



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“CARACTERIZACIÓN DE LA ADHESIÓN CELULAR
ENTRE CÉLULAS TUMORALES Y ENDOTELIALES
ACTIVADAS IN VITRO ”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA
L.E. DELINA GUADALUPE MONTES SÁNCHEZ

TUTOR
Dr. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

CO-TUTOR
Dra. LETICIA BUCIO ORTIZ

ASESORES EXTERNOS
Dra. REBECA LOPEZ MARURE
Dra. MYRNA SABANERO LOPEZ

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2003

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, forma parte del padrón de programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0; y actualmente se encuentra dentro del padrón de programas del PIFOP-CONACYT, clave: C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por el CONACYT con número 162603.

CARACTERIZACION DE LA ADHESIÓN CELULAR ENTRE
CELULAS TUMORALES Y CELULAS ENDOTELIALES
ACTIVADAS *in vitro*.

TESIS QUE PRESENTA:

L. E. DELINA GUADALUPE MONTES SÁNCHEZ

Para optar por el grado en

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tutor

Dr. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

COMITÉ TUTORAL

Tutor

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Instituto de Fisiología Celular

UNAM

azentell@ifc.unam.mx

Asesor Interno (Co-Tutor)

Dra. Leticia Bucio Ortiz

Depto. Ciencias de la Salud

UAM-Izt

lebo@xanum.uam.mx

Asesores Externos

Dra. Rebeca López Marure

Depto. Biología Celular

INC-Ignacio Chávez

rlmarure@yahoo.com.mx

Dra. Myrna Sabanero López

Instituto de Investigaciones en B.E

Universidad de Guanajuato

myrna@quijote.ugto.mx

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 19 de septiembre de 2003.

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Presidente

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Secretaria

Dra. Rocio Alcántara Hernández
Vocal

M. en C. Mina Konigsberg Fainstein
Vocal

Dra. Rebeca López Marure
Vocal

A mi tutor, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, por todo su apoyo, su paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo y porque sin conocerme confió en mí y en mi capacidad para sacar este proyecto adelante.

A Carlos Corona su amor y su apoyo desde siempre, sin su compañía y sin sus palabras de aliento en todo este tiempo, las circunstancias para mí hubieran sido mucho más difíciles de sobrellevar.

A mi madre, Erika Sánchez, por la comprensión, las palabras de motivación y las bendiciones con todo cariño que siempre he recibido de ella y que me han impulsado a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a mi comité tutorial: Dra. Myrna Sabanero López, Dra. Rebeca López Marure y a la Dra. Leticia Bucio Ortiz por todas sus críticas y opiniones, que me fueron muy útiles para mejorar el proyecto.

Agradezco todo su apoyo y cariño a toda mi familia, que son una parte indispensable en mi vida, mi abuelita Lotte, mis tías Yolanda y Dorothy, mis primos Rodolfo y Nadia, así como a las familias Lamegos Sánchez y Hernández Sánchez. Todos ellos saben cuanto los quiero.

Gracias también a la familia Ramírez Fitzner por la hospitalidad y cariño que me brindaron al inicio de esta etapa.

Ahora, quiero agradecer tantos momentos compartidos de clases y diversión a mis compañeros de la maestría, Estrella, Mayra, Suguey, Saúl, Carlos y José, me siento muy contenta de haberlos conocido y de poder contar con su amistad, por todo ese tiempo, muchas gracias.

Agradezco también a todos mis compañeros del laboratorio 204-sur del IFC, ya que con ellos también he pasado muchos buenos momentos y mucha diversión, gracias por brindarme su amistad, su ayuda en muchas ocasiones, su asesoría y apoyo a: José Luis, Adriana, Lucía, Criselda, Catalina, Erika, Francisco, Josué, Nohemí, Albino, Emilio, Fernando, Melchor, Salvador, Omar, Rocio Camarillo y Aidé.

Igualmente, doy las gracias a Rocio Alcántara y Paty Casas porque he contado con su amistad sincera desde que estoy en el IFC.

Muchísimas gracias también a mis amigos Sandra y Ricardo por su amistad y por todos los momentos divertidos que hemos pasado juntos en la ciudad.

Quiero agradecer la inigualable amistad y cariño de mis queridísimas amigas Rosario, Gaby, Verónica Paz y Verónica Aragón, a las que siempre recuerdo y que siempre han tenido palabras de aliento para mí y con las cuales comparto bonitos recuerdos y grandes momentos de mi vida.

A todas las personas aquí mencionadas y a todas las que de una u otra forma han contribuido a mi superación y a la culminación de esta etapa en mi vida, mil gracias por todo, espero contar con ustedes siempre.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. Cáncer (Fenotipo celular tumoral)	2
a. Oncogenes y genes supresores de tumores	3
b. Desarrollo tumoral y angiogénesis	7
II. Metástasis	8
III. Adhesión celular	14
a. Activación endotelial	15
b. Moléculas de adhesión	15
i. Selectinas	16
ii. Superfamilia de las inmunoglobulinas	17
iii. Integrinas	18
IV. Participación de moléculas de adhesión en metástasis	20
V. Alteraciones morfológicas celulares en la adhesión y metástasis	21
VI. Respuesta inflamatoria	24
ANTECEDENTES	28
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	33

MATERIALES Y MÉTODOS	34
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	76

RESUMEN

La metástasis es la invasión de células tumorales en órganos blanco distintos al lugar de origen, y se presenta en estadios avanzados de la progresión del cáncer. Los mecanismos por los cuales los tumores progresan a un estadio invasivo no son aún bien entendidos, se ha postulado que en etapas avanzadas, la célula tumoral puede migrar a través de la capa endotelial a la matriz extracelular donde prolifera y forma un depósito metastático.

Los endotelios preactivados con citocinas como el TNF- α o la IL-1 β presentan un incremento en la adhesión de leucocitos y de líneas tumorales humanas como las células U937. En este trabajo, hemos valorado si el incremento en adhesión resulta de un aumento en la capacidad adhesiva de toda la población de células endoteliales humanas derivadas de cordón umbilical (HUVEC), o si existe heterogeneidad en la capacidad adhesiva de las células pre-estimuladas con citocinas pro-inflamatorias. El análisis de la adhesión se realizó por medio de un conteo celular determinando cuantas células U937 son adheridas por cada célula endotelial. Los resultados muestran que la capacidad adhesiva es heterogénea, ya que tanto en cultivos de HUVECs control como en cultivos pre-estimulados con el TNF- α o la IL-1 β , siempre hay células endoteliales que no presentan células U937 adheridas. Desconocemos las bases moleculares que expliquen esta heterogeneidad en la capacidad de adhesión detectada *in vitro*, pero podrían reflejar una heterogeneidad funcional *in vivo*.

Paralelamente a los estudios orientados a analizar la heterogeneidad en la adhesión, se realizaron estudios orientados a identificar la presencia de moléculas de superficie que participaran en la adhesión intercelular entre el endotelio y las células U937 por medio de inmunocitofluorescencia indirecta. Las moléculas de adhesión analizadas en los experimentos de adhesión entre las células, fueron ICAM-1 y las integrinas β_1 y β_2 . Los resultados mostraron un aumento de intensidad en la señal fluorescente de ICAM-1 y la integrina β_1 en las adhesiones entre ambas células. La presencia de la integrina β_2 , solo fue detectable sobre las células U937 en estos ensayos.

La última parte de la caracterización antigénica por medio de inmunocitofluorescencia, durante la adhesión entre células endoteliales y células U937, consistió en analizar el citoesqueleto de las células una vez establecido el contacto para tratar de identificar cambios en las morfologías celulares o zonas de despolimerización de las fibras que sugirieran la preparación de las células para una migración o diapédesis. La tinción para filamentos de tubulina, permitió observar la presencia de prolongaciones en las células U937 a manera de pseudópodos sobre las células endoteliales, sin embargo, estas extensiones no fueron observables cuando se analizó la tinción para los filamentos de actina.

Las imágenes obtenidas con los anticuerpos son alentadoras ya que indican que es posible obtener información que evidencie la presencia de moléculas de adhesión y cambios en los filamentos del citoesqueleto en sitios de contacto entre las células U937 y las células endoteliales.

INTRODUCCIÓN

I. CANCER (FENOTIPO CELULAR TUMORAL)

La existencia de un período de vida limitado en el tiempo (crecer, reproducirse y morir) es una de las características de los organismos multicelulares complejos, en alguna de estas etapas pueden presentarse mutaciones que se asocian con la aparición de tumores. El estudio genético y molecular de las células ha permitido identificar los genes afectados por estas mutaciones e identificar los procesos celulares que presentan un comportamiento alterado. El patrón común de las células tumorales o fenotipo celular tumoral, indica que el comportamiento se debe en gran medida a alteraciones en los mecanismos de regulación de tres procesos celulares: i) el control del ciclo celular, ii) la muerte celular programada y iii) la diferenciación celular. Mientras que, en las primeras fases de la progresión tumoral, las mutaciones en un grupo restringido de genes generan una proliferación descontrolada, en etapas posteriores, la adquisición de mutaciones adicionales confieren la habilidad de invadir tejidos circundantes y la capacidad de proliferar en sitios nuevos e inapropiados, lo que tiene generalmente consecuencias letales para el organismo (Klein, 2000; Lewin, 2000).

Aunque la progresión tumoral parece un proceso lineal consecutivo, en realidad es un proceso de selección de una población heterogénea de las células tumorales. Esta heterogeneidad, es el resultado de la inestabilidad genética de las células tumorales, lo que implica que dentro de una masa tumoral existen múltiples subpoblaciones celulares con diversas características genéticas que se manifiestan como pequeñas variaciones en los aspectos bioquímicas, inmunológicas y biológicas. La interacción de estas poblaciones con su micro-ambiente, selecciona a las variantes tumorales para promover la proliferación con características favorables tumorales y eliminar a las que carecen de este fenotipo. Así, un solo tipo tumoral identificado en dos individuos puede presentar un comportamiento similar e incluso expresar marcadores antigénicos comunes, pero presentan diferentes mutaciones en diferentes genes. Esta variabilidad genética implica que en realidad una enfermedad oncológica particular es una colección de enfermedades con una diferente etiología pero con semejanzas fenotípicas. Para complicar más esta visión, el estudio molecular de

muchos genes esenciales en las fases invasivas ha mostrado que, su expresión alterada se explica por alteraciones epigenéticas, es decir por alteraciones en el patrón de expresión génica como resultado de un proceso adaptativo sin que haya mutaciones intra o extra génicas. El efecto de estos dos componentes parece ser acumulativo con respecto a la adquisición del fenotipo celular tumoral. Esta complejidad ha hecho difícil tanto la clasificación como el tratamiento de las enfermedades oncológicas (Alberts y cols, 2002; Fidler, 1997; Yoshida y cols, 2000).

Ia. Oncogenes y Genes Supresores de Tumores

Como ya se mencionó, la transformación de células normales a células tumorales implica mutaciones en el ADN. Estas se presentan en dos grandes grupos de genes que controlan el ciclo celular. El primer grupo incluye genes como: *src*, *abl*, *ras* o *myc*, que codifican proteínas que forman parte de las cascadas de señalización mitogénicas. Todas las mutaciones identificadas en estos genes se presentan en un solo alelo y tienen un efecto dominante. Todas ellas son mutaciones que generan un producto génico con ganancia de función, por lo que se genera una señal mitogénica permanentemente activa. A estos genes se les denomina proto-oncogenes y cuando presentan mutaciones que los hacen permanentemente activos en su función o nivel de expresión se les denominan oncogenes. En la tabla I, se muestran algunos oncogenes y neoplasias asociadas.

Los primeros oncogenes se identificaron por virus, cuya infección causa la transformación de sus blancos celulares. El ejemplo clásico de ganancia de función de un proto-oncogén la mutación en el residuo de valina 12 de *H-ras*, de tal forma que la proteína H-Ras no hidroliza el GTP unido, manteniendo a H-Ras permanentemente activa y la cascada mitogénica se mantiene encendida. Esta mutación incrementa la tasa de proliferación independientemente de la presencia de factores que promueven la proliferación (Hanahan y Weinberg, 2000).

El segundo grupo de genes que pueden ser mutados incluye genes como *Rb* o *p53* que participan normalmente como frenos del ciclo celular, por lo que se les conoce como genes supresores de tumores. En la tabla II, se muestran algunos genes supresores de tumores y neoplasias asociadas. En la actualidad se conocen varias

decenas de genes supresores de tumores, la mayoría de las mutaciones en estos genes producen una pérdida total de la función del producto génico y suelen implicar alteraciones en ambos alelos (mutaciones recesivas). La falta de función de estos frenos del ciclo celular colabora a una proliferación celular descontrolada, y además, afecta la estructura de la cromatina, estas mutaciones se asocian a muchas de las alteraciones epigenéticas observadas (Alberts, 2002; Lewin, 2000).

Recientemente, las observaciones y estudios del comportamiento de las células tumorales llevaron a Hanahan y Weinberg a proponer que estas células adquieren al menos 6 características: 1) autonomía con respecto a las señales de crecimiento, 2) evasión de la muerte celular por apoptosis, 3) insensibilidad a recibir señales que interfieren con el crecimiento, 4) capacidad de angiogénesis sostenida, 5) potencial replicativo ilimitado y 6) capacidad para invadir tejidos distantes y crecer en ellos. *Fig.1.*

Oncogene	Neoplasia
K-ras	LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA, CANCER DE TIROIDES, MELANOMA
H-ras	CANCER DE COLON, PULMON Y PANCREAS
N-myc	NEUROBLASTOMA
L-myc	CANCER DE PULMON
Neu	NEUROBLASTOMA, CANCER DE MAMA
Ret	CANCER DE TIROIDES
EGFR	CARCINOMA ESPINOCELULAR
Src	CANCER DE COLON
v-fos	OSTEOSARCOMA
v-jun	SARCOMA

TABLA I. Algunos de los principales oncogenes que se conocen y las neoplasias a las que están relacionados más frecuentemente.

Gen supresor	Síndrome	Tumores asociados
Rb1	Retinoblastoma	Retinoblastoma, osteosarcoma
p53	Li-Fraumeni	Sarcoma, cáncer de mama, gliomas
APC	Poliposis adenomatosa familiar	Adenoma y adenocarcinoma de colon
WT-1	Tumor de Wilms	Nefroblastoma
NF-1	Neurofibromatosis	Neurofibromas, sarcomas, gliomas
NF-2	Neurofibromatosis	Schwannomas, meningiomas
VHL	von Hippel-Lindau	Cáncer renal, feocromocitoma, hemangioblastoma
BRCA-1	Cáncer de mama familiar	Cáncer de mama
BRCA-2	Cáncer mama familiar	Cáncer de mama
TSC-2	Esclerosis tuberosa	Angio-mio-lipoma, gliomas, rabiomioma
p16	Melanoma familiar Cáncer pancreático	Melanoma, cáncer de páncreas

TABLA II. Genes Supresores de tumores y cánceres humanos relacionados a su alteración.

Es importante hacer notar que, con base en varios estudios, se ha definido que el número de genes mutados en una célula tumoral no es mayor de 10. De hecho, en

células murinas un solo alelo mutado de *ras* provoca un fenotipo tumoral. En humanos se requiere de la colaboración de al menos dos genes mutados como *ras* y *myc* por ejemplo. A pesar de que, en modelos experimentales el número de genes mutados es pequeño, los genes que presentan un patrón alterado en su expresión génica es mayor. Considerando que numerosos genes difieren en la expresión entre células normales y tumorales, es posible que ocurran múltiples interacciones en cada nivel de análisis y que éstos sean relevantes en la conducta biológica del cáncer (Albelda, 1994; Alberts y cols, 2002; Weber, 2002).



FIGURA 1. Capacidades adquiridas por las células a lo largo de su transformación.

En la actualidad, algunos de los genes más estudiados en el área del desarrollo del cáncer son los involucrados en la formación de vasos sanguíneos o angiogénesis, proceso sin el cual, las micromasas de células tumorales no podrían continuar su

desarrollo, por lo cual, se mencionarán brevemente algunos aspectos relacionados a este proceso.

Ib. Desarrollo Tumoral y Angiogénesis

La importancia que tiene la microvasculatura en el crecimiento y malignidad de tumores fue reconocida por Folkman en 1972, al observar que tumores implantados en sitios no muy irrigados de algunos órganos no se desarrollaban, mientras que tumores implantados cerca del lumen de un vaso sanguíneo inducían angiogénesis, crecían rápidamente e invadían un sitio nuevo (metástasis).

El incremento en la densidad intratumoral de vasos sanguíneos se correlaciona con la progresión y severidad de muchos tipos tumorales. El desarrollo de nuevos vasos es necesario para continuar el crecimiento de tumores sólidos, una vez que éstos han alcanzado un tamaño mínimo de 2 mm de diámetro. Los nuevos vasos proporcionan oxígeno y nutrientes que permiten la expansión del tumor (Webb y Vande Woude, 2000). La inducción de la angiogénesis es mediada por múltiples moléculas que son liberadas tanto por las células tumorales, como por las células huésped incluyendo células endoteliales, células epiteliales, células mesoteliales y leucocitos. *Fig. 2.* Reportes previos indican que la vasculatura tumoral tiene características específicas tales como alta permeabilidad y baja adhesividad de neutrófilos (Fidler, 1997; Hussein y Zucker, 2001; Kamada y cols, 2000).

La mayoría de los factores angiogénicos son péptidos clásicos que inducen el crecimiento celular. Estos factores se unen y activan a receptores específicos, con actividad intrínseca de cinasas de residuos de tirosina, por ejemplo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Se ha descrito que el VEGF, es importante para el desarrollo de una gran variedad de tumores de pulmón, riñón, hígado, ovarios y carcinomas gastro-intestinales. Los factores de crecimiento que actúan de manera autocrina en la célula tumoral estimulan la proliferación de una manera directa mientras que, los factores de crecimiento que actúan de forma paracrina contribuyen de manera indirecta con el crecimiento tumoral (Cavallaro y Christofori, 2001; Eatock y cols, 2000).

La estrecha interrelación entre angiogénesis y progresión tumoral ha llevado a proponer la existencia de un “switch angiogénico” que consiste en el punto específico del desarrollo tumoral temprano en el cual la angiogénesis se induce y permite la expansión del tumor. Este “switch angiogénico” se enciende y se apaga por reguladores positivos y negativos que son liberados por las células tumorales y por células del tejido huésped como fibroblastos, macrófagos y leucocitos (Kerbel, 1997; Hussein y Zucker, 2001; Roskelley y cols, 2001).

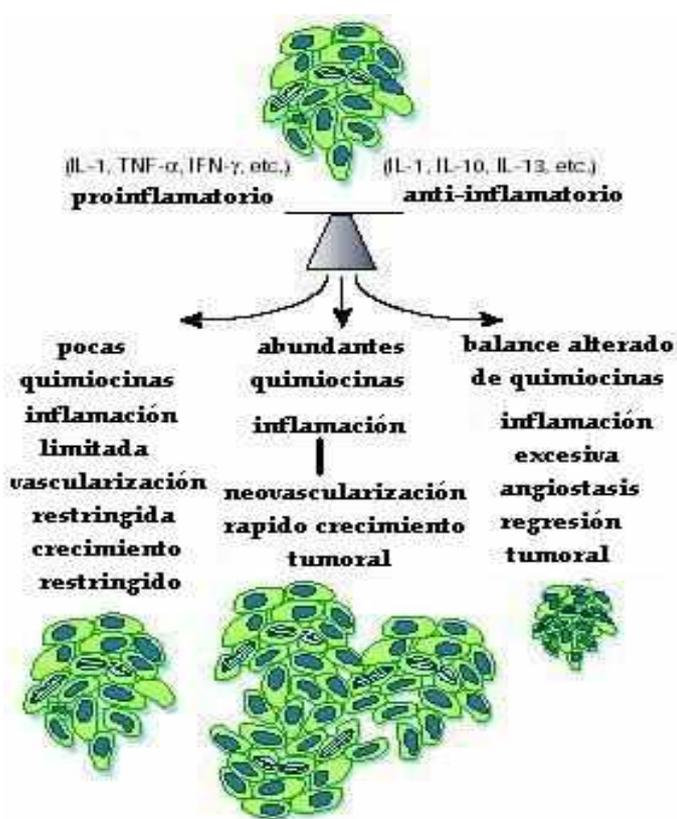


FIGURA 2. Relación de las citoquinas y quimiocinas en diferentes pasos de la angiogénesis y progresión tumoral.

II. METASTASIS

La invasión de tejidos permite a las células de los tumores primarios migrar, diseminarse y formar metástasis, condición que se asocia hoy en día al 90% de las muertes por cáncer. Para llevar a cabo estos procesos, las células de un tumor sólido modifican tanto las interacciones célula-célula, como célula-sustrato (Alberts y cols, 2002).

Las células tumorales migran abriéndose camino a través del tejido conectivo huésped y parecen presentar un tropismo que las conduce a la proximidad de los vasos. Una vez ahí, las células con potencial metastático destruyen la lámina basal de los vasos y se abren paso entre las uniones estrechas de las células endoteliales de capilares o vasos linfáticos para entrar a la circulación por medio del proceso de intravasación. La fase hematológica de la metástasis parece ser muy ineficiente, en modelos experimentales se ha documentado que una de cada millón de células metastáticas que ingresan al torrente sanguíneo logran invadir un tejido secundario. Esta baja eficiencia sugiere que dentro del torrente sanguíneo las células tumorales están sometidas a un fuerte proceso de selección, se consideran al menos dos grandes procesos implicados en esta selección: i) las fuerzas físicas que se generan en el flujo turbulento de la sangre en particular en los capilares y ii) la exposición directa a las células del sistema inmune, en particular a los linfocitos citotóxicos. A pesar de estos procesos de selección algunas células metastáticas logran escapar de la circulación por medio del proceso de extravasación y logran colonizar sitios secundarios (Webb y Vande Woude, 2000; Andrews y cols, 2001).

El proceso de extravasación implica una secuencia de eventos: i) la adhesión de la célula tumoral a la cara apical de las células endoteliales, ii) la apertura de las uniones estrechas entre las células endoteliales y la formación de uniones estrechas entre la célula tumoral y las células endoteliales, iii) la adhesión y la digestión de la membrana basal, y finalmente, iv) la invasión propiamente dicha del tejido conectivo en el órgano blanco secundario para la formación de un crecimiento metastático (Lewalle y cols, 1997). *Fig. 3.*

Aún se sabe poco sobre los mecanismos por los cuales los tumores desarrollan metástasis, sin embargo, durante las dos décadas pasadas ha llegado a ser claro que la localización de tumores metastáticos en distintos órganos no está determinada solamente por consideraciones anatómicas y flujo sanguíneo. Se ha reconocido que las células tumorales a menudo presentan una colonización selectiva de varios órganos blanco sugiriendo un tropismo dirigido muy probablemente tanto por factores solubles secretados por células de los tejidos y órganos blanco, como por factores asociados a sus matrices extra-celulares (Haier y Nicolson, 2001).

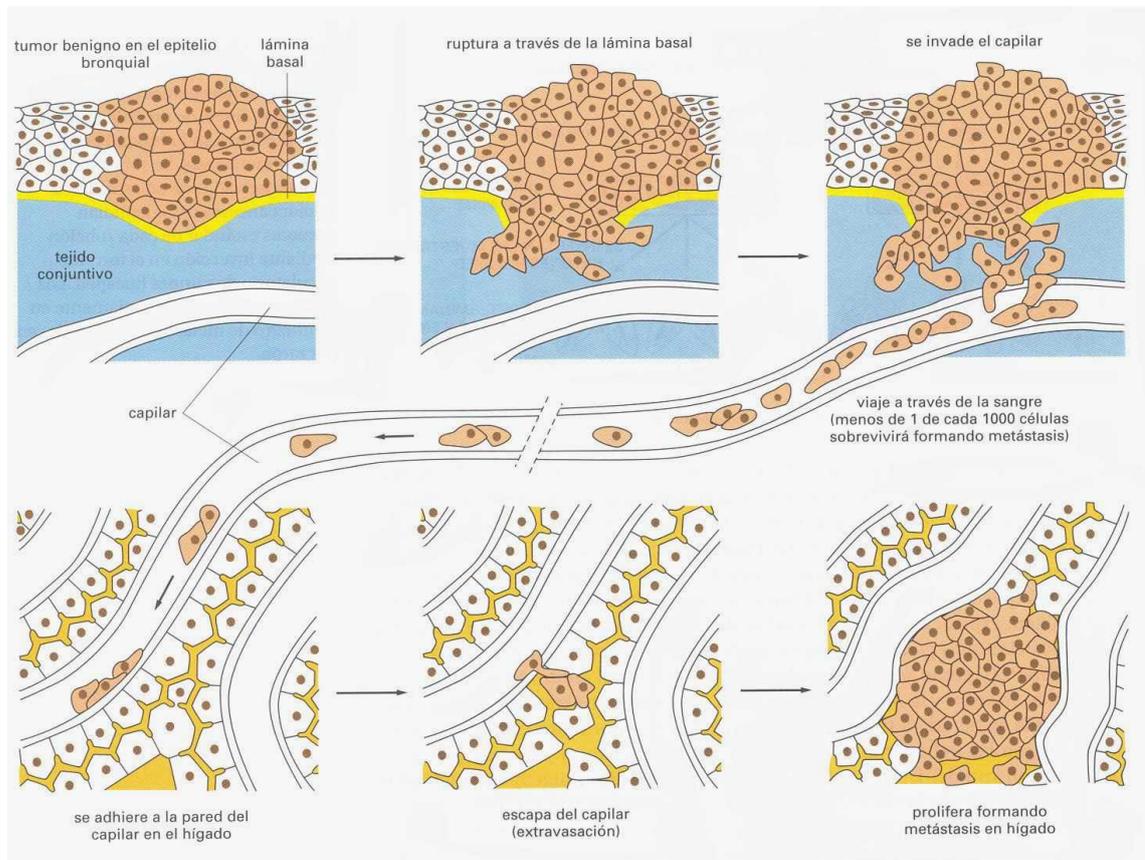


FIGURA 3. Etapas generales por las que pasan las células tumorales para la formación de metástasis en órganos secundarios.

El mecanismo aceptado para explicar el arresto de las células metastásicas en el órgano blanco, puede involucrar un mecanismo de retención en la microcirculación post-capilar del mismo órgano. Estudios de microscopía de video *in vivo* y el análisis cuantitativo del destino celular indica que órganos como el pulmón o el hígado son muy eficientes en arrestar un flujo de células cancerosas. Estos resultados han llevado a proponer que las interacciones de adhesividad órgano-específicas son indicadores de una señalización órgano-específicas, además de los factores que incrementan el arresto físico de células cancerosas en sitios específicos. Fig.4.

Estudios recientes han mostrado que las células tumorales presentan receptores a quimiocinas que son expresadas de manera específica en los órganos hacia los cuales metastatizan las células tumorales. A este proceso que se ha interpretado

también como tropismo o desplazamiento dirigido y se le ha denominado "homing", término que fue acuñado para describir el tropismo o movimiento dirigido de las células del sistema inmune inmaduras hacia los órganos linfoides primarios y secundarios. Debido a que las quimiocinas están involucradas en el "homing" de linfocitos, es razonable suponer que causan un efecto similar en las células tumorales promoviendo la metástasis en órganos específicos. La metástasis es un proceso no azaroso donde la implantación, invasión, sobrevivencia y crecimiento de una célula o número pequeño de células son dependientes de las propiedades del tejido hospedero (Rusciano y Burger, 1992; Chambers y cols, 2002).

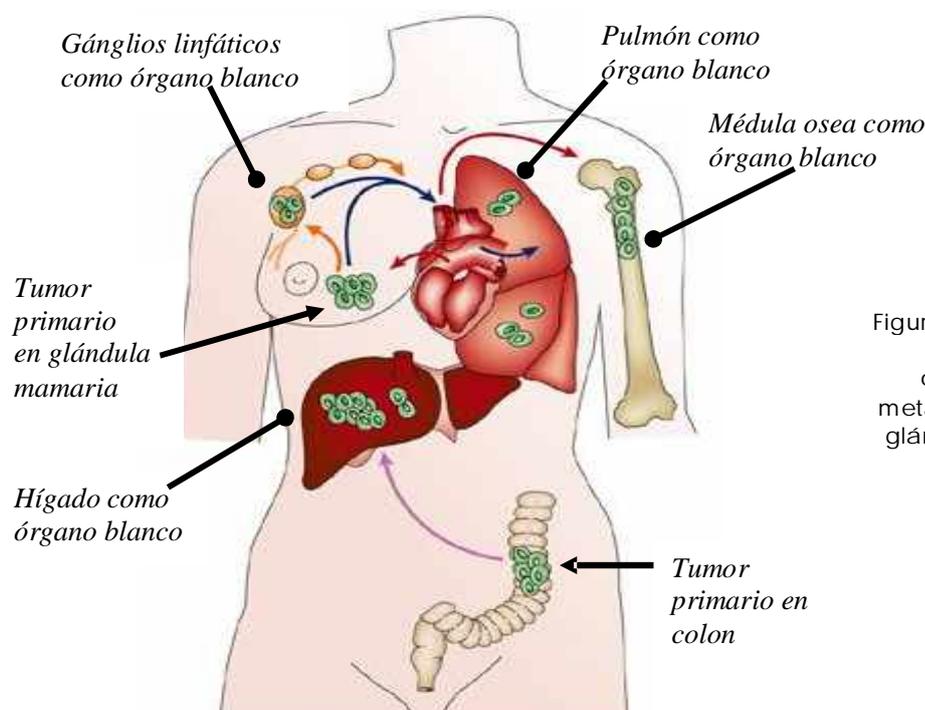


Figura 4. Organos que son afectados más comúnmente con metástasis en tumores de glándula mamaria o de colon

En resumen, la metástasis consta de las siguientes etapas:

- 1) Crecimiento del tumor primario y liberación de las células neoplásicas invasivas a los tejidos vecinos.
- 2) Ingreso de las células tumorales a los vasos linfáticos o vénulas post-capilares.

- 3) Supervivencia a los sistemas de defensa inmunológica e interacción de las células metastáticas con los elementos celulares de la sangre y/o la linfa.
- 4) Arresto de las células tumorales en sitios distantes del tumor primario por interacción con el endotelio vascular o linfático y en ocasiones a la membrana basal subendotelial.
- 5) Migración de las células tumorales al interior del parénquima tisular de los órganos blanco, y
- 6) Crecimiento del tumor en el sitio metastático.

El proceso de metástasis tumoral es por ende, una compleja cascada de eventos que se caracteriza por la adquisición de alteraciones genéticas y epigenéticas ausentes en las células del tumor primario y que resultan de la inestabilidad e implica cierta independencia en ambos tipos celulares (Klein, 2000).

Muchos de los pasos descritos, si no es que todos, involucran cambios, tanto de incremento como disminución en la habilidad de las células tumorales, para adherirse a células adyacentes o a su matriz celular con las que entran en contacto durante los procesos de diseminación e invasión. Por tanto, una parte importante en el desarrollo tumoral requiere de la degradación y remodelación de la matriz extracelular (MEC).

IIa. Matriz extracelular y metástasis

Las células tumorales destruyen los sustratos de la MEC por actividad hidrolítica o simplemente por presión sobre el tejido cuando la masa tumoral alcanza un mayor tamaño. Las células se adhieren a la MEC a través de pequeñas zonas de la membrana celular conocidas como adhesiones focales, que se componen de moléculas de adhesión de la familia de las integrinas y otras proteínas acopladoras que les permiten unirse a la actina del citoesqueleto. Estos complejos multiproteicos median eventos intracelulares de señalización en los que participan proteínas cinasas como Src, PI3-K y MAPK, que han sido identificados como importantes mediadores de la invasión y motilidad de las células tumorales (Webb y Vande Woude, 2000).

Algunos componentes de la MEC, tales como colágenas fibrilares (I y II) o colágena IV, laminina o la fibronectina, también participan en la regulación del

crecimiento de vasos sanguíneos favoreciendo la proliferación de las células endoteliales (Augustin y cols, 1994; Yancopoulos y cols, 1998).

Otra de las estrategias actuales para interferir con el proceso metastático, además de los estudios con la MEC, son los que se basan en el conocimiento de los componentes proteicos que participan en la interacción entre las células tumorales y las células endoteliales, células que forman las paredes de los capilares sanguíneos. Debido a que existe una mayor presión y flujo en los demás tipos de vasos sanguíneos, se considera que las vénulas post-capilares o vénulas de vasos pequeños son los idóneos para la extravasación de las células metastáticas, ya que se considera que es a partir de este punto es donde se inicia propiamente la invasión tumoral a los tejidos secundarios. Existen hasta el momento dos propuestas de cómo las células tumorales atraviesan o salen del torrente sanguíneo:

- 1) Restricción de tamaño. Esta teoría propone una extravasación de la célula tumoral por taponamiento capilar y destrucción del endotelio, ya que, las células tumorales tienen un diámetro mucho mayor en comparación al del capilar y al de las células que circulan en ellos normalmente como eritrocitos. En este tipo de arresto celular interviene principalmente la capacidad de cambiar de forma de la célula, y no parecen intervenir receptores específicos de membranas.
- 2) Adhesión célula-célula. Esta teoría es la más estudiada y documentada en la literatura, propone la participación de moléculas específicas de adhesión (CAMs), que son expresadas en las membranas de ambos tipos de células entre las cuales se establece un contacto como el que se lleva a cabo entre los leucocitos y células endoteliales en la respuesta inflamatoria. *Fig.5.*

La presencia de moléculas de adhesión específicas se ha confirmado en la interacción célula tumoral-endotelio en estudios de neoplasias malignas. Se espera que con el estudio y caracterización de las moléculas de adhesión específicas de cada una de las diferentes neoplasias, se logren comprender los aspectos moleculares del proceso metastático de tal forma que permitan realizar el diagnóstico, así como el tratamiento clínico (Albelda, 1994; Chambers y cols, 2002).

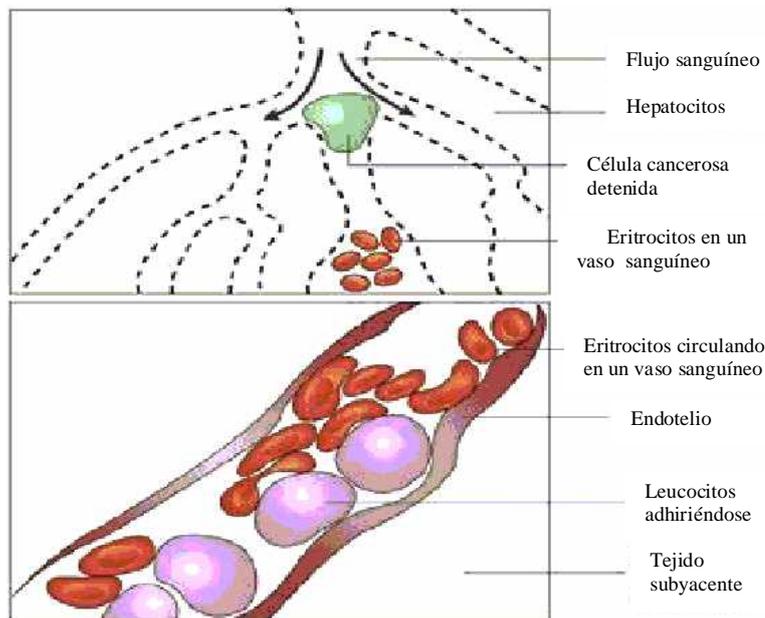


FIGURA 5. Teorías de la interacción y posterior extravasación de las células tumorales con las células endoteliales de vénulas post-capilares.

III. ADHESIÓN CELULAR

Las moléculas de adhesión de las células endoteliales, regulan el tráfico de células circulantes y proveen así un mapa interno de la compartimentalización del cuerpo. Dadas las complejas propiedades estructurales y funcionales de las células endoteliales, es apropiado considerar al endotelio vascular como un órgano sistémicamente diseminado.

El endotelio forma una barrera continua, permeable, que regula el paso de proteínas del plasma y las células que circulan desde la sangre hacia los tejidos, permitiendo el intercambio de nutrientes y desechos. La permeabilidad del endotelio depende de uniones especializadas responsables de la adhesión entre células adyacentes. Al menos 3 tipos de uniones han sido identificadas en las células endoteliales: uniones ocluyentes, uniones comunicantes y uniones de anclaje o adherentes. Estas participan en el control de la permeabilidad de proteínas del plasma y el intercambio de iones y moléculas pequeñas entre las células endoteliales (Alberts y cols, 2002; Lewalle y cols, 1997).

A pesar de ser un tejido metabólicamente activo, el endotelio en un organismo adulto sano se considera en estado de reposo ya que presenta un recambio muy bajo. A esto se le llama fenotipo constitutivo. Los vasos de distintos calibres están formados por poblaciones endoteliales con diferentes características funcionales heterogéneas, que incluso, presentan variaciones entre diferentes órganos. En la actualidad, se conoce muy poco acerca del control molecular del fenotipo constitutivo y de sus variantes en diferentes vasos y órganos (Brenner y cols, 1995; Voura y cols, 1998).

IIIa. Activación Endotelial

El fenotipo endotelial activado, es inducido por citocinas pro-inflamatorias durante la inflamación, ha sido el más estudiado y por lo tanto el mejor caracterizado. Cuando las células endoteliales son activadas por estas citocinas, experimentan profundas alteraciones funcionales que involucran respuestas inmediatas, como la aparición en la superficie de proteínas de membrana previamente sintetizadas y almacenadas en vesículas secretorias, entre las que se encuentran moléculas de adhesión y factores asociados a la coagulación, entre otros. Ya que, en la mayoría de los casos una misma célula está expuesta a una combinación de citocinas, es necesario considerar las interacciones entre diferentes citocinas, porque el resultado de estas combinaciones puede resultar inhibitoria, aditiva, sinérgica o incluso pueden producir efectos nuevos (Estrada y cols, 2003).

De acuerdo a lo que se acaba de mencionar, las células endoteliales expresan diferentes moléculas de adhesión celular (CAMs) tanto de forma constitutiva como en respuesta a las citocinas producidas localmente.

IIIb. Moléculas de Adhesión

Las CAM's que participan en la adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales, así como en la interacción entre las células del sistema inmune, pertenecen a cuatro familias de proteínas: las selectinas, las mucinas, las integrinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) (Augustin y cols, 1994; Bradley y Watson, 1996; Kuby, 1997). Todas ellas en general, participan en: i) la captura de los leucocitos o células tumorales desde el torrente sanguíneo, ii) la adhesión de las mismas a las células

endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, y iii) posteriormente la extravasación de las células, siguiendo un gradiente de quimio-atrayentes establecido por citocinas y quimiocinas, hacia el sitio lesionado, en el caso en el que se produce una reacción inflamatoria. Fig. 6.

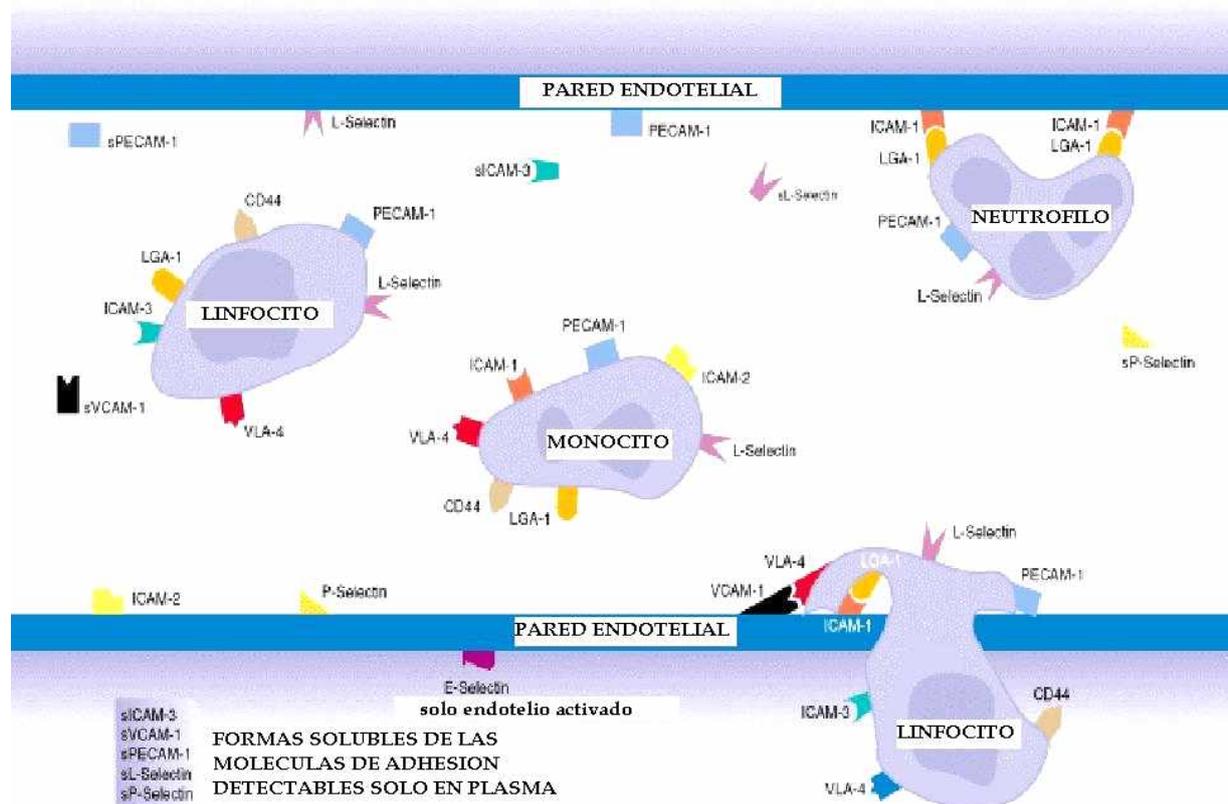


FIGURA 6. Moléculas de adhesión encontradas en la superficie de los leucocitos y con las cuales establecen contacto con contra-receptores de las células endoteliales para la migración en la respuesta inflamatoria.

a) Selectinas

La familia de las selectinas, cuya denominación se debe a que presentan una región N-terminal extracelular cuya estructura es dependiente de Ca^{2+} , están formadas por 120 aminoácidos (a.a.), están relacionadas con las lectinas fijadoras de mamíferos y son moléculas capaces de reconocer y unir residuos de azúcares presentes en los contra-receptores, denominado sialil-Lewis^x (Juliano, 2002). Las selectinas presentan además, un dominio del tipo del factor de crecimiento epidermal (EGF), un segmento de 2 a 9 repeticiones proteicas reguladoras, un segmento helicoidal transmembranal y

un segmento citoplasmático corto. Esta familia de moléculas de adhesión está compuesta por la selectina E (CD62E) que está confinada al endotelio y tiene un peso molecular de 97-115 kDa. En células endoteliales de la vena de cordones umbilicales (HUVECs), esta molécula de adhesión alcanza un nivel máximo de expresión entre 4-6 hrs después de la estimulación con citocinas pro-inflamatorias. Además de la selectina-E, las células endoteliales expresan la selectina-P (CD62P) con un peso de 140 kDa, que también está presente en las plaquetas y la selectina-L (CD62L) con un peso desde 75-100 kDa, presente en la mayor parte de los leucocitos, principalmente neutrófilos (Rosen y Bertozzi, 1994; Vestweber y Blanks, 1999).

b) Superfamilia de Inmunoglobulinas

Esta familia de moléculas de adhesión pertenecen las moléculas con dominios parecidos a los de inmunoglobulinas inmunes, son glicoproteínas transmembranales formadas unidas por puentes disulfuro. Esta familia de CAMs es el mayor grupo de moléculas de adhesión e incluye a más de 70 miembros distintos. Tienen en común el control de la conducta de algunas células y están relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso central y la regulación de la respuesta inmune. Incluye dos moléculas principales de adhesión endotelial: ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1 o CD54) con 5 dominios extracelulares y un peso molecular de 80-110 kDa, que se expresa constitutivamente en el endotelio de pequeños vasos sanguíneos. En HUVECs su expresión máxima se alcanza un máximo entre 6-8 hrs después de la estimulación de las células con citocinas pro-inflamatorias. El otro miembro de esta familia expresado en células endoteliales, es la molécula de adhesión celular del sistema vascular (VCAM-1 o CD106) que presenta 7 dominios extracelulares y un peso molecular de 110 kDa. VCAM-1 se expresa solo en células endoteliales activadas, su expresión máxima ocurre entre 6-12 hrs después de la activación. Los contra-receptores caracterizados para estas dos moléculas de adhesión son integrinas presentes en las membranas de los leucocitos (Williams y Barclay, 1988; Nakata y cols, 2000; Simiantonaki y cols, 2002). Fig. 7. Tanto las selectinas como estas CAMs se sobreexpresan en respuesta a citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β o el IFN- γ , así como por combinaciones entre éstas y otras citocinas (Vladova, 2002; Raab y cols, 2002).

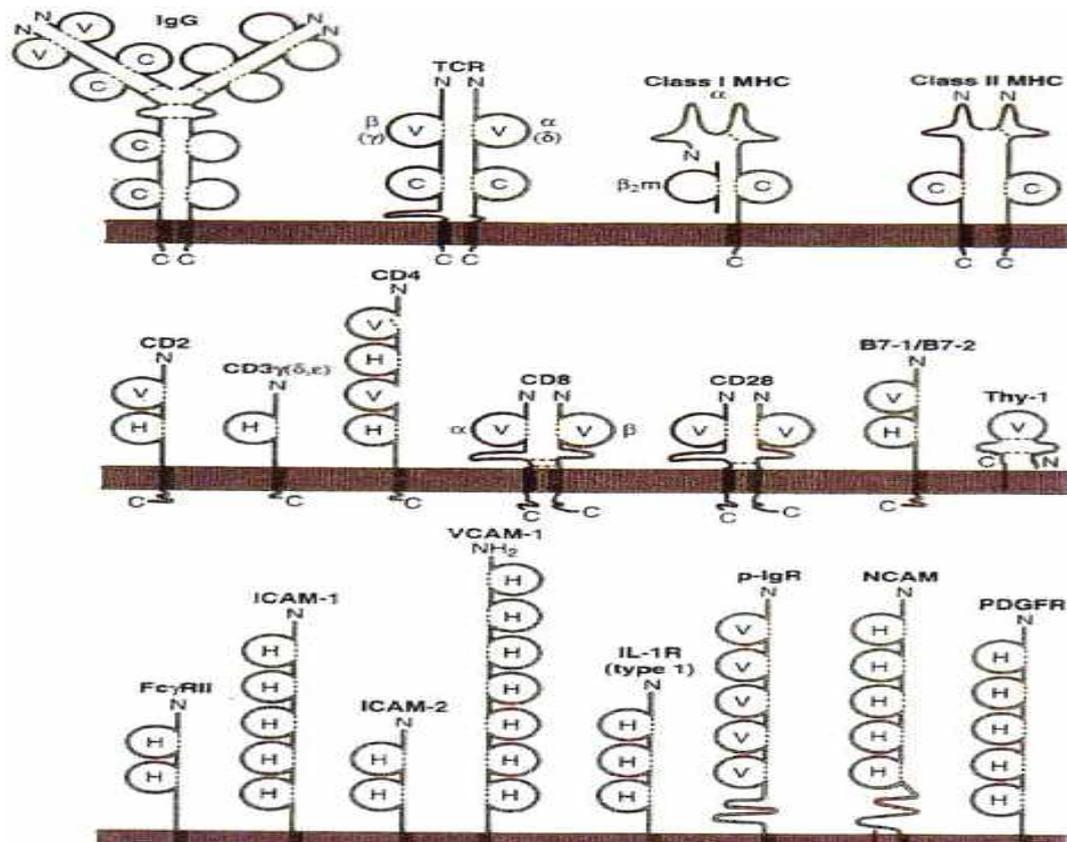


FIGURA 7. Moléculas que integran a la superfamilia de inmunoglobulinas, las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 aparecen en la parte inferior. Las azas indicadas con una letra H representan los dominios similares a inmunoglobulinas que se cierran por un puente disulfuro, indicado por la línea punteada.

c) Integrinas

Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas cuyas subunidades están asociadas no covalentemente. Existen 18 diferentes subunidades α y 8 diferentes subunidades β que median la adhesión célula-célula y célula-sustrato. Su interacción con la matriz extracelular (MEC), en particular con fibronectina, laminina y colágena son las más frecuentes y las mejor caracterizadas (Juliano, 2002). Las integrinas han sido divididas en tres grandes subfamilias, cada una de ellas se caracteriza por presentar una subunidad β común, misma que es capaz de asociarse a su vez con un grupo específico de subunidades α . Las integrinas se expresan usualmente en una conformación inactiva (estado de baja afinidad) y requieren un paso de activación

dependiente de cationes divalentes que les confieren capacidad de unión al ligando (estado de alta afinidad) (Albelda y Buck, 1990; Andrews y cols, 2001). Fig. 8. Las integrinas no solo son moléculas adhesivas sino que también actúan como receptores transduccionales, controlando parte de la conducta celular a través de su sistema de señalización. Las señales generadas por las integrinas involucran a proteínas G monoméricas de la familia Rho, RhoA, Rac1 y Cdc42. Estas proteínas G controlan el grado y el tipo de polimerización del citoesqueleto de actina adecuándolo para que funcione en procesos como la adhesión celular, la motilidad y la proliferación. Las integrinas que se unen a ICAM-1 pertenecen a la familia $\alpha 1\beta 2$ (LFA-1, antígeno asociado a la función leucocitaria o CD11a) y a la familia $\alpha M\beta 2$ (Mac-1, antígeno de macrófagos o CD11b). Para VCAM-1 su contra-receptor es de la familia $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, antígeno tardío o CD49d) (Williams y Barclay, 1988; Webb y Vande Woude, 2000).

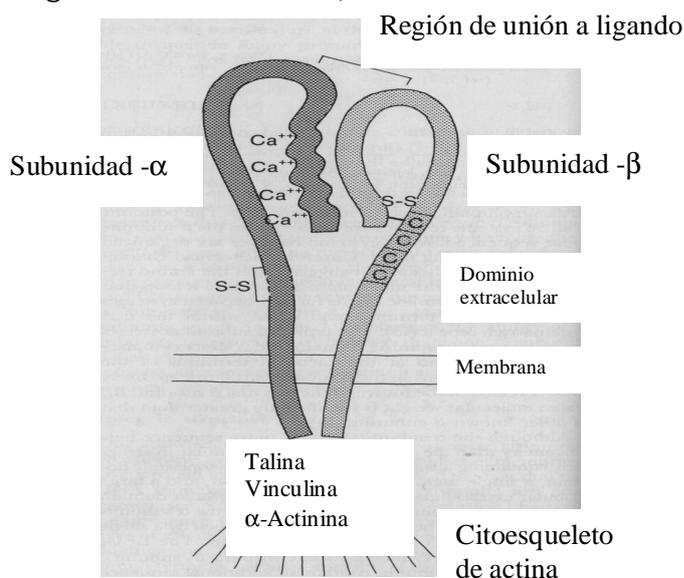


FIGURA 8. Esquema representativo de una integrina.

En la actualidad está aceptado que la metástasis tumoral está mediada por diferentes familias de moléculas de adhesión, que se expresan en células endoteliales activadas por citocinas pro-inflamatorias. Por tanto, se postula que estas moléculas de adhesión determinan la habilidad de las células tumorales para interactuar con las células endoteliales y posteriormente migrar, atravesando la monocapa endotelial y la membrana basal y de la matriz intersticial de los órganos blanco (van Rossen y cols, 2001; Vladova, 2002).

IV. PARTICIPACIÓN DE MOLECULAS DE ADHESIÓN EN METASTASIS

Estudios realizados por Brener y colaboradores (1995), Krause y Turner (1999) y Brakebusch y colaboradores (2002) muestran que las moléculas de adhesión están involucradas no solamente en la inflamación sino también en la metástasis tumoral. Al parecer, para adherirse al tejido blanco, los tumores aprovechan elementos de la respuesta inflamatoria, se ha encontrado la presencia de células inflamatorias rodeando al tumor y que producen citocinas como el TNF- α o la IL-1 β entre otras. Además, algunas citocinas pueden incrementar la inmunidad contra el tumor, otras la reducen ayudando así al desarrollo de la metástasis tumoral, y otras contribuyen promoviendo la migración y/o la neovascularización del tejido tumoral (Orosz y cols, 1993; Simiantonaki y cols, 2002).

Estudios recientes han demostrado la expresión de selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 y sus ligandos LFA-1, Mac-1 y VLA-4 en metástasis tumorales, así como en el endotelio vascular tumoral (angiogénesis tumoral) y en células del huésped que se infiltran al tumor como linfocitos, monocitos y neutrófilos. En especial la presencia de ICAM-1 y las integrinas β 2 LFA-1 y Mac-1 son moléculas que aseguran la migración transendotelial de células inmunes, la interacción de la integrina β 1 VLA-4 y su ligando endotelial VCAM-1 soportan la adhesión de estas células a las células endoteliales. En el caso de ICAM-1 en particular, se ha descrito que su expresión por parte de las células tumorales implica un mal pronóstico clínico (Vladova, 2002). Por todo esto, parece que la presencia de ICAM-1 y de sus contra-receptores en tumores metastáticos sugiere que las células tumorales utilizan mecanismos muy similares a los de las células inmunes para la invasión de tejidos.

Por otro lado, la expresión de ICAM-1 ha sido detectada en células epiteliales de cáncer gástrico, cáncer de seno, melanomas y enfermedad de Hodkings. Cómo ya se ha mencionado, la detección de niveles elevados de ICAM-1 en suero es generalmente un mal pronóstico clínico, ya que esta molécula ha sido correlacionada con el progreso y diseminación de la metástasis. También se ha reportado un incremento en la expresión de ICAM-1 asociada a la presencia de selectina-E en líneas celulares tumorales humanas (Witting, 1997). Consistentemente con estos datos, Madhavan y colaboradores (2002) obtuvieron una correlación de la presencia de estas

dos moléculas en carcinomas de seno, lo cual sugiere una interrelación entre ellas que facilita la diseminación tumoral. Por su parte, la presencia de VCAM-1 ha sido detectada en algunos cánceres de seno, pero su participación en tumores de origen epitelial no ha sido claramente demostrada.

La expresión de las selectinas en el endotelio de los vasos sanguíneos puede iniciar la extravasación de las células tumorales en sitios metastáticos y en algunos casos puede ser un prerrequisito para el desarrollo de las metástasis. A este respecto, el cáncer que más atención ha recibido es el de cáncer de colon ya que, en algunos casos, su conducta metastática correlaciona con la expresión del ligando de la selectina E en la superficie de las células tumorales. Al contrario, la selectina-P está ausente de la microvasculatura al menos en los melanomas primarios avanzados y en melanomas metastáticos (Krause y Turner, 1999), lo que sugiere que el propio melanoma disminuye la expresión de esta molécula de adhesión para evitar una respuesta inflamatoria por parte de los tejidos huésped. Por último, el papel de la selectina-L en la metástasis aún permanece incierto.

Cohen y colaboradores (2001) y Brakebusch y colaboradores (2002), han reportado la participación de diferentes integrinas durante la migración e invasión de células tumorales, principalmente a través de las interacciones entre estos receptores y la matriz extracelular o el citoesqueleto de actina. En melanomas humanos se ha detectado la sobre-expresión de las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, misma que ha sido correlacionada con la progresión tumoral (Webb y Vande Woude, 2000).

Nuestro grupo ha propuesto que las moléculas mencionadas, participan en la adhesión de células tumorales durante los procesos de invasión metastática. Se ha observado, que las células tumorales adheridas alteran su forma, por lo que se postula que la ocupación de las moléculas de adhesión transducen señales que resultan en un cambio del citoesqueleto (Voura y cols, 1998; Estrada 1998; Estrada y cols, 2003).

V. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS CELULARES EN LA ADHESIÓN Y METASTASIS

Como ya hemos mencionado, un fenómeno bien estudiado de migración celular es la entrada de leucocitos al sistema vascular en sitios de daño o infección en el proceso de inflamación. El pre-requisito es un mecanismo secuencial de

reconocimiento, formación del contacto y migración mediada por moléculas de adhesión. Para atravesar la monocapa endotelial durante la reacción inflamatoria, los leucocitos experimentan cambios en su estructura celular al entrar en contacto con tres células endoteliales. La diapédesis va acompañada de mecanismos que coordinan el reconocimiento, la adhesión y la reestructuración del citoesqueleto, tanto en los leucocitos como en las células endoteliales (Simiantonaki y cols, 2002).

El citoesqueleto proporciona a la célula fuerza y rigidez, además de ayudar a mantener el tamaño celular, por tanto cualquier cambio de forma implica una reestructuración del citoesqueleto. El citoesqueleto está constituido por microtúbulos de 20-25 nm de diámetro que pueden ser tan largos como un axón, los microtúbulos están contruidos de heterodímeros de las proteínas α y β tubulina que tienen un peso aproximado de 55 kDa. Cada microtúbulo contiene la misma cantidad de ambas proteínas, sus funciones más conocidas están relacionadas con la forma de la célula, el transporte vesicular y la división celular. Un segundo elemento que constituye al citoesqueleto son los microfilamentos de actina, que tienen un diámetro de 6-8 nm al que se asocian otras proteínas. El citoesqueleto de actina participa directamente en el movimiento celular. Otro elemento del citoesqueleto está constituido por los filamentos intermedios de 10-15 nm de diámetro formados por una o más subunidades proteicas, dependiendo del tipo celular y que no intervienen directamente en el movimiento celular. La función de los filamentos intermedios es más bien arquitectónica y representa las estructuras menos dinámicas en comparación a los microtúbulos y los filamentos de actina. *Fig. 9.* Los tres componentes del citoesqueleto tienen comportamientos diferentes y son regulados de modo distinto. Por ejemplo, con el frío y ciertas drogas como la colchicina, los microtúbulos se despolimerizan; con las citocalasinas los microfilamentos de actina se desorganizan; mientras que, los filamentos intermedios son más resistentes a estas drogas.

La locomoción de las células eucariotas reside en el citoesqueleto cortical de actina, en los últimos años ha quedado claro que las integrinas y otras moléculas de adhesión sirven como transductores de información que inducen cambios en la estructura del citoesqueleto permitiendo también el movimiento celular (Siegel y cols, 1998; Oakley, 2000; Juliano, 2002).

El despliegue de motilidad anormalmente activa, es una característica necesaria de células de carcinomas en invasión y metástasis, que se asocia a la proteólisis de la matriz extracelular y migración direccional. Todas estas características son requeridas para la intravasación, extravasación y penetración tisular. Una variedad de agentes derivados del huésped, como por ejemplo, factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y citocinas, promueven la motilidad de la célula tumoral. Esta puede ser de varias formas: 1) quimiocinesis (al azar), 2) quimiotaxis (migración celular dirigida por concentración de gradientes solubles), 3) haptotaxis (migración celular dirigida por factores insolubles de matriz extracelular) (Downey, 1994; Siegel y Malmsten, 1997).

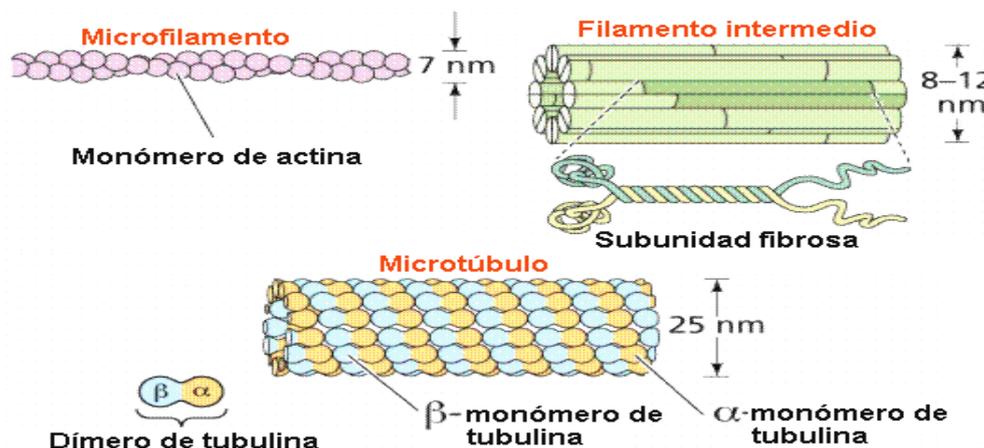


FIGURA 9. Los tres tipos de filamentos que conforman el citoesqueleto celular.

Hasta ahora se considera que el movimiento de las células tumorales implica cambios análogos, por ejemplo, a los que ocurren durante el movimiento de los linfocitos T. En este sistema, las redes de filamentos de actina de las células deben ser reversiblemente desensambladas y reensambladas para permitir la protrusión direccional de los pseudópodos y lamelipodios. Los receptores de quimioquinas son reorientados hacia el quimioatrayente en los lamelipodios que avanzan al frente de la célula. Mientras que, los receptores que median la adhesión intercelular con la matriz, son redistribuidos en la parte posterior de la célula o uropodio hacia regiones más anteriores para mantener una zona de contacto célula-célula y célula-matriz. Una vez

que la célula detiene su movimiento, las integrinas interaccionan con moléculas de señalización para reorientar y dar mayor estabilidad (Serrador y cols, 1999).

La función de los microfilamentos y microtúbulos también es esencial en los diversos estadios de la migración y fagocitosis leucocitaria. De hecho, algunos defectos del movimiento de los leucocitos hacia el lugar de una lesión o de su capacidad fagocítica, están asociados con defectos funcionales del citoesqueleto (Robbins y cols, 1995; Lodish y cols, 2000; Pawlak y Helfman, 2001). En principio, se propone que estos componentes del citoesqueleto también participan en los movimientos de diapédesis y migración de las células tumorales.

La migración transendotelial de las células tumorales es un fenómeno complejo que involucra a ambos tipos celulares, ya que la penetración de la célula tumoral requiere por un lado de que el endotelio redistribuya sus moléculas de adhesión y por otro lado, que se retraiga para el paso de la célula tumoral. Sin embargo, serán necesarios más estudios moleculares al respecto, para definir el grado de analogía entre la diapédesis de los leucocitos y la de las células metastáticas (Voura y cols, 1998).

El siguiente apartado se escribe con la finalidad de dejar más claros los procesos que caracterizan a la adhesión durante la reacción inflamatoria, y así, poder realizar la analogía con la adhesión durante la metástasis.

VI. RESPUESTA INFLAMATORIA

El daño causado al tejido por una herida, generalmente va acompañada de la invasión de microorganismos patógenos que liberan factores como los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), y que desencadenan una compleja serie de eventos fisiológicos conocidos colectivamente como la respuesta inflamatoria. En este proceso participan una gran variedad de mediadores bioquímicos, cuyas acciones son sólo parcialmente entendidas. En general, estos mediadores han sido divididos en dos grupos principales: citocinas y quimiocinas.

Las citocinas son proteínas reguladoras de bajo peso molecular secretadas en su mayoría por leucocitos, se unen a receptores específicos de membrana con una alta

afinidad en sus células blanco y accionan vías de transducción que modifican la expresión de genes. Las citocinas regulan la intensidad y la duración de la respuesta inmune ya que estimulan o inhiben la activación, proliferación y maduración de varios tipos celulares (Mantovani y cols, 1992). La función general de las citocinas es actuar a través de señales moleculares. Entre las principales citocinas producidas por los leucocitos que desencadenan la reacción inflamatoria están: la Interleucina 1β (IL- 1β) el Interferón γ (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la linfotóxina α (LT- α), etc.

Las quimiocinas son polipéptidos de bajo peso molecular que ejercen e inducen una atracción quimiotáctica para la migración de monocitos, macrófagos y células T activadas sobre el endotelio vascular hacia un sitio lesionado en el organismo (Kuby, 1997; Sacca y cols, 1997; Kähler y cols, 1999).

En el desarrollo de la reacción inflamatoria se han reconocido tres etapas: i) la marginación o adhesión de los leucocitos a la superficie endotelial, ii) la diapédesis o extravasación de los mismos a través de la monocapa de células endoteliales y iii) la quimiotaxis o movimiento dirigido de los leucocitos al sitio de infección (Kuby, 1997). Fig. 10. Para poder adherirse, los leucocitos primero deben superar las fuerzas hemodinámicas, lo cual logran pasando por una etapa de rodamiento mediada por moléculas de adhesión como las selectinas-E y P. A esta etapa le sigue una adhesión firme mediada por ICAM-1. Durante la migración participa VCAM-1 a través de las uniones de las células (proceso de diapédesis). Es interesante notar, que los ensayos *in vitro* en los que se ha documentado la diapédesis de leucocitos, se ha demostrado que la extravasación se da preferencialmente en los vértices donde convergen tres o más células endoteliales. Finalmente, los leucocitos penetran la membrana basal para después migrar a través del espacio tisular. Todo este proceso de diapédesis leucocitaria, al igual que el incremento de la permeabilidad vascular, se produce predominantemente en las vénulas post-capilares (Rosales y Juliano, 1995; Matheny y cols, 2000; Burns y cols, 2000).

El contacto directo célula-célula es requerido para llevar a cabo la expresión de los receptores de adhesión que median los contactos iniciales así como la subsecuente adhesión firme de los leucocitos a la superficie apical del endotelio (Schall y Bacon, 1994; Robbins y cols, 1995; Muller, 1996; Yarwood y cols, 2000).

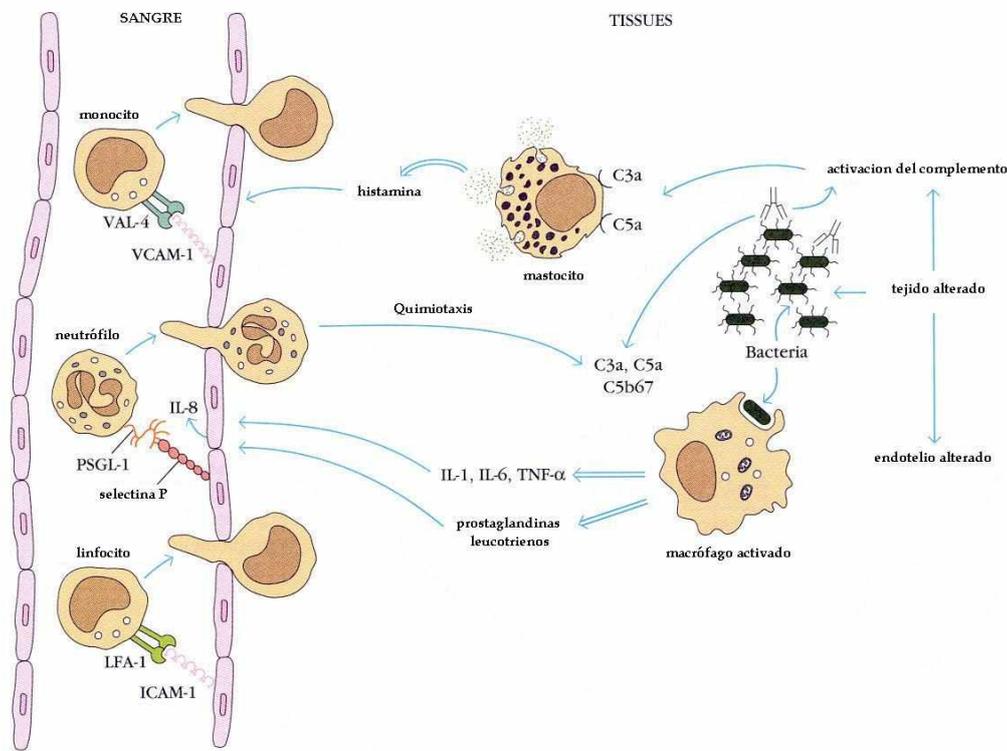


FIGURA 10. Eventos generales que se desarrollan durante la extravasación de leucocitos durante la respuesta inflamatoria.

Actualmente, se considera que la activación endotelial por citocinas incrementa la expresión de moléculas de adhesión en la membrana endotelial, y que esa respuesta es crítica en el reclutamiento de leucocitos hacia el sitio de inflamación (Ward y Marks, 1989; Orosz y cols, 1993; Sedgwick y cols, 2000). La unión del TNF- α a su receptor de tipo 1 (TNFR1) presente en las células endoteliales, desencadena una cascada de señalización que activa al factor de transcripción nuclear kapa beta (NF- κ B) que se trasloca del citoplasma al núcleo. Esta traslocación de NF- κ B es indispensable para que se lleve a cabo la transcripción de moléculas de adhesión como la selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1. Algo similar ocurre con algunas citocinas como las interleucina 6 (IL-6) u 8 (IL-8). El factor de transcripción NF- κ B puede interactuar cooperativamente con otros factores de transcripción en regiones promotoras para inducir la transcripción de otros genes (Modur y cols, 1996).

Estudios preliminares de nuestro laboratorio y de otros grupos han demostrado que en cultivos primarios de células endoteliales activadas con citocinas, principalmente con el TNF- α , se observa la adhesión de leucocitos (polimorfonucleares) o de leucemias (HL-60 o U937). Estos estímulos promueven la adhesión y extravasación de ambos tipos celulares y por lo tanto en el caso de células tumorales se promueve una diapédesis experimental que puede servir como modelo de metástasis. Actualmente existe un gran interés por realizar estudios que analizan la participación y regulación de las citocinas y moléculas de adhesión en la progresión tumoral.

ANTECEDENTES

Frecuentemente las lesiones tumorales metastáticas están circundadas por tejido inflamado, lo que ha llevado a proponer que algunas citocinas proinflamatorias puedan participar en los procesos de adhesión, migración o extravasación y/o desarrollo del tumor en el nuevo sitio de invasión. Se visualiza a la metastasis como un proceso dependiente de una compleja red de citocinas y factores de crecimiento aún no bien definidos (Mantovani y cols, 1992; Gopalan y cols, 2000). El papel de las células endoteliales en este proceso es crucial ya que presenta un cambio en el repertorio de las moléculas de superficie, en particular de las moléculas de adhesión en respuesta a las interacciones con las células metastáticas. Sin embargo, la identidad de las moléculas de adhesión que participan en la adhesión de células tumorales es aún incierta (Brener y cols, 1995; Voura y cols, 1998).

Es importante considerar que bajo condiciones fisiológicas normales, las células endoteliales tienen una muy baja adhesividad a cualquier componente celular presente en la sangre. Estudios *in vitro* con diferentes células tumorales humanas y murinas han mostrado que la adhesión de estas células al endotelio es muy limitada; sin embargo, la exposición a citocinas proinflamatorias promueve la transición a un fenotipo endotelial activado que se caracteriza por un aumento en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales. Bajo estas condiciones de estimulación se incrementa la adhesión de células tumorales. Entre las moléculas de adhesión cuyo número se incrementa al adquirir el fenotipo activado se encuentran las selectinas P y E así como las moléculas de adhesión inmunológica (ICAM-1) y de adhesión del endotelio vascular (VCAM-1) (Estrada-Bernal, 1998; Estrada-Bernal y cols, 2003). Varias evidencias experimentales *in vitro* e *in vivo* han permitido concluir que en el caso de reacción inflamatoria estas moléculas son elementos indispensables en la adhesión de los neutrófilos y polimorfonucleares a las células endoteliales.

Otro fenómeno bien estudiado durante la respuesta inflamatoria es la migración o diapédesis de los leucocitos adheridos al sistema vascular y al intersticio de los tejidos infectados o dañados. Estudios en modelos *in vitro*, han mostrado que a pesar de que

la diapédesis implica el deslizamiento de los leucocitos entre las células endoteliales, durante este proceso se generan uniones intercelulares estrechas entre ambos tipos celulares.

Finalmente, los procesos de adhesión y diapédesis implican que tanto el citoesqueleto de los leucocitos, como el de las células endoteliales, debe alterarse por lo que se propone que el contacto entre las moléculas de adhesión y sus contra-receptores o bien la liberación de factores solubles, evocan señales intracelulares que activan y mantienen estos cambios.

Diversos grupos, incluyendo al nuestro, han propuesto que la analogía entre los eventos de adhesión y diapédesis en la reacción inflamatoria y fases tempranas de la invasión metastática puede ir mas allá de los aspectos fenomenológicos y que podrían compartir mecanismos bioquímicos. Nuestro grupo, ha definido dos tipos de interacciones entre las células metastáticas y el endotelio vascular: i) interacciones funcionales, como la secreción de factores solubles que modulan el comportamiento de ambos tipos celulares de forma parácrina, y ii) interacciones físicas, como la adhesión y diapédesis.

La migración transendotelial de las células tumorales implica la penetración de la célula tumoral entre las uniones estrechas de la monocapa endotelial y requiere, por un lado, de que el endotelio redistribuya sus moléculas de adhesión y por otro lado, que la célula endotelial se retraiga para abrirle paso a la célula tumoral. De manera similar a lo que ocurre durante la respuesta inflamatoria, se postula que el citoesqueleto de ambos tipos celulares debe sufrir alteraciones importantes de manera coordinada, aunque aún hay pocos estudios al respecto (Voura y cols, 1998).

Hasta ahora, son pocos los estudios que han tratado de evidenciar y comprender tanto las interacciones funcionales como las físicas de la adhesión entre células tumorales y endoteliales. Uno de los modelos mejor caracterizados es el cultivo de células endoteliales derivadas del cordón umbilical humano, estos cultivos de células primarias humanas han mostrado ser un modelo experimental de fácil acceso y adecuado que se asemeja más a las condiciones fisiológicas que las líneas celulares para evidenciar y analizar a nivel molecular y bioquímico las posibles interacciones

entre células tumorales y células endoteliales en un sistema *in vitro* (Estrada-Bernal, 1998; Estrada-Bernal y cols, 2003).

De tal manera que, si la interacción entre las células endoteliales activadas con citocinas proinflamatorias y las células tumorales producen o simulan un proceso análogo a la adhesión de leucocitos a los endotelios vasculares durante la reacción inflamatoria, se predice que: i) la activación endotelial y el mantenimiento de este fenotipo dependerá de citocinas u otros factores solubles secretados por las células tumorales, ii) que la adhesión esté mediada por moléculas de adhesión expresadas de novo en la superficie de las células endoteliales, y que iii) debe de haber cambios en el citoesqueleto de ambos tipos celulares que permitan, la diapédesis de las células tumorales a través de las endoteliales. El modelo de las células endoteliales humanas derivadas del cordón umbilical nos ha permitido reproducir y estudiar *in vitro* al menos el primero de estos fenómenos.

Por otro lado, los experimentos de adhesión realizados previamente en nuestro grupo, habían documentado la adhesión cuantificando el número de células U937 marcadas con [H³]-timidina unidas a una monocapa de células endoteliales control o activadas con diferentes citocinas o productos derivados de células tumorales.

Sin embargo, se había documentado sólo en forma cualitativa que al observar la adhesión al microscopio parecía ser heterogénea, esto es, que a pesar de haber expuesto a todas las células endoteliales al mismo estímulo, en un mismo pozo, existen células que no adhieren ninguna célula del mieloma U937 mientras que su vecina puede adherir un número variable de 1 a 10. Es interesante notar que a pesar de la extensa literatura que documenta la adhesión de neutrófilos, polimorfonucleares y monocitos a las células endoteliales en ninguno de estos trabajos se menciona si la adhesión observada es homogénea o heterogénea (Janatpour, 2001). Por esta razón el presente trabajo se ha dedicado en buena parte a caracterizar este fenómeno.

JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en México en el cultivo de las células endoteliales *in vitro* y en particular en el estudio de los cambios funcionales (aumento en la expresión de moléculas de adhesión y adhesión de células tumorales a este tejido) en respuesta al factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) y de otras citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 beta ($\text{IL-1}\beta$). Estos estudios nos llevaron a analizar la posible adhesión de células tumorales humanas como las de linfomas y células de cáncer cérvico uterino al endotelio activado por el $\text{TNF-}\alpha$ y por factores solubles secretados por las células tumorales. El presente proyecto se encuentra dentro de esta nueva línea de investigación y pretende profundizar sobre la naturaleza de la adhesión de células tumorales a cultivos primarios de células endoteliales activadas *in vitro*.

HIPÓTESIS

En caso de que el mecanismo de adhesión de las células tumorales a las células endoteliales de vénulas y vasos linfáticos asociada a la invasión tisular sea similar a la de los leucocitos durante la respuesta inflamatoria, se esperaría lo siguiente:

- 1) La adhesión de las células tumorales a las células endoteliales siga un patrón de distribución igual, ya que las células endoteliales son activadas con citocinas de la misma forma, es decir, una célula tumoral adherida a una célula endotelial.
- 2) Las moléculas de adhesión expresadas por los leucocitos y las células endoteliales como selectina E, ICAM-1, VCAM-1 e integrinas de las familias $\beta 1$ y $\beta 2$ sean las mismas que se presentan entre las células tumorales y las células endoteliales.
- 3) Que existan cambios como polimerización o despolimerización de filamentos del citoesqueleto en las células tumorales adheridas y las endoteliales que reflejen la preparación de las células tumorales para el proceso de migración o extravasación a través de las células endoteliales.

OBJETIVO GENERAL

Se caracterizará la adhesión (homogénea o heterogénea) entre las células leucémicas humanas U937 y las células endoteliales humanas activadas *in vitro* con citocinas proinflamatorias. Se analizará también, la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 e integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$) durante la adhesión y se visualizará si existen cambios en el citoesqueleto (tubulina y actina) después de establecerse la adhesión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar por microscopía óptica si el patrón de adhesión de células tumorales de la leucemia humana U937 a células endoteliales activadas *in vitro* es homogénea o heterogénea, es decir, si todas las células endoteliales presentan la misma capacidad adhesiva ante el mismo estímulo.
- 2) Definir si moléculas de adhesión como: ICAM-1 e integrinas de la familia $\beta 1$ y $\beta 2$ se localizan en la zona de adhesión entre las células tumorales y las células endoteliales, para ello se usarán anticuerpos específicos dirigidos contra cada una de estas moléculas y se analizarán por microscopía de fluorescencia.
- 3) Determinar si durante la adhesión entre las células U937 y las células endoteliales se presentan alteraciones en el citoesqueleto celular por medio del análisis de los filamentos de tubulina y actina en microscopía de fluorescencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las células

Células endoteliales humanas: fueron extraídas a partir de cordones umbilicales provenientes de partos eutócicos y cesáreas de embarazos sin complicaciones (Jaffe y cols, 1973). Los cordones fueron obtenidos en el Hospital de Gineco-Obstetricia no.4 del IMSS, el protocolo de investigación de este proyecto fue aprobado por parte de un Comité de Evaluación Interno. Los cordones fueron recolectados en solución salina fisiológica estéril (NaCl al 0.9%), se limpiaron con gasas estériles. Se canuló la vena umbilical con la finalidad de lavarla y eliminar coágulos y residuos sanguíneos. Las células endoteliales se obtuvieron de la vena del cordón que fue sometida a una disgregación enzimática con solución de tripsina al 0.1% (Sigma, EUA) preparada en una solución de verseno (NaCl 136 mM, KCl 5.36×10^{-3} mM, EDTA 5.26×10^{-4} mM, Tris 28 mM; pH 7.7) durante 15 min a 37° C. Posteriormente, la solución con células endoteliales fue colectada en tubos estériles y centrifugada a 1200 rpm (500 x g) durante 10 min. El botón celular obtenido de 1-8 cordones para cada cultivo fue sembrado en matraces de cultivo (Corning, EUA), aproximadamente se sembró por matraz de cultivo el recolectado de células de 3 cordones umbilicales.

Células promielocíticas U937: estas células fueron adquiridas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC, EUA) y mantenidas en cultivo de acuerdo a las indicaciones con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) y una mezcla de antibióticos (penicilina 100 U/ml; streptomycin 100 µg/ml; antimicótico anfotericina 0.25 µg/ml) (Gibco/BRL, EUA), en una incubadora húmeda con una temperatura de 37° C y una atmósfera de 95% de aire con 5% de CO₂ (DiCorleto y de la Motte, 1985).

Cultivo celular

Las células endoteliales humanas fueron sembradas y mantenidas con medio de cultivo M-199 (Gibco/BRL, EUA) suplementado con glutamina (Gibco/BRL, EUA) al 1%, 0.1 mg/ml de factor de crecimiento endotelial (Biomedical Technologies Inc, EUA), 0.1 mg/ml de heparina (Sigma, USA), suero fetal de bovino (SFB) al 10% (In vitro, México) y

una mezcla de antibióticos-antimicótico al 1%, (penicilina 100 U/ml; streptomycin 100 µg/ml; antimicótico anfotericina 0.25 µg/ml) (Gibco/BRL, EUA) (Jaffe y cols, 1973). Una vez sembradas, las células fueron mantenidas a 37° C con una humedad relativa al 100% y una atmósfera del 95% de aire y 5% de CO₂. Las células fueron utilizadas para los experimentos entre los pasajes 1-3, se sembraron a una densidad de 3x10⁴ células/cm² en placas de 48 pozos (Corning, EUA) y a 5x10⁴ en cubreobjetos de vidrio de 22 mm². Las células se utilizaron después de 3 o 4 días. Estos cultivos fueron tratados a tiempos iguales con citocinas proinflamatorias recombinantes como: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la interleucina 1 beta (IL-1β) y el interferón gamma (IFN γ), todas ellas comerciales (R&D Systems, EUA).

Las células U937 crecen en medio RPMI (Gibco/BRL, EUA) suplementado con 10% de SFB (Gibco/BRL, EUA) y antimicótico al 1% (Gibco/BRL, EUA). Las células crecen en suspensión por lo que para el cambio de medio, éste se recolectó junto con las células del plato de cultivo, se centrifugó a 1000 rpm x 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en 1ml de medio para resembrar la cuarta parte del volumen en un plato con medio fresco. Para prevenir la activación de las células por endotoxinas se empleó material estéril nuevo en el cultivo de estas células (Corning, EUA).

Caracterización de las células endoteliales

Las células fueron caracterizadas como endotelio por 2 aspectos: 1) su morfología epitelial típica cuando alcanza confluencia (formación de una monocapa) y 2) por medio de la identificación de un antígeno específico en estas células, asociado al factor VIII de coagulación Von Willebrand por medio de inmunofluorescencia (Chung-Welch y cols, 1989). Para este ensayo las células endoteliales fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio, después de 48 hrs se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en medio durante 15 min, para después, colocar únicamente el fijador por 30 min más, posteriormente, se permeabilizaron con tritón al 1% por 5 min, se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de ratón (DAKO, EUA) dirigido contra el factor Von Willebrand, que es una proteína acarreadora para el factor VIII de coagulación y que se acumula en gránulos de secreción en el citoplasma de células

endoteliales, plaquetas y células cebadas. Para revelar la presencia del anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Roche, Alemania) acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), los dos anticuerpos fueron incubados por 1hr a 37° C en una cámara húmeda. Para reconocer individualmente a las células, los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (Sigma, EUA). Con esta doble tinción, se pudieron contar todas las células presentes en un campo para evaluar la población positiva al anticuerpo. El porcentaje de células endoteliales obtenidas de los cultivos primarios, durante los tres primeros pasajes siempre fue de 100%.

Marcado de las células U937 con timidina tritiada

Las células U937 fueron crecidas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB al que se le añadió 1 μ Ci/ml de timidina tritiada (New England Nuclear), durante 48hrs. Posteriormente, las células marcadas fueron lavadas dos veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y resuspendidas en medio M-199 suplementado con suero, glutamina, heparina y factor de crecimiento endotelial para ponerlas en contacto con las células endoteliales (Estrada-Bernal, 1998).

Ensayos de Adhesión

Se trató a las células endoteliales con las siguientes citocinas proinflamatorias para su activación: TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) e IFN γ (1000 u/ml). El tratamiento de las células con las 3 citocinas se llevó a cabo por 3 hrs, la activación del endotelio con cada citocina se hizo por separado y además se realizaron dos combinaciones de ellas: TNF- α + IL-1 β y TNF- α + IFN γ , en las mismas concentraciones que por separado, siempre se incluyó un control al que no se le añadió ninguna citosina (modificado de van Rossen, 2001). Posteriormente la monocapa de células endoteliales se puso en contacto con promielocitos U937 por 3 hrs más para permitir la con el endotelio. En algunos experimentos las células U937 fueron previamente marcadas con timidina tritiada a una densidad de entre 3-4 x10⁵ células U937/cm² que fue una cantidad suficiente para cubrir por completo la monocapa de células endoteliales, después del tiempo establecido la monocapa se lavó 2 veces con solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS). Posteriormente a la monocapa de células endoteliales con U937 se

les añadió 500 μ l de NaOH 0.2N con el fin de lisarlas e hidrolizar el ADN de las células U937. Finalmente, después de 10-15 hrs esta solución alcalina, se mezcló con 3 ml de tritosol y la radiactividad incorporada se cuantificó en un contador de emisiones β (modelo LS6000SC, Beckman, Palo Alto, CA) (modificado de McEvoy, 1996).

En otros experimentos, las células endoteliales tratadas con citocinas proinflamatorias en las mismas condiciones a las anteriores, se pusieron en contacto con las células U937 que no fueron marcadas con timidina tritiada. Al finalizar el período de contacto endotelio-U937 establecido se lavaron los pozos de cultivo dos veces con PBS y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (modificado de McEvoy, 1996). Al día siguiente, el paraformaldehído se retiró y se cambió por PBS, se cuantificó el número de células U937 adheridas por cada célula endotelial, a lo largo de una línea central de cada pozo, utilizando un microscopio óptico de contraste de fases. Los resultados de ambos tipos de experimentos de adhesión se analizaron estadísticamente.

Análisis estadístico de los datos de ensayos de adhesión

Los experimentos se realizaron al menos tres veces y cada uno de ellos por triplicado. Para homogeneizar los datos obtenidos, se transformaron en porcentajes de sus propios controles. Se calculó el promedio y la desviación estándar para cada grupo de resultados. Al número de experimentos individuales se les aplicó la prueba estadística T de student para muestras pareadas y obtener el valor de p. Por último se calculó el error estándar que aparece en las gráficas.

Experimentos de adhesión en cubreobjetos para Inmunofluorescencia indirecta

Las células endoteliales (6×10^4 células) fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 22 mm² colocados en placas de cultivo de 6 pozos (Corning, EUA). Las células se trataron con citocinas proinflamatorias, en las mismas condiciones que las células sembradas en pozos y se pusieron en contacto con las células U937 (método modificado de McEvoy, 1996). Al finalizar el tiempo establecido, los pozos se lavaron dos veces con PBS y las células fueron fijadas con una solución de: paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.05% en PBS por 15-30 min, para preparaciones en donde se

utilizaron anticuerpos que reconocen moléculas del citoesqueleto y con paraformaldehído al 4% por 30 min para ensayos donde se usaron anticuerpos que reconocen moléculas de adhesión. Los fijadores fueron añadidos al medio de las muestras 10 min antes de que terminara el período de la adhesión, posteriormente este medio-fijador fue retirado y se colocó nuevamente fijador por 15 min más.

Preparaciones para Inmunofluorescencia indirecta del citoesqueleto de tubulina y actina

MICROTUBULOS DE TUBULINA

El mismo día de la fijación de las células en cubreobjetos (después de realizar el ensayo de adhesión), se llevó a cabo el procesamiento de las muestras para el análisis por inmunofluorescencia con un microscopio confocal. Los cubreobjetos con las células se lavaron dos veces más con PBS y 1 vez con agua y quedaron listos para los ensayos de inmunotinción. Se colocó una solución estabilizadora de microtúbulos que contiene: 0.1 M MES, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 1% DMSO, 1% PEG 3350 y Tritón 0.1% por 5 min a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y se colocaron sobre 20 µl del anticuerpo primario monoclonal de ratón dirigido contra α o β tubulina (Sigma, EUA), en una dilución de 1:20. Las muestras se incubaron por 1 h a 37°C en una cámara húmeda. Al finalizar este tiempo se lavaron 1 vez con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario α IgG para ratón (Vector, EUA) acoplado a FITC por 1 hora más en las mismas condiciones. Al término de la incubación se lavaron las muestras 3 veces con PBS y una vez con agua (modificado de Souza y cols, 1983). Para poder reconocer individualmente a las células, los núcleos fueron teñidos con una solución de yoduro de propidio al 10% (Sigma, EUA). Finalmente, los cubreobjetos fueron colocados sobre portaobjetos utilizando resina de montaje comercial (mountain medium de DAKO, USA) para su fijación y conservación. Las preparaciones de inmunofluorescencia se almacenaron en una caja plástica de portaobjetos a -4° C en la oscuridad.

MICROFILAMENTOS DE ACTINA FIBRILAR

Después del ensayo de adhesión y de la fijación de las células en las condiciones anteriores para tubulina, se retiró el fijador de los cubreobjetos y se lavaron 2 veces con

PBS, las muestras se permeabilizaron y se estabilizaron con una solución amortiguadora de polimerización para fibras de actina con: 75 mM Imidazol, 6 mM de $MgCl_2$, 300 mM KCl, 3 mM ATP y 0.5% de tritón por 5 min a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron 1 vez con PBS y se incubaron con 20 μ l de una solución de faloidina acoplada a FITC (Sigma, EUA) por 20-25 min a temperatura ambiente. Al final, se realizaron 2 lavados con PBS y 1 con agua (Morán y cols, 1996). Los núcleos de las células fueron teñidos con una solución de yoduro de propidio al 10% (Sigma, EUA) y colocados sobre portaobjetos utilizando una resina comercial de montaje (DAKO, EUA), para su fijación y conservación. Por último, las preparaciones fueron almacenadas en una caja plástica de portaobjetos a $-4^\circ C$.

Preparaciones para análisis de Inmunofluorescencia indirecta de Moléculas de Adhesión

El mismo día de la fijación de las células en cubreobjetos y después de realizarse el ensayo de adhesión, se llevó a cabo el procedimiento de inmunotinción. Después del tiempo de fijación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS, se colocaron sobre 20 μ l de anticuerpo primario monoclonal de ratón contra las moléculas de adhesión: ICAM-1, integrina $\beta 1$ o integrina $\beta 2$ (Sta Cruz, EUA), a una dilución 1:100 cada uno y se incubaron las muestras por 1 h a $37^\circ C$ en una cámara húmeda. Al finalizar este tiempo, se lavaron 1 vez con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario α -IgG para ratón (Roche, Alemania), a una dilución de 1:100 por 1 h más en las mismas condiciones. Al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario, las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS y una vez con agua. Al final, los cubreobjetos fueron colocados sobre portaobjetos utilizando una resina comercial de montaje (mountain medium de DAKO, EUA) para su fijación y conservación, por último, las preparaciones fueron almacenadas en una caja plástica de portaobjetos a $-4^\circ C$.

Análisis de las imágenes de inmunofluorescencia

Las imágenes de las proteínas marcadas con los fluoróforos, se obtuvieron y analizaron en un microscopio confocal MCR-1024 Bio-Rad equipado con un láser Kr/Ar y acoplado a un microscopio invertido Nikon TMD 300. La potencia utilizada del láser estuvo en un

rango del 30% al 100%, el valor de abertura del iris se ajustó en un rango de 2 a 3 para la mayoría de las muestras y una ganancia máxima. Las imágenes fueron adquiridas con los objetivos: 100x de inmersión y 10x de un microscopio invertido Nikon utilizando canales separados de 2 fotomultiplicadores, estas fueron almacenadas en unidades con capacidad de memoria de 100 MB. Por último, las imágenes capturadas se visualizaron y analizaron después de convertirlas a formato TIF con el programa computacional Confocal Assistant versión 4.02.

RESULTADOS

Caracterización de células endoteliales obtenidas de la vena de cordones umbilicales humanos (HUVEC's)

Para asegurarnos de la pureza de los cultivos obtenidos y determinar la posible presencia de células no endoteliales que alteraran los resultados y su interpretación, se realizó un análisis de inmunofluorescencia indirecta en ensayos de adhesión usando un anticuerpo primario monoclonal dirigido contra la glicoproteína o factor Von Willebrand (FVW) que se asocia al factor VIII de coagulación y la cual se expresa de manera exclusiva en células endoteliales, plaquetas y células cebadas. Fig. 11. El resultado de este análisis mostró que el 100 % de las células obtenidas, son células endoteliales y que esta proporción se conserva a lo largo de los primeros tres pasajes por lo que todos los experimentos se realizaron con cultivos en estos pasajes.

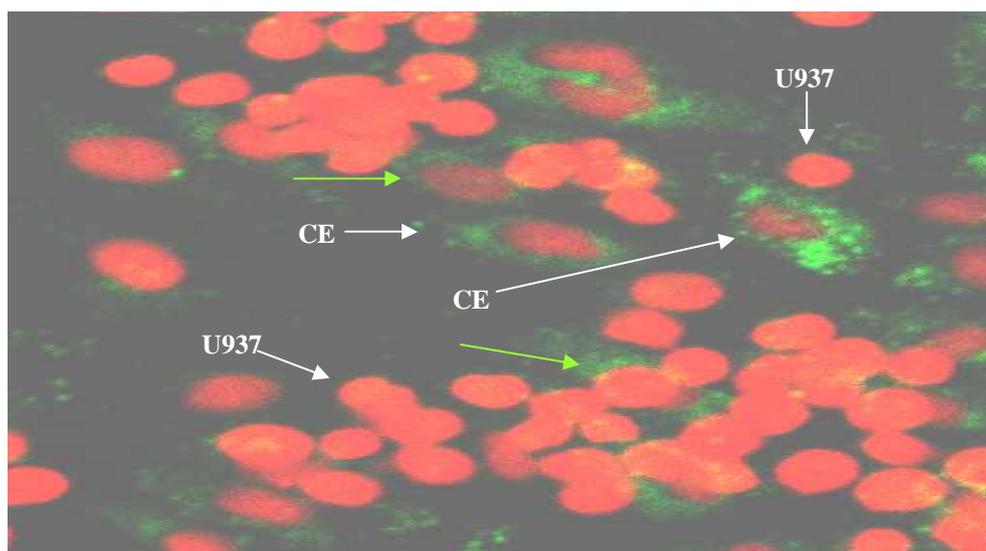


FIGURA 11. Adhesión entre células endoteliales (CE) y células U937, las células endoteliales son positivas al anticuerpo para FVW (verde), y las U937 no lo fueron. Los núcleos de ambas células fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo); los núcleos de las U937 se ven más intensos por ser el primer plano que se observa con el microscopio.

Efecto de diferentes citocinas pro-inflamatorias sobre la adhesión entre U937 marcadas con tritio (^3H) y células endoteliales

Como se mencionó anteriormente, las citocinas pro-inflamatorias activan al endotelio vascular y aumentan su capacidad de adherir leucocitos y células

tumorales (Estrada-Bernal y cols, 2003). Para evaluar los diferentes grados de activación y por consiguiente de adhesión que producen diferentes citocinas, se realizaron experimentos de adhesión marcando a las células U937 con ^3H , y se midió la radiactividad del lisado de ambas células en contacto.

Los experimentos de adhesión fueron realizados con dos tipos de poblaciones de células endoteliales, para comparar la distribución de la adhesión en células derivadas de un solo cordón umbilical con la distribución de la adhesión en células derivadas de una mezcla de 3 o más cordones, ya que los estudios en el laboratorio previos a este trabajo solo se habían realizado combinando las células endoteliales derivadas de diferentes cordones umbilicales y podrían existir diferentes capacidades de respuesta entre ambas poblaciones.

Como se muestra en la figura 12-A, las células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical en la barra control sin estímulo, presentaron solamente un 9% de adhesión, mientras que, las células endoteliales tratadas con el $\text{TNF-}\alpha$ presentaron un claro incremento de adhesión que fue del 43%. El tratamiento con la $\text{IL-1-}\beta$ también incremento el valor de adhesión con respecto al grupo control que fue del 30%, un poco menor a la adhesión que se observó con el tratamiento del $\text{TNF-}\alpha$. El tratamiento con el $\text{IFN-}\gamma$ disminuyó la adhesión con respecto a las citocinas anteriores, el valor obtenido del 12% fue muy similar al del grupo control. La combinación de citocinas $\text{TNF-}\alpha$ + $\text{IFN-}\gamma$ aumentó la adhesión al 50% y, por último, la combinación de $\text{TNF-}\alpha$ + $\text{IL-1-}\beta$ también promovió la adhesión y se obtuvo un valor similar al del tratamiento de las células endoteliales solo con $\text{TNF-}\alpha$ del 45%. A pesar de las diferencias observadas entre el tratamiento con $\text{IFN-}\gamma$ y las demás citocinas o las combinaciones entre ellas, este valor de adhesión también resultó estadísticamente significativo con respecto al control.

Por otro lado, los experimentos realizados con la mezcla de cordones fueron muy similares a los resultados anteriores. Fig. 12-B. Las células control sin estímulo, presentaron un porcentaje de adhesión del 12%, la adhesión de células U937 a las células endoteliales tratadas con el $\text{TNF-}\alpha$ tuvo un incremento del 41%. El tratamiento de las células con la $\text{IL-1}\beta$ presentó una adhesión ligeramente mayor del 45%, mientras que el tratamiento con el $\text{IFN-}\gamma$, al igual que en los ensayos realizados con células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical presentó un porcentaje igual al del control, este fue del 12%. La combinación de citocinas $\text{TNF-}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$

promovió la adhesión de las células U937 de una manera muy similar a la que promovió el tratamiento individual con el TNF- α , este valor fue del 37%, en este caso no se observó algún incremento que sugiriera una promoción del efecto por ambas citocinas sobre la activación de las células endoteliales que llevara a una mayor adhesión. Por último, el tratamiento de las células con el TNF- α y la IL-1 β juntas, tampoco promovió el efecto, al igual que en las células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical, el porcentaje de adhesión que presentaron fue del 40%. Al igual que la figura 12-A, todos los porcentajes de adhesión obtenidos son estadísticamente significativos con respecto a los resultados obtenidos con las células control sin estímulo.

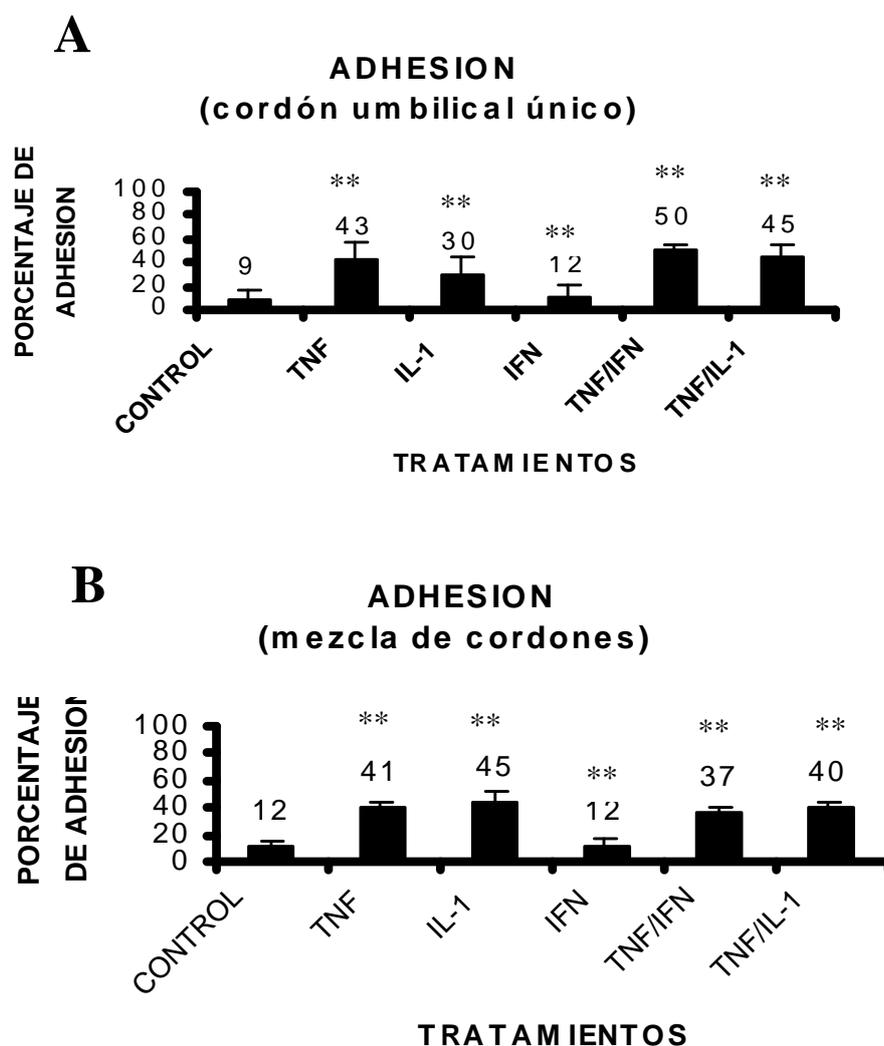


FIGURA 12. En A se observan los porcentajes de adhesión, obtenidos con células endoteliales provenientes de un solo cordón umbilical que fueron puestas en contacto con células U937 marcadas con timidina tritiada por 48 hrs. En B se observan los valores de adhesión obtenidos

en las mismas condiciones experimentales pero con células endoteliales obtenidas de un pool de cordones (**=p<0.05).

Efecto de diferentes citocinas pro-inflamatorias sobre la adhesión entre el número de U937 adheridas por célula endotelial

Para evaluar la adhesión que producen las citocinas que activan al endotelio, se realizaron ensayos de adhesión donde se evaluó el número de células promielocíticas humanas U937 adheridas por célula endotelial. La realización de experimentos comparando dos poblaciones de células endoteliales, permitió valorar si la heterogeneidad en la adhesión se presenta de forma independiente al factor genético. Los resultados indican que la adhesión de células U937 a las HUVEC's no es igual para todas las células, es decir, es heterogénea ya que, en todos los tratamientos (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , la combinación TNF- α /IL-1 β y la combinación TNF- α /IFN- γ) se observaron las mismas poblaciones de células: en la primera, las células endoteliales no presentaban contacto o adhesión con ninguna célula tumoral, en el segundo tipo de población, las células presentaron una adhesión o contacto mínimo (1, 2, 3 o 4 células), y en la tercera población, las células endoteliales tienen contacto con varias células tumorales a la vez (5 o más células).

En la figura 13-A se observan los porcentajes de adhesión del grupo control con células obtenidas de un solo cordón umbilical que presentó un 54% de células endoteliales que no tienen adhesión con células U937, 28% corresponde a una adhesión de 1 a 4 células U937 y el 18% de las células adhirió 5 o más células U937. Por otro lado, el grupo control con células obtenidas de varios cordones presentó un porcentaje mayor que fue del 77% de células endoteliales que no adhirieron U937, la adhesión de 1 a 4 células U937 fue del 16% y 7% de las células endoteliales adhirió 5 o más U937. Fig. 13-B. A pesar de la diferencia entre los porcentajes de las gráficas, el comportamiento de la heterogeneidad en la adhesión sigue siendo el mismo ya que en ambos casos la primera y última de las barras son muy parecidas.

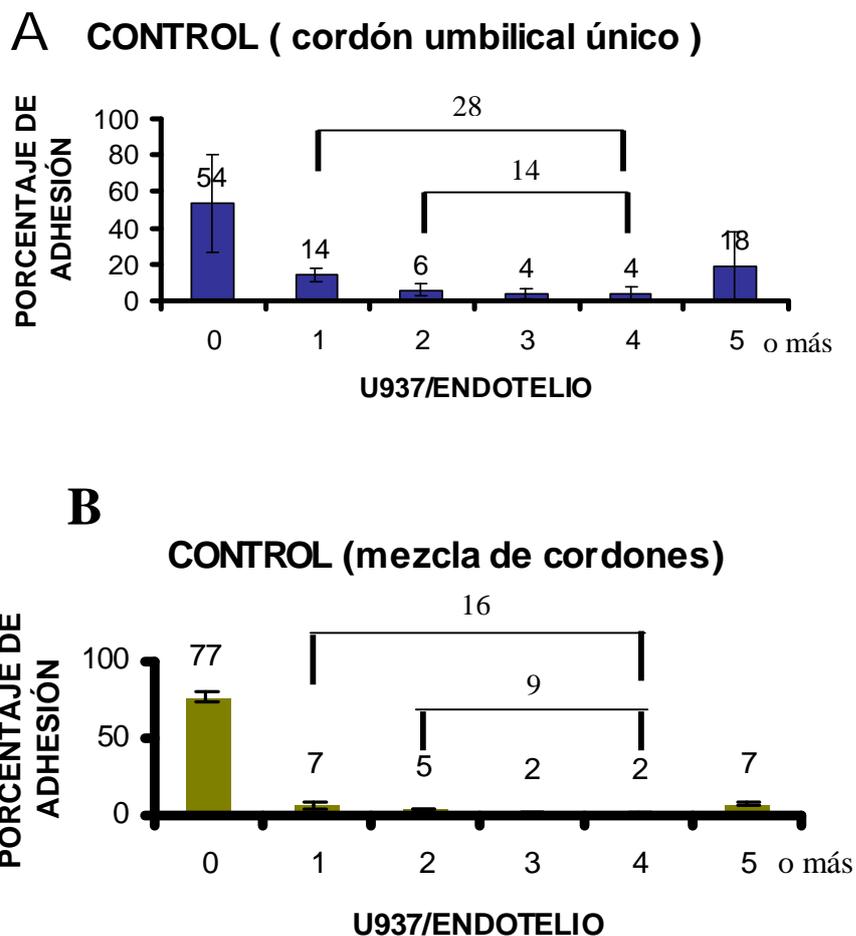


FIGURA 13. Distribución de la adhesión de U937 en células endoteliales en cultivos control no estimulados. En A se presentan los porcentajes de adhesión con células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical y en B se muestran los porcentajes con células obtenidas de varios cordones.

Células activadas con TNF- α

Cuando las células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical son activadas con el TNF- α (10ng/ml) se observó un incremento de las células que adhieren U937, especialmente aquellas que unen 5 o más células, de tal manera que el valor obtenido fue del 60%. Fig. 14-A. El resto de la población se distribuyó en, 19% para las células endoteliales activadas por el TNF- α que adhieren de 1 a 4 células U937 y, por último, un porcentaje del 21% de células endoteliales no adhirieron ninguna U937. En la figura 14-B se observan los porcentajes de adhesión de células endoteliales obtenidas de la mezcla de cordones tratadas con TNF- α

(10ng/ml). En este grupo, únicamente el 9% de las células no adhirieron ninguna célula U937, mientras que el 25% adhirieron de 1 a 4 células U937 y, el 66% de las células endoteliales adhirieron 5 o más células U937, los valores de adhesión obtenidos fueron muy similares a los que se obtuvieron con las células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical. Resultó claro que el TNF- α activa a las células endoteliales y que esta activación permite una mayor adhesión de células tumorales U937.

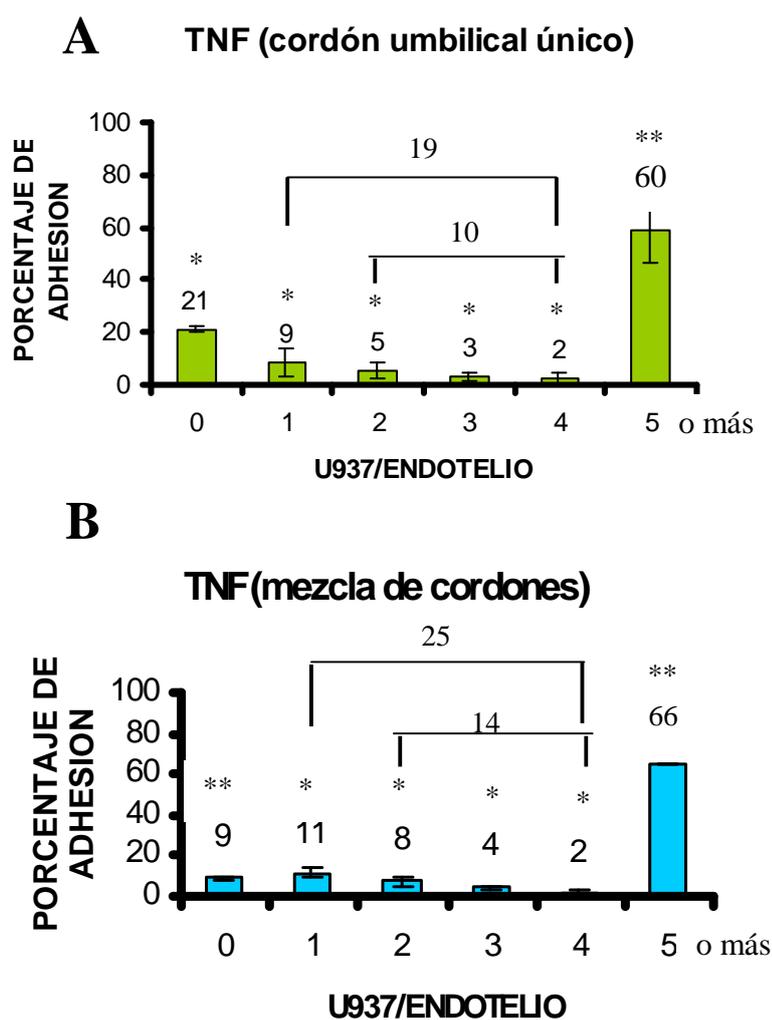


FIGURA 14. Distribución de la adhesión de células U937 a células endoteliales tratadas con el TNF α (10ng/ml). En A, se presentan los porcentajes de adhesión obtenidos con células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical y en B, se observan los porcentajes con células endoteliales obtenidas del pool de cordones (**= $p < 0.01$; *= $p < 0.05$).

Células activadas con IL-1 β

Por otro lado, las células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical y que fueron activadas con IL-1 β presentaron valores de adhesión muy similares a los presentados por el tratamiento de TNF- α . En la figura 15-A se pueden observar los porcentajes de adhesión con células obtenidas de un solo cordón umbilical. El 26% de las células endoteliales no presentaron adhesión de células U937, un porcentaje aproximado del 21% estuvo repartido en células endoteliales que adhirieron 1, 2, 3 o 4 células U937 y el 53% de las células adhirieron 5 o más células. En el caso de las células endoteliales obtenidas de la mezcla de cordones el comportamiento fue muy similar obteniéndose porcentajes parecidos, el 12% de las células endoteliales no presentó adhesión de células U937, el 30% adhirió de 1 a 4 células y el 58% de las células adhirieron 5 o más. *Fig. 15-B.* Estos datos sugieren que tanto el TNF- α , como la IL-1 β , son capaces de incrementar la adhesión de células U937 al endotelio activado.

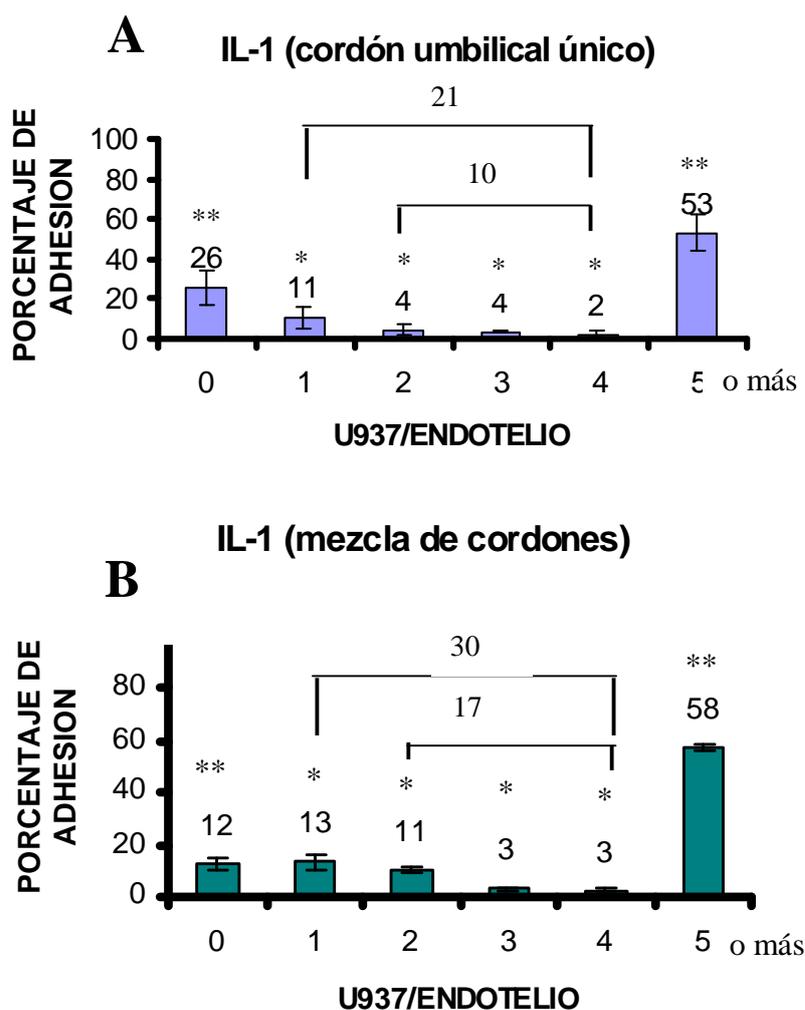


FIGURA 15. Distribución de la adhesión de U937 a células endoteliales tratadas con IL-1 β , el porcentaje más alto corresponde con TNF- α , a las células endoteliales que adhirieron 5 o más U937 en ambos tipos de células, las que fueron obtenidas de un solo cordón umbilical en A y las que fueron obtenidas de la mezcla de cordones en B (**= p<0.01; *= p<0.05).

Células activadas con IFN- γ

Los porcentajes de adhesión de las células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical y tratadas con IFN- γ fueron valores muy similares a los del control, un 64% de células endoteliales no adhirieron ninguna célula U937, un 22% estuvo distribuido entre las que adhirieron de 1 a 4 células y el 16% adhirió 5 o más células. Fig. 16-A. Las células endoteliales obtenidas de la mezcla de cordones tuvieron el siguiente comportamiento, el 75% de las células endoteliales no presentó adhesión de células U937, el 18% adhirió de 1 a 4 células y el 7% de las células adhirieron 5 o más. Fig. 16-B.

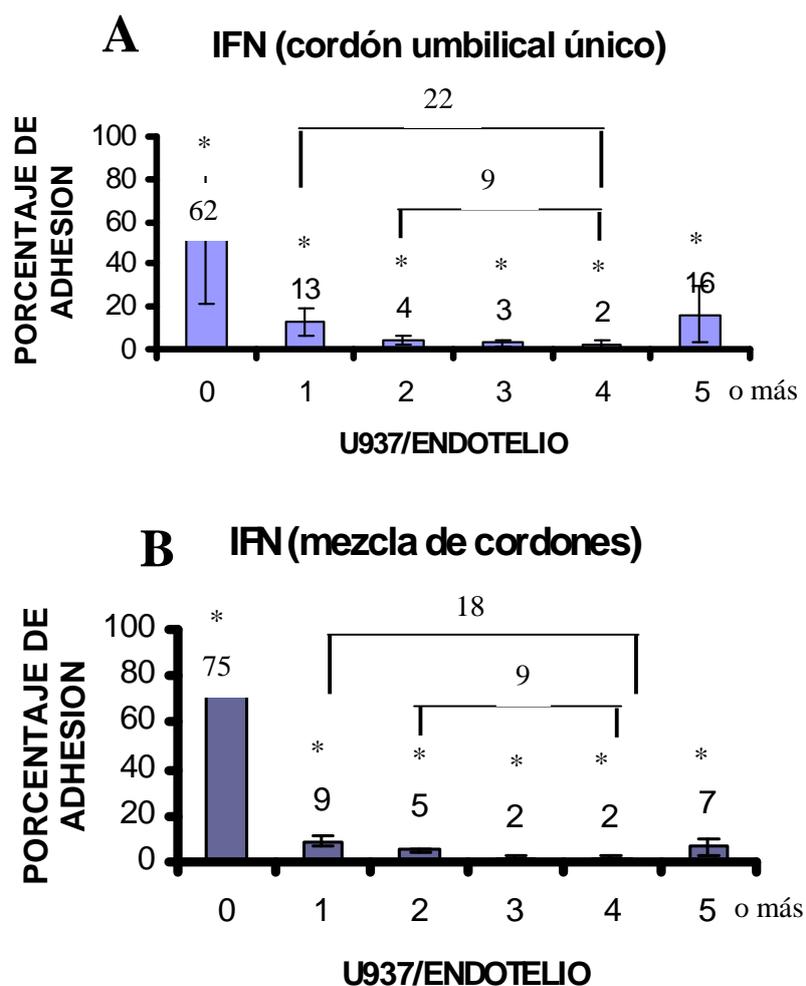
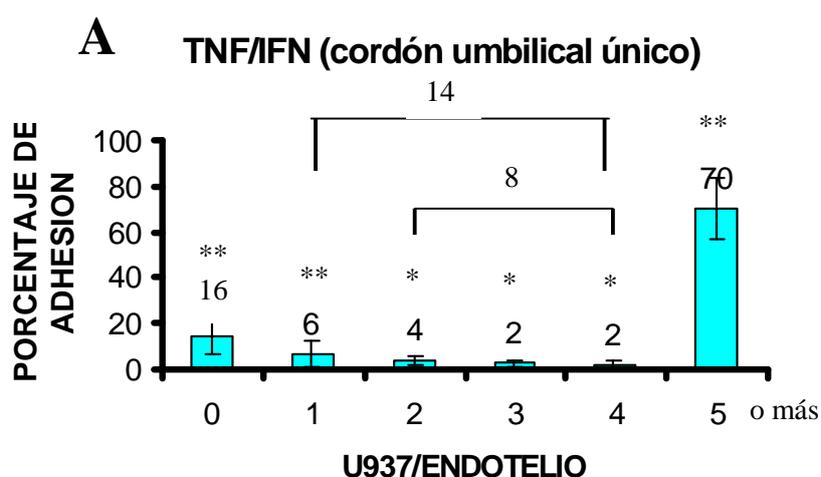


FIGURA 16. Distribución de la adhesión de U937 a células endoteliales tratadas con IFN- γ . El porcentaje más alto corresponde a las células endoteliales que no adhirieron U937. Células obtenidas de un solo cordón umbilical en A, y células obtenidas de la mezcla de cordones en B (* = $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que a diferencia del TNF- α y la IL-1 β , el IFN- γ no fue capaz de inducir un incremento en la adhesión de células tumorales a endoteliales, ya que el mayor porcentaje es de células que no hacen contacto, como sucede con células endoteliales que no han sido activadas.

Células activadas con la combinación TNF- α + IFN- γ

Para determinar si la combinación de citocinas tiene un efecto distinto sobre la adhesión realizamos los experimentos correspondientes y obtuvimos los siguientes resultados. Cuando las células endoteliales fueron tratadas con la combinación de dos citocinas colocadas al mismo tiempo, en este caso TNF- α + IFN- γ , se observa un ligero incremento de adhesión al obtenido con el TNF- α , aumentando el porcentaje de células endoteliales que adhieren 5 o más células U937. Fig. 17-A. El resto de los porcentajes (1 a 4 células U937 adheridas), se ve disminuido notablemente, sugiriendo que la fracción poblacional de células que adhirieron 5 o más células provienen probablemente de las otras poblaciones. Este tipo de comportamiento se observó tanto en las células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical, como en las células obtenidas de la mezcla de cordones. Fig. 17-B.



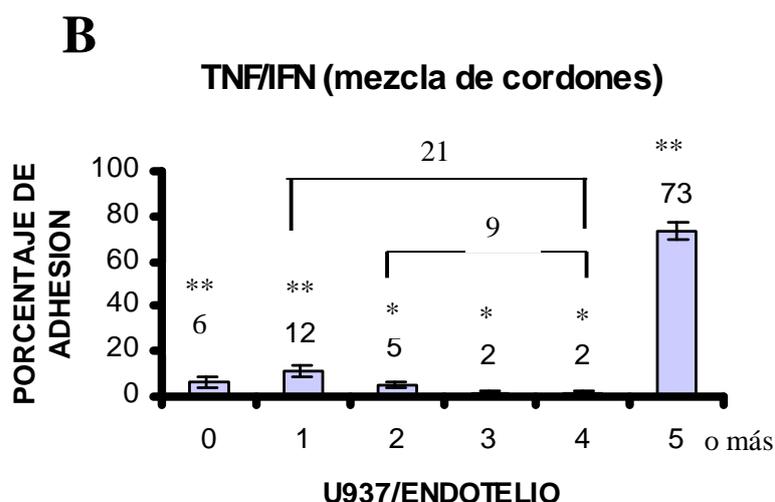


FIGURA 17. Distribución de la adhesión de U937 a células endoteliales tratadas con TNF- α e IFN- γ , se observa una potencialización del efecto de la combinación de citocinas. En A, células endoteliales de un solo cordón umbilical. En B, células endoteliales obtenidas de la mezcla de cordones (**= $p < 0.01$; *= $p < 0.05$).

Células activadas con la combinación TNF- α + IL-1 β

En el caso de la combinación de citocinas TNF- α + IL-1 β los porcentajes son similares a los que se obtienen en los tratamientos de las mismas citocinas de manera independiente; esto es, en células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical, el 12% de las células endoteliales no adhiere ninguna célula, 54% de los endotelios adhiere 5 o más células y el resto de la adhesión del 34% es distribuido entre las que adhiere de 1 a 4 células. Fig.18-A. Para las células endoteliales obtenidas de la mezcla de cordones los porcentajes de adhesión fueron: el 14% de las células no adhirió ninguna U937, el 22% adhirió de 1 a 4 células U937 y el 64% adhirió 5 o más células. Fig. 18-B. Estos resultados sugieren que no existe ningún efecto aditivo o de promoción entre TNF- α e IL-1 β como el que existe entre TNF- α e IFN- γ .

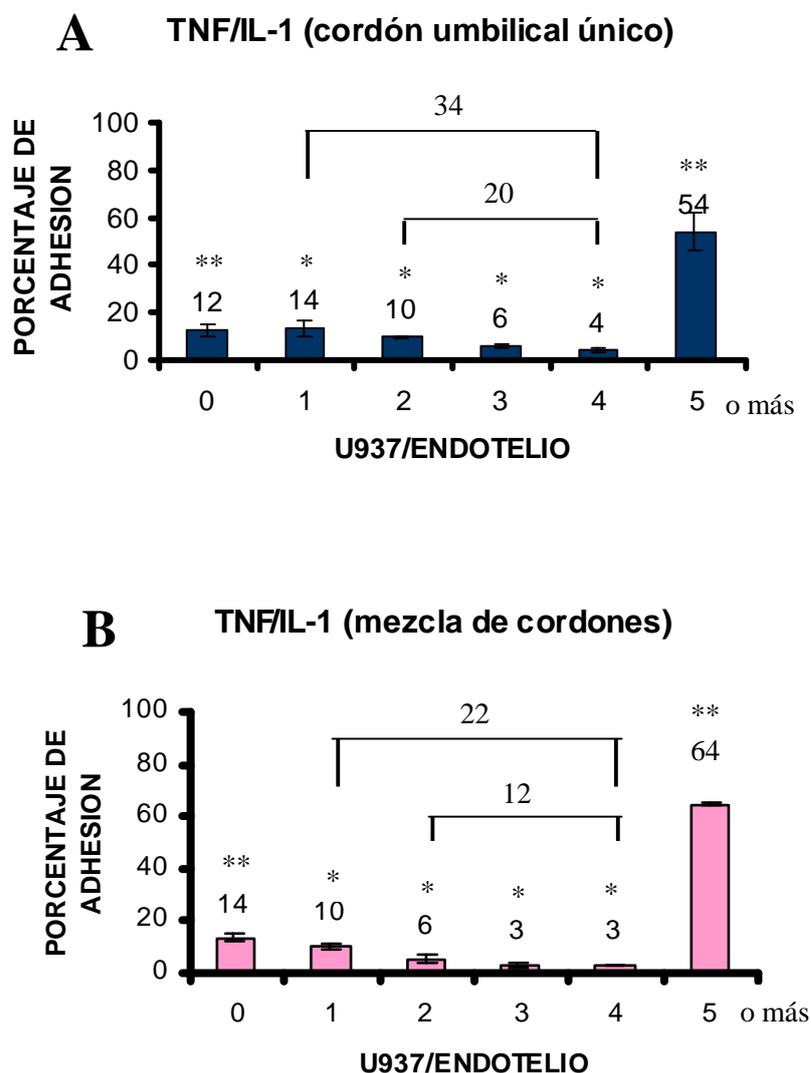


FIGURA 18. Distribución de la adhesión de U937 a células endoteliales tratadas con la combinación de citocinas TNF- α + IL-1 β en células obtenidas de un solo cordón umbilical en A, y en células obtenidas del pool de cordones en B (**= $p < 0.01$; *= $p < 0.05$).

En las tablas III y IV se muestra el resumen de los valores obtenidos con cada una de las condiciones experimentales.

U937/célula endotelial	0	1	2-4	5 o más
<i>Control</i>	54 ± 12	14 ± 4	14 ± 4	18 ± 20
<i>TNF</i>	21 ± 1	9 ± 6	10 ± 2	60 ± 13
<i>IL-1</i>	26 ± 9	11 ± 6	10 ± 2	53 ± 9
<i>IFN</i>	62 ± 21	13 ± 7	9 ± 2	16 ± 13
<i>TNF + IFN</i>	16 ± 8	6 ± 6	8 ± 2	70 ± 13
<i>TNF + IL1</i>	12 ± 3	14 ± 4	20 ± 1	54 ± 8

TABLA III. Resume los porcentajes de adhesión observados en las figuras que se presentan con distintos tratamientos de citocinas en células endoteliales obtenidas de un solo cordón umbilical (n=8).

U937/célula endotelial	0	1	2-4	5 o más
<i>Control</i>	77 ± 3	7 ± 2	9 ± 1	7 ± 1
<i>TNF</i>	9 ± 1	11 ± 3	14 ± 2	66 ± 0
<i>IL-1</i>	12 ± 3	13 ± 3	17 ± 1	58 ± 2
<i>IFN</i>	75 ± 6	9 ± 2	9 ± 1	7 ± 1
<i>TNF + IFN</i>	6 ± 2	13 ± 2	9 ± 1	73 ± 3
<i>TNF + IL1</i>	14 ± 2	10 ± 1	12 ± 1	64 ± 1

TABLA IV. Resume los porcentajes de adhesión observados en las figuras que se presentan con distintos tratamientos de citocinas en células endoteliales obtenidas de la mezcla de cordones umbilicales (n=3).

Para determinar si la activación de las células endoteliales con las citocinas pro-inflamatorias, además de inducir un incremento en la adhesión de células tumorales, promueven un incremento en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células se realizaron los siguientes experimentos.

Expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales por inmunocitofluorecencia indirecta

Para corroborar la especificidad del anticuerpo secundario que utilizamos en los experimentos, se realizaron pruebas en células endoteliales sembradas en cubreobjetos probando diferentes concentraciones para obtener una óptima. Lo que se observó, en el microscopio confocal en imagen superpuesta de fluoresceína del canal verde (522nm) y de luz transmitida, fue la morfología característica de las células sin ninguna tinción. Fig. 19. Esto indicó, que el anticuerpo secundario no reconoce antígenos inespecíficos, es decir, no acoplados a un anticuerpo primario y por lo tanto la emisión en color verde del FITC no se presenta en las muestras. La concentración óptima con la que se trabajó fue 1:100.

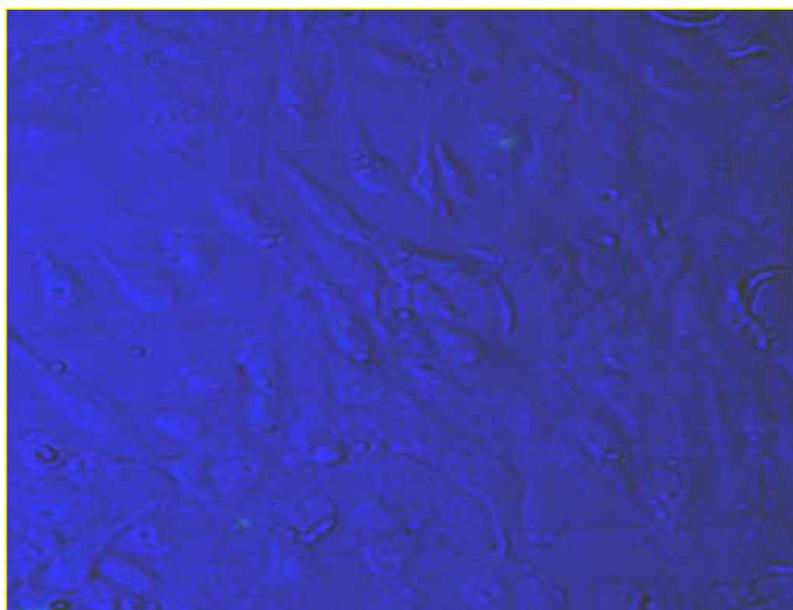


FIGURA 19. Experimentos de especificidad del anticuerpo secundario acoplado a FITC en células endoteliales. En ausencia del pretratamiento con anticuerpo primario específico, la señal en color verde del FITC no se observó. Se observa la imagen de transmisión superpuesta a la de la fluoresceína verde a una dilución 1:100, se empleó un aumento de 3x. Los parámetros fueron: láser 30%, lente 10x, ganancia máxima (1500), iris de 4.

Una vez analizada y comprobada la especificidad del anticuerpo secundario acoplado a FITC, se realizaron las tinciones con anticuerpos primarios específicos de las moléculas de adhesión. Como una primera aproximación se hicieron las tinciones en células endoteliales las cuales fueron previamente tratadas con el TNF- α (10 ng/ml) por 3 hrs o en células control no tratadas.

1.- Expresión de ICAM-1 en células endoteliales

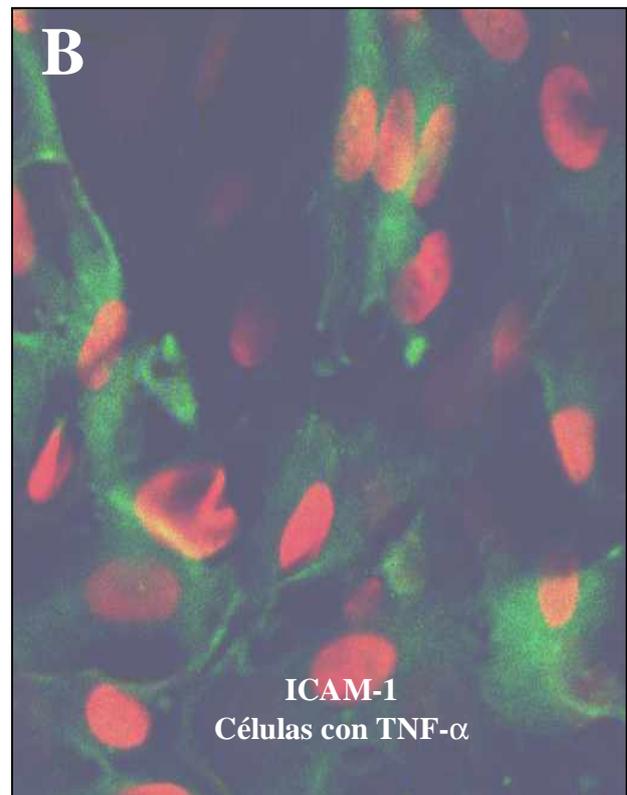
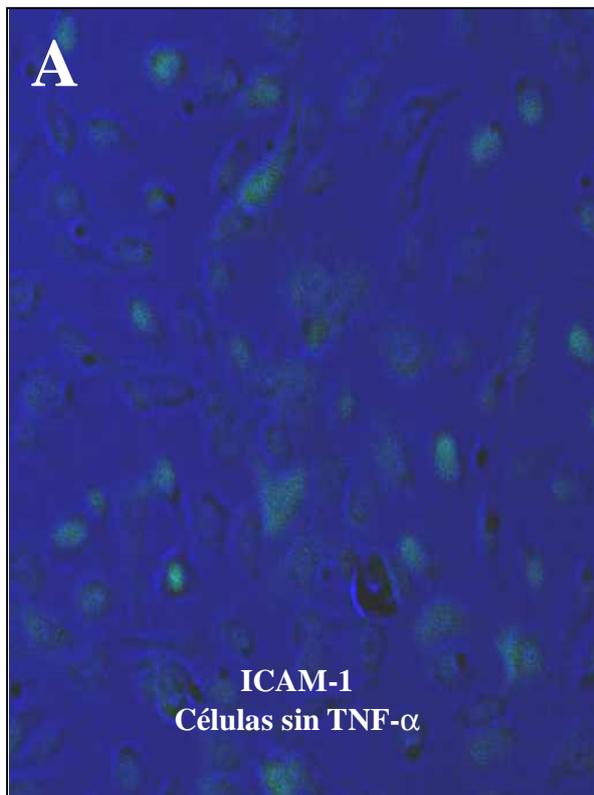
La expresión de ICAM-1 en el endotelio sin tratamiento con el TNF- α fue muy baja. Fig. 20-A. Sin embargo, el tratamiento de las células con la citocina causó un incremento en la señal fluorescente sugiriendo un aumento en la expresión de la molécula de adhesión que puede observarse en el acercamiento tomado a la muestra, los núcleos están teñidos con yoduro de propidio (color rojo). Fig. 20-B.

2.- Expresión de la integrina $\beta 2$ en células endoteliales

No hubo expresión de la integrina $\beta 2$ en el endotelio sin tratamiento del TNF- α . Fig. 20-C. Con tratamiento del TNF- α , tampoco pudo observarse ninguna tinción que indicara la presencia de la molécula de adhesión en las células. Fig. 20-D.

3.- Expresión de la integrina $\beta 1$ en células endoteliales

Las células no tratadas con la citocina no presentaron expresión de esta integrina como puede observarse en la figura 20-E, en donde solo pueden distinguirse los núcleos teñidos con yoduro de propidio y muy poco de la estructura celular. En la figura 20-F, se observa un acercamiento de las células tratadas con la citocina y que presentan una ligera tinción que sugiere la expresión de la integrina $\beta 1$.



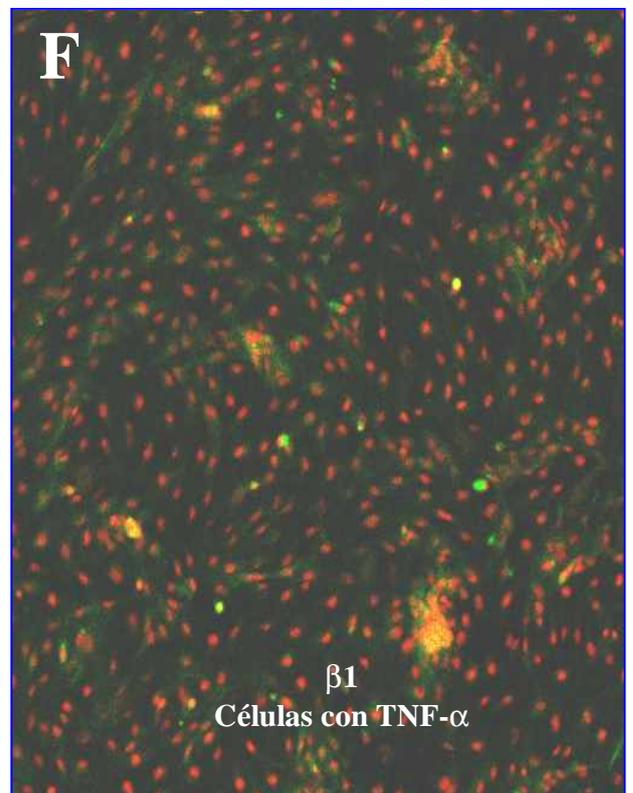
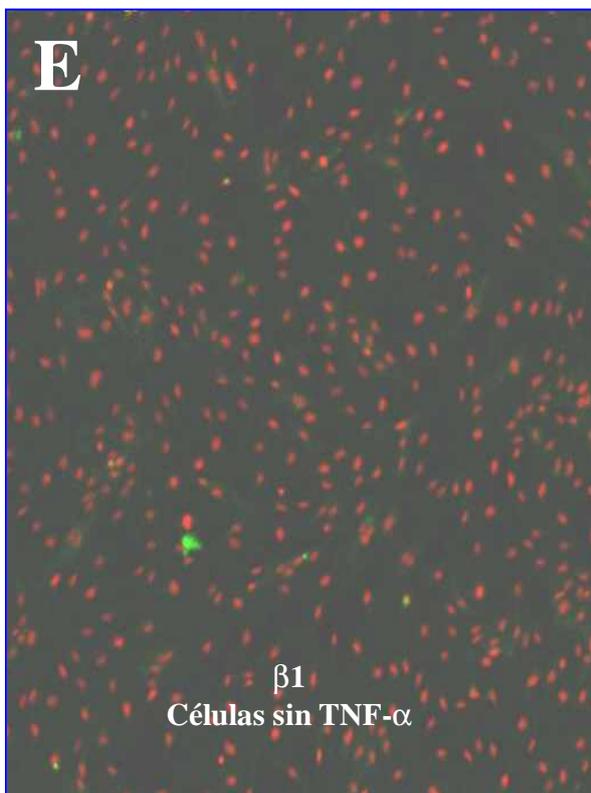
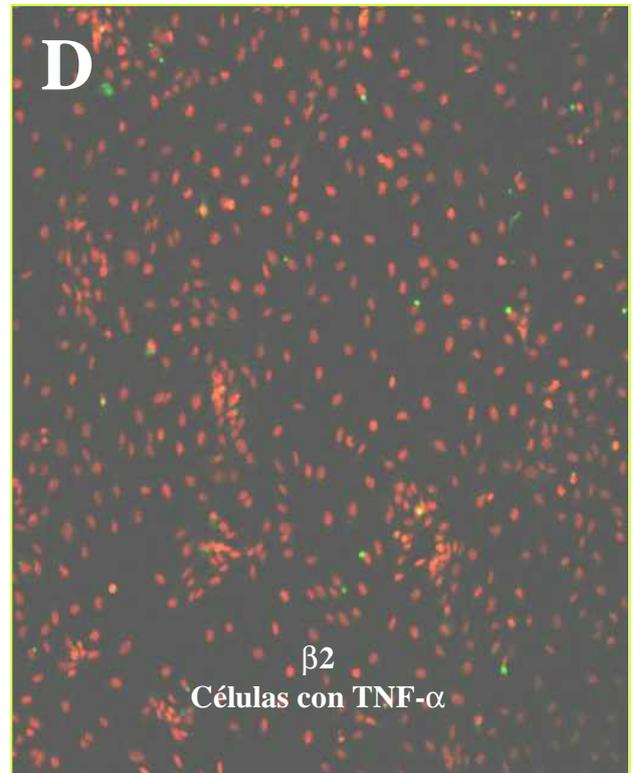
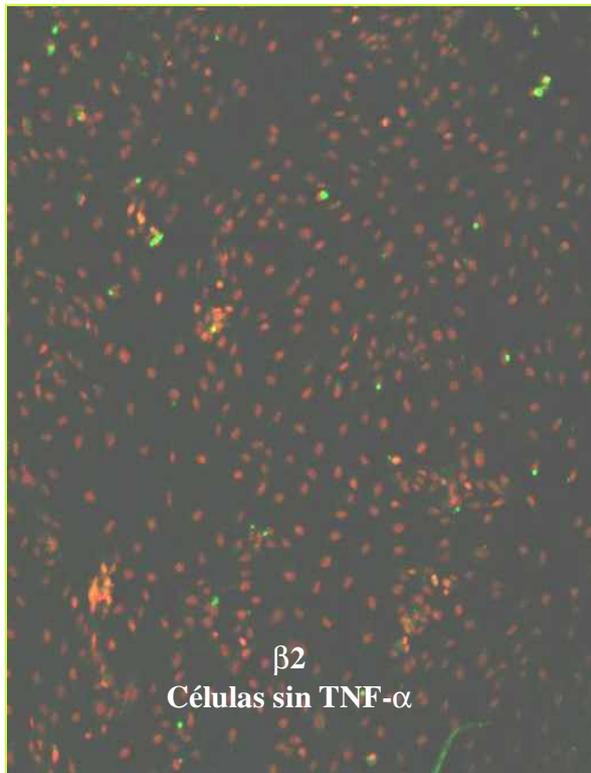


Figura 20. Células endoteliales con anticuerpos contra las moléculas de adhesión sin tratamiento: A, C y E; y tratadas con TNF- α : B, D y F. En A, expresión de ICAM-1, parámetros del microscopio: lente 100x, láser 30%, aumento 1x, ganancia máxima (1500), iris 5. En B, fuerte expresión de ICAM-1 en el endotelio con tratamiento, parámetros del microscopio: láser 30%, aumento 4x, lente 100x, color verde: ganancia máxima (1500), iris 4, color rojo: ganancia de 800, iris 3. En C y D, expresión de la integrina β 2, ambas muestras se adquirieron bajo los siguientes parámetros del microscopio: láser 30%, aumento 1x, lente 10x, ganancia máxima, iris máximo. Por último en E y F, se observa la expresión de la integrina β 1, parámetros del microscopio: láser 100%, aumento 1x. Ambas muestras fueron adquiridas con una ganancia máxima (1500) y un iris máximo (8).

Para determinar si estas moléculas de adhesión se expresan también en las células tumorales, y además su localización se restringe a los puntos de contacto entre ambas células, se hicieron los siguientes experimentos.

Expresión de moléculas de adhesión durante los ensayos de adhesión entre células endoteliales y células U937

Una vez observados y analizados los patrones de expresión de las moléculas de adhesión: integrinas β 1, ICAM-1 e integrina β 2 en preparaciones que solo contenían células endoteliales, realizamos las mismas tinciones en ensayos de adhesión, donde las células endoteliales fueron tratadas previamente con TNF- α .

4.- Expresión de ICAM-1 en ensayos de adhesión

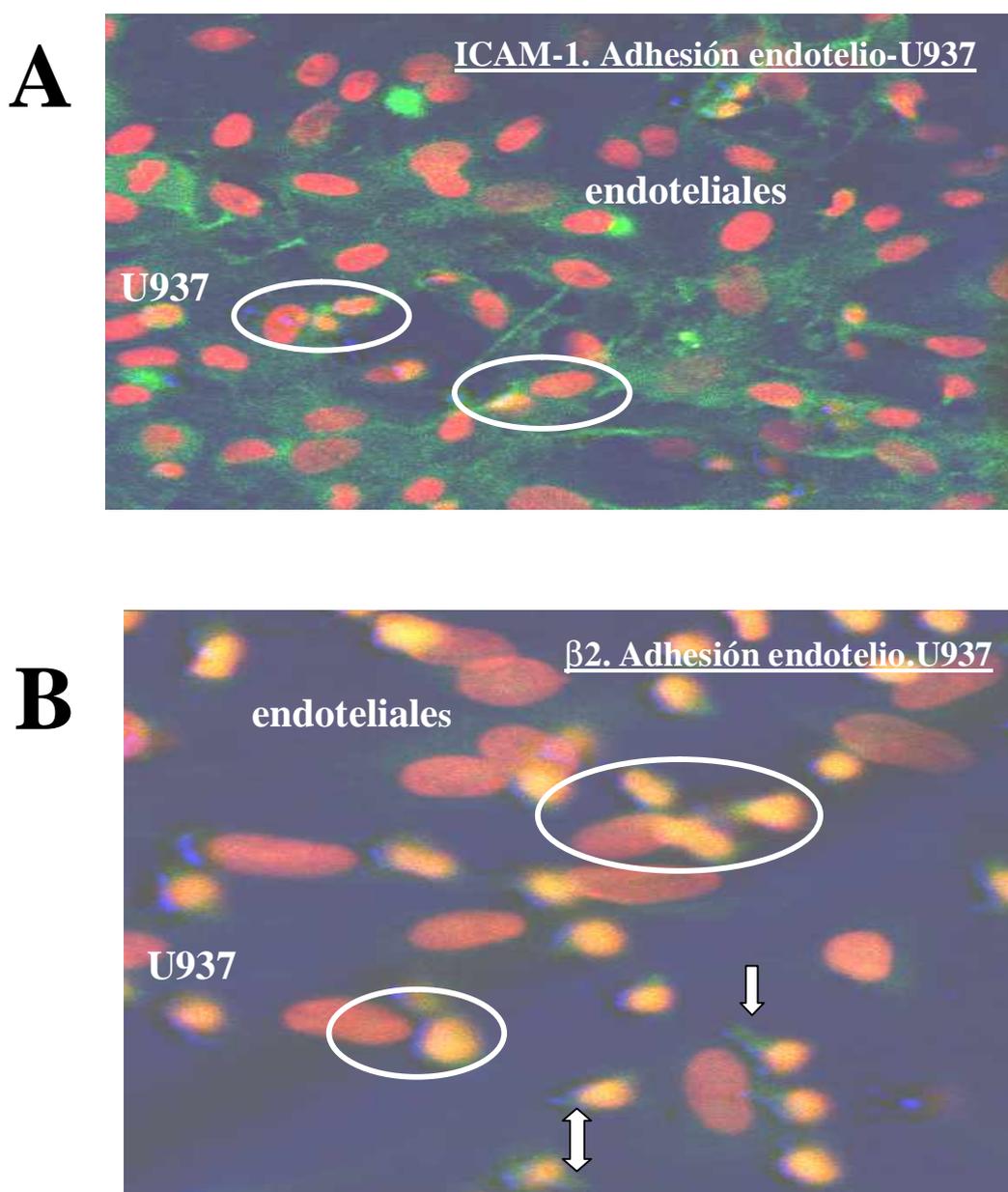
Se observó una clara expresión de ICAM-1 (color verde) en los ensayos de adhesión, de tal forma que también permite distinguir las morfologías de ambos tipos celulares durante la adhesión (círculos blancos), así como sus núcleos (color rojo). Fig. 21-A. Tanto las células endoteliales como las células U937 presentan señal de la molécula de adhesión aunque al parecer, es en las células endoteliales donde su expresión es mayor.

5.- Expresión de la integrina β 2 en ensayos de adhesión

La señal de la integrina β 2 en los ensayos de adhesión mostró un patrón diferente, restringido a las células U937. En las zonas de contacto pueden distinguirse prolongaciones teñidas en verde (círculos blancos), con una mayor intensidad de fluorescencia que podría indicar una mayor expresión de la molécula de adhesión (flechas blancas), los núcleos de ambas células están teñidos con yoduro de propidio, pero, en particular en las U937, la sobreposición de los colores verde-rojo, genera un color celular naranja o amarillo. Fig. 21-B.

6.- Expresión de la integrina $\beta 1$ en ensayos de adhesión

Durante la adhesión de células endoteliales y células U937 se observó una clara expresión de la integrina $\beta 1$ en ambas células (color verde), además, se observan también las morfologías de las células y el contacto entre ellas (círculos blancos), los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (color rojo). Fig. 21-C. En las imágenes adquiridas se observa también la formación de pequeñas prolongaciones que fluorescen con una mayor intensidad lo que podría indicar una mayor expresión de la molécula de adhesión (flechas blancas).



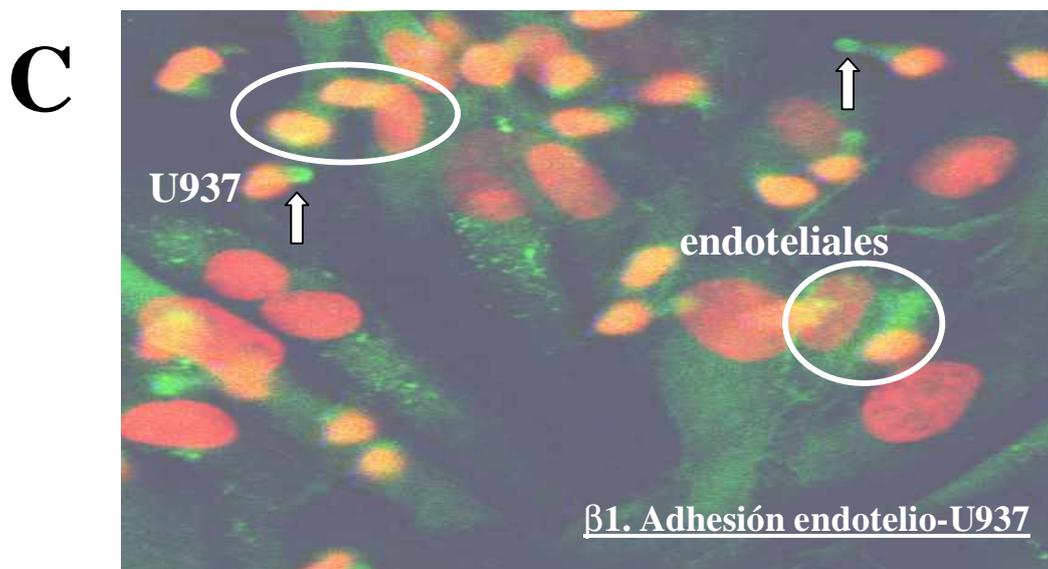


Figura 21. Ensayos de adhesión entre células endoteliales y células U937, las coloraciones en verde, corresponden a los anticuerpos contra diferentes moléculas de adhesión y en rojo, pueden observarse los núcleos de las células teñidos con ioduro de propidio, los círculos blancos indican un contacto o adhesión entre ambas células y las flechas blancas una prolongación emitida por células U937. A, expresión de ICAM-1; B, expresión de la integrina $\beta 2$; C= expresión de la integrina $\beta 1$. Las 3 imágenes representativas fueron tomadas con los siguientes parámetros: potencia del láser del 30%, zoom 4 y lente 100x, verde (FITC): ganancia 1000, iris 4; rojo (IP): ganancia 700, iris 3).

	<i>ICAM-1</i>	<i>Integrina $\beta 2$</i>	<i>Integrina $\beta 1$</i>
HUVEC 'S sin TNF	MUY POCA SEÑAL	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL
HUVEC 'S con TNF	SEÑAL ALTA	NO HAY SEÑAL	POCA SEÑAL SOLO EN U937
ADHESION HUVEC 'S Y U937	SEÑAL FUERTE EN AMBAS CÉLULAS	SEÑAL FUERTE SOLO EN LAS CELULAS U937	SEÑAL FUERTE EN AMBAS CÉLULAS

TABLA V. Patrón de expresión de las moléculas de adhesión durante ensayos de adhesión entre células endoteliales y células U937 en 3 condiciones experimentales.

Finalmente, para determinar si la activación de las células endoteliales además de inducir un incremento en la adhesión de células tumorales y en la expresión de moléculas de adhesión, promueve cambios en el citoesqueleto de las células, que sugieran una preparación de las células U937 a la diapédesis después de una adhesión estable con el endotelio, realizamos los siguientes experimentos.

Análisis del citoesqueleto de actina en ensayos de adhesión

Las preparaciones celulares fueron incubadas con una sonda acoplada a FITC, que se une a los microfilamentos de actina celulares. La morfología de las células endoteliales es aplanada y alargada, mientras que, la morfología de las U937 es más pequeña y redonda. Fig 22. Los círculos en rojo muestran los puntos de contacto entre las células, las imágenes superpuestas de color verde y rojo da una mezcla que resulta en una tonalidad anaranjada o amarilla observada en las U937. No se observó en ninguna de las imágenes adquiridas la formación de prolongaciones similares a pseudópodos o zonas de despolimeración evidentes en las células U937 que sugieran cambios del citoesqueleto para efectuar movimientos celulares. Fig. 23-A y B.

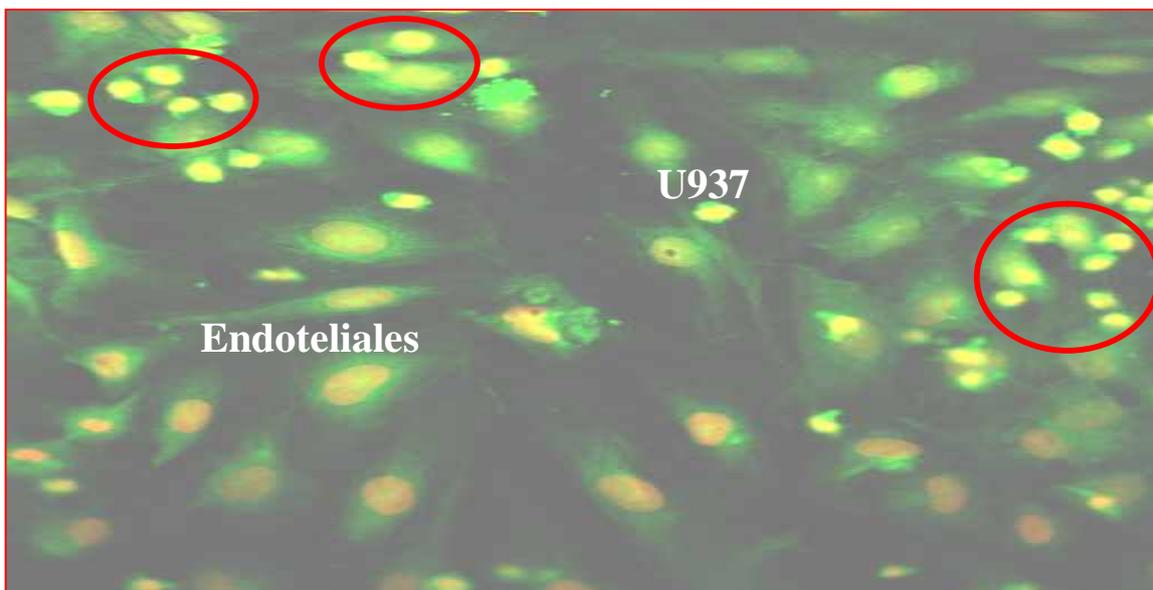


Figura 22. Ensayo de adhesión donde las células están teñidas con una sonda fluorescente en color verde para microfilamentos de actina, los núcleos están teñidos en rojo con yoduro de propidio, pueden observarse las morfologías de ambas células y el contacto

establecido entre ellas (círculos rojos). Parámetros del microscopio: láser 30%, aumento 1x, lente 100x, verde (FITC): ganancia 1000, iris 4, rojo (IP): ganancia 700, iris 3.

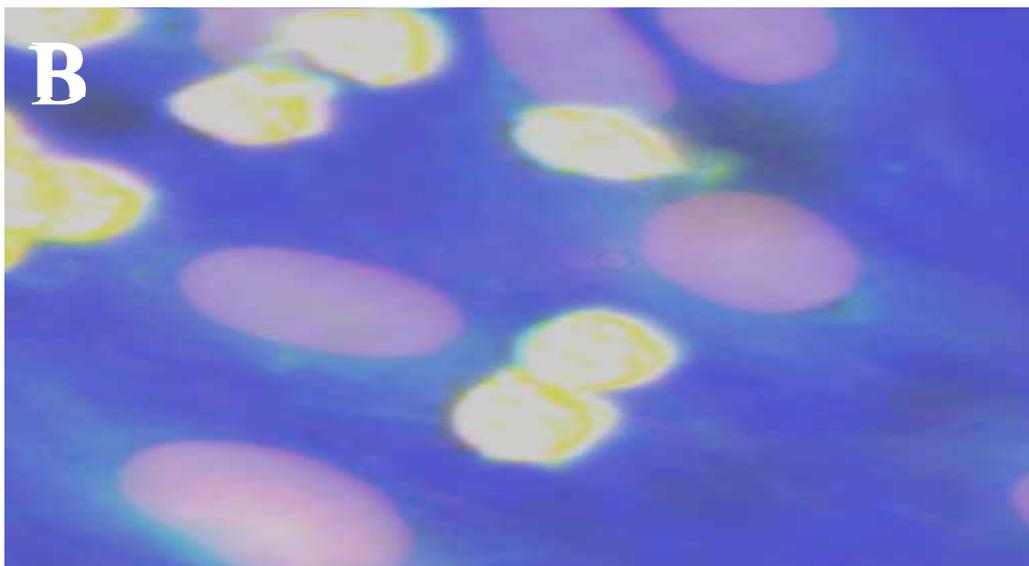
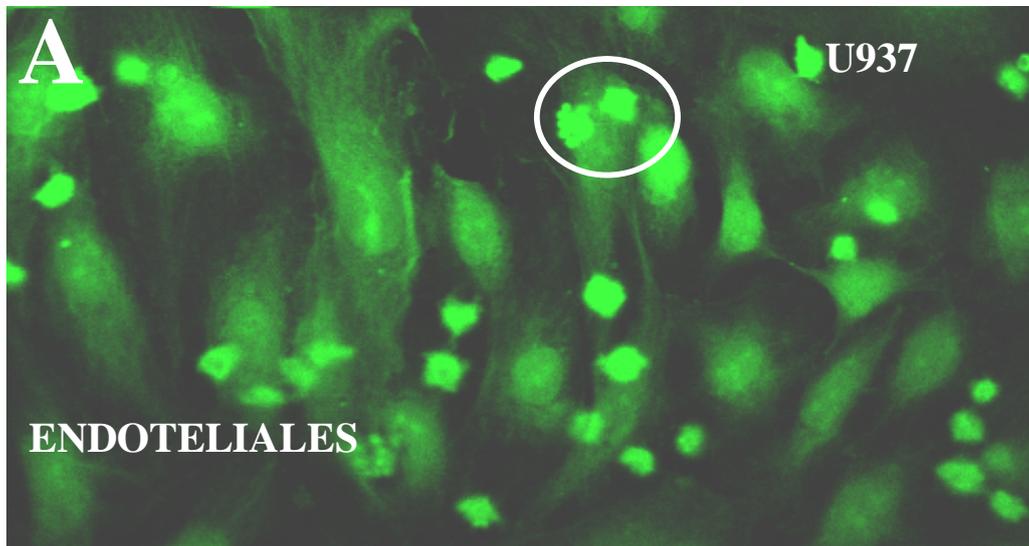


Figura 23. Ensayos de adhesión teñidos con una sonda fluorescente en verde para microfilamentos de actina. En ninguna de las imágenes (A y B) fue observable a primera vista ningún cambio en la morfología de las células como formación de prolongaciones o zonas de despolimerización de las fibras. Parámetros del microscopio: láser 30%, aumento 4x, lente 100x, verde (FITC): ganancia 1000, iris 4, rojo (IP): ganancia 700, iris 3.

Análisis del citoesqueleto de tubulina en ensayos de adhesión

La última parte de este proyecto, consistió en analizar la tubulina del citoesqueleto de las células una vez establecido el contacto. Esto se hizo para

tratar de identificar cambios en las morfologías celulares o zonas de despolimerización de las fibras del citoesqueleto que sugirieran la preparación de las células para una migración o diapédesis. En la figura 24 se puede observar la morfología típica alargada de las células endoteliales formando una monocapa uniforme en color verde, la coloración está superpuesta a una imagen de transmisión en el microscópio.

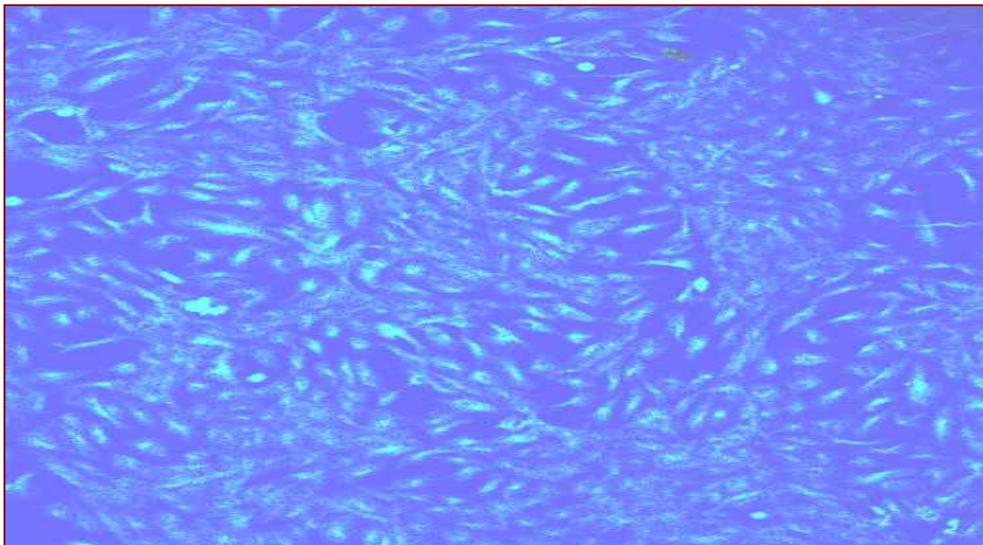


Figura 24. Células endoteliales teñidas con un anticuerpo primario contra tubulina y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Puede observarse la morfología típica celular. La muestra fué tomada con los siguientes parámetros: potencia del láser del 30%, zoom 1 y lente 10x, verde (FITC): ganancia 1500, iris 4.

Posteriormente, el análisis del citoesqueleto de tubulina se llevó a cabo en ensayos de adhesión. A diferencia de las muestras donde se analiza el citoesqueleto de actina, que se observa la presencia de prolongaciones similares a pseudópodos en las células U937 que establecen el contacto con el endotelio. Fig. 25-A y B. A diferencia de las células tumorales no se observaron estas estructuras en las células endoteliales. Por otro lado, tampoco fueron observables en las muestras zonas de contacto o adhesión entre las dos células que sugirieran una despolimerización o rearrreglo de las fibras del citoesqueleto. Debido a la posición que toman las células en el ensayo de adhesión (U937 sobre endotelial), la tinción de los anticuerpos resalta o se hace mas intensa en las células U937 que están en el plano superior.

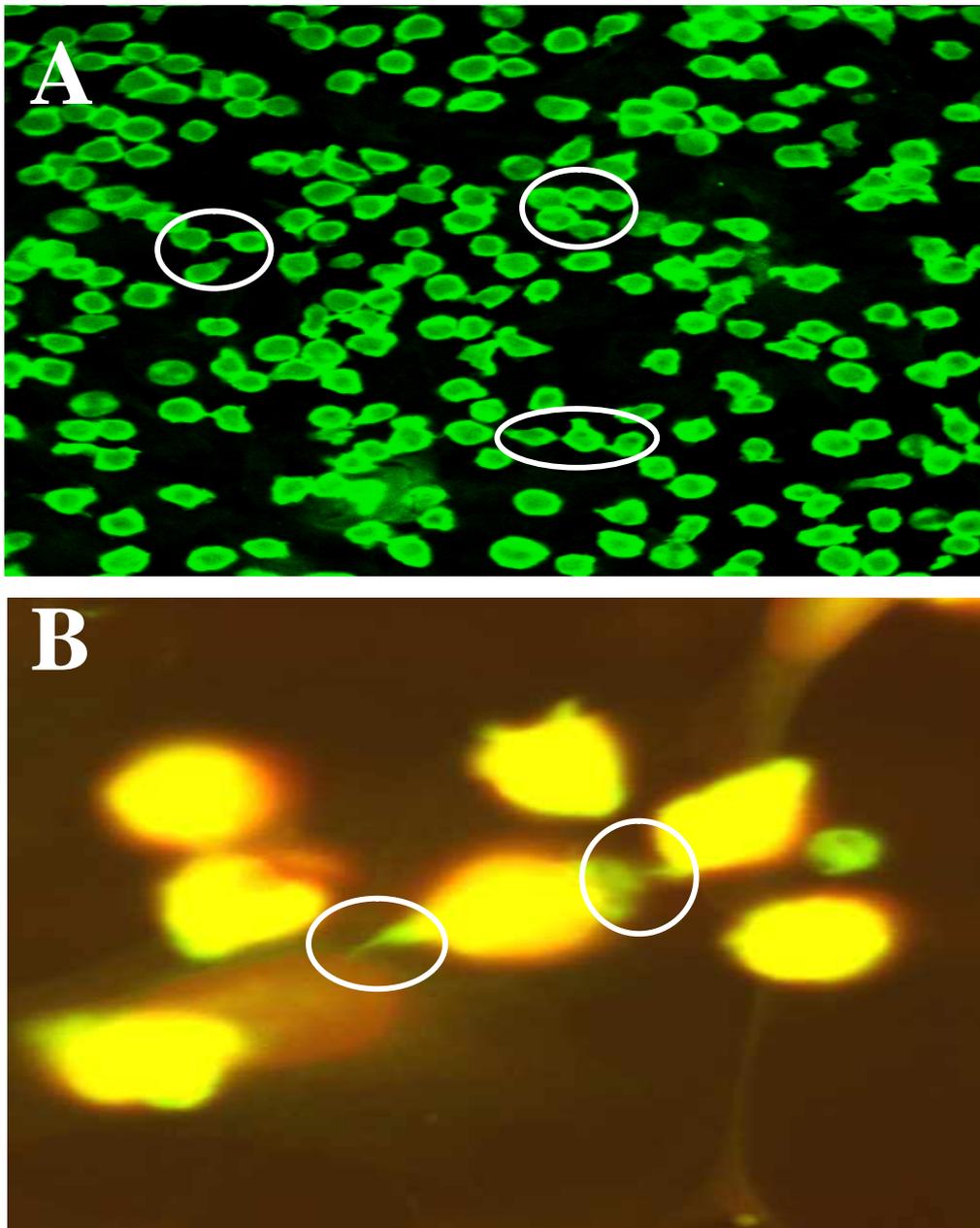


Figura 23. Ensayos de adhesión de células endoteliales y células U937 teñidas con un anticuerpo primario contra tubulina y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. En A, pueden observarse en las U937, prolongaciones similares a pseudópodos (círculos blancos); verde (FITC): ganancia 1000, iris 5; en B, acercamiento de la adhesión donde se alcanzan a percibir las prolongaciones de manera más clara; verde (FITC): ganancia 900, iris 5; rojo (IP): ganancia 800, iris 3). Ambas muestras fueron tomadas con una potencia del láser del 30% y lente 100x.

DISCUSIÓN

I. Análisis de la Adhesión

El endotelio vascular como modelo de estudio

La mayor parte del tiempo las células endoteliales interactúan con la sangre y sus elementos celulares en un estado de reposo, en el cual, las células realizan ciertas funciones fisiológicas como la importación de nutrientes, indispensables para el mantenimiento del tejido irrigado o las respuestas que les permiten adaptarse a los cambios locales de presión. Sin embargo, estas mismas células experimentan un cambio radical en su fenotipo y en sus funciones, al ser expuestas a factores secretados al medio por diversos tipos celulares circulantes o de tejidos cercanos (Augustin y cols, 1994; Estrada-Bernal, 2002). La capacidad del endotelio vascular para hacer estos rápidos cambios de sus funciones, así como su extensa localización en cualquier parte del organismo, han hecho del endotelio un interesante y accesible modelo de estudio en procesos que requieren de las interacciones con otras células, como ocurre con los leucocitos en la reacción inflamatoria o con las células tumorales metastásicas durante la invasión de tejidos blanco.

Importancia y dificultades técnicas de trabajar con cultivos primarios

Si bien las células endoteliales de mayor interés son las que recubren las vénulas post-capilares, el acceso a este tipo de células es muy limitado. Esta limitación técnica ha llevado a que las células endoteliales que han servido como modelo en la mayoría de los estudios descritos en la literatura, sean las que recubre los grandes vasos, principalmente, las de aorta de rata, de aorta de bovino o las de la vena del cordón umbilical humano (Chatterjee y cols, 2003; Isenovic y cols, 2003; Takeo y cols, 2003). Un caso excepcional, es el estudio de cultivos de células endoteliales primarias de micro-vasculatura, obtenidas de prepucios humanos o de pulmón (Krump-Konvalinkova y cols, 2001), sin embargo, el número de células que se obtienen en estos cultivos es muy reducido y por tanto, limitante para estudios bioquímicos o moleculares. Todas estas limitaciones han llevado al establecimiento de líneas de células endoteliales (Kieda y cols, 2002), donde lamentablemente las células o bien han perdido muchas de las

características fenotípicas y funcionales que caracterizan a las células endoteliales o bien no son inmortales, por lo que no se consideran un modelo endotelial adecuado.

Existen hasta el momento pocas líneas celulares ya establecidas de endotelio vascular humano o de origen bovino. Todas ellas han sido generadas transfectando diferentes oncogenes virales a cultivos primarios de células endoteliales, tal es el caso de la línea de células endoteliales humanas HMEC-1, derivadas de cultivos primarios de células endoteliales de micro-vasculatura de prepucios humanos. Si bien la presencia de oncogenes les confiere inmortalidad a estas líneas y por tanto facilitan su manejo, cultivo y análisis molecular, en la misma medida alteran la fisiología celular, alejándolas de su condición fisiológica intacta. Estas dificultades han llevado a intentar nuevas estrategias para establecer modelos endoteliales *in vitro*, en particular empleando endotelio de origen humano (MacKenzie y cols, 2002; Veitonmaki y cols, 2003; Gagnon y cols, 2002; Murasawa y cols, 2002; O'Hare y cols, 2001).

Al inicio de la década de los 60's, el Dr. Jafee de la Escuela de Medicina de la Universidad de Cornell desarrolló un procedimiento sencillo que permite establecer cultivos celulares primarios, altamente enriquecidos en células endoteliales humanas derivadas de la vena del cordón umbilical, obtenido de partos eutócicos o incluso de cesáreas. Este modelo se ha convertido en una poderosa herramienta para realizar diversos estudios y experimentos, orientados al estudio de las funciones endoteliales imposibles de realizar *in vivo*. Los cultivos primarios de células endoteliales humanas obtenidas de la vena de cordones umbilicales han permitido a varios grupos, entre ellos al nuestro, poner a prueba la hipótesis de que existen interacciones funcionales (análogas a la activación en la respuesta inflamatoria) y físicas (como la adhesión celular) entre células endoteliales primarias humanas y células tumorales humanas.

El factor Von Willebrand (VW) asociado al factor VIII de coagulación como marcador endotelial

Un problema frecuente al trabajar con cultivos primarios radica en determinar la pureza del cultivo, ya que éste podría estar contaminado con

células de músculo liso, fibroblastos o células hematopoyéticas. Todos estos tipos celulares adicionales a las células endoteliales, están presentes en la vena del cordón umbilical. El procedimiento diseñado por Jaffe, asegura que un gran porcentaje (más del 90%) de las células obtenidas, está constituido por células endoteliales, sin embargo, para determinar con precisión la pureza de los cultivos, se han buscado antígenos proteicos que se expresen sólo en las células endoteliales, entre los que se encuentran: i) el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), ii) la caderina-E, iii) el factor VW asociado al factor VIII de coagulación, y más recientemente iv) el antígeno asociado a las uniones endoteliales estrechas JAM-1. El antígeno que nosotros seleccionamos fue el factor asociado al factor VIII de coagulación, originalmente descrito como factor Von Willebrand, en honor al investigador que lo describió por primera vez. Este antígeno se expresa también en plaquetas y en células cebadas. Las células endoteliales expresan a esta proteína de manera constitutiva y la almacenan en vesículas citoplásmicas próximas a la membrana celular. En respuesta a estímulos pro-inflamatorios como el TNF- α , las vesículas se fusionan con la membrana celular y el factor VW, expresado en la superficie celular se une al factor VIII, favoreciendo la coagulación en respuesta a un daño vascular (Chung-Welch y cols, 1989; Pu y cols, 2002).

Para este proyecto se realizaron análisis con anticuerpos contra el factor Von Willebrand, que revelaran la pureza de los cultivos primarios de las células endoteliales derivadas de cordón umbilical con las que se trabajó y que fue del 100%.

Naturaleza heterogénea de la adhesión de células U937 a células endoteliales (HUVEC)

Los experimentos de adhesión realizados previamente en nuestro grupo (Estrada-Bernal y cols, 2003), habían documentado la adhesión cuantificando el número de células U937 marcadas con $[H^3]$ -timidina unidas a una monocapa de células endoteliales control o activadas con diferentes citocinas o productos derivados de células tumorales (Fig. 12-A y B). Se había documentado sólo en forma cualitativa, que al observar la adhesión al microscopio parecía ser

heterogénea, esto es, que a pesar de haber expuesto a todas las células HUVEC al mismo estímulo, en un mismo pozo, existen células endoteliales que no adhieren ninguna célula del mieloma U937 mientras que su vecina puede adherir un número variable de 1 a 10. Es interesante notar que a pesar de la extensa literatura que documenta la adhesión de neutrófilos, polimorfonucleares y monocitos a las células endoteliales (Ward y Marks, 1989; Robbins y cols, 1995; Yarwood y cols, 2000; Sedgwick y cols, 2000; Bradley y Watson, 1996; Schall y Bacon, 1994), en ninguno de estos trabajos se menciona si la adhesión observada es homogénea o heterogénea. Por esta razón el presente trabajo se ha dedicado en buena parte a caracterizar este fenómeno.

La adhesión heterogénea no se debe a variaciones genéticas de los donadores

Ya que los estudios previos a este trabajo se habían realizado combinando las células endoteliales derivadas de diferentes cordones umbilicales, la heterogeneidad podría resultar de una mezcla de diferentes poblaciones endoteliales con diferentes capacidades de respuesta. Por esta razón, los experimentos de adhesión fueron realizados con dos tipos de poblaciones de células endoteliales. Se comparó la distribución de la adhesión en células endoteliales derivadas de un solo cordón umbilical con la distribución de la adhesión en células derivadas de una mezcla de 3 o más cordones. La similitud de los datos obtenidos en ambas poblaciones de células endoteliales, sugiere que la heterogeneidad no se debe a diferencias genéticas de las donadoras o a variaciones fisiológicas de los embarazos.

Estas observaciones de nuestra parte pueden apoyarse con los diversos estudios hechos por otros grupos de investigación con células endoteliales obtenidas de la vena de cordones umbilicales (HUVEC's) (Pu y cols, 2002; Matheny y cols, 2000; Raab y cols, 2002; Lewalle, 1997; Augustin y cols, 1994), donde no hacen ninguna mención de haber trabajado con ciertas poblaciones de células endoteliales de su cultivo. Por tanto, debemos decir que la heterogeneidad es una característica propia del tipo celular presente en la población endotelial de cada vena de cordón umbilical.

Ciclo celular como posible fuente de la heterogeneidad en la adhesión

Otro aspecto que no fue analizado experimentalmente a detalle, pero fue tomado en cuenta en esta discusión, es que la heterogeneidad pudiera estar asociada al ciclo celular. Ya que el cultivo primario es asincrónico, teniendo células en todas las fases del ciclo celular, podría postularse por ejemplo, que las células endoteliales que no unen células U937 a pesar del estímulo con las citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , podrían ser células que han iniciado su compromiso de proliferación localizadas en la transición de G1 a S. En contraposición a esta hipótesis, es importante considerar que todos los experimentos fueron realizados con células que al tocarse entre ellas y formar una monocapa (confluencia), detienen su ciclo celular y se sincronizan de manera natural en la fase temprana de G1, por esta razón, consideramos que la heterogeneidad tampoco está asociada al ciclo celular. Para nosotros la heterogeneidad en la capacidad adhesiva que presentan las células endoteliales, sólo puede reflejar una heterogeneidad funcional entre células endoteliales.

Heterogeneidad tumoral

Datos recientes muestran que las poblaciones de células neoplásicas son también heterogéneas. Se ha demostrado que células obtenidas de diferentes tumores individuales varían con respecto a propiedades como: morfología, tasa de proliferación, cariotipo, características metabólicas, potencial inmunogénico, producción de proteínas de matriz extracelular, moléculas de adhesión, receptores a hormonas, así como su habilidad invasiva (Friedl y cols, 1995). El aspecto más interesante es comprender como se origina, mantiene y controla esta heterogeneidad. Estudios como el de Kang y colaboradores (2003), en los que se ha usado ratones desnudos como modelos para metástasis de neoplasias humanas han demostrado que muchas líneas celulares tumorales humanas como el melanoma, el carcinoma de seno, el carcinoma de próstata, el carcinoma renal o de colon son biológicamente heterogéneos y contiene subpoblaciones de células con propiedades metastáticas muy diferentes (Heyder y cols, 2002).

¿Qué significa la adhesión heterogénea de U937 a células HUVEC?

Parece que dentro de un tipo celular morfológica y antigénicamente homogéneo como las células endoteliales, existen variaciones funcionales que apenas ahora estamos reconociendo. Esta perspectiva nos obliga a pensar de una manera diferente acerca de la forma en que una población celular responde a un estímulo.

En este trabajo en particular, fueron distinguidas diferentes subpoblaciones o tipos de células endoteliales que presentaron comportamientos variables en la adhesión con U937, a pesar de que todas las células del pozo fueron estimuladas de la misma forma. Se encontraron células endoteliales que no adhirieron U937, algunas que adherían pocas U937 (1 o 2) y otras que parecieron tener una mejor capacidad o ventaja de adhesión, ya que las U937 que presentaban unidas a su superficie eran desde 3, 4, 5 o más. Al respecto, la literatura solo menciona de forma general que, efectivamente se ha logrado distinguir una heterogeneidad o presencia de subpoblaciones celulares endoteliales, pero en ninguno de ellos se profundiza con otros estudios esta respuesta (Modur y cols, 1996; Pober y cols, 1986; Pu y cols, 2002; van Rossen 2001).

La naturaleza misma de la heterogeneidad funcional aún queda indeterminada pero ya que todos los casos de heterogeneidad funcional han sido documentados *in vitro*, una interrogante de gran importancia consiste en saber si *in vivo* también se presenta este fenómeno, en cuyo caso sería de gran relevancia en la fisiología normal y patológica (Brener y cols, 1995; Voura y cols, 1998). Como complemento de los resultados acerca de la heterogeneidad en la adhesión presentados en este documento, actualmente se desarrolla en el laboratorio un proyecto complementario en el que se analiza por microscopía electrónica de barrido y transmisión la vena completa del cordón umbilical, tratada con el mismo protocolo de adhesión usado *in vitro*, los resultados hasta el momento son muy alentadores, ya que al parecer, la heterogeneidad observada en nuestros experimentos es también observable en las células endoteliales de la vena del cordón umbilical *in vivo*.

Hasta el momento desconocemos las bases celulares para la heterogeneidad en la adhesión de células U937 a la superficie endotelial pero

podemos plantear varias alternativas. 1) Que a pesar de que las células endoteliales son homogéneas en cuanto a su expresión de antígenos específicos como el factor Von Willebrand, exista una gran heterogeneidad funcional que se refleja en su capacidad adhesiva. 2) Que el proceso de adhesión sea muy complejo y susceptible a fallar. En este caso la heterogeneidad podría reflejar diferentes estadios en el proceso de una adhesión multicelular exitosa (adhesión de 5 o más células) y de adhesiones en proceso de aborto (adhesión variable de 1 a 4 células U937), 3) que la heterogeneidad no se presente en las células endoteliales sino en la capacidad de auto-agregación de las células tumorales lo cual podría asegurar su permanencia sobre el endotelio.

Es evidente que la heterogeneidad en la respuesta endotelial podría jugar un papel importante en la metástasis, pero el origen de esta heterogeneidad no parece ser genética a diferencia de la heterogeneidad presente en las células de un mismo tumor.

II. Análisis de las Inmunocitoquímicas

Detección de las moléculas de adhesión

De forma paralela a los estudios orientados a analizar la heterogeneidad en la adhesión, se realizaron estudios orientados a identificar la presencia de moléculas de superficie que participaran en la adhesión intercelular entre el endotelio y las células U937. La función de reconocimiento célula-célula a través de las moléculas de adhesión, es un mecanismo primordial para muchos procesos fisiológicos normales, o patológicos como la inflamación o la invasión y diseminación de células tumorales (Schall y Bacon, 1994; Robbins y cols, 1995; Muller, 1996; Yarwood y cols, 2000).

Está bien documentado que en la respuesta inflamatoria participan 4 grandes familias de moléculas de adhesión que son: selectinas, integrinas, caderinas e inmunoglobulinas, todas ellas proteínas expresadas en la superficie de las células endoteliales (Modur y cols, 1996; Kuby, 1997; Pober y cols, 1986; Raab y cols, 2002; Kuninaka y cols, 2000).

En general todos los miembros de las familias de moléculas de adhesión participan en: i) la captura de leucocitos desde el torrente sanguíneo, ii) la

adhesión de los mismos a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, y iii) posteriormente la extravasación de las células inmunes siguiendo el gradiente de quimio-atrayentes establecido por citocinas y quimiocinas hacia el sitio lesionado donde se produce una reacción inflamatoria.

Ya que la expresión de la ICAM-1 en la superficie apical de las células endoteliales participa en la adhesión firme de los leucocitos, evaluamos su patrón de expresión con el propósito de determinar su posible participación en la adhesión de las células U937. Como ya se ha reportado en el laboratorio por Estrada-Bernal, la expresión de ICAM-1 es muy baja en células endoteliales en reposo y aumenta significativamente cuando las células son tratadas con citocinas como el TNF- α , estos cambios fueron caracterizados principalmente por citofluorometría.

En este proyecto, en particular, el patrón de expresión obtenido por microscopía confocal de fluorescencia de la ICAM-1 fue parcialmente difuso, respetando la región nuclear en la mayoría de las células (Fig. 21-A). Este patrón bien podría ser el resultado de moléculas de ICAM-1 en tránsito del retículo endoplásmico hacia la superficie celular y reflejaría una expresión irregular sobre la membrana. En las zonas de contacto con las células U937 (marcadas en las imágenes con círculos), no se observó ninguna variación en la señal fluorescente asociada a ICAM-1, implicando que si la molécula participa en la adhesión, el proceso no va acompañado de una redistribución que la concentre en estas zonas. Cabe mencionar que si bien en principio, el microscopio confocal permite acercarse a las regiones de contacto, esto requiere de una señal de fluorescencia intensa. Desafortunadamente, nuestras tinciones no presentaron esas características, lo que se reflejó en nuestro uso de aperturas de iris mayores a 2. Con esta limitante, no pudimos analizar secciones ópticas con diámetros menores a 10 μm , y por tanto, tampoco nos permitió evaluar posibles variaciones en la localización de ICAM-1 o de las otras moléculas de adhesión analizadas.

Las imágenes de fluorescencia sugieren la presencia de ICAM-1 en la superficie de las células U937, aunque interpretamos su menor intensidad como un menor nivel de expresión, comparado con las células endoteliales. Cabe mencionar que la expresión de ICAM-1 en la superficie de células tumorales

reportado por Brakebusch y colaboradores (2002), se ha asociado a un incremento de su capacidad metastásica y cursa con un mal pronóstico clínico. La identificación de ICAM-1 en las células U937 no fue inesperado, ya que van Rossen y colaboradores (2001), ya habían reportado la detección de esta y otras moléculas de adhesión en un modelo de adhesión parecido al nuestro entre células mesoteliales y tumorales. Sin embargo, lo que a la fecha no se ha definido es si las moléculas de ICAM-1 expresadas en la superficie tumoral encuentran contra-receptores $\alpha_3\beta_2$ o $\alpha M\beta_1$, en la superficie de las células endoteliales.

Estudios realizados por Vladova (2002), acerca de la expresión de ICAM-1 y otras moléculas de adhesión, involucran a esta molécula no solo en la adhesión célula endotelial-célula tumoral, sino también como un receptor que dirige la migración de las células tumorales hacia el órgano blanco de metastásis.

Ya que los contra-receptores de ICAM-1 son integrinas de la familia β_2 , en particular la integrina $\alpha_3\beta_2$, se analizó el patrón de expresión de esta integrina en células endoteliales con y sin tratamiento de TNF- α , pero sin U937 adheridas. Igualmente, se analizó su expresión durante la adhesión de células U937. En este caso, la expresión de la molécula de adhesión, estuvo restringida sólo a las células U937 (Fig. 2- B). Debido a que las células U937 poseen poco citoplasma, la superposición de la tinción nuclear roja del ioduro de propidio sobre la tinción verde de la fluoresceína asociada a la integrina β_2 , generó un color anaranjado o incluso amarillo en las imágenes, dependiendo de las intensidades relativas de cada una de las señales. Un hallazgo interesante con esta tinción fue la presencia de pequeñas zonas irregulares de color verde en la periferia de las células U937 adheridas a las células endoteliales (Fig. 21-B). Esta observación sugiere extensiones citoplásmicas o pseudópodos de las células U937. Nuestros resultados no permiten definir si la integrina β_2 , juega un papel en la formación de dichos pseudópodos. Para poder realizar este análisis sería necesario contar con una tinción más intensa que permitiera al menos definir si la integrina se encuentra en la superficie de contacto entre ambas células.

Finalmente, analizamos el patrón de expresión de la integrina β_1 , que forma parte de los contra-receptores de VCAM-1, otra de las moléculas de adhesión clave en la respuesta inflamatoria para el tráfico leucocitario y que también está

involucrada con células tumorales, como las de cáncer de mama (Charpin y cols, 1998).

En este caso, encontramos señal fluorescente asociada a la integrina β_1 tanto en las células endoteliales como en las células U937. El patrón en las células endoteliales fue punteado y sugiere la presencia de puntos de adhesión focal entre la membrana basal de las células endoteliales y el cubreobjetos. En contraposición a esta distribución, en la identificación de la integrina β_1 en las células U937, observamos una imagen superpuesta de los canales rojo y verde que sugiere una distribución homogénea sobre la superficie de estas células, y que debido a la presencia de un gran núcleo rodeado de poco citoplasma genera una tinción de color anaranjado o amarillo. Interesantemente, al igual que para la integrina β_2 se identificaron pequeñas zonas irregulares de color verde alrededor de las células U937 adheridas a la superficie endotelial. Sin embargo, a diferencia de la tinción con la integrina β_2 , la integrina β_1 si mostró zonas con mayor intensidad de fluorescencia, (marcadas con una flecha blanca en las imágenes) (Fig. 21-C). Este patrón, sugiere no solo la formación de pseudópodos que emanan de las células U937, sino también una redistribución de la integrina β_2 que parece concentrarse en las regiones distales de estos pseudópodos.

Quedarían por realizarse experimentos de co-localización de las dos integrinas, esperando que ambas colocalizaran en las estructuras que parecen pseudópodos de las células U937. Una corroboración más directa de que la integrina β_2 participa en el proceso de adhesión, requeriría de la co-tinción con anticuerpos dirigidos contra la integrina α_4 o contra VCAM-1. Para este análisis, sería necesaria la obtención de rebanadas ópticas muy delgadas empleando el microscopio confocal y de una reconstrucción tridimensional virtual con ayuda de un programa de análisis y reconstrucción de imágenes. Un seguimiento temporal del proceso de adhesión también podría arrojar información acerca de estas zonas de fluorescencia de mayor intensidad asociada a la integrina β_2 . Las imágenes obtenidas con los anticuerpos anti- integrina β_2 son alentadores ya que indican que es posible obtener imágenes que evidencien la presencia de moléculas de adhesión en sitios de contacto entre las células U937 y las células endoteliales.

Valoración de las imágenes del citoesqueleto de tubulina y actina

El análisis de las muestras con tinciones para el citoesqueleto de actina o de tubulina tuvo los mismos inconvenientes que las muestras de las moléculas de adhesión, el acercamiento para la observación de las muestras, provocó la superposición de los colores que generaron una gran intensidad de luz que no permitió distinguir algún cambio como despolimerización de las fibras del citoesqueleto de las U937 en las zonas de contacto con las células endoteliales que se encontraban debajo. El objetivo del análisis del citoesqueleto era precisamente la identificación de zonas irregulares que coincidieran con las zonas donde se establecía la adhesión entre las células U937 y el endotelio, como una propuesta, al igual que con las muestras de las moléculas de adhesión sería útil en el futuro el análisis de este tipo de muestras desde un plano superior con el uso de programas computacionales que permitan una reconstrucción tridimensional así como ciertas rotaciones del plano de la imagen.

A pesar de las dificultades técnicas para analizar el citoesqueleto celular, fue posible apreciar en varias imágenes, que han sido las mostradas en este trabajo, la formación de prolongaciones en el citoesqueleto de las células U937 a manera de pseudópodos, que parecen extenderse para el establecimiento de la adhesión con el endotelio, esto fue observable únicamente en las muestras del citoesqueleto de tubulina ya que previamente se habían analizado las muestras del citoesqueleto de actina y no se observaron estos cambios en la forma de las células. Generalmente, cuando una célula se enfrenta a un cambio en su morfología ante un estímulo del medio, el primer elemento que se modifica es el citoesqueleto de actina y posteriormente el de tubulina, varias horas después y por último, se modifican los filamentos intermedios. En el caso de nuestros resultados, nosotros pensamos que quizá no estamos detectando cambios en el citoesqueleto de actina, debido a que estos cambios son detectables en las células a tiempos más tempranos en lo que se refiere al ensayo de adhesión. En el caso de las prolongaciones observadas en el citoesqueleto de tubulina es probable que nuestro ensayo de adhesión y los cambios de estas fibras estén coincidiendo en un momento favorable.

A futuro, podemos pensar como otra opción, en analizar el citoesqueleto de las células en diferentes estadios de tiempo durante el ensayo de adhesión, que nos dieran más datos para sustentar la hipótesis planteada originalmente acerca de una preparación de las células para iniciar un proceso de migración o diapédesis a través de la monocapa endotelial.

En lo que se refiere a la literatura, existen pocos estudios acerca de cambios en el citoesqueleto de estos dos tipos celulares en el proceso de adhesión, pero, seguramente este será un campo de estudios muy prometedor en el futuro, como una alternativa más para interferir con la metastásis de células tumorales.

CONCLUSIONES

Este proyecto, se enfocó en el análisis de la adhesión entre células tumorales U937 y células endoteliales, tomando como modelo lo que ocurre en la respuesta inflamatoria entre leucocitos y células endoteliales.

En la primera parte del desarrollo del proyecto, pudimos identificar la presencia de subtipos celulares en cultivos de células endoteliales con el mismo origen y que presentaron una heterogeneidad de respuesta al mismo estímulo, este es un fenómeno común, observado en diferentes tipos celulares, pero difícil de explicar en términos moleculares. La identificación de alguna de las causas que expliquen por qué algunas células endoteliales no presentan adhesión de células tumorales podría servir como una alternativa clínica para disminuir o suprimir la invasión de células malignas durante la metástasis.

En el análisis de la distribución y posible participación de moléculas de adhesión específicas, encontramos una mayor tinción positiva para ICAM-1 y las integrina $\beta 1$, lo cual sugiere, a reserva de confirmarlo con más estudios, que estas moléculas tienen un papel relevante en la adhesión. La identificación de estos receptores, así como el papel que desempeñan en la interacción de células tumorales y endoteliales, permitiría en el futuro su uso como marcadores clínicos y diagnósticos de las etapas de la enfermedad, con la posibilidad de interferirla en algún punto.

Por último, este proyecto analizó, cambios observables en los filamentos que componen el citoesqueleto. Específicamente, la formación de prolongaciones similares a pseudópodos o zonas de despolimerización en el contacto de las células U937 y endoteliales que sugirieran movimientos celulares de ambas para el proceso de migración. Solo la formación de prolongaciones fueron detectables en el análisis de tubulina y no se detectó ningún cambio en el citoesqueleto de actina.

En teoría la inhibición de alguno de los pasos del proceso metastático, desde la liberación inicial de células en la circulación en el sitio primario del tumor, o en los estados finales de crecimiento en el nuevo órgano, pueden ofrecer blancos terapéuticos.

La investigación acerca de los mecanismos moleculares que regulan la patobiología de la metástasis del cáncer, así como un mejor entendimiento de la interacción entre las células metastásicas y el microambiente del huésped pueden proveer un fundamento para nuevas aproximaciones terapéuticas.

REFERENCIAS

1. A. Haskell C, D. Cleary M, F. Charo I. (1999). Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. *J Biol Chem*, 274: 10053-10058.
2. Albelda S, Buck C. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB*, 4:2868-2880.
3. Albelda S. (1994). Role of Cell Adhesion Molecules in tumor Progression and Metastasis. *The Handbook of Immunopharmacology: Adhesion Molecules*. Chapter 4. Academic Press Limited. USA.
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. (1996). *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. Barcelona, España.
5. Andrews E, Wang J, Winter D, Laug W, Redmond H. (2001). Tumor cell adhesion to endothelial cells is increased by endotoxin via an upregulation of $\beta 1$ Integrin expression. *J Surg Res*, 97:14-19
6. Augustin H, Kozian D, Jonson R. (1994). Differentiation of endothelial cells: Análisis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays*, 16:901-906.
7. Baud V, Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biol*, 11: 372-377.
8. Bishara NB, Dunlop ME, Murphy TV, Darby IA, Sharmini Rajanayagam MA, Hill MA. (2002). Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular Ca^{2+} signaling in endothelial cells. *J Cell Physiol*, 193 :80-92.
9. Bradley L, Watson S. (1996). Lymphocyte Migration into Tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Current Opinion in Immunology*, 8: 312-320.
10. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R. (2002). Integrins in invasive growth. *J Clin Invest*, 109: 999-1006.
11. Brener W, Langer P, Oesh F, Edgell Cora –Jean S, Wieser R.J. (1995). Tumor cell-endothelium adhesion in an artificial venule. *Analyt Bioch*, 225: 213-219.
12. Burns A, Bowden R, MacDonell S, Walker D, Odebunmi T, Donnachie E, Simon S, Entman M, Smith W. (2000). Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Scien*, 113: 45-57.
13. Cavallaro U, Christofori G. (2000). Molecular mechanism of tumor angiogenesis and tumor progresión. *J Neuro-Oncol*, 50: 63-70.
14. Cavallaro U, Christofori G. (2001). Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Bioch et Bioph Acta*, 1552: 39-45.

15. Clemens M.J. (1991). Cytokines en Medical Perspectives Series. Read A & Brown T Eds. BIOS Scientific Publishers. Oxford, U.K.
16. Cohen Even-Ram S, Maoz M, Pokroy E, Reich R, Katz Ben-Zion, Gutwein P, Altevogt P, Bar-Shavit R. (2001). Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the $\alpha\beta 5$ integrine. *J Biol Chem*, 276: 10952-10962.
17. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. (2002). *Nature Rev Cancer*, 2: 563-572.
18. Chatterjee S, Al-Mehdi AB, Levitan I, Stevens T, Fisher AB. (2003). Shear Stress Increases Expression of a KATP Channel in Rat and Bovine Pulmonary Vascular Endothelial Cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 25.
19. Chung-Welch N, Patton WF, Yen-Patton GP, Hechtman HB, Shepro D. (1989). Phenotypic comparison between mesothelial and microvascular endothelial cell lineages using conventional endothelial cell markers, cytoskeletal proteins markers and in vitro assays of angiogenic potential. *Differentiation*, 42: 44-53.
20. de Souza W, Meza I, Martínez A, Sabanero M, Souto-Padrón T, Meirelles MN. (1983). Trypanosoma cruzi: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. *J Parasitol*, 69: 138-142.
21. DiCorleto PE y de la Motte CA. (1985). Characterization of the adhesion of the human monocytic cell line U937 to cultured endothelial cells. *J Clin Invest*, 75: 1153-1161.
22. Dinarello C.A. (2001). IL-1 Receptor Type I in Cytokine Reference. Vol 2: Receptors. Oppenheim J & Feldman M. Eds. Academic Press. London, UK. pp 1587-1600.
23. Downey GP. (1994). Mechanisms of leukocyte motility and chemotaxis. *Current Opinion in Immunol*, 6: 113-124.
24. Eatock M, Schätzlein A, Kaye S. (2000). Tumor vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treatment Rev*, 26: 191-204.
25. Estrada A. (1998). Efecto del Factor de Necrosis Tumoral α en la expresión de moléculas de adhesión en cultivos primarios de células endoteliales humanas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
26. Estrada A. (2002). Citocinas y activación endotelial. *REB*, 21:41-49.
27. Estrada-Bernal A, Mendoza-Milla C, Ventura-Gallegos JL, López-Bojórquez LN, Miranda-Peralta E, Arechavaleta-Velasco F, Vadillo-Ortega F, Sánchez- Sánchez L, Zentella-Dehesa A. (2003). NF κ B dependent activation of human endotelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer Letters*,

28. Fidler I.(1997). Molecular Biology of Cancer in Cancer: Principles & Practice Oncology. De Vita V.T Jr, Hellman S, Rosenberg S. Eds. Uppincott-Raven Pub. Philadelphia, USA. pp 135-152.
29. Folkman J. (1972). Anti-angiogenesis: neoconcept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 175: 409-416.
30. Friedl P, Noble PB, Walton PA, Laird DW, Chauvin PJ, Tabah RJ, Black M, Zänker KS. (1995). Migration of coordinated cells clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. *Cancer Res*, 55:4557-4560.
31. Gagnon E, Cattaruzzi P, Griffith M, Muzakare L, LeFlao K, Faure R, Beliveau R, Hussain SN, Koutsilieris M, Doillon CJ. (2002). Human vascular endothelial cells with extended life spans: in vitro cell response, protein expression, and angiogenesis. *Angiogenesis*, 5: 21-33.
32. Gomez TM, Robles E. (2003). Imaging calcium dynamics in developing neurons. *Methods Enzymol*, 361:407-22.
33. Gopalan P, Burns A, Simon S, Sparks S, McIntire L. (2000). Preferential sites for stationary adhesion of neutrophils to cytokine-stimulated HUVEC under flow conditions. *J Leuco Biol*, 68: 47-57.
34. Haier J, Nicolson G. (2001). The role of tumor cell adhesion as an important factor in formation of distant colorectal metastasis. *Dis Colon Rectum*, 44: 876-884.
35. Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
36. Heyder C, Gloria-Maercker E, Entschladen F, Hatzmann W, Niggeman B, Zänker K.S, Dittmar T. (2002). Realtime visualization of tumor cell/endothelial cell interactions during transmigration across the endothelial barrier. *J Cancer Res Clin Oncol*, 128 : 533-538.
37. Horie T, Dobashi K, Iizuka K, Yoshii A, Shimizu Y, Nakasawa T, Mori M. (1999). Interferon γ rescue TNF- α induced apoptosis mediated by up-regulation of TNFR2 on Eo1-1 cells. *Exp Hematol*, 27: 512-519.
38. Hussein D, Zucker S. (2001). Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *DDT*, 6: 478-482.
39. Irijala H, Elima K, Johansson EL, Merinen M, Kontula K, Alanen K, Grenman R, Salmi M, Jalkanen S. (2003). The same endothelial receptor controls lymphocyte traffic both in vascular and lymphatic vessels. *Eur J Immunol*, 33: 815-24.
40. Isenovic ER, Divald A, Milivojevic N, Grgurevic T, Fisher SE, Sowers JR. (2003). Interactive effects of insulin-like growth factor-1 and beta-estradiol on endothelial nitric oxide synthase activity in rat aortic endothelial cells. *Metabolism*, 52: 482-7.

41. Jackson DG. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. (2003). *Trends Cardiovasc Med*, 13: 1-7.
42. Jaffe A, Nachmen L, Becker C, Minick R. (1973). Culture of human endothelial cells from umbilical veins. *J Clin Investigation*, 52 : 2745-2756.
43. Juliano R.L.(2002). Signal Transduction by Cell Adhesión Receptors and the Cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 42: 283-323.
44. Kähler C, Kaufmann G, Hogue-Angeletti R, Fisher-Colbrie R, Dunzerdorfer S, Reinisch N, Wiedermann C. (1999). A soluble gradient of the neuropeptide secretoneurin promotes the transendothelial migration of monocytes *in vitro*. *Euro J of Pharmacol*, 365: 65-75.
45. Kamada H, Tsutsumi Y, Kihira T, Tsunoda Shin-ichi, Yamamoto Y, Mayumi T. (2000). *In vitro* Remodeling of tumor vascular endothelial cells and their sensitivity to TNF α . *Bioch and Bioph Res Commun*, 268: 809-813.
46. Karkkainen M, Mäkinen T, Alitalo K. (2001). Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nature Cell Biol*, 4: E2-E5.
47. Kerbel R. (1997). A cancer therapy resistant to resistance. *Nature*, 390: 335-336.
48. Kieda C, Paprocka M, Krawczenko A, Zalecki P, Dupuis P, Monsigny M, Radzikowski C, Dus D. (2002). New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium*, 9: 247-61.
49. Klein C. (2000). The biology and analysis of single disseminated tumor cells. *Trends in Cell Biology*, 10: 489-493.
50. Krause T & Turner G.A. (1999). Are selectins involved in metastasis?. *Clin & Exper Metast*, 17:183-192.
51. Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, Unger RE, Peters K, Lehr HA, Kirkpatrick CJ. (2001) Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest*, 81: 1717-27.
52. Kuby J. (1997). Immunology. 3rd Edition. W.H. Freeman and Company. USA.
53. L. Corbí Angel. (1996). Integrins: common functional and structural aspects en Leukocyte integrins: structure, expresión and function. Cap. 2. R.G. Landes Company. FALTA LUGAR. pp 17-46.
54. Leite MF, Thrower EC, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM, Ehrlich BE, Nathanson MH. (2003). Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 2975-80.

55. Lewalle, Jean-Marc, Bajou K, Desreux J, Dejana E, Noël A, Foidart Jean-Michel. (1997). Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro. *Exper Cell Res*, 237: 347-356.
56. Lewin B. (2000). Genes VII. Oxford University Press and Cell Press.
57. Lodish H, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. (2000). Molecular Cell Biology. 4th Edition. W.H. Freeman and Company. USA.
58. MacKenzie KL, Franco S, Naiyer AJ, May C, Sadelain M, Rafii S, Moore MA. (2002). Multiple stages of malignant transformation of human endothelial cells modelled by co-expression of telomerase reverse transcriptase, SV40 T antigen and oncogenic N-ras. *Oncogene*, 21: 4200-11.
59. MacKenzie KL, Franco S, Naiyer AJ, May C, Sadelain M, Rafii S, Moore MA. (2002). Multiple stages of malignant transformation of human endothelial cells modelled by co-expression of telomerase reverse transcriptase, SV40 T antigen and oncogenic N-ras. *Oncogene*, 21: 4200-11.
60. Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, Ahmed I, Vijayalekshmi NR, Balaram P. (2002). Down regulation of endothelial adhesion molecules in node positive breast cancer: possible failure of host defence mechanism. *Pathol Oncol Res*, 8: 125-128.
61. Maltsev VA, Wolff B, Hess J, Werner G. (1994). Calcium signalling in individual T-cells measured by confocal microscopy. *Immunol Lett*, 42: 41-7.
62. Mancardi S, Vecile E, Dusetti N, Calvo E, Stanta G, Burrone OR, Dobrina A. (2003). Evidence of CXC, CC and C chemokine production by lymphatic endothelial cells. *Immunology*, 108: 523-30.
63. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. (1992). Cytokine regulation endothelial cell function. *FASEB J*, 6: 2591-2599.
64. Matheny H, Deem T, Cook-Mills J. (2000). Lymphocyte Migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 via endothelial cell NADPH Oxidase. *J Immunol*, 164: 6550-6559.
65. McEvoy L.M. (1996). In vitro assays of leukocyte-endothelial adhesion en Weirs Handbook of experimental immunology vol II. Herzenber L.A, Blackwell C. Eds. Blackwell Science Australia. pp 70.1-70.7.
66. Modur V, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. (1996). Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor α . *J of Biol Chem*, 271: 13094-13102.
67. Molnar E, Hegyesi H, Tóth S, Falus S. (2000). Autocrine and Paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Citokyne*, 12: 547-554.

68. Morán J, Sabanero M, Meza I, Pasantes-Morales H. (1996). Changes of actin cytoskeleton during swelling and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *Am J Physiol*, 271: C1901-C1907.
69. Muller w. (1996). Assays of Transendothelial Migration of Leucocytes. *Weirs Handbook of Experimental Immunology*. 5th Edition. Chapter 164. Volume IV: The Integrated Immune System. USA.
70. Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T. (2002). Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation*, 106: 1133-9.
71. Nakata B, Hori T, Sunami T, Ogawa Y, Yashiro M, Maeda K, Sawada T, Yasuyuki K, Ishikawa T, Hirakawa K. (2000). Clinical significance of serum soluble intercellular adhesion molecule 1 in gastric cancer. *Clinic Cancer Res*, 6:1175-1179.
72. Narita T, Kawakami-Kimura N, Matsuura N, Hosono J, Kannagi R. (1995). Corticosteroids and medroxyprogesterone acetate inhibit the induction of E-selectin on the vascular endothelium by MDA-MB 231 breast cancer cells. *Anticancer Res*, 15: 2523-2527.
73. Oakley BR. (2000). An abundance of tubulins. *Trends in Cell Biol*, 10: 537-542.
74. O'Hare MJ, Bond J, Clarke C, Takeuchi Y, Atherton AJ, Berry C, Moody J, Silver AR, Davies DC, Alsop AE, Neville AM, Jat PS. (2001). Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 646-51
75. Okamoto Y, Furuno T, Hamano T, Nakanishi M. (1995). Confocal fluorescence microscopy for studying thapsigargin-induced bivalent-cation entry into B cells. *Biochem J*, 305 : 1011-5.
76. Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Rüschoff J, Weber D, Männel DN. (1993). Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 177: 1391-1398.
77. Orr F, Wang H, Lafrenie R, Schebarth S, Nance D. (2000). Interactions between cancer cells and endothelium in metastasis. *J Pathol*, 190: 310-329.
78. Pawlak G, Helfman D. (2001). Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11: 41-47.
79. Pober JS, Gimbrone Jr. M.A, Lapierre L.A, Mendrick D.L, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J of Immunol*, 137: 1893-1896.
80. Podgrabinska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M. (2002). Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 16069-74.

81. Raab M, Daxecker H, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller M. M. (2002). Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. *Clin Chim Acta*, 321:11-16.
82. Reis-Filho JS, Schmitt FC. (2003). Lymphangiogenesis in tumors: what do we know?. *Microsc Res Tech*, 60: 171-80.
83. Robbins S, Cotran R, Kumar V. (1995). Patología Estructural y Funcional. 4ª Edición. Vol 1. Interamericana McGRAW-Hill. Madrid, España.
84. Rosales C, Juliano R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors in leucocytes. *J Leuco Biol*, 57: 189-198.
85. Rosen S, Bertozzi C. (1994). The Selectins and their ligands. *Current Opinion in Cell Biology*, 6: 663-673.
86. Roskelley C, Williams D, McHardy L, Leong K, Troussard A, Karsan A, Andersen R, Dedhar S, Roberge M. (2001). Inhibition of tumor cell invasion and Angiogenesis by mutopuramines. *Cancer Res*, 61: 6788-6794.
87. Rusciano D, Burger M. (1992). Why do cancer cells metastasize into particular organs?. *BioEssays*, 14: 185-194.
88. Sacca R, Cuff C, Ruddle N. (1997). Mediators in Inflammation. *Curr Opinion in Immunol*, 9: 851-857.
89. Sanding M, Negrou E, Rogers K. (1997). Changes in the distribution of LFA-1, catenins and F-actin during transendothelial migration of monocytes in culture. *J of Cell Science*, 110: 2807-2818.
90. Schall T, Bacon K. (1994). Chemokines, leucocyte trafficking and inflammation. *Curr Opinion in Immunol*, 6: 865-873.
91. Sedgwick J, Riminton D, Cyster J, Körner H. (2000). Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today*, 21: 110-113.
92. Serrador JM, Nieto M, Sánchez-Madrid F. (1999). Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol*, 9: 228-233.
93. Shankaran V, Schreiber R. (2001). IFN γ Receptor in Cytokine Reference. Vol 2: Receptors. Oppenheim J & Feldman M. Eds. Academic Press. London, UK. pp 1819-1837.
94. Sheppard C.J.R, Shotton D.M. (1997). Confocal Laser Scanning Microscopy. BIOS Scientific Publishers Limited. Oxon, U.K.
95. Siegel G, Malmsten M, Klübendorf D. (1998). Tumor cell locomotion and metastatic spread. *Microsc Res and Tech*, 43: 276-282.

96. Siegel G, Malmsten M. (1997). The role of endothelium in inflammation and tumor metastasis. *Int J Microcirc Clin Exp*, 17: 257-272.
97. 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*. *Exper and Mol Pathol*, 73: 46-53.
98. Swartz M y Skobe M. (2001). Lymphatic function, lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Microsc Res and Tech*, 55: 92-99.
99. Takeo C, Nakamura S, Tanaka T, Uchida D, Noguchi Y, Nagao T, Saito Y, Tatsuno I. Rat cerebral endothelial cells express trk C and are regulated by neurotrophin-3. (2003). *Biochem Biophys Res Commun*, 305: 400-6.
100. Tsuchiya R, Yoshiki F, Kudo Y, Morita M. (2002). Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellow cameleon, in rat cortical primary cultures. *Brain Res*, 956: 221-9.
101. van Rossen M.E.E, Hofland L.J, van del Tol M.P, van Koetsveld P.M, Jeekel J, Marquet R.L, van Ejick C.H.J. (2001). Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumor cell adhesion to the peritoneum. *J of Pathol*, 193: 530-537.
102. Veitonmaki N, Fuxe J, Hultdin M, Roos G, Pettersson RF, Cao Y. (2003). Immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/pRb. *FASEB J*, 17: 764-6.
103. Vidal-Vanaclocha, Alvarez A, Asumendi A, Urcelay B, Tonino P, Dinarello C. (1995). Interleukina 1(IL-1) dependent melanoma hepatic metastasis *in vivo*: increased endothelial adherence by IL-1 induced mannose receptors and growth factor production *in vitro*. *J Nat Canc Inst*, 88: 198-205.
104. Vladova Gulubova M. (2002). Expresión of cell adhesión molecules, their ligands and tumor necrosis factor α in the liver of patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *Histocho J*, 34: 67-77.
105. Vestweber D, Blanks J. (1999). Mechanism that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, 79: 181-202.
106. Voura E, Sandig M, Siu Ch. (1998). Cell-Cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microsc Res and Tech*, 43: 265-275.
107. Wajant H, Henkler F, Scheurich P. (2001). The TNF-receptor-associated factor family Scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cellular Signalling*, 13: 389-400.
108. Ward P.A y Marks R.M. (1989). The acute inflammatory reaction. *Curr Opin Immunol*, 2: 5-9.

109. Webb C y Vande Woude G. (2000). Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neuro-Oncol*, 50: 71-87.
110. Weber BL. (2002). Cancer Genomics. *Cancer Cell*, 1:37-47.
111. Williams A, Barclay N. (1988). The Immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol*, 6: 381-405.
112. Yancopoulos G, Klagsbrun M, Folkman J. (1998). Vasculogenesis, Angiogenesis and growth factors: Ephrins enter the fray at the border. *Cell*, 93: 661-664.
113. Yarwood H, Mason J, Mahiouz D, Sugars K, Haskard D. (2000). Resting and activated T cells induce expression of E-selectin and VCAM-1 by vascular endothelial cells through a contact-dependent but CD-40 ligand-independent mechanism. *J Leuco Biol*, 68: 233-242.
114. Yoshida B, Sokoloff M, Welch D, Rinker-Schaeffer C. (2000). Metastasis-Suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Nat Cancer Inst*, 92: 1717-1730.