como inhibidor de éste factor de transcripción.

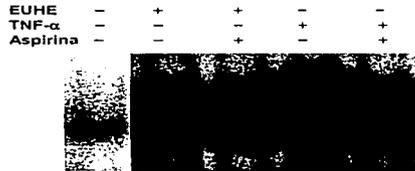


Figura 30. Efecto del ácido acetil salicílico en la translocación de NF- κ B. HUVEC fueron tratadas con 4 mg/ml de aspirina por 1 h, posteriormente se estimularon con 60 ng/ml de medio condicionado o con 10 ng/ml de TNF- α por 20 min. Por último, se realizó el EMSA como se reporta en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos anteriormente muestran que se requiere de NF- κ B para el aumento en la capacidad de adhesión de las células endoteliales inducida por citocinas y por los productos secretados por las células de la línea EUHE. Recientemente se demostró que la aspirina y los salicilatos son capaces de inhibir la adhesión de linfocitos T a células endoteliales (Gerli et al., 1998; 2001). Por lo que se analizó si la aspirina era capaz de inhibir la adhesión endotelial inducida por los productos secretados por las células tumorales. La figura 31 muestra que el tratamiento con 4 o 3 mg/ml de aspirina reduce la adhesión inducida por TNF- α a los niveles basales, mientras que a concentraciones más bajas (2, 1 mg/ml) el efecto inhibitorio es parcial. Sin embargo en las HUVECs estimuladas con los medios condicionados de las células EUHE se observa un bloqueo de la adhesión en todas las concentraciones de aspirina evaluadas.

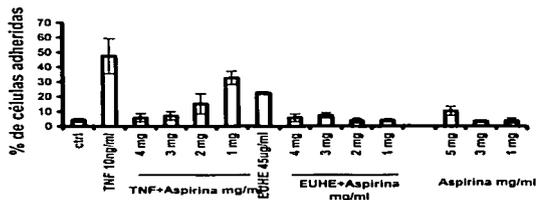


Figura 31. La aspirina inhibe la adhesión inducida por TNF- α y los productos secretados por las células tumorales EUHE. El ensayo se realizó como se menciona en materiales y métodos.

Como se mencionó anteriormente la adhesión de linfocitos y de algunas células tumorales depende de la expresión de moléculas de adhesión las cuales requieren de la activación de NF- κ B para su síntesis. Si por efecto del ácido acetil salicílico no hay activación de NF- κ B y como consecuencia hay una reducción de la adhesión, se podría esperar que hubiera una reducción en los niveles de las moléculas de adhesión en la membrana de las células endoteliales. De ahí que se evaluarán los niveles de ICAM-1 en la membrana de HUVECs tratadas con aspirina y estimuladas con TNF- α o con los medios condicionados de las células EUHE o el medio de macrófagos activados con LPS como control positivo. Se observa que el tratamiento con aspirina abate la expresión de ICAM-1 a pesar del estímulo, en todos los casos se mantienen los niveles basales de expresión (Fig. 32).

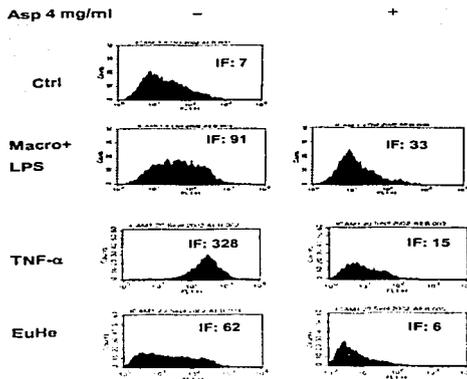


Figura 32. Efecto de la aspirina (Asp) en la expresión de ICAM-1 en la membrana de HUVECs. Células HUVEC fueron tratadas por 6 h con el medio condicionado de células EUHE (60 μ g/ml), con TNF- α (10 ng/ml) y con el medio de macrófagos activados con LPS (Macro+LPS) (50% v/v), posteriormente, se realizó un análisis por citometría de flujo como se indica en materiales y métodos. IF: Intensidad relativa de fluorescencia.

Es importante aclarar que la aspirina tiene diversos efectos sobre las células, entre los que se encuentra la inhibición de la vía del ácido araquidónico (A.A.) para la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, a través del bloqueo de la actividad de la ciclooxigenasa (COX1). Con este antecedente, se analizó la participación de estas vías sobre la activación endotelial reflejada por un aumento en la adhesión, para lo cual se utilizaron 3 inhibidores que actúan a distintos niveles de la vía del A.A.: la indometacina, la dexametasona y el bromuro de bromofenacilo (BPB). Las concentraciones que se utilizaron en los ensayos son concentraciones reportadas para inhibir la actividad de las enzimas. La figura 33 muestra que la vía del ácido araquidónico y sus metabolitos no participan en la adhesión inducida por TNF- α y por lo tanto en el cambio de fenotipo endotelial. Lo

que sugiere que en la inhibición de la adhesión por la aspirina no esta participando la vía de transducción que lleva a la producción de prostaglandinas y leucotrienos.

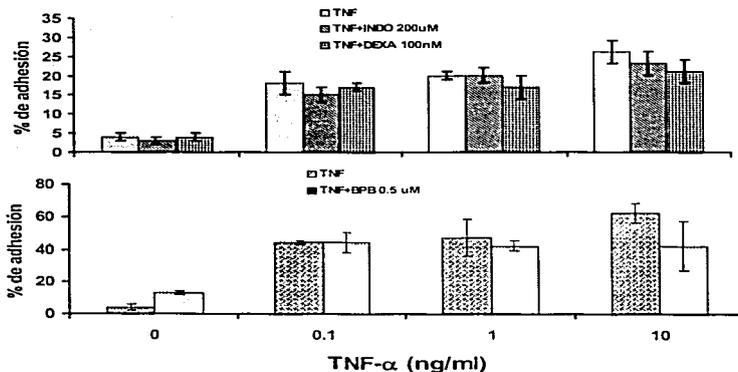


Figura 33. Participación de la vía del ácido araquidónico en la adhesión. Células HUVEC fueron tratadas con los inhibidores (dexametasona 100 nM [DEXA]; indometacina 200 μM [INDO] y bromuro de bromofenacilo [BPB 0.5 μM]) por 1 h. posteriormente se realizó en ensayo de adhesión como se reporta en materiales y métodos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSION

El endotelio no sólo provee de una barrera estructural entre la circulación y el tejido que la rodea, sino que también participa en la coagulación, en la adhesión y extravasación de linfocitos durante la reacción inflamatoria y en la secreción de mediadores que influyen en la hemodinámica vascular (Hogg et al., 1995; Cines et al 1998). Actualmente, se sabe que el endotelio tiene que mantener un estado de reposo o quiescente para poder optimizar la regulación del flujo sanguíneo; siendo éste el estado en el que las células endoteliales mantienen de manera activa, una superficie antitrombótica que facilita la circulación del plasma y sus componentes celulares a través de la vasculatura.

El endotelio es un órgano que responde a una gran variedad de agonistas, de "retos" microambientales y de estímulos que lo llevan a un proceso de activación, el cual, lleva a una pérdida de las propiedades anticoagulantes y a la adquisición de otras propiedades como las vasodilatadoras procoagulantes y las proadhesivas (Cines et al., 1998). En los sitios de inflamación, las células endoteliales son activadas por citocinas proinflamatorias, paso importante que permite entre otras cosas la adhesión y extravasación de leucocitos.

Diversas características del paradigma del reclutamiento de leucocitos son análogas en diversos aspectos a los últimos pasos de la cascada metastásica. En particular, en sitios secundarios de colonización donde se ha sugerido que las células metastásicas interactúan con el endotelio microvascular (Vidal-Vanaclocha et al., 2000; Cines et al 1998; Schadendorf et al., 1995). De este hecho, surge la hipótesis que propone que las células tumorales utilizan la misma vía o una vía semejante a la de los leucocitos para adherirse y extravasarse.

Los productos solubles secretados por las células tumorales activan a las células endoteliales.

Un aspecto importante de la transformación y malignización de las células tumorales radica en su capacidad de producir una variedad de factores con diversas actividades biológicas. Si bien, muchos de estos factores han sido identificados, su función precisa y su papel no resulta fácil de comprender dentro

de los diferentes contextos microambientales en los que se desarrollan las células tumorales.

Recientemente se ha reportado la presencia de distintos factores secretados por células tumorales que pueden afectar el fenotipo endotelial. Se ha demostrado que las células tumorales B16 derivadas de un melanoma murino secretan factores que inducen la expresión de citocinas, incluyendo IL-1 β , en células endoteliales hepáticas, ésta IL-1 β tiene un efecto autócrino induciendo la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 que lleva a un incremento en la adhesión de células tumorales (Vidal-Vanaclocha et al 2000). La IL-1 α derivada de un tumor de mama, pancreas y de melanomas humanos contribuye de una manera autócrina y parácrina a la inducción de genes que contribuyen al aumento en la adhesión de células tumorales (Nozaki et al., 2000; Kaji et al., 1995; Burrows et al., 1991).

Sin embargo, nuestro conocimiento con respecto a los componentes del medio condicionado derivado de los tumores metastásicos de mayor incidencia con efectos sobre las células endoteliales es aún muy limitado. Trabajos realizados por Kamada y colaboradores (2000) demostraron que los medios condicionados de varias células tumorales junto con el TNF- α promueven la remodelación de las células endoteliales. De igual manera, Liu y colaboradores (2001) observaron que las células de cáncer de colon humano secretan un factor que inhibe la apoptosis de células endoteliales. Estos dos trabajos se encuentran relacionados con los procesos angiogénicos que favorecen la formación de las masas tumorales.

Para el presente estudio se utilizó un linfoma primario derivado de una lesión metastásica (EUHE) y una línea derivada de células EUHE inyectadas en ratones desnudos (Eusebia), las cuales mantuvieron la capacidad de secretar factores que pueden activar al endotelio vascular. Es importante recalcar que se utilizaron diferentes lotes de los medios condicionados, pero que en todos los casos se evaluó que tuvieran el mismo patrón de bandeado, esto es el mismo contenido proteico, en geles de SDS-poliacrilamida. A pesar de que en este estudio se emplearon distintos lotes del medio condicionado la respuesta celular

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

obtenida siempre alcanzó el mismo nivel. El medio condicionado derivado de éstas dos líneas difieren sólo en los niveles máximos de adhesión siendo que los productos secretados por las células EUHE inducen un máximo de adhesión por arriba de los niveles saturantes de TNF- α y del medio condicionado de macrófagos activados con LPS que se empleó como control positivo, por que se sabe secretan una combinación de citocinas proinflamatorias que pueden activar a las células endoteliales (Sajjadi et al., 1996).

Dado el origen hematopoyético de las células tumorales (EUHE y Eusebia) y siendo que el TNF- α y la IL-1 β corresponden a los activadores endoteliales mejor caracterizados (Anrather et al., 1997; Etter et al., 1998; Modur et al., 1996; Pober et al., 1986), se evaluó la presencia de estas citocinas entre los productos secretados por las células tumorales. El bioensayo para TNF- α y el de ELISA mostraron que entre los productos secretados por las células tumorales no se encuentran presentes ni el TNF- α ni la IL-1 β . El hecho de que los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra TNF- α humano o IL-1 β humana no tuvieran efecto en el incremento en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales pero si interfirieran con la adhesión mediada por las citocinas recombinantes y el medio condicionado de los macrófagos activados, confirma la ausencia de estas dos citocinas en los medios condicionados de los linfomas utilizados. Por lo que podemos concluir que los factores secretados por las células tumorales, son distintos a TNF- α y a IL-1 β ; sin embargo, inducen un cambio fenotípico en las células endoteliales.

Un acercamiento para el análisis de los posibles productos secretados por las células EUHE y Eusebia fue el uso de reacciones de RT-PCR, lo que permitió evaluar la presencia de RNAm de algunas citocinas y factores. Con éste análisis sólo se amplificó el RNAm del NGF, factor que se ha demostrado puede activar a NF- κ B en células de Schwann, en células del ganglio dorsal, en PC-12 y PCNA (Wood, 1995; Carter et al., 1996; Pahl, 1999). Los experimentos realizados con NGF muestran que la respuesta endotelial a este factor (recombinante) es pequeña comparada con la que se obtiene con el medio condicionado de las células tumorales. No obstante, no se puede descartar que el NGF pueda estar

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

contribuyendo parcialmente a la respuesta general de los productos secretados por las células tumorales, o que su efecto sobre las células endoteliales esté potenciado por otros factores cosecretados por los linfomas EUHE o Eusebia.

Activación endotelial por productos secretados por células de tumores cérvico-uterinos humanos

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron los productos secretados por dos linfomas (EUHE y Eusebia), un punto importante fue evaluar si todas las células tumorales secretan factores capaces de activar al endotelio. Se ha reportado que los medios condicionados de líneas celulares derivadas de tumores de colon, fibrosarcoma y adenocarcinoma de colon son capaces de alterar la fisiología de la célula endotelial (Kamada et al., 2000; Liu et al., 2001), pero no es claro si esta alteración este relacionada con el proceso de activación endotelial que permite una mayor adhesión de células metastásicas.

Con este propósito se realizaron ensayos de adhesión utilizando los productos secretados por células de 3 líneas de cáncer cérvico-uterino, que al provenir de tumores sólidos tienen un origen y comportamiento distinto a los linfomas que son células en suspensión.

Los datos mostraron que las 3 líneas secretan factores capaces de activar al endotelio, con diferencias de intensidad entre ellos. Esto nos sugiere que muy probablemente los linfomas y tumores cervico-uterinos, y tal vez la mayoría de los tumores, tienen la capacidad de secretar productos solubles capaces de alterar el fenotipo endotelial y aumentar su capacidad de adhesión *in vitro*. Si bien es difícil de demostrar actualmente, es importante evaluar la relevancia de estos fenómenos descritos *in vitro*, en un modelo de metástasis *in vivo*.

¿Cuántas señales participan en la activación mediada por los productos secretados por células tumorales?

Considerando que los productos secretados por las células tumorales son un conjunto de factores y citocinas es importante tomar en cuenta las diferentes

vías de señalización que pueden ser encendidas de manera simultánea que pueden modular positiva o negativamente.

Las citocinas y factores llevan a cabo sus actividades biológicas a través de receptores específicos, cuyo patrón de expresión y afinidad por moléculas de señalización son distintos; así cuando los receptores se activan la respuesta celular será el resultado será un equilibrio entre las vías encendidas. Un claro ejemplo de esto es el TNF- α , que enciende simultáneamente una vía apoptótica a través de la cascada de caspasas y una vía anti-apoptótica a través de la activación de NF- κ B (Hirano et al., 2001).

De hecho, aún cuando un receptor puede activar las mismas vías de transducción, cada célula puede responder a la estimulación de manera diferente, dependiendo de su activación previa por otros moduladores ya sea por diferencia en los niveles de expresión o por un estado de activación inducido por otras moléculas que pudieran afectar la vía de una manera negativa o positiva.

El balance de cada vía de transducción puede ser influido por una variedad de factores que determinan la duración y la intensidad de cada señal. En este sentido, los mecanismos de retroalimentación positiva y negativa pueden ser cruciales para determinar el balance y la respuesta.

Así, la diferencia entre los productos secretados por las células tumorales y el TNF- α sobre la expresión de moléculas de adhesión, como la selectina-E, puede deberse a la combinación de vías encendidas que da como resultado una activación transcripcional diferencial del gen y del producto génico. Sin embargo, la respuesta celular general es la misma, un incremento en la capacidad de adhesión.

Participación de NF- κ B en la activación inducida por los productos secretados por las células tumorales.

Los productos secretados por las células tumorales incrementan la translocación del factor de transcripción NF- κ B de una manera similar a como lo hace el TNF- α . Sin embargo, es importante notar que a pesar de que la magnitud de translocación es semejante, el porcentaje de células adheridas es distinto, lo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que sugiere la participación de otras vías que son activadas por los medios condicionados en particular EUHE y que estas vías no son activadas por el TNF- α . En cualquier caso, esto quiere decir que no hay necesariamente una correlación lineal entre la translocación del factor NF- κ B y la adhesión celular.

El incremento en la adhesión, mediada por los medios condicionados de las células tumorales y por citocinas proinflamatorias, depende de la activación de NF- κ B, lo que se demuestra con el uso del inhibidor BAY 11-7085 que bloquea la vía de activación del factor de transcripción. La concentración de 5 μ M fue suficiente para demostrar que en presencia del inhibidor la translocación de NF- κ B al núcleo disminuye, lo que correlaciona con una disminución en el incremento en la adhesión inducida tanto por los productos secretados por las células tumorales como por el TNF- α recombinante. El efecto parcial del BAY 11-7085 puede ser debido a que la concentración del inhibidor es insuficiente para producir un bloqueo total o a la participación de vías que no son afectadas por el BAY 11-7085, como en las que se encuentran involucradas otras isoformas de κ B. A pesar de tener el mismo origen, las HMEC-1, una línea celular ya establecida resultó ser resistente al efecto tóxico del inhibidor y al evaluar el efecto se observó que con 10 μ M de BAY 11-7085 se presenta un bloqueo completo de la activación de NF- κ B a pesar de la presencia de TNF- α .

La dependencia del efecto de los productos secretados por las células tumorales sobre NF- κ B queda demostrada con el uso de anticuerpos contra las subunidades p50, p65 y con el ensayo de competencia con oligonucleótido frío; de igual manera se demuestra al evaluar la translocación del factor de transcripción SP-1, donde no se observa ningún efecto. Al igual que los productos secretados por las células tumorales, el efecto del inhibidor BAY 11-7085 es específico sobre la translocación de NF- κ B, ya que el tratamiento con el inhibidor tampoco afecta a SP-1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Participación de elementos de la vía de activación de NF- κ B

Se sabe que existe una vía de activación de NF- κ B clásica (Karin et al., 2002), que involucra la cinasa IKK y los inhibidores I κ B. Sin embargo, por lo menos se han reportado dos vías alternas para llegar a la activación del complejo IKK, la primera a través de la cinasa NIK y la segunda utilizando la vía de la PI $_3$ K y su sustrato Akt (Nidal et al., 1999; Romashkova et al., 1999).

Con el objetivo de determinar si existían diferencias entre las vías de señalización activadas por los medios condicionados de las células tumorales y la vía dependiente de TNF- α se realizaron inmunoblots utilizando anticuerpos específicos para Akt en su forma fosforilada, lo que permite valorar de manera indirecta la activación de la vía de PI $_3$ K. Los resultados muestran que en las células endoteliales tratadas con los productos secretados por las células tumorales la vía de PI $_3$ K/Akt es más común que en las células tratadas con TNF- α , lo que implica que existen diferencias en las vías de señalización hacia el complejo IKK.

Una vez que el complejo IKK es activado, se espera la fosforilación de los inhibidores asociados a NF- κ B, los I κ Bs. Se sabe que por efecto de las citocinas proinflamatorias el inhibidor que preferencialmente se degrada en tiempos cortos (5-30 min) es I κ B α (Karin et al 2002). Como en el caso anterior se realizaron inmunoensayos tipo "western" utilizando anticuerpos contra I κ B α , los datos comprobaron que la activación endotelial mediada por TNF- α induce la degradación de I κ B α , mientras que las células endoteliales tratadas con los productos secretados por las células tumorales no mostraron cambios en los niveles de I κ B α a pesar del tratamiento. Estos resultados sugieren que los medios condicionados de las células tumorales utilizan un vía de activación de NF- κ B independiente de I κ B α . Es probable que los medios condicionados de células tumorales recluten al NF- κ B que se encuentra asociado a otras poblaciones de inhibidores como pueden ser I κ B β o I κ B ϵ (también presentes en células endoteliales humanas) o que utilicen una vía en la que una cinasa (PI $_3$ K, MAP, o alguna otra) puede fosforilar a NF- κ B causando un cambio conformacional que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

modula su activación promoviendo su translocación al núcleo. (Schmitz et al., 2001).

Independientemente del mecanismo por el cuál los productos secretados por las células tumorales reclutan a NF- κ B nuestros resultados sugieren que las vías de señalización que utilizan los productos secretados por las células tumorales para la activación de NF- κ B son distintas a los que utilizan las citocinas proinflamatorias.

Participación de las moléculas de adhesión endotelial selectina-E e ICAM-1 en la interacción de las células U937 con el endotelio.

Como se mencionó anteriormente, NF- κ B es esencial para la transcripción de moléculas de adhesión endotelial como selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1. De estas tres moléculas, la primera en ser expresada es la selectina-E que participa en la adhesión laxa y el "rolling" de leucocitos (Meagher et al., 1994; Modur et al., 1996; Pober et al., 1986). De hecho, recientemente se ha reportado que la selectina-E participa en la adhesión de varias células tumorales al endotelio (Krause et al., 1999). Se ha observado que algunos tipos celulares de carcinoma escamoso, melanoma, cáncer de mama, carcinoma pancreático y cáncer colorectal utilizan a la selectina-E para adherirse al endotelio e iniciar un proceso metastásico (Allen et al 1996; Schadendorf et al 1995; Tözere et al., 1995; Iwai et al 1993; Matsumoto et al., 2002).

Los resultados del análisis por RT-PCR y citometría de flujo sugieren que a pesar de que la translocación de NF- κ B es similar para los medios condicionados y para el TNF- α , el estímulo no es suficiente para promover una expresión semejante de selectina-E; el uso de anticuerpos neutralizantes demuestra que la adhesión inducida por TNF- α requiere de la expresión de selectina-E, mientras que en la inducida por los productos secretados por las células tumorales no es necesaria. El promotor de la selectina-E contiene 3 sitios de unión para las subunidades p50/p65 de NF- κ B, un sitio de unión para los factores de transcripción ATF-2 y un sitio para la unión de HMGI (del inglés High Motility Group) (Collins et al., 1995); Estos sitios deben de actuar cooperativamente para

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inducir la transcripción del gen. Se sabe que para el caso de TNF- α existe esta cooperación y por lo tanto una inducción completa del gen, sin embargo, dado que no conocemos que otras vías de señalización sean activadas por los productos secretados por las células tumorales es posible que no tengamos el efecto de cooperación de todos los sitios en el promotor, o que en uno de los sitios se una un represor y como consecuencia no exista expresión de la proteína en la membrana endotelial. Una posible explicación a la falta de expresión de selectina-E es la activación del factor HMG1 que en este caso actúa como represor de la transcripción.

Estos resultados sugieren la participación de otras moléculas de adhesión, cuya expresión podría ser inducida por los medios condicionados y de otras que pudieran estar presentes en la membrana previo al estímulo y que por efecto del medio condicionado cambien su afinidad por el contrareceptor (Rosales et al., 1995). Se sabe que moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, fractalina y ESM-1 pueden ser inducidas por citocinas proinflamatorias (Fong et al., 1998, Meagher et al., 1994), el análisis de RT-PCR de éstas moléculas confirmó éste efecto, sin embargo, mostró que los productos secretados por las células tumorales sólo son capaces de inducir al doble el RNAm de ICAM-1. Los resultados obtenidos en la citometría de flujo con anticuerpos anti-ICAM-1, confirman que los productos secretados por las células tumorales son capaces de aumentar la expresión de la proteína en la superficie de la membrana de las células endoteliales. Cuando las células endoteliales son tratadas con el inhibidor BAY 11-7085 y los productos secretados por las células tumorales se observa que hay una disminución en la expresión de la molécula de adhesión que alcanza los niveles basales. Estos resultados confirman que es necesaria la translocación de NF- κ B al núcleo para la inducción de la expresión de esta molécula de adhesión. Así, hemos identificado a la expresión de ICAM-1 y la falta de expresión de selectina-E como marcadores moleculares del estado de activación endotelial provocado por los factores secretados por la célula tumoral EUHE y Eusebia. Sin embargo, aún faltan ensayos que evalúen la participación directa de esta molécula en la adhesión inducida por los medios condicionados.

Los resultados presentados muestran que los productos secretados por las células tumorales no inducen la expresión selectina-E, pero si aumentan los niveles de ICAM-1. Esto implica que los medios condicionados de las células tumorales carecen de una señal coestimuladora que se encuentra presente en la vía activada por TNF- α o que activan un mecanismo de represión que evita la expresión de selectina-E. Demostrando que selectina-E no participa en la adhesión inducida por los productos secretados por las células tumorales.

Estos datos también implican que la adhesión de células U937 sigue un proceso diferencial al de la adhesión de leucocitos. Así, si bien la adhesión es similar es muy probable que las moléculas de adhesión implicadas sean diferentes a las que participan en la reacción inflamatoria. Considerando la hipótesis inicial que propone que el proceso que llevan la adhesión de las células metastásicas a las células endoteliales es similar a lo que ocurre en la inflamación, es importante resaltar que ni el TNF- α ni la IL-1 β , se encuentran entre los productos secretados por las células tumorales. Este hallazgo implica diferencias entre ambos procesos incluso desde el factor (o factores) responsables de activar al endotelio vascular. Queda fraccionar al medio condicionado por los linfomas EUHE y Eusebia para identificar al factor (o factores) responsables de la activación endotelial.

Efecto de la aspirina sobre la activación de células endoteliales mediada por los productos secretados por las células tumorales.

Drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAIDs del inglés, non-steroidal anti-inflammatory drugs) como la aspirina, llevan a cabo su efecto anti-inflamatorio en parte por inhibición de la actividad de la enzima ciclooxigenasa. Estudios más recientes han demostrado que la aspirina (el ácido acetil salicílico) también puede inhibir la vía de NF- κ B asociada a la patogénesis de la respuesta inflamatoria. Este bloqueo se lleva a cabo a través de la inhibición de la cinasa IKK β cuya función es fosforilar a I κ B propiciando su degradación y la liberación de NF- κ B para ser translocado al núcleo (Yin et al., 1998; Kopp et al., 1994). Paralelamente, estudios hechos por Gerli (1998, 2001) mostraron que el pre-

tratamiento con aspirina de linfocitos T, reduce la adhesión de éstos a células endoteliales activadas.

Sin embargo, desde 1973 existen reportes del efecto anti-metastásico del ácido acetil salicílico (Powles et al., 1973; Livolsi, 1973). Se ha observado que pacientes con artritis reumatoide que reciben aspirina de manera crónica tienen poco riesgo de adquirir cáncer colorectal, apoyando la evidencia epidemiológica de que el uso de NSAIDs, en particular de la aspirina, puede proteger del desarrollo de cáncer (Gridley et al., 1993). Recientemente se ha observado que la aspirina al inhibir la actividad de ciclooxigenasas puede regular la angiogénesis inducida por células de carcinoma de colón (Tsuji et al., 1998). De igual manera, se sabe que la aspirina puede inhibir la secreción de MMP-2, aumentar la producción de cadherina-E e inhibir la invasión de células tumorales (Jiang et al., 2001).

Con estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo se evaluó si la aspirina era capaz de inhibir la adhesión inducida por TNF- α y por los productos secretados por las células tumorales. Los resultados muestran que el pretratamiento de las células endoteliales con aspirina disminuye su capacidad de adhesión aún en presencia de los activadores. Esta inhibición correlaciona con una menor translocación de NF- κ B al núcleo y un decremento en los niveles de la molécula de adhesión ICAM-1 en la membrana de la célula endotelial.

Si bien, estos estudios fueron realizados *in vitro*, cabe resaltar que tienen el antecedente de los pacientes de artritis reumatoide, por lo que es posible considerar a la aspirina o a fármacos con actividad neutralizante de la activación de NF- κ B como un complemento en las terapias para el tratamiento de cáncer.

Inhibición de la adhesión, la posibilidad de una terapia.

Las células tumorales mimetizan la adhesión de leucocitos a endotelios durante la reacción inflamatoria. Experimentos recientes han demostrado que las selectinas pueden jugar un papel importante en particular en la metástasis de carcinoma de colón (Nakamori et al., 1993; Sawada et al., 1994; 1993; Goetz et al 1995). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que no

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sólo la selectina puede estar involucrada en la adhesión de células tumorales. De hecho, existen reportes en los que las moléculas de adhesión involucradas son distintas a las selectinas, como por ejemplo ICAM-1 y VCAM-1 (Langley et al., 2001; Maeda et al., 2002).

Recientemente, ha tomado fuerza la idea de establecer una terapia anti-adhesión para el tratamiento del cáncer. Considerando que el origen de la metástasis es un proceso con un componente pro-adhesivo y uno anti-adhesivo, esto es, 1) la separación de células tumorales individuales de grupos pequeños de células tumorales o del tumor primario como consecuencia de una reducción en la tendencia de las células tumorales de mantenerse unidas y 2) el aumento en la "adhesividad" de las células tumorales metastásicas que les permiten mantenerse unidas en la sangre para interactuar con las células endoteliales y extravasarse. La mayor parte del reconocimiento intercelular que media los fenómenos de adhesión requiere de grupos de carbohidratos expuestos sobre las moléculas de adhesión. Por tanto, se establecen 2 puntos en los que la inhibición de la adhesión celular puede ser un blanco terapéutico: los mecanismos de pérdida de adhesión entre las células metastásicas pueden ser interferidos o eliminados con la aplicación de inhibidores del procesamiento de la N-glicosilación como la castanospermina, la N-metilnojirimicina y particularmente la swainsonina y sus análogos. Se ha reportado que la swainsonina reduce la actividad de la α -manosidasa alterando el proceso de N-glicosilación e inhibe fuertemente la capacidad metastásica de las células tumorales de ratón MDAY-D2 (Dennis, 1986). Esta actividad anti-metastásica de la swainsonina puede incluir su habilidad para restablecer la inhibición por contacto durante el crecimiento y la normalización del funcionamiento de algunas integrinas (Dennis et al., 1993). De hecho, existe un estudio en fase I utilizando a la swainsonina en pacientes con cáncer avanzado que ha mostrado resultados promisorios (Goss et al., 1994).

Se han alcanzado avances importantes en la caracterización estructural y funcional de carbohidratos asociados a moléculas de adhesión que juegan un papel importante en la diseminación metastásica del cáncer. El concepto de una terapia combinada para el tratamiento de la metástasis ha surgido basada en la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

aplicación de agregantes para las células tumorales e inhibidores de adhesión como las glicoaminas sintéticas antimetastásicas y la tradicional terapia de radiación o quimioterapia. La idea es sinergizar la apoptosis que inducen estas terapias para evitar la resistencia a drogas dependiente de adhesión que puedan presentar las células tumorales. Análogos sintéticos de glicoaminos son las nuevas drogas anti-metastásicas que se encuentran en fase I de prueba clínica. Sin embargo, la evidencia experimental indica que la terapia anti-metastásica basada en el principio de la adhesión y los reactivos para el diagnóstico de la metástasis se encuentran todavía en proceso de desarrollo.

Una de las nuevas ideas es el desarrollo de una terapia basada en la modificación de la adhesión, esto es, la aplicación combinada de inhibidores de la N-glicosilación con el objetivo de restaurar la función normal de los receptores de adhesión (como las integrinas) y las glicoaminas sintéticas con énfasis en la inhibición de la agregación y adhesión tumoral basada en interacciones homo y heterotípicas carbohidrato-lectina. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo, es posible considerar la inhibición localizada de factores de transcripción como NF- κ B para evitar la expresión de moléculas de adhesión endotelial que favorezcan la adhesión y la diseminación del tumor. La terapia anti-adhesión para la metástasis de cáncer tendría como blanco dos pasos críticos en la cascada metastásica y puede limitar la habilidad de las células para encontrar una "puerta de escape" para entrar a un tejido durante la diseminación del tumor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

1) Los productos secretados por las células tumorales son capaces de activar al endotelio reflejado en un aumento en su capacidad de adhesión.

2) Este cambio en el fenotipo endotelial depende de la activación del factor de transcripción NF- κ B.

3) El bloqueo de NF- κ B por inhibidores específicos como el BAY 11-7085 y la aspirina abaten la respuesta de adhesión, la expresión de ICAM-1 inducida por los productos secretados por las células tumorales.

4) La molécula de adhesión endotelial Selectina-E no participa en la adhesión inducida por los productos secretados por el linfoma EUHE; Sin embargo, es posible que ICAM-1 pueda estar participando en ésta adhesión al ser inducida por los productos secretados por las células tumorales.

5) Las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β no se encuentran presentes en los productos secretados por las células del linfoma EUHE y Eusebia, por lo que la activación endotelial se debe a la presencia de otro (s) factor (es) que puedan cambiar el fenotipo endotelial de una manera dependiente del factor de transcripción NF- κ B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PERSPECTIVAS

Este trabajo nos abrió un panorama a cerca los mecanismos de adhesión entre las células tumorales y las células endoteliales, en donde existen varias preguntas por contestar:

1) El proceso de adhesión requiere de moléculas de adhesión presentes tanto en las células endoteliales como en las células tumorales. ¿Cuáles son éstas moléculas? ¿En que momento de la adhesión participan? Por lo tanto, es importante evaluar utilizando diversas metodologías la expresión y participación de estas moléculas durante el proceso de adhesión tumoral.

2) Las células tumorales secretan factores que son capaces de activar al endotelio vascular. Es importante identificar que factores a parte de la IL-1 β y el TNF- α que son capaces de activar al endotelio afectando su capacidad de adhesión.

3) El factor de transcripción NF- κ B es importante para muchos procesos celulares, entre los que se encuentra el proceso metastásico. Por lo que evaluar su inhibición con bloqueadores fisiológicos es importante.

4) Los experimentos mostrados en este trabajo fueron realizados *in vitro*, de ahí que sea importante evaluar si se presentan los mismos efectos analizando el proceso en un modelo *in vivo*.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



NF- κ B dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas

Adriana Estrada-Bernal^a, Criselda Mendoza-Milla^a, José Luis Ventura-Gallegos^a, Lucía Nikolaia López-Bojórquez^a, Enrique Miranda-Peralta^b, Fabián Archavaleta-Velasco^c, Felipe Vajillo-Ortega^c, Luis Sánchez-Sánchez^a, Alejandro Zentella-Dehesa^{a,*}

^aDepartamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular UNAM, Copilco Universidad, P.O. Box 70-243, México D.F., 04510, México

^bUnidad de Biología Molecular y Hematología del Hospital General de México S.S. Dr. Balboa 148, México D.F. 06726, México

^cDirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología S.S. Montes Urales 800, México D.F. 11000, México

*Unidad de Diferenciación y Crecer de la FES Zaragoza UNAM, Calle Basilio de 3 de Mayo, México D.F. 09230, México

Received 28 July 2002; received in revised form 22 October 2002; accepted 26 October 2002

Abstract

NF- κ B activation is an early event during cytokine-mediated endothelial activation related to increased adhesion of leukocytes. We report that soluble products secreted by two human lymphomas activate NF- κ B, and increase the ability of endothelial cells to adhere U937 cells *in vitro*. Analysis of the tumor-derived products revealed the absence of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . Interference of NF- κ B activation prevented the increase in U937 cell adhesion, suggesting a potential role for endothelial NF- κ B activation in the establishment of physical interactions between the vascular endothelium and tumor cells. © 2002 Published by Elsevier Science Ireland Ltd.

Keywords: Endothelial cell; Cytokines; Tumor necrosis factor- α ; Conditioned media; Metastasis; I α -1 β ; E-selectin; Lymphomas

1. Introduction

Tumor cells secrete a variety of cytokines and growth factors with autocrine and paracrine action that influence the surrounding cells and their interaction with invading tumor cells. The cell-cell interaction between metastatic and endothelial cells has been postulated as an important event previous to tissue invasion, involving paracrine signaling, mechanical contact and transient intercellular adhesion [1]. It

has been shown that melanoma derived interleukin-1 β (IL-1 β) activates NF- κ B in endothelial cells, increases the adhesion of melanoma cells due to the up-regulating of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 [2]. Other studies reveal a positive correlation between increased expression of IL-1 α and lymph node metastasis [3]. IL-1 α derived from breast cancer cells promotes NF- κ B activation and expression of NF- κ B-dependent genes in normal skin fibroblasts [4]. B16M and Meth A tumor cells have also been shown to secrete products, not yet identified, capable of inducing phenotypic changes in endothelial cells [5,6]. Although the intracellular targets for all these products have not been completely defined, in addi-

* Corresponding author. Tel.: +52-5-622-5609; fax: +52-5-622-5611.

E-mail addresses: aestrada@ifisioi.unam.mx (A. Estrada-Bernal), azentell@ifisioi.unam.mx (A. Zentella-Dehesa).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

97 tion to NF- κ B, AP-1 and the STAT family have been
98 proposed as likely intracellular mediators for these
99 effects [7].

100 The NF- κ B family of eukaryotic transcription
101 factors function as homo- and hetero-dimers [8],
102 that includes p50/p105, p52/p100, RelA (p65), c-Rel
103 and RelB. Dimers bind to a set of related 10 base pair
104 (bp) DNA-binding sequences, collectively called κ B
105 sites that regulate the expression of a wide variety of
106 genes. In the cytoplasm of most cells, Rel/NF- κ B
107 transcription complexes are present in an inactive
108 state bound to inhibitory proteins collectively known
109 as I κ Bs [8]. Through the action of a multitude of
110 extracellular signals I κ Bs are degraded, liberating
111 NF- κ B. In particular, endothelial cell activation by
112 pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis
113 factor- α (TNF- α) requires NF- κ B activation for the
114 expression of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , the inducible
115 NO synthase, and cell-adhesion molecules (CAMs)
116 such as E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 [9,10].
117 The combined expression of these products and adhe-
118 sion molecules contribute to a normal inflammatory
119 response.

120 It has been postulated that tumor cell interactions
121 with the micro-vascular endothelium is analogous to
122 leucocyte adhesion and extravasation during the
123 inflammatory response, processes dependent on NF- κ B
124 activation [1,11]. Hence, tumor cells with invasive
125 potential would benefit from increasing the adhesive
126 capacity of endothelial cells towards tumor cells in
127 much the same way as TNF- α or IL-1 β , promote
128 leucocyte adhesion.

129 We show that soluble factors derived from two
130 human metastatic human lymphoma cell lines
131 promote endothelial NF- κ B activation linked to adhe-
132 sion of U937 cells.

133
134

135 2. Methods

136 2.1. Cell culture

137
138
139 Primary human endothelial cells (HUVECs) were
140 isolated from umbilical cords by proteolytic dissocia-
141 tion as previously described [12] and cultured in
142 medium 199 supplemented with 10% FBS (GIBCO/
143 BRL, Rockville, MD), glutamine (2 mM), heparin (1
144 mg/ml) (Sigma, Saint Luis, MO), and endothelial

145 mitogen (0.01 μ g/ml) (Biomedical Technologies
146 Inc., Stoughton, MA). Eulle cells were obtained
147 from a metastatic lesion in the neck of a 15 year-old
148 female patient with Hodgkin's disease, cells presented
149 Hodgkin's cell-morphology and expressed CD15, a
150 marker of Hodgkin's lymphoma, in addition to
151 CD19, CD20 and CD23 [13]. The Eusebia cell line
152 was derived from a metastatic lesion produced in NIH
153 Swiss nude mice that had been injected with the Eulle
154 cell line. This second cell line was positive for the
155 same markers as the parental Eulle cell line. Both
156 Eulle and Eusebia cells were cultured in RPMI lack-
157 ing phenol red, supplemented with 10% FBS. Cells
158 from the human lymphoma U937, purchased from the
159 ATCC (Manassas, VA), were cultured in regular
160 RPMI supplemented with 10% FBS. All cells line
161 cultures were incubated at 37°C in a humidified atmo-
162 sphere with 5% CO₂.

163 2.2. Preparation of conditioned media from tumor 164 cells

165
166 Cells from the two different lymphomas were
167 cultured until they reached 100% confluence. The
168 cell layer was washed ten times with PBS-DMEM
169 (1:1 v/v) to remove serum components. Then, the
170 flasks were incubated with 25 ml of serum free
171 RPMI. After 48 h the culture medium containing the
172 soluble products derived from the tumor cells was
173 collected, and lyophilized after centrifugation. The
174 resulting powder was dissolved in 1/10 of the original
175 volume and dialyzed with a PM-10 ultra-filtration
176 membrane (Millipore, Bedford, MA). Protein concen-
177 tration was assayed with a commercial Bradford
178 reagent (BioRad, Hercules, CA).

179 2.3. Preparation of conditioned medium from LPS- 180 activated macrophages

181
182 U937 cells were differentiated with an 8 h pulse of
183 PMA (0.1 μ M), and stimulated with LPS (0.1 μ g/ml)
184 48 h later, as described [14]. After 30 min of LPS-
185 stimulation the cells were washed three times with
186 PBS to reduce the residual LPS, conditioned medium
187 was recovered 3 h later.

188 2.4. Cell adhesion assay

189
190 The assay was performed as previously described
191
192

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

[15]. Stimulation of confluent cultures of HUVECs was carried out for 3 h. A suspension of U937 cells (1×10^6 cells/ml) was radiolabeled with [3 H]-thymidine (1 μ Ci/ml) (NEN, Boston, MA) for 48 h. Aliquots of the labeled cell suspension (250×10^3 cells/250 μ l) were added to each well. After 3 h of co-incubation, all the non-adherent cells were removed by aspiration followed by two washes with PBS. The adherent cells were immediately solubilized with 500 μ l of 0.2 M NaOH and mixed with 3 ml of scintillation fluid and counted in a β counter (Beckman). Neutralizing antibodies (Pharmingen, San Diego, CA) and the inhibitor BAY 11-7085 (Calbiochem, La Jolla, CA) were added to the medium 1 h prior to stimulation. Results are the percentage of attached cells relative to the total number of U937 cells added per well.

2.5. Flow cytometry

HUVECs received the different stimuli or control medium for 4 h at 37°C, washed twice with PBS and incubated for 30 min at 4°C with the biotinylated primary antibody against E-selectin (diluted 1:1600 in PBS-BSA, 5%) (Pharmingen, San Diego, CA). Following a 30 min incubation with phycoerythrin-labeled streptavidin (1:3000 in PBS-BSA, 5%) at 4°C, HUVECs were detached with 4 mM EDTA, resuspended in PBS, and analyzed in a FACScalibur cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Histograms present the relative fluorescence intensity value at 560 nm (FL).

2.6. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

NF- κ B and translocation to the nucleus was determined as previously described [16]. The [32 P]-labeled double stranded oligonucleotide, used (5'-AGTTGAGGGGACCTTCCAGG-3') contains the underlined NF- κ B consensus sequence (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), antibodies for NF- κ B complex analysis were purchased from the same vendor. Protein/DNA complexes were resolved in 5% non-denaturing polyacrylamide gels, dried and analyzed with a Storm 850 phosphorimager and the ImageQuant software (Molecular Dynamics, San José, CA). EMSA for the SP1 transcription factor was performed in a similar way using the oligonucleotide 5'-ATTCGACTCGGGC-GGGGCCGAGC-3' (Santa Cruz, Santa Cruz, CA).

2.7. ELISA

Assays were performed following the vendor's protocol (K&D Systems, Minneapolis, MN). Fifty μ l aliquots of the capture antibody (2 μ g/ml) were used per well, with 100 μ l of the sample or the standards. One μ g/ml of the biotinylated capture antibodies were used with streptavidin-alkaline phosphatase diluted 1:1000. Finally, 100 μ l of p-nitrophenyl-phosphate (1 mg/ml) were added to each well, incubated for 30 min. The O.D. at 405 nm was measured with a plate reader (Biotech Instruments Inc., Highland Park, VT).

2.8. L929 TNF bioassay

The assay was performed as previously described [17]. Briefly, L929 cells were plated in 96-well plates (1.12×10^4 cells/well). After 24 h the culture medium was replaced with medium containing 1 μ g/ml of actinomycin D with 100 μ g of total protein from the different conditioned media, or sequential 2-fold dilutions. After 12 h of incubation at 37°C, remaining cells were fixed and stained with crystal violet. The stain was dissolved in 10% acetic acid (200 μ l) and the O.D. at 595 nm was determined using a plate reader. A standard curve with rTNF- α was included in each assay. Results are expressed as the percentage of viability relative to the control.

2.9. Statistical analysis

Results are the average of three independent experiments performed in triplicates; error bars indicate standard deviation of the mean. Data were treated with Student's *t*-test to establish statistical significance.

3. Results

3.1. Enhancement of U937 cells adhesion to HUVEC by pre-treatment with soluble products derived from human lymphomas

We compared the adhesion of U937 cells to HUVEC that had been pre-treated with: (i) TNF- α (Fig. 1A); (ii) the conditioned media from LPS-activated macrophages containing native TNF- α and IL-1 β and other

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

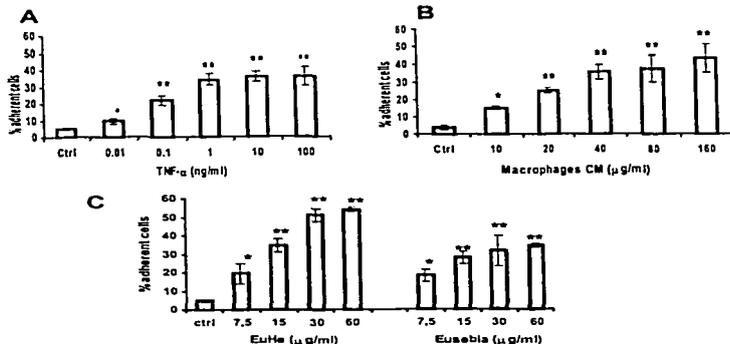


Fig. 1. Products secreted by the human lymphomas EufHe and Eusebia increase endothelial cell adhesion. HUVEC where pretreated for 3 h with TNF- α (A), conditioned media (CM) from LPS-activated macrophages, (B) or conditioned media of tumor cells (C). U937 cells were co-cubated with HUVECs for 3 h before evaluating cell adhesion. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$.

cytokines (Fig. 1B); or (iii) with the soluble products derived from the human lymphomas EufHe or Eusebia (Fig. 1C). TNF- α and the conditioned medium from LPS-activated macrophages led to a dose dependent increase in cell adhesion, reaching a maximum value of 34 and 40%, respectively, despite excess stimulant addition (Figs. 1A,B). The conditioned media from the two lymphomas (EufHe and Eusebia) also induced a dose dependent increase in cell adhesion (Fig. 1C). While the maximal cell adhesion induced by the Eusebia conditioned medium was 30%, maximal adhesion reached 50% with the conditioned media from EufHe, 19% above the maximal cell adhesion level induced by recombinant and native cytokines. The increase in cell adhesion induced by the three different conditioned media remained unchanged when they were tested in the presence of polymyxin-B (10 μ g/ml), indicating no contamination with LPS (data not shown). We

conclude that the conditioned media derived from the lymphomas change the resting endothelial cell phenotype increasing their adhesion capacities analogous to TNF- α .

3.2. Endothelial cell activation correlates with NF- κ B activation

Activation of the NF- κ B transcription factor is essential for endothelial cell activation by TNF- α and other pro-inflammatory cytokines. NF- κ B activation in HUVECs, was evaluated by EMSA, 20 min after stimulation the translocation increased 6- and 8-fold when treated with products derived from EufHe or Eusebia cells, respectively (Fig. 2A). A similar 6-fold increase was observed with TNF- α . The principal complex induced by TNF- α or by the soluble factors derived from both tumor cell lines had a similar mobi-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432

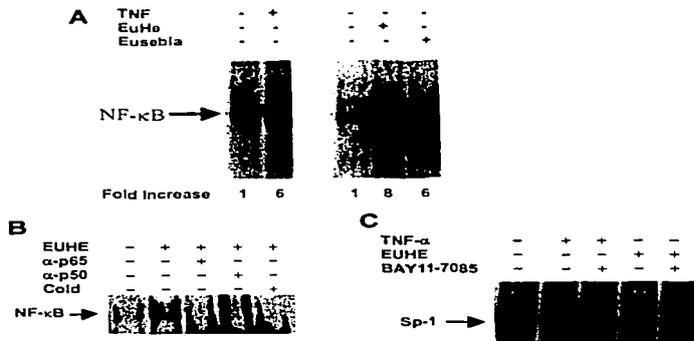


Fig. 2. Activation of NF- κ B in endothelial cells treated with soluble products secreted by lymphoma cells. (A) Nuclear extracts were prepared 20 min after the addition of 60 μ g of soluble products secreted by tumor cells or 10 ng/ml TNF- α . A [³²P]-labeled NF- κ B probe was used for the EMSA. Numbers below each lane indicate the fold increases with respect to non-stimulated controls. (B) Analysis of the NF- κ B complexes using the NF- κ B probe with nuclear extracts from HUVECs treated with 60 μ g of the soluble products secreted by EuHe pretreated with antibodies against the p65, the p50 NF- κ B subunits or competed with the unlabeled NF- κ B probe. The image is representative of three independent experiments. (C) EMSA analysis using an Sp1 probe with nuclear extracts from HUVECs treated with 60 μ g of soluble products secreted by tumor cells or 10 ng/ml TNF- α .

lity (arrow in Fig. 2A). The specificity of the DNA/NF- κ B complexes was confirmed using an unlabeled oligonucleotide probe as a competitor and with anti-p65 or anti-p50 antibodies (Fig. 2B). With both antibodies the putative NF- κ B complex was destabilized indicating the presence of both NF- κ B subunits. To confirm that this effect of the products derived from tumor cells on NF- κ B was specific, we evaluated the nuclear content of the Sp-1 transcription factor. Neither TNF- α nor the products derived from EuHe produced any change in the Sp-1 nuclear content, alone or in the presence of BAY 11-7085. Hence, conditioned media derived from both tumor cell lines contain factors that specifically activate NF- κ B, similar to TNF- α .

3.3. E-selectin does not participate in cell adhesion induced by tumor-secreted products

The expression of E-selectin on the cell surface was evaluated by flow cytometry. HUVECs treated with TNF- α or with the soluble products from LPS-activated macrophages for 4 h showed a 10-fold increase in fluorescence intensity above controls in 90% of the cells. In contrast, only 10% of the endothelial cell population treated with conditioned media from EuHe and Eusebla showed an equivalent increase in fluorescence intensity (Fig. 3A). While neutralizing antibodies against E-selectin reduced adhesion of U937 cells to endothelial cells treated with TNF- α by 36%, they had no effect on the adhesion to

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480

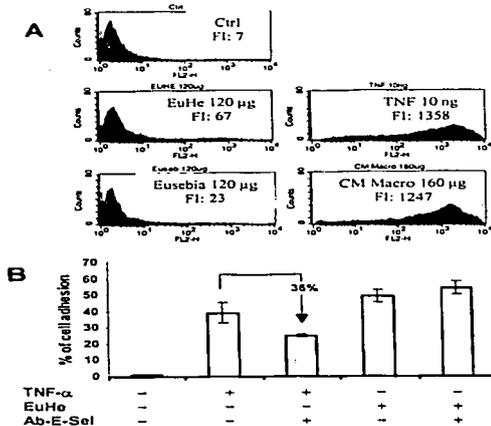


Fig. 3. E-selectin expression in response to TNF- α and pro-inflammatory cytokines compared to the soluble products derived from tumor cells. (A) Flow cytometry analysis of E-selectin expression on the surface of live HUVECs 3 h following stimulation with: TNF- α (10 ng/ml), soluble products derived from tumor cells (EuHe and Eusebia: 120 μ g/ml) or conditioned media from LPS-activated macrophages (CM Macro: 160 μ g/ml). FI: average of the relative fluorescence intensity. (B) Cell adhesion assay in the presence of 2 μ g/ml E-selectin neutralizing antibodies. HUVECs were pretreated with TNF- α (10 ng/ml) or with soluble products derived from the EUE cell line (60 μ g/ml).

endothelial cells pretreated with the soluble products derived from tumor cells (Fig. 3B). We conclude that E-selectin does not participate in the adhesion of U937 cells to HUVEC stimulated with the soluble factors derived from tumor cells, and is not expressed despite the activation NF- κ B.

3.4. Increased cell adhesion induced by tumor cell secreted products is dependent on NF- κ B

To confirm the link between the activation of NF-

κ B and the increase in cell adhesion, BAY 11-7085, a specific inhibitor of IKK-mediated phosphorylation of I κ B α , was used (Fig. 4A). In the presence of 5 μ M of the inhibitor, cell adhesion decreased by 54 and 44%, respectively in HUVECs pretreated with the soluble products derived from the EuHe and Eusebia cells. When tested against TNF- α or soluble factors secreted by LPS-activated macrophages, BAY 11-7085 led to an 88 and 92% respective decrease in cell adhesion (Fig. 4A). Two doses of BAY 11-7085 (1 and 5 μ M) reduced the translocation of NF-

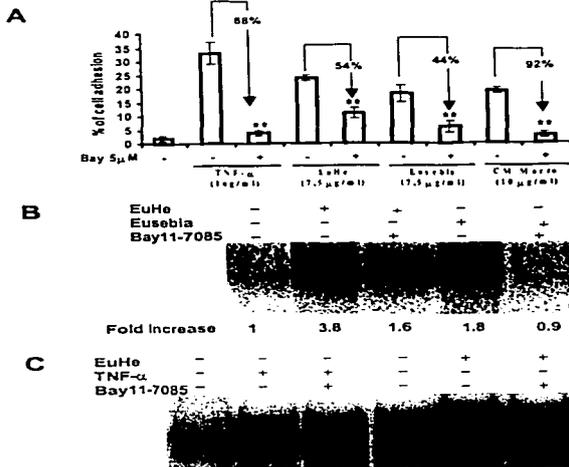


Fig. 4. Blocking NF- κ B activation interferes with cell adhesion induced by soluble products secreted by tumor cells. (A) Cell adhesion assay was performed as described in Fig. 1. HUVEC were pretreated with (+) or without (-) BAY 11-7085 for 1 h before addition of TNF- α (1 ng/ml), soluble factors derived from tumor cells (EuHe and Eusebia: 7.5 μ g/ml) or cytokines secreted by LPS-stimulated macrophages (Macto: 40 μ g/ml). (B) Reduced translocation of NF- κ B in the presence of BAY 11-7085 1 (B), or 5 (C) μ M. HUVECs were pre-incubated with the inhibitor for 1 h before stimulation with the soluble products derived from the tumor cells (15 μ g) or TNF- α (10 ng/ml). Numbers indicate the fold-increase of the signal of the NF- κ B complex with respect to untreated controls (lane 1). This image is representative of three independent experiments.

κ B in response to the soluble products derived from both tumor cell lines (Figs. 4B,C). While for Eusebia, 1 μ M of BAY 11-7085 was enough to produce complete inhibition of NF- κ B translocation, for EuHe and TNF- α 5 μ M of the inhibitor were required to obtain a similar effect. To prove that the inhibitory

effect of BAY 11-7085 is specific to NF- κ B, we analyzed its effect on the Sp-1 transcription factor (Fig. 2C). The inhibitor had no effect on Sp-1 nuclear content in HUVECs stimulated either with TNF- α or with the soluble products derived from the EuHe tumor cell line. We conclude that NF- κ B activation

K

A. Estrada-Hernul et al. / Cancer Letters 22 (2002) 222-232

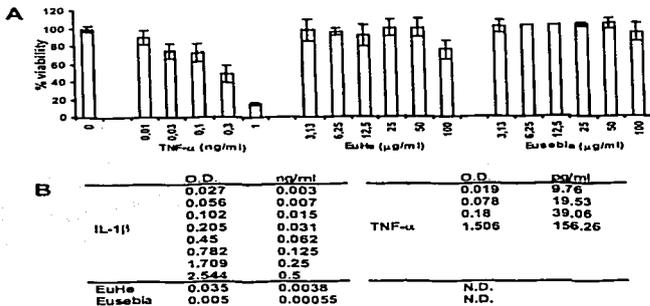


Fig. 5. Lack of TNF- α or IL-1 β among the soluble products secreted by tumor cells. (A) L929 murine fibroblasts were treated with the indicated doses of TNF- α or soluble factor from tumor cells. Cell viability was evaluated as described in materials and methods. (B) ELISA for TNF- α or IL-1 β in the soluble products secreted by tumor cells. ND: not detected.

is necessary for the increase in cell adhesion induced by tumor cell derived soluble products.

3.5. Soluble products derived from EuHe and Eusebia lymphomas lack TNF- α or IL-1 β

Endothelial activation activity secreted by tumor cells were retained an ultrafilter membrane with a 10 000 cut off value (Millipore) and past through a similar membrane with a 50 000 cut off value. Preliminary fractionation revealed that the activity was not retained in a Mono-S sepharose column (data not shown). None of the two conditioned media derived from tumor cells induced TNF- α associated cytotoxicity, even with and excess of 100 μ g of protein (Fig. 5A), nor was there any detectable TNF- α in the two conditioned media using ELISA tests (Fig. 5B). IL-1 β was detected in amounts below the minimum required to obtain any biological response, (0.5 pg/ml in EuHe and 3.9 pg/ml in Eusebia). Hence the change in

endothelial cell phenotype results from factors different to TNF- α or IL-1 β .

4. Discussion

Activated endothelial cells participate in neutrophilic and PMN adhesion and extravasation from the blood stream to the tissues during the inflammatory reaction [18]. Similar molecular mechanisms have been postulated for cell adhesion and extravasation of metastatic cells [19]. Here we report that soluble factors secreted by two human lymphoma cells alter the endothelial phenotype in vitro promoting an apparent activated state, in which increased adhesion of U937 cells is linked to the activation of NF- κ B.

Several studies indicate that tumor cells secrete soluble factors capable of inducing different phenotypic changes in human endothelial cells in vitro. B16M tumor cells secrete products that induce hepatic sinusoidal endothelial cells to liberate cytokines like IL-1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
764
765
766
767
768

that in an autocrine way promote the expression of VCAM-1 [5]. The conditioned media from Meth-A tumor cells contain factors that promote remodeling of endothelial cells *in vitro* [6]. In these cases the factor(s) responsible for these effects remains unknown. Although TNF- α and IL-1 β are the best characterized endothelial cell activators [20], ELISA tests and cytotoxicity assay for TNF- α provided no evidence for their presence among the soluble factors derived from EulE or Eusebia lymphoma cells. Hence, the factors responsible for the endothelial phenotypic changes induced by the conditioned media by these two human lymphomas are different to these two cytokines, they are between 10 000 and 50 000 in size and do not bind to Mono-S sepharose. We are currently exploring the presence of other proinflammatory cytokines. Based on the reported activators of NF- κ B in endothelial cells recently reviewed [21], and on the known physicochemical properties of the biological activity of the conditioned media, NGF is a likely participant, but not necessarily the only active factor secreted by tumor cells.

The soluble factors derived from tumor cells promoted translocation of NF- κ B complexes containing both the p65 and p50 subunits, that are likely to form heterodimers. This effect is specific to NF- κ B, since no change in the nuclear content of the transcription factor Sp-1 was observed in response to the soluble products derived from tumor cells, nor to TNF- α . Even in the presence of the inhibitor BAY 11-7085 Sp-1 nuclear content remained unchanged, indicating a specific effect for this inhibitor.

NF- κ B plays a crucial role in the activation of the endothelial cells in response to pro-inflammatory cytokines promoting the expression of E-selectin [5,19], which is necessary for cell adhesion of different tumor cells to endothelial cells [22]. Even though the amounts of NF- κ B translocated to the nucleus are similar for TNF- α and for the soluble products secreted by tumor cells, this was not enough to promote an equivalent expression of E-selectin, probably due to the lack of a co-stimulant signal induced by pro-inflammatory cytokines or to the activation of a signaling pathway with a repression effect. In addition, the lack of interference of anti-E-selectin neutralizing antibodies indicates that in these cell-cell interaction other cell adhesion molecules are required. Taken together, these discrepancies suggest the acti-

vation of different transduction pathways between TNF- α and the soluble factors secreted by tumor cells that nevertheless share NF- κ B activation.

Both cell adhesion and NF- κ B activation rose during stimulation with the tumor derived factors and decreased with the inhibitor of I κ B phosphorylation BAY 11-7085. The lack of complete interference of BAY 11-7085 with cell-adhesion suggests the participation of a signaling pathway not affected by this inhibitor. The fact that BAY 11-7085 completely blocked the adhesion in cells treated with TNF- α and the conditioned media of activated macrophages suggests that while cell activation by proinflammatory cytokines depends on I κ B degradation tumor cell derived factors require other I κ B isoforms [8].

In this study, two lymphoma cell lines that secrete products capable of activating endothelial cells were used. The Eusebia cell line, generated in nude mice injected with the original lymphoma EulE, retained biological activity able to change the endothelial phenotype. Hence the production of soluble factors capable of altering the endothelial phenotype was retained in the secondary tumor. The soluble products derived from these two cell lines differed only in the maximal levels of cell adhesion evoked, but presented the same effects on the translocation of NF- κ B and the interference with BAY 11-7085. Our results suggest that both cell lines secrete the same factor(s) responsible for the phenotypic change linked to NF- κ B activation. We postulate that the presence of endothelial activators derived from tumor cells act on NF- κ B, promoting gene expression patterns that lead to a phenotype characterized by an increased cell adhesion capacity. Although many different cell adhesion molecules may be expressed in response to different tumor derived products, NF- κ B activation may be a more common response. In consequence, tumor cell adhesion linked to NF- κ B activation in endothelial cells would be an ideal target for the interference of this cell-cell interaction.

Acknowledgements

We acknowledge, the Unit of Molecular Biology at the IFC, UNAM for the use of the flow cytometer and the phosphorimager. We thank the Servicio de Gineco-Obstetricia, Hospital General de Zona Tron-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

coso, IMSS in Mexico City for the umbilical cords. This work was supported by grants IN21-1900 (DGAPA, UNAM) and 400346-5-34878M (CONACYT). The authors thank Dr Felix Recillas and Dr Bruce Beutler for their critical review and useful advice.

References

- [1] F.W. Orr, H.H. Wang, R.M. Lafrenie, S. Scherbar, D.M. Nance, Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis, *J. Pathol.* 190 (2000) 310-320.
- [2] F.J. Burrows, D.O. Haskard, I.R. Hard, J.F. Marshall, S. Celisnik, S. Poole, P.E. Thorpe, Influence of tumor derived interleukin 1 on melanoma-endothelial cell interactions *in vitro*, *Cancer Res.* 51 (1991) 4768-4775.
- [3] R.G.S. Chirvi, C. Chiodoni, P. Mustani, A. Garofalo, S. Bernasconi, M.P. Colombo, R. Giavazzi, IL-1 α gene-transfected human melanoma cells increase tumor-cell adhesion to endothelial cells and their retention in the lung of nude mice, *Int. J. Cancer* 67 (1996) 856-863.
- [4] P. Bhal-Nakshatri, T.R. Newton, K. Goulet Jr, H. Nakshatri, NF- κ B activation and interleukin 6 production in fibroblasts by estrogen receptor-negative breast cancer cell-derived interleukin 1 α , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 6971-6976.
- [5] F. Vidali-Vanaclocha, P. Fantuzzi, L. Mendoza, A.M. Fuentes, M.J. Anasagasti, J. Martin, T. Carrascal, P. Walsh, L.L. Reznikow, S.H. Kim, D. Novack, M. Rubinstein, C.A. Dinarello, IL-18 regulates IL-1 β dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 734-739.
- [6] H. Kameda, Y. Tsutsumi, T. Kibira, S. Tsumoda, Y. Yamamoto, T. Mayama, *In vitro* remodeling of tumor vascular endothelial cells using conditioned medium from various tumor cells and their sensitivity to TNF- α , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208 (2000) 809-813.
- [7] C.S. Hill, R. Treisman, Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity, *Cell* 80 (1995) 199-211.
- [8] M. Karin, Y. Ben-Nerza, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activation, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 621-663.
- [9] T. Collins, M.A. Read, A.S. Neish, M.Z. Whitley, D. Thanos, T. Maniatis, Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers, *FASEB J.* 9 (1995) 899-909.
- [10] M. Nguyen, C.L. Corless, B.M. Kraling, C. Tran, T. Aiba, J. Inouchi, S.H. Baskin, Vascular expression of E-selectin is increased in estrogen-receptor-negative breast cancer. A role of tumor cell secreted interleukin-1 α , *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 1307-1314.
- [11] T. Krause, G.A. Turner, Are selectins involved in metastasis? *Clin. Exp. Metastasis* 17 (1999) 183-192.
- [12] E. Jaffe, R.L. Nachmen, G.C. Becker, C.R. Mimick, Culture of human endothelial cells from umbilical veins, *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 2745-2756.
- [13] E.I. Miranda, J.J. Montesinos, E.E. López, A. Martínez, M.H. Cellario, P. Pérez, H. Mayani, A. García-Carranca, A. Zentella, M. Gutierrez, Establishment and characterization of a Hodgkin's lymphoma cell line. Abstract from the XII Congress of the American Society of Hematology, New Orleans, LA, USA, Blood 94 (1999) 246.
- [14] F.G. Sajadi, K. Takabayashi, A.C. Foster, R.C. Donaghy, G.S. Firestein, Inhibition of TNF- α expression by adalimumab, *J. Immunol.* 156 (1996) 3435-3442.
- [15] L.M. McEvoy, *In vitro* assays of leukocyte-endothelial adhesion, in: L.A. Herzenberg, D.M. Weir, L.A. Herzenberg, C. Blackwell (Eds.), *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, II, Blackwell Science, Australia, 1996, pp. 70.1-70.7.
- [16] M. Reyes, A. Zentella, C. Rosales, Phosphatidylinositol 3-kinase mediated integrin-dependent NF- κ B and MAPK activation through separate signaling pathways, *Life Sci.* 71 (2001) 1579-1589.
- [17] S.M. Kramer, M.E. Carter, Serum-free *in vitro* bioassay for the detection of tumor necrosis factor, *J. Immunol. Methods* 93 (1986) 201-206.
- [18] N. Hogg, C. Herlin, Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking, *Immunol. Today* 16 (1995) 327-330.
- [19] B. Stoeckler, M. Hafner, P. Orosz, B. Niewandt, D.N. Mannel, Role of adhesion molecules and platelets in TNF-induced adhesion of tumor cells to endothelial cells: implications for experimental metastasis, *J. Inflamm.* 46 (1996) 155-167.
- [20] J.S. Pober Jr, M.A. Gimbrone, L.A. Lapierre, D.L. Mendrick, M. Fiers, R. Rubenstein, T.A. Springer, Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon, *J. Immunol.* 137 (1986) 1893-1896.
- [21] H.L. Pahl, Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors, *Oncogene* 18 (1999) 6853-6866.
- [22] M.H. Allen, M.K. Robinson, P.E. Stephens, D.M. Macdonald, N. Barker, E-selectin binds to squamous cell carcinoma and keratinocyte cell lines, *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 611-615.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

Albino P. A., Davis B. M., Nanus, D. M. 1991. Induction of growth factor RNA expresión in human malignant melanoma: markers of transformation. *Cancer Res*, 51:4815-4820.

Alkalay I., Yarom A., Hatzubai A., Jung S., Avraham A., Gerlitz O., Pashut-Lavon I., Ben-Neriah Y. 1995. Stimulation-dependent I κ B α phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*, 15:1294-1301.

Allen M. H., Robinson M. K., Stephens P. E., MacDonald D. M., Barker J. N. 1996. E-selection binds to squamous cell carcinoma and keratinocyte cell lines. *J Invest Dermatol*, 106:611-6115.

Anrather D., Millan M. T., Palmethofer A., Robson S. C., Geczy C., Ritchie A. J., Bach F. H., Ewenstein B. M. 1997. Thrombin activates nuclear factor- κ B and potentiates endothelial cell activation by TNF. *J Immunol*, 159:5620-5628.

Ardestani S. K., Inserra P., Salkoff D., Watson R. R. 1999. The role of cytokines and chemokines on tumor progression: A review. *Cancer Detec Preven*, 23:215-225.

Arenzana-Seisdedos F., Turpin P., Rodríguez M., Thomas D., Hay R. T., Virelizier J. L., Dargemont C. 1997. Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci*, 110:369-378.

Auerbach R., Alby L., Morrissey W., Tu M., Joseph J. 1985. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res*, 29:401-411.

Augustin H. G., Kozian D. H., Johnson R. C. 1994. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*, 16:901-906.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Augustin-Voss H. G., Pauli B. U. 1991. Modulation of endothelial cell surface glycoconjugate expression by organ-derived biomatrices. *Exp Cell Res*, 192:346-351.
- Augustin-Voss H. G., Pauli B. U. 1992. Migrating endothelial cells are distinctly hyperglycosylated and express specific migration-associated glycoproteins. *J Cell Biol*, 119:383-491.
- Baker A. H., George S. J., Zaltsman A. B., Murphy G., Newby A. C. 1999. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer*, 79:1347-1355.
- Bechard D., Scherpereel A., Hammad H., Gentina T., Tsiopoulos A., Aumercier M., Pestel J., Dessaint J. P., Tonnel A. B., Lasalle P. 2001. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 167:3099-3106.
- Bender D., Gottlicher M., Whiteside S., Rahmsdorf H. J., Herrlich P. 1998. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *EMBO J*, 17:5170-5181.
- Beraud C., Henzel W. J., Baeuerle P. A. 1999. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:429-434.
- Bhat-Nakshatri P., Newton T. R., Goulet R., Nakshatri H. 1998. NF- κ B activation and interleukin 6 production in fibroblasts by estrogen receptor-negative breast cancer cell-derived interleukin 1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:6971-6976.
- Birchmeier W., Behrens J. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta*, 1198:11-26.
- Borsig L., Wong R., Feramisco J., Nadeau D.R., Varki N.M., Varki A. 2001. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:3352-3357.

- Burnette W. N. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112:195-203.
- Burrows F. J., Haskard D. O., Hard I. R., Marshall J. F., Cellkirk S., Poole S., Thorpe P. E. 1991. Influence of tumor derived interleukin 1 on melanoma-endothelial cell interactions *in vitro*. *Cancer Res*, 51:4768-4775.
- Caceres-Cortes J. R., Alvarado-Moreno J. A., Waga K., Ranger-Corona R., Monroy-García A., Rocha-Zavaleta L., Urdiales-Ramos J., Weiss-Steider B., Haman A., Hugo P., Brousseau R., Hoang T. 2001. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leucemias. *Cancer Res*, 61:6281-6289.
- Caliguri M. A., Zmudzinas A., Manley T. J., Levin H., Smith K. A., Ritz J. Functional consequences of IL-2 receptor expression on resting human lymphocytes: identification of a novel NK subset with high affinity receptors. *J Exp Med*, 171:1509-1526.
- Callaway M. P., Briggs J. C. 1989. The incidence of late recurrence (greater than 10 years); an analysis of 536 consecutive cases of cutaneous melanoma. *Br J Plast Surg*, 42:46-49.
- Carter B. D., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B., Offenshauser N., Bohm-Matthaei R., Baeuerle P. A., Barde Y. A. 1996. Selective activation of NFκB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*, 272:542-545.
- Chambers A. F., MacKonald I. C., Schmidt E. E., Koop S., Morris V. L., Khokha R., Groom A. C. 1995. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev*, 14:279-301.
- Challberg M. D., Englund P. T. 1980. Specific labeling of 3' termini with T4 DNA polymerase. *Methods Enzymol*, 65:39-43.
- Chen F. E., Ghosh G. 1999. Regulation of DNA binding by Rel/NFκB transcription factors :structural views. *Oncogene*, 18 :6845-6852.

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

Cines D. B., Pollack E. J., Buck C. A., Loscalzo J., Zimmerman G. A., McEver R. P., Pober J. S., Wick T. M., Konkle B. A., Schwartz B. S., Schmidt A. M., Ster D. M. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91:3527-3561.

Cohen L., Henzel W. J., Baeuerle P. A. 1998. IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature*, 395:292-296.

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

Crawford H. C., Matrisian L. M. 1994. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis*, 14:234-245.

Delhase M., Hayakawa M., Chen Y., Karin M. 1999. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK beta subunit phosphorylation. *Science*, 284:309-313.

Dennis J. W. 1986. Effect of swainsonine and polyinosinic: poly-cytidylic acid on murine tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res*, 46:5131-5136.

Dennis J. W., White S. L., Freer A. M., Dime D. 1993. Carbonyloxy analogs of the anti-metastatic drug swainsonine. Activation in tumor cells by esterases. *Biochem Pharmacol* 46:1459-1466.

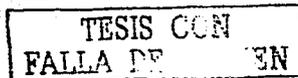
Derynck R., Goeddel D. V., Ullrich A., Gutterman J. U., Williams R. D., Bringman T. S., Berger W. H. 1987. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res*, 47:707-712.

DiDonato J. A., Hayakawa M., Rothwarf D. M., Zandi E., Karin M. 1997. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 388:548-554.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- DiDonato J. A., Mercurio F., Karin M. 1995. Phosphorylation of I κ B α precedes but is not sufficient for its dissociation from NF- κ B. *Mol Cell Biol*, 15 :1302-1311.
- DiDonato J. A., Mercurio F., Rosette C., Wu-Li J., Suyang H., Ghosh S., Karin M. 1996. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, 16:1295-1304.
- Dignam J. D., Leboritz R. M., Roeder R. G. 1983. Accurate transcription initiation by RBA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acid Res*, 11 : 1475-1489.
- Dotto G. P., Moellmann G., Ghosh S., Edwards M., Halaban, R. 1989. Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment. *J Cell Biol*, 109:3115-3128.
- Duczmal A., Schollahammer S., Katich S., Ebeling O., Schwartz-Albiez R., Altevogt P. 1997. The L1 adhesion molecule support alpha v beta 3-mediated migration of human tumor cells and activated T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 232:236-239.
- Duggan C., Maguire T., McDermott E., O'Higgins N., Fennelly J. J., Duffy M. J. 1995. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int J Cancer*, 61:597-600.
- el-Sabban E., Pauli B. U. 1991. Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cell and vascular endothelium. *J Cell Biol*, 115 :1375-1382.
- el-Sabban E., Pauli B. U. 1994. Adhesion-mediated gap junctional communication between lung metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis*, 14 :164-176.
- Engers R., Gabbert H. E. 2000. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126:682-692.
- Engers R., Gerharz C. D., Donner A., Mrzyk S., Krause-Paulus R., Petek O., Gabbert H. E. 1999. *In vitro* invasiveness of human epithelioid-sarcoma cell lines: association with cell motility and inverse correlation with the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases. *Int J Cancer*, 80:406-412.

- Estrada-Bernal A. 1998. Efecto del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en la expresi3n de mol3culas de adhesi3n en cultivos primarios de c3lulas endoteliales humanas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Etter H., Althaus R., Eugster H. P., Santamaria-Babi L. F., Weber L., Moser R. 1998. IL-4 and IL-13 downregulated rolling adhesion of leukocytes to IL-1 or TNF- α -activated endothelial cells by limiting the interval of E-selectin expression. *Cytokine*, 10:395-403.
- Farmer P., Pugin J. 2000. Beta-adrenergic agonists exert their "antiinflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279:L675-L682.
- Feng Y. Y., Dummer R., Geersten R., Hofbauer G., Laine E., Manolio S., Burg G. 1997. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer*, 71:630-637.
- Fidler I. 1990. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: Twenty-eight GHA Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, 50:6130-6138.
- Foekens J. A., van Putten W. L., Portengen H., de Koning H. Y., Thirion B., Alexieva F. J., Klijn J. G. 1993. Prognostic value of PS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis. *J Clin Oncol*, 11:899-908.
- Fong A. M., Robinson L. A., Steeber D. A., Tedder T. F., Yoshie O., Imai T., Patel D. D. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*, 188:1413-1419.
- Franca C. M., Jaeger R. G., Freitas V. M., Araujo N. S., Jaeger M. M. 2001. Effect of N-CAM on *in vitro* invasion of human adenoid cystic carcinoma cells. *Oral Oncol*, 37(8):638-642.
- Fried M. G. 1989. Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis*, 10:366-376.
- Gabbert H. 1985. Mechanisms of tumor invasion: evidence from *in vivo* observations. *Cancer Metastasis Rev*, 4:293-309.



Gabbert H. E., Meier S., Gerharz C. D., Hommel G. 1992. Tumor-cell dissociation at the invasion front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients. *Int J Cancer*, 50:202-207.

Gerli R., Gresele P., Bistoni O., Paolucci C., Lanfrancone L., Fiorucci S., Muscat C., Costantini V. 2001. Salicylates inhibit cell adhesion on endothelium under nonstatic conditions: induction of L-selectin shedding by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Immunol*, 166:832-840.

Gerli R., Paolucci C., Gresele P., Bistoni O., Fiorucci S., Muscat C., Belia S., Bertotto A., Costantini V. 1998. Salicylates inhibit adhesion and transmigration of T lymphocytes by preventing integrin activation induced by contact with endothelial cells. *Blood*, 92:2389-2398.

Gilmore T. D. 1999. The Rel/NF-kB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*, 18 :6842-6844.

Goetz D. J., Ding H., Atkinson W. J., Wachino G., Camphausen R. T., Cumming D. A., Luscinskas F. W. 1996. A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am J Pathol*, 149:1661-1673.

Goetz D. J., Ding H., Luscinskas F. W. 1995. A colon carcinoma cell lines adheres to P-selectin underflow conditions independent of PSGL-1. *Mol Cell Biol*, 6 :410a.

Gomez D. E., Alonso D. F., Yoshiji H., Thorgeirsson U. P. 1997. tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74:111-122.

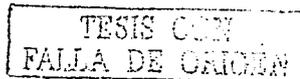
Goss P. E. Baptiste J., Fernandes B., Bajer M., Dennis J. W. 1994. A phase I study of swainsonine in patients with advanced malignancies. *Cancer Res*, 54:1450-1457.

Gridley G., McLaughlin J. K., Ekbohm A., Klareskog L., Adami H. O., Hacker D. G., Hoover R., Faumeni J. F. Jr. 1993. Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. *J Natl Cancer Inst*, 85:307-311.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Gui G. P., Wells C. A., Yeomans P., Jordan S. E., Vinson G. P., Carpenter R. 1996. Integrin expression in breast cancer cytology: a novel predictor of axillary metastasis. *Eur J Surg Oncol*, 22:254-258.
- Gumkowski F. G., Kamiska G., Kaminski M., Morissey L. W., Auerbach R. 1985. Heterogeneity of mouse vascular endothelium. *In vitro* studies using lymphatic, large vessel, and microvascular endothelial cells. *Blood Vessels*, 24:11-23.
- Hauser I. A., Setter E., Bell L., Madri J. A. 1993. Fibronectin expression correlates with U937 cell adhesion to migratin bovine aortic endothelial cells *in vitro*. *Am J Path*, 143:173-180.
- Hawes B. E., Luttrell L. M., van Biesen T., Lefkowitz R. J. 1996. phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem*, 271:12133-12136.
- Hellman K. 1991. Entry of cancer cells into the vasculature. En Orr F. W., Buchanan M. R., Weiss L. (Eds). *Microcirculation in Cancer Metastasis*. Boca Raton, FL, CRC Press. Pp 67-77.
- Hershko A., Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67:425-479.
- Hill G. E., Whitten C. W. 1997. the role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis, and the propagation of disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 11:316-321.
- Hirano T., Fukada T. 2001. IL-6 Ligand and receptor family. en Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Oppenheim J. J., Feldman M. Eds. Academic Press. U.S.A. pp 523-535.
- Hogg N., Berlin C. 1995. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol Today*, 16:327-330.
- Honn K. V., Tang D. G., Grossi I. M., Reanud C., Duniec Z. M., Johnson C. R., Diglio C. A. 1994. Enhanced endothelial cell retraction mediated by 12(S)-HETE: A proposed mechanism for the role of platelets in tumor cell metastasis. *Exp Cell Res*, 210 :1-9.

- Hsu M. H., Wang M., Browning D., Mukaida N. 1999. NF-kappaB activation is required for C5a-induced interleukin-8 gene expression in mononuclear cells. *Blood*, 93:3241-3249.
- Imbert V., Rupec R. A., Livosli A., Pahl H. L., Traenckner E. B., Mueller-Dieckmann C., Farahifar D., Rossi B., Auberger P., Baeuerle P. A., Peyron J. F. 1996. Tyrosine phosphorylation of IkappaB alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of Ikappa B-alpha. *Cell*, 85:149-158.
- Isseckutz A. C. 1983. Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography. *J Immunol Methods*, 61:275-281.
- Iwai K., Ishikura H., Kaji M., Sugira H., Ishizu A., Takahashi C., Kat T., Yoshiki T. 1993. Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer*, 54:972-977.
- Jaffe, E. A., Nachmen R. L., Becker G. C., Minick C. R. 1973. Culture of human endothelial cells from umbilical veins. *J Clin Invest*, 52: 2745-2756.
- Jiang M. C., Liao C. F., Lee P. H. 2001. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits *in vitro* invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 282:671-677.
- Jiang W. G. 1998. Cell adhesion molecules in the formation of liver metatasis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 5:375-382.
- Johnson J. P. 2000. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Met Rev*, 18:345-357.
- Johnson L. N., Noble M. E. M., Owen D. J. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85:149-158.
- Kaji M., Ishikura H., Kishimoto T., Omi M., Ishizu A., Kimura T., Takahashi H., Kato H., Yoshiki T. 1995. E-selectin expression induced by pancreas-carcinoma-derived interleukin-1a results in enhanced adhesion of pancreas-carcinoma cells to endothelial cells. *Int J Cancer*, 60:712-717.
- Kamada H., Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Yamamoto Y., Mayumi T. 2000. *In vitro* remodeling of tumor vascular endothelial cells using conditioned



médium from various tumor cells and their sensitivity to TNF- α . *Biochem Biophys Res Comm*, 268: 809-813.

Karin M. 1999. How NF κ B is activated : the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18 :6867-6874.

Karin M., Delhase M. 1998. JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB wich are the targets for MEK kinase 1 action?. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:9067-9069.

Karin M., Lin A. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 3:221-227.

Khokha, R., Martin, D. C., Fata, J. E. 1995. Utilization of transgenic mice in the study of matrix degrading proteinases and their inhibitors. *Cancer Met Rev*, 14:97-111.

Kim L.T., Yamada K. M. 1997. The regulation of expression of Integrin receptors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 214:123-131.

Kopp E., Ghosh S. 1994. Inhibition of NF-kB by sodium salicylate and aspirin. *Science*, 265:956-959.

Kramer, S. M., Carver M. E. 1986. Serum-free *in vitro* bioassay for the detection of tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods*. 93:201-206.

Krause T., Turner, G. A. 1999. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metas*, 17:183-192.

Krugmann S., Hawkins P. T., Pryer N., Braselmann S. 1999. characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. *J Biol Chem*, 274:17152-17158.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Lafrenie R. M., Gallo S., Podor T. J., Buchanan M. R., Orr F. W. 1994. The relative roles of vitronectin receptor, E-selectin and α 4 β 1 in cancer cell adhesion to interleukin-1-treated endothelial cells. *Eur J Cancer*, 30A:2151-2158.

Langley R. R., Carlisle R., Specian R. D., Gerritsen M. E., Granger D. N. 2001. Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma. *Microcirculation*, 8:335-345.

- Lauri D., Bertomeu M. C., Orr F. W., Bastida E., Sauder D., Buchanan M. R. 1990. Interleukin-1 increases tumor cell adhesion to endothelial cells through an RGD dependent mechanism: *In vitro* and *in vivo* studies. *Clin Exp Metastasis*, 8:27-32.
- Lázár-Molnár E., Hegyesi H., Tóth S., Falus, A. 2000. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*, 12(6):547-554.
- Lee K. S., Buck M., Hougum K., Chojkier M. 1995. Activation of hepatic stellate cells by TGF- α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest*, 96:2461-2468.
- Leavy Y., Tsapis A., Brouet J. C. 1991. IL-6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. *J Clin Invest*, 88:696-699.
- Lewalle J. M., Bajou K., Desreux J., Mareel M., Dejana E., Noel A., Foidart J. M. 1997. Alteration of inter-endothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction *in vitro*. *Exp Cell Res*, 237:347-356.
- Lewalle J. M., Cataldo D., Desreux J., Lambert C. A., Foidart J. M. 1998. Endothelial cell intracellular Ca²⁺ concentration is increased upon breast tumor cell contact and mediates tumor cell transendothelial migration. *Clin Exp Metastasis*, 16:21-29.
- Li N., Karin M. 1998. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF- κ B through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:13012-13017.
- Li Y., Kang J., Friedman J., Tarassishin L., Ye J., Kowalenko A., Wallach D., Horwitz M. S. 1999. Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF- κ B activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:1042-1047.
- Liu W., Davis D. W., Ramirez K., McConkey D. J., Ellis L. M. 2001. Endothelial cells apoptosis is inhibited by a soluble factor secreted by human colon cancer cells. *Int J Cancer*, 92:26-30.
- LiVolsi V. A. 1973. Anti-metastatic effect of aspirin. *The Lancet*, Aug 4, 2:263.

Maeda K., Kang S. M., Sawada T., Nishiguchi Y., Yashiro M., Ogawa Y., Ohira M., Ishikawa T., Hirakawa Y. S., Chung K. 2002. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 9:511-514.

Mantovani A., Sozzani S., Introna M. 1997. Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci USA*, 832:93-116.

Marches R., Scheuermann R. H., Uhr J. W. 1998. Cancer dormancy: role of cyclin-dependent kinase inhibitors in induction of cell cycle arrest mediated via membrane IgM. *Cancer Res*, 58:691-697.

Mareel M.M., van Roy F. M., Bracke M. E. 1993. How and when do tumor cells metastasize?. *Crit Rev Oncol*, 4:559-594.

Matsumoto S., Imaeda Y., Umemoto S., Kobayashi K., Suzuki H., Okamoto T. 2002. Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br J Cancer*, 86:161-167.

McEvoy L. M. 1996. *In vitro* assays of leukocyte-endothelial adhesion en Weir's handbook of experimental immunology Vol. II. Herzenber L. A., Weir D. M. Herzenber L. A. Blackwell C. Eds. Blackwell Science Australia. pp 70.1-70.7.

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

Mercurio F., Murray B. W., Shevchenko A., Bennett B. L., Young D. B., Li J. W., Pascual G., Motiwala A., Zhu H., Mann M., Manning A. M. 1999. IkkappaB kinase (IKK) associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol*, 19:1526-1538.

Meyer, T., Hart, I. R. 1998. Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer*, 23:214-221.

Mills A. N., Haworth S. G. 1986. Changes in lectin binding patterns in the developing pulmonary vasculature of the pig lung. *J Pathol*, 149:191-199.

Miranda E. I., Montesinos J. J., Lopez E. E., Martínez A., Collazo M. H., Pérez P., Mayani A., García-Carrancá A., Zentella A., Gutiérrez M. 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Establishment and characterization of a Hodgkin's lymphoma cell line. Resumen presentado en el XLI Congreso de la American society of Hematology. New Orleans, Louisiana, USA. Blood, 94:246.
- Modur V., Zimmerman G. A., Prescott S. M., McIntyre T. M. 1996. Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor α . J Biol Chem, 271:13094-13102.
- Muller W. A. 1995. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies *in vitro* and *in vivo*. J Leukocyte Biol, 57:523-528.
- Murga C., Languinge L., Wetzker R., Cuadrado A., Gutkind J. S. 1998. Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors: a role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH- Kinasegamma. J Biol Chem, 273:19080-19085.
- Nakamori S., Kameyama M., Imaoka S., Furukawa H., Ishikawa O., Sasaki Y., Kabuto T., Iwanaga T., Matsushita Y., Irimura T. 1993. Increased expression of sialyl Lewis X antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. Cancer Res, 53:3632-3637.
- Nicolson G. L. 1991. Gene expression, cellular diversification and tumor progression to the metastatic phenotype. Bioessays, 13:337-342.
- Nidai O., Mayo L. D., Gustin J. A., Pfeiffer S. R., Pfeiffer L. M., Donner D. B. 1999. NF- κ B activation by tumor necrosis factor requires the AKT serine-threonine kinase. Nature, 401:82-85.
- Nidal-Ozes O., Mayo L. D., Gustin J. A., Pfeiffer S. R., Pfeiffer L. M., Donner D. B. 1999. NF- κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. Nature, 401:82-85.
- Nobes C. D., Hall A. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. J Cell Biol, 144:1235-1244.
- Nozaki, S., Sledge, G. W., Nakshatri H. 2000. Cancer cell-derived interleukin 1α contributes to autocrine and paracrine induction of pro-metastatic genes in breast cancer. Biochem Biophys Res Comm, 275:60-62.

- Okahara H., Yagita H., Miyake K., and Okumura K. 1994. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and cascaral cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res*, 54:3233-3236.
- Olashaw N. E., Kowalik T. F., Huang E. S., Pledger W. J. 1992. Induction of NF-kappa B-like activity by platelet-derived growth factor in mouse fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 3:1131-1139.
- Orlidge A., D'Amore P. A. 1987. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Bio*, 105:1455-1462.
- Orr, W. F., Wang, H. H., Lafrenie, R. M., Scherbarth, S., Nance, D. M. 2000. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol*, 190:310-329.
- Pahl H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene*, 18:6853-6866.
- Palecek S. P., Loftus J. C., Ginsberg M. H., Lauffenburger D. A., Horwitz A. F. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385:537-540.
- Pianetti S., Arsura M., Romieu-Maurez R., Coffey J. R., Somenshein G. E. 2001. Her2/neu overexpression induces NF-kB via a P13 Kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of I-kB- α that can be inhibited by tumor suppressor PTEN. *Oncogene*, 20:1287-1299.
- Pober J. S., Gimbrone Jr. M. A., Lapierre L. A., Mendrick D. L., Fiers W., Rothlen R., Springer T. A. 1986. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*, 137:1893-1896.
- Powles T. J., Easty G. C., Easty D. M., Neville A. M. 1973. Anti-metastatic effect of aspirin. *The Lancet*, Jul 14, 2:100.
- Pressman D., Yagi Y. 1964. Chemical differences in vascular beds. En Colwell A. R., Meyer K. (Eds). *Small blood vessel involvement in Diabetes Mellitus*. Washington, DC., AIBS. Pp 177-183.

Racila E., Hsueh R., Marches R., Tucker T. F., Kramer P. H., Scheuermann R. H., Uhr J. W. 1996. Tumor dormancy and cell signaling: anti-mu-induced apoptosis in human B-lymphoma cells is not caused by an APO-1-APO-1 ligand interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:2165-2168.

Rahman E., Anwar K. N., Uddin S., Xu N., Ye R. D., Platanias L. C., Malik A. B. 2001. Protein kinase C-delta regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells via activation of p38 mitogen activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, 21:5554-5565.

Ray J. M., Stetler-Stevenson W. G. 1994. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis, and angiogenesis. *Eur Respir J*, 7:2062-2071.

Réginer C. H., Song H. Y., Gao X., Goeddel D. V., Cao Z., Rothe M. 1997. Identification and characterization of an IkappaB-kinase. *Cell*, 90:373-383.

Ridley A. J., Comoglio P. M., Hall A. 1995. Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol*, 15:1110-1122.

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

Rodeck U., Bossler A., Graeven U., Fox F. E., Nowell P. C., Knabbe C., Kari C. S. 1994. Transforming growth factor β production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res*, 54:575-581.

Romashkova J. A., Makarov S. S. 1999. NF-kB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, 401:86-90.

Rosales C., O'Brien V., Kornberg L., Juliano R. 1995. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1242:77-98.

Rothwarf D. M., Zandi E., Natoli G., Karin M. 1998. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, 395:297-300.

Roussel E., Gingras M. C., Ro J. Y., Branch C., Roth J. A. 1994. Loss of alpha 1 beta 1 and reduced expression of other beta 1 integrins and CAM in lung adenocarcinoma compared with pneumocytes. *J Surg Oncol*, 56:198-208.

Sachdev S., Hoffmann A., Hannink M. 1998. Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat of the Ikappa B alpha ankyrin repeats

define a novel class of cis-acting nuclear import sequence. *Mol Cell Biol*, 18 :2524-2534.

Sajjadi F. G., Takabayashi K., Foster A. A., Domingo R. C., Firestein G. S. 1996. Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine : role of A3 adenosine receptors. *J Immunol*, 156 :3435-3442.

Sandig M., Voura E. B., Kalnins V. I., Siu C. H. 1997. Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton*, 38:351-364.

Sato, M., Narita, T., Kimura, N., Zenita, K., Hashimoto, T. 1995. The association of sialyl Lewis x antigen with the metastatic potencial of human colon cancer cells. *Anticancer Res*, 17:3505-3512.

Sawada R., Lowe J. B., Fukuda M. 1993. E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell surface lamp-1 expression levels. *J Biol Chem*, 268:12675-12681

Sawada R., Tsuboi S., Fukuda M. 1994. Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer with distinct metastatic potential. *J Biol Chem*, 269:1425-1431.

Schadendorf D., Heidel J., Gawlik C., Suter L., Czarnetzki B. M. 1995. Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J Natl Cancer Inst*, 87:366-371.

Schmitz M. L., Bacher S., Kracht M. 2001. I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci*, 26:186-190.

Sen R., Baltimore D. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46 :705-716.

Sheetz M. P., Felsenfeld D., Galbraith C. G., Choquet D. 1999. Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp*, 65:223-243.

Sheppard K. A., Rose D. W., Haque Z. K., Kurokawa W., McInerney E., Westin S., Thanos D., Rosenfeld M. G., Glass C. K., Collins T. 1999. Transcriptional activation by NF- κ B requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol*, 19:6367-6378.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Shih, I. y Herlin, M. 1993. Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol*, 100:S196-S203.

Shirota K., Kató Y., Irimura T., Kondo H., Sugiyama Y. 2001. Anti-metastatic effect of the sialyl-lewis-X analog GSC-150 on the human colon carcinoma derived cell line KM 12-HX in the mouse. *Biol Pharm Bull*, 24:316-319.

Silye R., Karayiannakis A. J., Syrigos K. N., Poole S., van Noorden S., Batchelor W., Regele H., Segá W., Boesmueller H., Krausz T., Pignatelli M. 1998. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytes lesions. *J Pathol*, 186:350-355.

Simiantonaki N., Jayasinghe C., Kirkpatrick C. J. 2002. Effect of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules *in vitro*. *Exp Mol Path*, 73:46-53.

Springer T. A. 1994. Traffic signals for lymphocytes recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76:301-314.

Stallmach A., von Lampe B., Matthes H., Bornhoft, G., Riecken E. O. 1992. Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation. *Gut*, 33:342-346.

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

Stone J. P., Wagner D. D. 1993. P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J Clin Invest*, 92:804-813.

Suggs S. V., Wallace R. B., Hirose T., Kawashima E. H., Itakura K. 1981. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human b2 microglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:6613.

Sugino T., Kawaguchi T., Suzuki T. 1993. Sequential process of blood-borne lung metastases of spontaneous mammary carcinoma in C3H mice. *Int J Cancer*, 55:141-147.

Sultana C., Shen Y., Rattan V., Kalra V. K. 1996. Lipoxygenase metabolites induced expression of adhesion molecules and transendothelial migration of

monocyte-like HL-60 cells is linked to protein kinase C activation. *J Cell Physiol*, 167:477-487.

Sun W. H., Kreisler R. A., Phillips A. W., Ershler, W. B. 1992. *In vivo* and *in vitro* characteristics of interleukin-6-transfected B16 melanoma cells. *Cancer Res*, 52:5412-5415.

Tamaki M., Acyagi M., Morita Z., Hirakawa K., Murota S. 1995. Cell adhesion molecules acting between C6 glioma and endothelial cells. *J Neurooncol*, 24:283-286.

Tang D. G., Timar J., Grossi I. M., Renaud C., Kinler V. A., Diglio C. A., Taylor J. D., Honn K. V. 1993. The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE induces a protein kinase C- dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cell. *Exp Cell Res*, 207:361-375.

Tang D. G., Tarrien M., Dobrzynski P., Honn K. V. 1995. Melanoma cell spreading on to fibronectin induced by 12(S)-HETE involves both protein kinase C- and protein tyrosine kinase-dependent focal adhesion formation and tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125^{FAK}). *J Cell Physiol*, 165 : 291-306.

Thorlacius H., Prieto J., Raud J., Gauta N., Patarroyo M., Hedquist P., 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.

Torzewski M., Sarbia M., Verreet P., Dutkowski P., Heep H., Willers R., Gabbert H. E. 1997. Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator expression in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Clin Cancer Res*, 3:2263-2268.

Tözeren A., Kleinman H. K., Grant D. S., Morales D., Mercurio A. M., 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.

Tsujii M., Dubois R. N., 1995. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells over-expressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83:493-501.

TESIS
FALLA DE ORIGEN

Vidal-Vanaclocha F., Fantuzzi G., Mendoza L., Fuentes A. M., Anasagasti M. J., Martín J., Carrascal T., Walsh P., Reznikov L. L., Kim S. H., Novick D., Rubinstein M., Dinarello, C. A. 2000. IL-18 regulates IL-1- β -dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:734-739.

Vitetta E. S., Tucker T. F., Racila E., Huang Y. W., Marches R., Lane N., Scheuermann R. H., Street N. E., Watanabe T., Uhr J. W. 1997. Tumor dormancy and cell signaling. V. Regrowth of the BCL1 tumor after dormancy is established. *Blood*, 89:4425-4436.

Vlemminkx K., Wakaet Jr L., Mareel M., Fiers W., Van Roy F. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66:107-119.

Voura E. B., Sandig M., Siu C. H. 1998. Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microsc Res Tech*, 43:265-275.

Wang X., Fu X., Brown P. D., Crimmin M. J., Hoffman R. M. 1994. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batismastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res*, 54:4726-4728.

Ward P. A., Marks R. M. 1989. The acute inflammatory reaction. *Curr Opin Immuno*, 2:5-9.

Weinel R. J., Rosendahl A., Pinschmidt E., Kisker O., Simon B., Santoso S. 1995. The alpha 6-integrin receptor in pancreatic carcinoma. *Gastroenterology*, 108:523-532.

Weiss L., Dimitrov D. S., Angelova M. 1985. The haemodynamic destruction of intravascular cancer cells in relation to myocardial metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82:5737-5741.

Weiss L., Nannmark U., Johansson B. R., Bagge U. 1992. Lethal deformation of cancer cells in the microcirculation: a potential rate regulator of hematogenous metastasis. *Int J Cancer*, 50:103-107.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Wood J. N. 1995. Regulation of NF-kappaB activity in rat dorsal root ganglia and PC12 cells by tumor necrosis factor and nerve growth factor. *Neurosci Lett*, 192:41-44.

Xie P., Browning D. D., Hay N., Mackman N., Ye R. D. 2000. Activation of NF-kappa B by bradykinin through a Galpha q- and Gbeta gamma dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. *J Biol Chem*, 275:24907-24914.

Yanagawa H., Sone S., Takahasi Y., Haku T., Yano S., Shinohara T., Ogura T. 1995. Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer. *Br J Cancer*, 71:1095-1098.

Yaron A., Hatzubai A., Davis M., Lavon I., Amit S., Manning A. M., Andersen J. S., Mann M., Mercurio F., Ben-Neriah Y. 1998. Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature*, 396:590-594.

Ye R. D. 2001. Regulation of nuclear factor kB by G-protein coupled receptor. *J Leuko Biol*, 70:839-848.

Yin M. J., Yamamoto Y., Gaynor R. B. 1998. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of IkB kinase- β . *Nature*, 396:77-80.

Yoshioka T., Masuko T., Kotanagi H., Aizawa O., Saito Y., Nakazato H., Koyama K., Hashimoto Y. 1998. Homotypic adhesion through carcinoembryonic antigen plays a role in hepatic metastasis development. *Jpn J Cancer Res*, 89:177-185.

Zandi E., Rothwarf D. M., Delhase M., Hayakawa M., Karin M. 1997. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits IKKalpha and IKK beta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, 91:243-252.

Zhu D., Cheng C. F., Pauli B. U. 1991. Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:9568-9572.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN