

2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

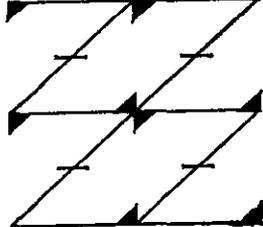
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"**

**UTILIZACION DE LIPOSOMAS COMO  
ACARREADORES DE LAS CITOCINAS IL-1 e IFN  
gama DIRIGIDAS CONTRA POBLACIONES DE  
MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL  
DE RATON.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
**MIRIAM VILLA VARGAS**

ASESORES: M. EN C. TERESA CORONA ORTEGA.  
DR. JULIO CACERES CORTES.

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 1998.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

267641



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

### ***A mis padres***

POR TODO EL AMOR, CARIÑO Y APOYO QUE ME HAN BRINDADO INCONDICIONALMENTE Y QUE ME HA SERVIDO PARA LLEGAR A LOGRAR ESTA META. CON TODO AMOR Y RESPETO.

### ***A mi hermano***

POR LA PACIENCIA, AYUDA, CARIÑO Y APOYO QUE ME HA BRINDADO SIEMPRE.

### ***A Javier***

POR TODO EL AMOR, CARIÑO Y COMPRENSIÓN QUE ME HA BRINDADO ASÍ COMO ALENTARME PARA SEGUIR ADELANTE.

### ***A mis Asesores y Sinodales***

QUIERO DAR UNA GRAN AGRADECIMIENTO A MIS SINODALES POR SU VALIOSA AYUDA EN LA REVISIÓN DE ESTE TRABAJO, MAESTRA ROSALVA, ISABEL, MAESTRO JULIO Y RAMÓN Y PRINCIPALMENTE A MI ASESORA TERESA CORONA POR EL APOYO QUE ME BRINDO DURANTE LA REALIZACIÓN DE TODO EL TRABAJO Y SOBRE TODO POR LA CONFIANZA QUE DEPOSITO EN MI.

MIRIAM VILLA VARGAS

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
MARCO TEORICO	
MACROFAGOS .....	4
INTERLEUCINA 1 .....	8
INTERFERONES .....	10
INMONUGLOBULINAS .....	15
LIPOSOMAS .....	17
OXIDO NITRICO .....	20
RECEPTORES Fc .....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	26
HIPOTESIS .....	27
OBJETIVOS .....	28
MATERIAL Y METODOS .....	29
METODOLOGIA .....	32
RESULTADOS .....	33
DISCUSION .....	48
CONCLUSIONES .....	53
SUGERENCIAS .....	54
BIBLIOGRAFIA .....	55
ANEXO 1 .....	58

## RESUMEN

Las citocinas como la interleucina 1 $\beta$  e interferón  $\gamma$  son proteínas producidas en pequeñas cantidades por el propio organismo que cuentan con la capacidad de activar a macrófagos, sin embargo, se sabe que al administrarse *in vivo* aun en bajas concentraciones pueden ser tóxicas o producir efectos adversos. En otro orden de ideas, se conoce la cualidad que tienen los liposomas de acarrear diferentes sustancias. El objetivo del presente trabajo fue encontrar las condiciones necesarias para encapsular las citocinas mencionadas en liposomas y lograr una activación en macrófagos peritoneales de ratones CD-1. Se fabricaron diversos tipos de liposomas encapsulando IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  y se utilizaron para la activación *in vitro* de este tipo celular, como un modelo para su posterior aplicación *in vivo*. La activación de las células fue evaluada por la aparición de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y por la determinación de la liberación de óxido nítrico. Nuestros resultados indicaron que cuando se utilizan liposomas con carga negativa como vía de administración de IL-1 $\beta$  se produce un aumento de los receptores y que en contraste los liposomas neutros son mejores para el acarreamiento de IFN- $\gamma$ . Bajo nuestras condiciones de trabajo, se determinó que los liposomas son buenos acarreadores y protectores de las citocinas y que es muy importante considerar las características de las sustancias a encapsular, las condiciones fisiológicas, así como las propiedades de la célula blanco a las cuales van dirigidas para la elección del tipo de liposoma a utilizar.

## INTRODUCCION

Los macrófagos juegan un papel importante en numerosos fenómenos biológicos de defensa del cuerpo, estos efectos que presentan los macrófagos son mediados por las citocinas, que son péptidos o glucoproteínas de pesos moleculares de 6000 a 60,000 Daltones sintetizadas y secretadas por distintas células específicas (efectoras) del cuerpo; cada citocina es producto de un gen particular, aunque puede haber algunas de ellas estrechamente relacionadas. Son compuestos potentes en extremo que actúan en concentraciones desde  $10^{-10}$  a  $10^{-15}$  mol/l para estimular a sus células blanco después de interacciones específicas entre ligando y receptor. Una sola citocina purificada puede tener efectos múltiples sobre el crecimiento y diferenciación de muchos tipos de células por lo que estos moduladores presentan una imbricación considerable en sus efectos biológicos sobre células blanco linfoides, mieloides y del tejido conectivo, se requieren muchas citocinas para la activación de diferentes tipos celulares (Keller J.,1990). Es importante mencionar que las citocinas administradas en altas concentraciones pueden ser extremadamente tóxicas, un ejemplo son las citocinas que actúan sobre la fase aguda (Male D.,1995).

Las interleucinas son citocinas que participan en la comunicación celular entre leucocitos. La interleucina 1 (IL-1) es una citocina de fase aguda producida endógenamente por monocitos y macrófagos para estimular la síntesis de proteínas y promover la proliferación de células T, así como para autoestimularse (Male D., 1995; Santiago, et al, 1993).

El interferón gama (IFN- $\gamma$ ), también denominado interferón tipo II, es una glucoproteína hemodimérica que contiene subunidades de aproximadamente 21 a 24 kDa. El IFN- $\gamma$  es un importante activador por medio del cual las células T activan a los macrófagos, además actúa directamente sobre los linfocitos T y B para promover su diferenciación y activa a las células endoteliales vasculares (Stites D., 1993).

Los liposomas son considerados sistemas transportadores de gran versatilidad debido a su capacidad de acarreamiento tanto de moléculas hidrofílicas en su fase acuosa, como de moléculas hidrofóbicas en su fase lipídica. Desde el punto de vista de su estructura, los liposomas están constituidos básicamente por fosfolípidos cuyas moléculas pueden poseer gran diversidad en cuanto a los tipos de ácidos grasos, grupos polares, etc. Asimismo pueden contener otros tipos de moléculas que se adicionan para modificar la superficie liposomal, la fluidez de la membrana, o bien la permeabilidad de la bicapa (Reynoso A., Rojas V., 1997)

Los liposomas son diseñados con el fin de lograr distintos objetivos, entre ellos destacan: proteger los fármacos de un medio ambiente biológico desfavorable, proveer una liberación prolongada o controlada en el tiempo y lograr un sistema transportador de fármacos que pueda actuar selectivamente en el blanco terapéutico (Reynoso A., Rojas V., 1997)

Como ya se mencionó, entre las citocinas que activan a los macrófagos se encuentran interleucina-1, e interferón gama; en este trabajo, ambas citocinas se encapsularon en liposomas con la finalidad de establecer las condiciones necesarias para su uso en la activación *in vivo* de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal. Lo anterior permitiría reducir la toxicidad de las citocinas libres y les daría especificidad para llegar a su sitio de acción.

Creemos que la unión de los tres conceptos (liposomas, citocinas y macrófagos) puede proporcionar alternativas terapéuticas y de desarrollo, razón por la cual en esta investigación se buscó la evaluación de la eficacia del uso de las citocinas encapsuladas en liposomas para estimular macrófagos.

# MARCO TEÓRICO

## MACRÓFAGOS

Todas las células del sistema mononuclear se originan en la médula ósea y, tras su maduración y posterior activación, pueden adquirir diferentes formas morfológicas. El primer tipo de célula que entra en la sangre periférica tras dejar la médula ósea no está completamente diferenciado y se llama monocito. Los monocitos tienen un diámetro de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , un núcleo en forma de pera y un citoplasma finamente granulado que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueléticos. Una vez que colonizan los tejidos, estas células maduran y se convierten en macrófagos, que también se denominan histiocitos. Los macrófagos pueden activarse por diferentes estímulos y pueden adquirir formas diferentes. Algunas desarrollan abundante citoplasma y se llaman células epiteloideas porque se parecen a las células epiteliales de la piel. Los macrófagos pueden fundirse entre sí y formar células gigantes multinucleadas. Los macrófagos se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos (Abbas K., Lichtman H., 1995).

El sistema fagocítico mononuclear está caracterizado por dos tipos de células: los monocitos y los macrófagos. En general los macrófagos tienen un núcleo grande que es circular en perfil y posiblemente no dentado, contiene numerosos gránulos, vacuolas o incisiones citoplasmáticas (Bach J., 1984); constituyen la segunda población celular principal del sistema inmunológico. A principios del siglo XX, los morfólogos observaron que ciertas células captaban los pigmentos que se administraban por vía intravenosa. Aschoff identificó a estas células como macrófagos en el tejido conectivo, microglía en el sistema nervioso central, células endoteliales en los sinusoides vasculares y células reticulares en los órganos linfoides, y sugirió que estos tipos celulares diferentes actuaban en la defensa del huésped fagocitando a invasores extraños como los microorganismos. El agrupó a todas estas células como sistema retículo endotelial (Bach J., 1984). En la actualidad se clasifica a monocitos y macrófagos como miembros del sistema fagocítico mononuclear (Bach J., 1984).

Los macrófagos se encuentran virtualmente en todos los tejidos blandos del cuerpo, aunque el bazo y el hígado son los que tienen una población más abundante. Los macrófagos se nombran de acuerdo con el tejido en que residen; los macrófagos se llaman histocitos en el tejido conectivo, células de Kupffer en el hígado, células de “polvo” en los pulmones, etc. Estas células recibieron nombres diferentes debido a que, a pesar de su origen y propiedades comunes, no tienen una morfología idéntica. Su metamorfosis a partir del estado monocítico al del macrófago, se ve influenciada por el microambiente del tejido en el cual se lleva a cabo esta transformación, lo que da como resultado esta variación morfológica. Estas células terminales mononucleares son grandes, quizá de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro y tienen un núcleo ovoide o con forma de bloque. Su citoplasma está lleno de gránulos lisosomales y vacuolas.

En la primera línea de defensa del organismo contra cuerpos extraños, existe un subgrupo de células fagocíticas que son los macrófagos (Cullis P., 1989). Aun cuando la destrucción fagocítica de los microbios patógenos justifica un estudio extenso de estos tipos celulares los macrófagos contribuyen con otras células en etapas importantes de la respuesta inmune, como es el procesamiento del antígeno, seguida por la presentación del antígeno a los linfocitos (Barret J., 1991).

Los macrófagos se caracterizan por una movilidad ameboide que hace posible que se muevan a través de las superficies del cuerpo en donde atacan y fagocitan objetos particulados. En muchos casos la destrucción fagocítica es el resultado primario de esta actividad. En otras circunstancias el antígeno es capturado y degradado de manera parcial, y sus partes esenciales son rescatadas; a este proceso se le llama procesamiento del antígeno. Entonces, los macrófagos presentan los epitopos clave a los linfocitos B y T como células presentadoras de antígeno. Los macrófagos secretan más de 50 proteínas (entre ellas las citocinas), además de las enzimas contenidas en sus gránulos (Barret J., 1991).

Los macrófagos son capaces de llevar a cabo varias funciones diferentes (Figura 1). Así mismo, producen varias citocinas que funcionan como moléculas reguladoras. Además

con la secreción de citocinas, los macrófagos también pueden tener una influencia potencial inhibidora (Zambrano S., 1993).

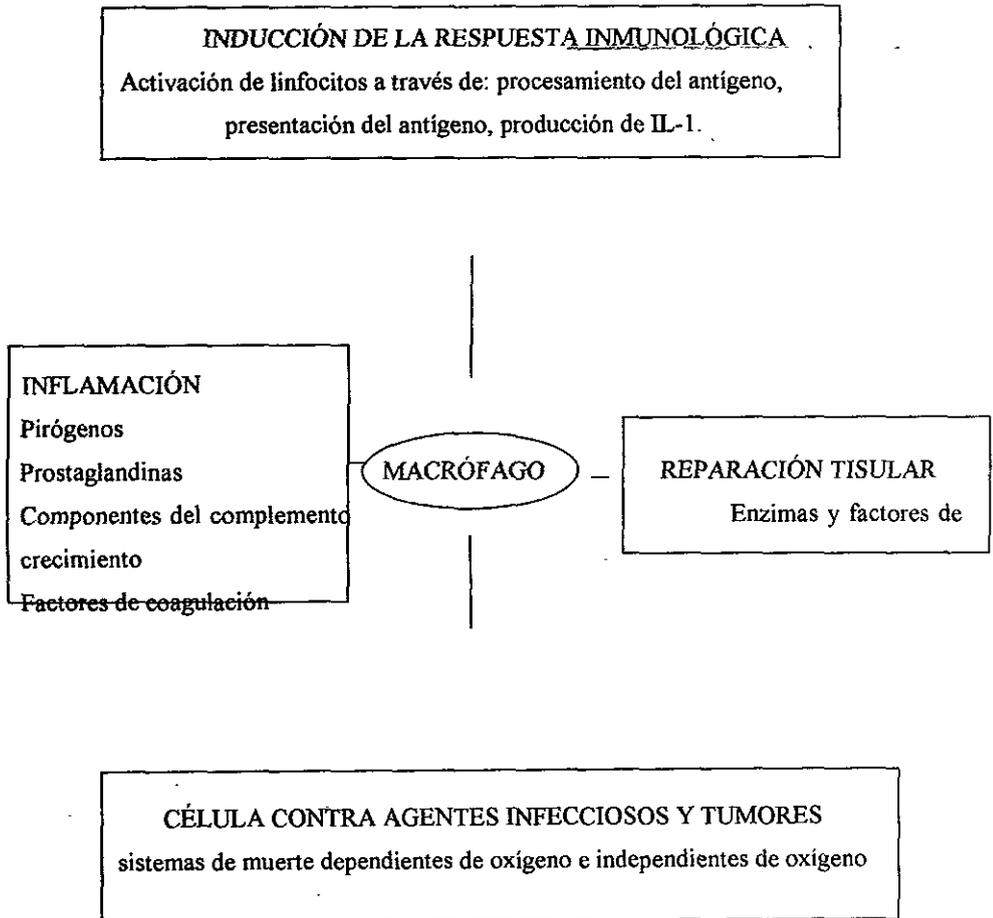


FIGURA 1. Esquema donde se pueden apreciar las funciones de los macrófagos. Funcionan como células efectoras al producir moléculas citotóxicas contra microorganismos, protozoarios y tumores. Son importantes en la fase inductora de una respuesta inmunológica y contribuyen a la inflamación y reparación tisular.

Los efectos que presentan los macrófagos son mediados por las citocinas. Las citocinas por lo general, son péptidos o glucoproteínas sintetizados y secretados por distintas células del cuerpo, con pesos moleculares de 6000 a 60,000 daltones. Son compuestos potentes en extremo que actúan en concentración desde  $10^{-10}$  a  $10^{-15}$  mol/l para estimular algunas funciones en las células blanco después de interacciones específicas entre ligando y receptor. Una sola citocina pura puede tener efectos múltiples sobre el crecimiento y diferenciación de distintos tipos celulares. Como consecuencia las citocinas pueden tener efecto biológico sobre una gran variedad de células blanco linfoides, mieloides y del tejido conectivo (Keller J., 1990).

Las interleucinas son citocinas que participan en la comunicación celular entre leucocitos. Existen muchas citocinas involucradas en la regulación de la defensa del organismo, entre ellas: la interleucina 1 (IL-1) que es producida por monocitos y macrófagos para estimular la síntesis de proteínas y promover la proliferación de células T, es una sustancia producida endógenamente (Dinarello C., 1991).

Además de la IL-1, los macrófagos contribuyen a la respuesta inmune a través de la secreción de un gran número de moléculas bioactivas como el factor de necrosis tumoral, IL-2 (Interleucina 2), IL-1 (Interleucina 1), IL-6 (Interleucina 6), IL-8 (Interleucina 8), IL-10 (Interleucina 10), IL-12 (Interleucina 12), IFN- $\alpha$  (Interferón alfa) y  $\beta$  (Interferón beta), TGF- $\beta$  (Factor de necrosis tumoral) y el IFN $\gamma$  (Interferón gama) (Dinarello C., 1991).

Debido a la facilidad con la cual pueden ser capturados en el espacio peritoneal y lavados alveolares, los macrófagos obtenidos de otras zonas reciben mayor atención. Aquellos que se encuentran en el espacio peritoneal del pulmón no tratado o en un sitio cualquiera residiendo sin estimulación previa, se denominan macrófagos residentes. Estos son macrófagos normales o en reposo. Estas células tienen capacidad de fagocitosis y son citodestructivas para cualquier célula o materia extraña que ingieran. Se adhieren con facilidad a superficies y muestran movilidad ameboide (Barret J., 1991).

La activación de la cavidad peritoneal con irritantes no antigénicos atrae macrófagos adicionales al espacio peritoneal. Estas células son más móviles, tienen una cavidad fagocítica mayor y son más citotóxicas que los macrófagos residentes. Estas células se llaman macrófagos estimulados o inducidos (Roitt M., 1991).

Los macrófagos de tercer nivel son los más móviles y los fagocitos más citodestructivos. Estos fagocitos pueden cosecharse, una vez más, a partir del espacio peritoneal después del tratamiento de dichos espacios con materiales antigénicos o mitogénicos (Bach J., 1984).

## INTERLEUCINA 1

La interleucina 1 (IL-1) es una citocina producida en gran parte por activación de monocitos y macrófagos. La IL-1 es un estimulador y regulador de efectos en términos de crecimiento y diferenciación de numerosos tipos celulares y tiene importantes efectos sobre el sistema inmune, regulado por células B y T, también es un regulador de la respuesta inflamatoria.

Los primeros estudios sobre la IL-1 datan de 1953 cuando, Bennet y Besson describieron un material pirogénico, producido por leucocitos activados que llamaron pirogéno endógeno. Más tarde, en 1972 Gery y Waskman describieron un molécula producida por macrófagos peritoneales de ratón, que aumentaban la proliferación de timocitos en respuesta a dosis subóptimas de mitógenos como la concavalina A y la fitohemaglutinina, ellos llamaron a esta molécula factor activador de linfocitos (Keller J., 1990).

En 1974 el grupo de Murphy, llevando a cabo la caracterización del Pirogéno endógeno (EP) demostró que esta molécula tenía un peso molecular de 14 a 17 kDa. Al mismo tiempo, Dinarello y su grupo describieron dos EP producidas por monocitos humanos una con un punto isoelectrico (pI) de 5 (IL-1 $\alpha$ ) y la otra con un punto de 7 (IL-1 $\beta$ ) (Keller J., 1990).

De esta manera la IL-1 ha sido referida en la literatura con diferentes nombres los cuales describen diferentes actividades de esta proteína, algunos sinónimos de IL-1 incluyen: pirogéno leucocítico, mediador endógeno leucocítico, factor de proliferación de timocitos, proteína mitogénica, factor remplazante de células T, factor estimulador de células B, factor diferenciador de células B, factor de células mononucleares, factor activador de osteoclastos y factor inductor de la proteólisis de músculo, sin embargo, en 1979 los inmunólogos decidieron nombrar a todos estos factores en base a su similitudes biológicas y bioquímicas como IL-1 (Dinarello C., 1991).

La IL-1 es una glicoproteína de 17.5 kDa de la cual existen dos formas denominadas Interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) e Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ). Las dos formas de IL-1 puede inducir más de 50 efectos diferentes, algunos desencadenados a concentraciones picomolares. Esta molécula tiene efecto sobre una gran diversidad de células del organismo, por ello modula propiedades inflamatorias, metabólicas, fisiológicas, hematopoyéticas e inmunológicas (Dinarello C., 1991). Aunque las dos formas de IL-1 son productos de genes diferentes, ambas reconocen los mismos receptores de superficie y comparten variadas actividades biológicas (Joshep A., 1995).

Otra característica muy interesante de la IL-1 es que a pesar de que sus dos formas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) muestran una baja homología, ambas compiten por el mismo receptor en diversos tipos celulares como en monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B. El receptor de la IL-1 es una proteína de 60 000 Daltones que está glucosilada en abundancia y tiene un tamaño completo de 80 000 Daltones. Este receptor fue purificado de la línea de células T EL4 de ratón, pesa 80 kDa en su forma glicosilada y esta formada de tres dominios. Uno extracelular de 319 aminoácidos, un transmembranal de 21 y un citoplásmico de 217. Es importante destacarse que este receptor pertenece a la familia de las inmunoglobulinas (Bomford R., Henderson B., 1989).

La producción de IL-1 es estimulada por linfocitos T activados, complejos inmunes, productos microbiales, levaduras, virus y lectinas, así como agentes inflamatorios.

Probablemente las endotoxinas, en particular la molécula de lípido A (componente activo de los lipopolisacáridos), sean los activadores más potentes de la producción de IL-1 y de los fagocitos mononucleares.

*En las células T en reposo se presentan muy pocas moléculas de receptor para la IL-1, pero después de la exposición al antígeno se presenta un incremento de diez veces más. La unión de la IL-1 al receptor se cree que activa a la célula T mediante la vía proteína G-cAMP, en vez de hacerlo por el sistema Ca+fosfatidilinositol-proteína cinasa C (Barret J., 1991).*

La mayoría de las actividades de IL-1 muestran una característica común. todas son parte del complejo grupo de respuesta conocido como respuesta de fase aguda, que lleva a cabo el organismo ante invasiones microbiales, reacciones inmunológicas y procesos inflamatorios. Finalmente el hecho de que IL-1 se haya conservado a lo largo del proceso evolutivo sugiere que su función esencial es la de actuar como un orquestador de los mecanismos de adaptación inmunológica del individuo.

Una característica interesante de la IL-1 $\beta$  es que carece de la secuencia hidrofóbica característica de las proteínas de secreción de manera que no es claro el mecanismo a través del cual IL-1 $\beta$  es llevada fuera de la célula; algunas evidencias tales como ausencia de IL-1 $\beta$  en el retículo endoplasmático y su presencia en el citosol y fracciones lisosomales hacen suponer que la IL-1 $\beta$  esta asociada y es liberada a través de vesículas lisosomales.

## INTERFERONES

En 1957 se descubrió un factor soluble producido por células B expuestas a un virus inactivo que era capaz de transferir "interferencia" de la replicación viral a células recién obtenidas. Por esta razón, se denominó interferón y desde entonces se ha descubierto que los interferones son una gran familia de proteínas que tienen actividad antiviral (Roitt M., 1991). Se trata de glucoproteínas de peso molecular variable según las

condiciones de su obtención e importantes en la función inmune (Bach J., 1984). Posteriormente, se demostró que estos interferones eran producidos por células infectadas por casi cualquier virus animal, ya sea que posean ADN o ARN (Stites D., 1993).

Los interferones purificados que proceden de diversas fuentes están constituidos por proteínas pequeñas, extraordinariamente estables a un pH básico, y moderadamente resistentes al calor (Stites D., 1993).

Los interferones no son específicos para cada tipo de virus, sino específicos para cada tipo de célula, tanto en su producción como en sus efectos. Los interferones inducidos por el mismo agente en diferentes especies o incluso en diferentes células de la misma especie (como los fibroblastos y leucocitos humanos) difieren en cuanto a su antigenicidad, punto isoeléctrico y peso molecular. Así, cada especie tiene más de un gen codificador de interferón (Stites D., 1993).

Los interferones constituyen una familia grande de proteínas secretoras que tienen en común no solo su actividad antiviral, si no también la propiedad de inhibir la proliferación de células de vertebrados y de modular respuestas inmunitarias (Floxwell B., 1992).

Estudios revelaron que hay tres principales interferones: alfa, beta y gamma. También denominados tipo I y tipo II. Estos interferones son bioquímicamente similares y tienen propiedades individuales únicas (Keller J., 1990).

El interferón es producido por las células infectadas por viriones completos o activados. En condiciones de multiplicación vírica la síntesis de interferón empieza tras la iniciación de la maduración vírica; que de no ser interrumpida por un bloqueo temprano de la síntesis de macromoléculas del huésped, continúa el mismo ritmo durante 50 a 20 horas, para luego detenerse. Si las células sobreviven durante un largo tiempo, no pueden producir de nuevo interferón, en respuesta a la reinfección, hasta después de un período refractario de por lo menos dos divisiones celulares (Stites D., 1993).

Aunque al parecer la totalidad de las células animales son capaces de producir interferón, las células de la médula ósea, del bazo y los macrófagos parecen tener un papel especial (Zambrano S., 1993).

El IFN- $\gamma$  es codificado por un solo gene en el ratón, este se encuentra en el cromosoma numero 16. La secuencia del IFN- $\gamma$  es aproximadamente 12% homóloga a la del IFN- $\alpha$ . La proteína madura es de 146 aminoácidos de longitud, no presenta cisteínas, por lo que es incapaz de formar puentes disulfuro, y esta glucosilada. El IFN- $\gamma$  es sintetizado en respuesta a mitógenos, antígenos e IL-2 (Zambrano S., 1993).

El receptor para IFN- $\gamma$  presenta una constante de disociación de 10-100 pM, su número es de aproximadamente 1000 en células normales, que es una cantidad mucho menor que el número de receptores que se presentan para las hormonas como insulina o factores de crecimiento. El gene que codifica para el receptor está localizado en el cromosoma 6. El receptor pesa 90 kDa y une al IFN- $\gamma$  como dímero, y requiere de un factor especie específico (Zambrano S., 1993). La mayoría de los tipos celulares responden al interferón y, por lo tanto, los receptores para interferón están presentes en la mayoría de las células. La unión de los interferones a sus receptores es de alta afinidad. La unión es saturable hasta con 7000 receptores de interferon tipo I y 13000 tipo II por célula, en algunas líneas celulares. Sin embargo, algunas células expresan mucho menos receptores para interferón. Los linfocitos pequeños en reposo solo tienen 250 para IFN $\alpha$  y 500 para INF $\gamma$  de alta afinidad por célula.

Entre los efectos del interferón se encuentran: el incremento de las moléculas MHC clase I y II, incremento en la expresión de receptores para la inmunoglobulina G tipo I y III en monocitos-macrófagos, media algunas respuestas a través de su inducción de los receptores Fc entre las que se encuentran incluidas la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, fagocitosis, secreción de enzimas lisosomales, producción de anión en superóxido.

El IFN- $\gamma$  es un activador por excelencia de los macrófagos ya que controla su capacidad presentadora de antígenos, de degradación de triptofano extracelular, fagocitosis y producción de citocinas así como su capacidad tumoricida *in vivo* (Weir D , 1995)

Éste se produce durante las reacciones inmunitarias por linfocitos T estimulados por antígeno, mitógeno o lectina, con actividad tipo NK. El interferón tipo II es lábil a pH 2.0, propiedad que se usa a menudo como un método simple para identificación (Scragg A , 1996).

Los interferones inducen un estado antiviral que protege a las células blanco contra la mayoría de los tipos de virus. Además, los interferones tienen efectos celulares poderosos, principalmente inhibición de la proliferación celular. Pueden ya sea inhibir o incrementar la diferenciación celular, según, el tipo celular y la dosis del interferón; también son agentes inmunomoduladores y efectúan tareas importantes en la respuesta normal de defensa del individuo

En contraste con los anticuerpos que reaccionan y neutralizan directamente a los virus, los interferones establecen un estado antiviral y actúan como agentes antiproliferadores e inmunomoduladores al inducir la síntesis de proteínas celulares y alterar el metabolismo de las células blanco. Respecto a esto, los interferones son similares, en su mecanismo de acción a hormonas polipeptídicas y factores de crecimiento

Después de unirse el interferón a su receptor de superficie, el complejo de interferón y receptor se agregan en vesículas recubiertas y se internalizan por endocitosis mediada por el receptor. Al menos parte del interferón internalizado se degrada en los lisosomas. Aún no se han definido los eventos bioquímicos que traducen la señal del receptor superficial para el interferón hacia el interior de la célula a fin de producir las diversas respuestas biológicas (figura 2). Dado que el IFN- $\gamma$  presenta segmentos específicos caracterizados por la presencia de residuos de arginina y lisina, estos segmentos son esenciales para que esta citocina sea funcional (Zambrano S , 1993) confiriéndole carga positiva a la molécula.

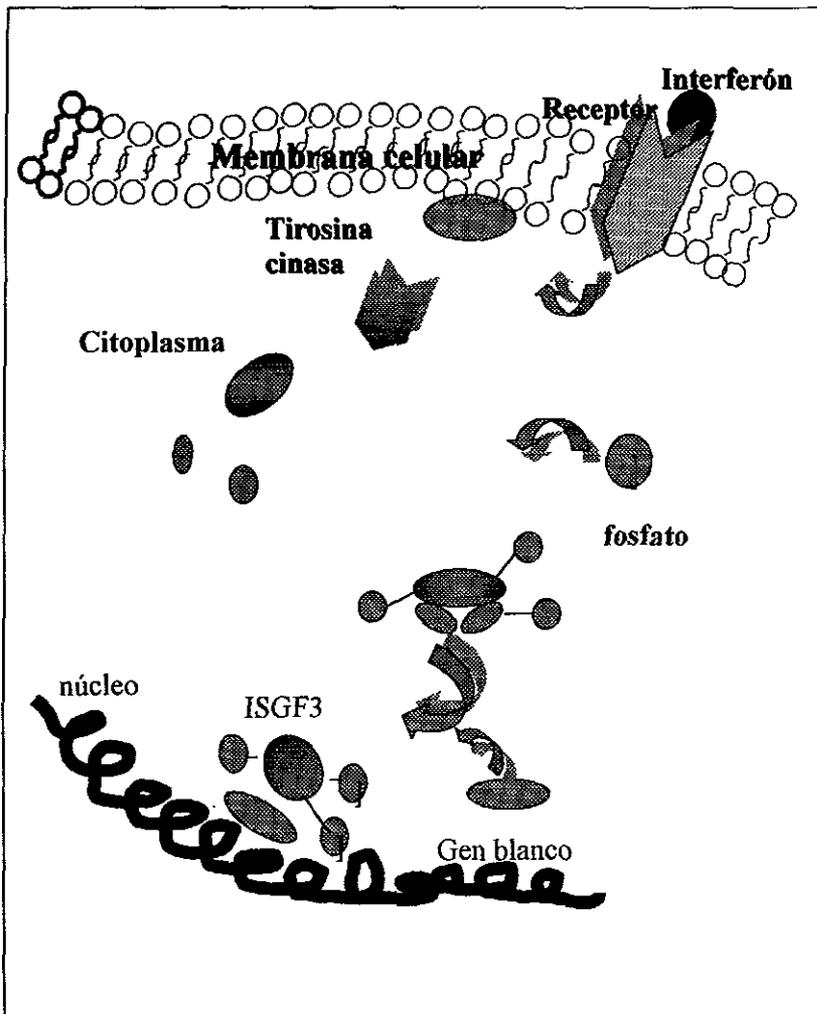


Figura 1. En esta figura se muestra como se lleva a cabo la activación del interferón por medio de los receptores de la célula blanca a la cual esta dirigida (macrófago).

## INMUNOGLOBULINAS

Las inmonoglobulinas o anticuerpos, son un grupo de glucoproteínas presentes en el suero y líquidos orgánicos de todos los mamíferos. Son producidos en grandes cantidades por las células plasmáticas, que constituyen el estadio diferenciado terminal de los linfocitos B. Estos linfocitos llevan inmunoglobulinas insertadas en su membrana, para la inducción de la formación de anticuerpos es necesario que el antígeno propio y los linfocitos B entren en contacto (Roitt M., 1991).

En la mayoría de los mamíferos superiores se conocen cinco clases distintas de moléculas de inmonoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (tabla 1).

Nomenclatura actual	Abreviatura	Nomenclatura anterior
Inmunoglobulina G	IgG	Globulina $\gamma$ G Globulina $\gamma$ 7s
Inmunoglobulina A	IgA	Globulina $\gamma$ A Globulina $\beta$ z <sup>a</sup>
Inmunoglobulina M	IgM	Globulina $\gamma$ M Macroglobulina $\gamma$
Inmunoglobulina D	IgD	---
Inmunoglobulina E	IgE	Reagina, I $\gamma$ ND

TABLA I. Muestra las características así como los tipos de inmunoglobulinas que existen.

Las inmunoglobulinas difieren una de otras en tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos. Además de las diferencias entre las distintas clases, las inmunoglobulinas de una misma clase son también muy heterogéneas. Desde el punto de vista electroforético, las inmunoglobulinas muestran una gama única de heterogeneidad que se extiende desde la fracción  $\gamma$  hasta la  $\alpha$  del suero normal. En general, la clase IgG es la que muestra mayor heterogeneidad de carga, mientras que las otras clases tienen una movilidad más limitada en las regiones  $\beta$ , y  $\gamma$ . Después de haber sido absorbido con el correspondiente antígeno, el suero de un animal hiperinmune muestra una marcada reducción de estas fracciones electroforéticas, lo que sugiere que desempeña un papel en la respuesta inmune.

La inmunoglobulina G es la inmunoglobulina principal del suero humano y representa el 70-75 % del reservorio total de inmunoglobulinas. Es una proteína monómera que tiene un coeficiente de sedimentación de 7 S y un peso molecular de 146 000 Da, (Figura 3). Sin embargo, los estudios de las subclases de la IgG han indicado que las proteínas IgG3 son un poco mayores que las otras subclases, y este aumento se debe a la cadena  $\gamma_3$ , ligeramente más pesada.

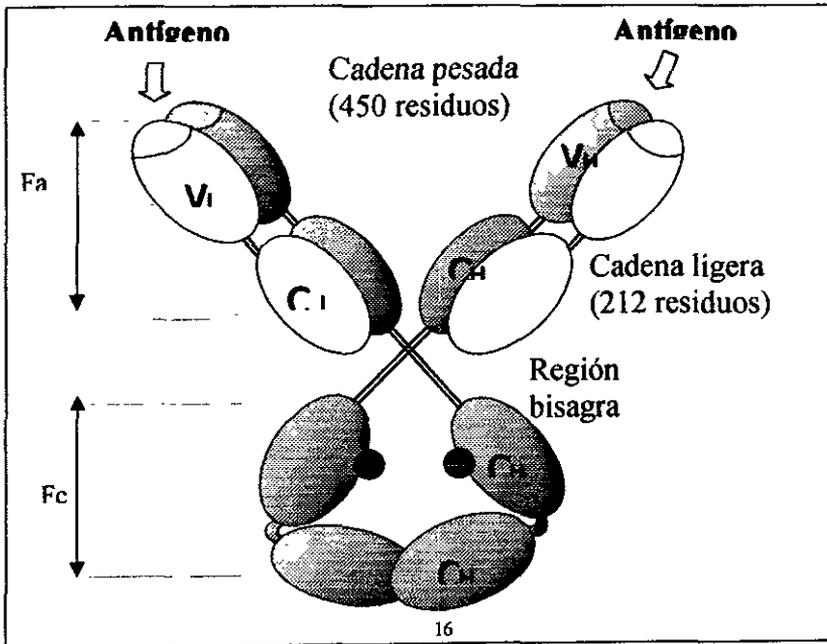


FIGURA 3. Se muestra la estructura básica de la inmunoglobulina IgG, en la cual se observan las dos cadenas por las que está conformada una fracción Fab y fracción Fc.

La clase IgG, que se halla distribuida uniformemente entre los espacios intravascular y extravascular, es la predominante en la respuesta secundaria de anticuerpos y es la única que actúa como antitoxina (Michel J., 1994).

## LIPOSOMAS

Los liposomas son microvesículas esféricas constituidas por una o más bicapas de moléculas de fosfolípidos dispuestas en forma concéntrica, dejando atrapada entre las mismas una fase acuosa. Los liposomas pueden acarrear moléculas de medicamentos por diferentes vías: intercaladas dentro de la bicapa, disueltas en la bicapa o bien atrapadas en el interior. Los liposomas también pueden formar complejos iónicos o hidrofílicos con ácidos nucleicos y otras macromoléculas (Lasic D., 1996). La capacidad de encapsular moléculas hidrofílicas en su fase acuosa, así como de moléculas hidrofóbicas en su fase lipídica, les confiere la posibilidad de ser considerados sistemas transportadores de gran versatilidad (Carl R, et. al., 1995).

La estructura y propiedades de los liposomas fueron descubiertos por Alec Bangham en el año de 1960, desde ese tiempo los liposomas se establecieron como una importante herramienta en biofísica y bioquímica, convirtiéndose en motivo de constantes investigaciones para su uso en la liberación de medicamentos. Anecdóticamente, la primera solicitud para ser patentados fue denegada porque en 1934, el grupo de trabajo del químico alemán I.G. Farbenindustrie registro una patente que describía mezclas acuosas de lecitina y colesterol como acarreadores de medicamentos.

Los liposomas se constituyen por bicapas de fosfolípidos concéntricos separados por compartimentos acuosos. El número de bicapas de fosfolípidos concéntricos (liposomas unilaminares o multilaminares), la composición fosfolípida y la carga de los liposomas puede ser variada; de tal forma, que éstos lleguen a su célula blanco. La carga eléctrica de estas partículas depende de su composición fosfolípida, en este aspecto pueden fabricarse tres tipos de liposomas: liposomas neutros, negativos y positivos. Además pueden llevar asociadas moléculas marcadoras (por ejemplo anticuerpos monoclonales) en su exterior o pueden ser estéricamente estabilizados para evitar su ingestión por los macrófagos que es su destino usual. (Lasic D., 1996). Precisamente esta característica de los macrófagos hace de los liposomas una herramienta muy útil para su manipulación.

Los liposomas, han sido usados como un sistema acarreador de fármacos con los siguientes propósitos: para transportar, proteger fármacos lipofílicos (de rápida disolución en el torrente sanguíneo), como acarreadores de agentes inmunológicos y de agentes antimicóticos (Gregory G., 1991).

Se ha encontrado que algunos fármacos encapsulados en liposomas, presentan propiedades farmacocinéticas, diferentes a los fármacos libres; por ejemplo, la posibilidad del tratamiento del cáncer con liposomas, debido a que el transporte liposomal de agentes citotóxicos a tejidos malignos evita las reacciones indeseables provocadas por tales fármacos a tejidos normales. Esto se demuestra por trabajos realizados en animales con tumores donde las células tumorales son tratadas con medicamentos encapsulados en liposomas. Lo anterior se debe principalmente al aumento de la actividad endocítica de algunas células tumorales combinadas con el incremento local de la permeabilidad de capilares adyacentes (Ringden O., et. Al., 1991). Se han utilizado también los liposomas en la industria cosmética con buenos resultados (Gregory G., 1991).

La asociación de liposomas conteniendo medicamentos, desata respuestas inmunes que ayudan en el control de diversas enfermedades, por ejemplo, los liposomas son aplicados en el tratamiento de infecciones de hongos muy comunes en pacientes

inmunosuprimidos. La candidiasis diseminada puede ser tratada subsecuentemente con anfotericina B incorporada dentro de liposomas (Ringden O., et. Al., 1991).

Otra aplicación de liposomas es como acarreadores en la aplicación de vacunas. El desarrollo de la tecnología recombinante de DNA hace posible una nueva generación de subunidades recombinantes y vacunas de péptidos sintéticos que imitan pequeñas regiones de proteínas virales, bacterianas y protozoarias. Estas vacunas pueden ser específicas en la respuesta inmune; son definidas a niveles moleculares y son potencialmente seguras (Michel J., 1994),

Debido a que en ocasiones los antígenos peptídicos no son inmunogénicos, se necesitan de un agente adyuvante. Estos adyuvantes son sustancias que aumentan la respuesta inmune específica a antígenos a través de diversos mecanismos. Por ejemplo, los adyuvantes pueden activar macrófagos para liberar citocinas como interleucina-1, que estimula la proliferación de linfocitos. Otro mecanismo por el que los adyuvantes pueden ejercer su acción, es la baja degradación en el sitio de infección, que facilita la relación antígeno-nodos linfáticos (Carl R., et. al., 1995 ).

En respuesta a que los adyuvantes no siempre son efectivos e incrementan la inmunidad celular solo ligeramente, se encuentran en constante investigación nuevos adyuvantes alternativos. Por esto, no es sorprendente que se usen liposomas para crear respuestas inmunes, pues se conoce la interacción de éstos con macrófagos disponibles y la liberación de los antígenos encapsulados en ellos, lo que produce una fuerte respuesta inmune (Carl R., et. al., 1995).

Una nueva ventaja de los liposomas respecto a otros adyuvantes es la gran variabilidad en características estructurales que pueden dárseles, el modo en que los antígenos son acomodados y el tipo de inmunidad que ellos promueven; por lo anterior, los liposomas son muy versátiles en su acción inmunoadyuvante y por lo tanto para el diseño de vacunas (Carl R., et. al., 1995). Como un ejemplo, la actividad adyuvante se ha demostrado con liposomas recubiertos de un ligando manosilado, éste facilita la unión a las

células que presentan antígenos las cuales expresan el receptor manosa. Adicionalmente existe la posibilidad de utilizar otros agentes con alto potencial inmunológico con liposomas para mejorar la capacidad adyuvante. De este modo al encapsular interleucina-2 junto con el antígeno en liposomas, se obtuvo un incremento en la respuesta a éste alcanzando los niveles más altos con antígeno liposomal (Carl R., et. al., 1995).

Por otro lado, la encapsulación en liposomas puede incrementar el índice terapéutico de los medicamentos. Algunos medicamentos como la anfotericina B, minoxidil y ciclosporina, así como también porfirinas y algunas hormonas, son difíciles de disolver, y los liposomas representan un sistema de solubilización conveniente para ellos. De este modo, cuando moléculas de medicamentos son firmemente asociadas con un liposoma, se forman coloides que reducen la nefrotoxicidad y neurotoxicidad de la anfotericina B, o bien la cardiotoxicidad de doxorubicina (Ringden O., et. al., 1991).

Actualmente, mediante estudios realizados con liposomas, se ha encontrado que pueden hacerse llegar diversas sustancias a zonas marginales de macrófagos del bazo, como primer paso en la inducción de una respuesta inmune. Además, los liposomas se han utilizado en diversos estudios con macrófagos, liposomas que contienen EDTA (Edeato disódico), o varios complejos de iones como calcio o que muestran la habilidad de activar macrófagos *in vivo* (Lain F., et. al., 1994).

## OXIDO NITRICO

El óxido nítrico juega un papel importante en la respuesta inmune a varios agentes patógenos. La primera evidencia de que el óxido nítrico presentaba una capacidad inmunológica fue dada en 1985 cuando Stuehr y Marlett demostraron que los macrófagos de ratones pueden ser estimulados *in vitro* por LPS (Lipopolisacáridos de pared celular bacteriana) para producir altos niveles de nitritos y nitratos, los productos finales del óxido nítrico. El IFN- $\gamma$  también puede estimular células para producir nitritos y nitratos y esto forma parte de la inhibición de la replicación celular tumoral (Donnell C., 1994).

El mecanismo por el cual el óxido nítrico puede inhibir la proliferación celular tumoral o de agentes patógenos no es específico, ya que este puede reaccionar con grupos Fe-S, formando complejos fierro-glucosilados, obtenidos por la inactivación y/o degradación de enzimas susceptibles, por ejemplo aconitasa y complejo I y II de un transporte mitocondrial y de la interrupción de la replicación de DNA (Donnell C., 1994)

Las enzimas involucradas en la activación de la producción de óxido nítrico se dan a partir de L-arginina, NADPH, oxidoreductasa. Los trabajos realizados muestran que la síntesis de óxido nítrico requiere L-arginina y NADPH y da como resultado la producción de citulina así como óxido nítrico. Además la reacción necesita oxígeno, 4 cofactores (hemo, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina) y la presencia de calmodulina (Knowles R, 1994). (Figura 3 )

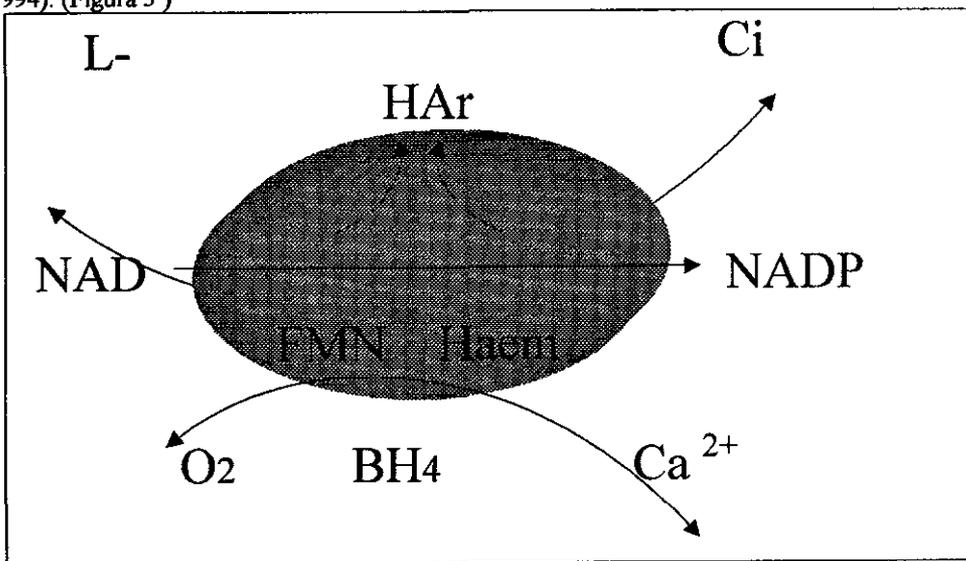


FIGURA 3. Se puede apreciar el proceso y los sustratos necesarios para la síntesis de óxido nítrico L-Arg (L-Arginina), O<sub>2</sub> (Oxígeno), BH<sub>4</sub> (tetrahidro-L-biopterin), CaM (Calmodulina).

Son tres las isoenzimas que pueden actuar en la síntesis de óxido nítrico 1) nNOS (isoenzima n) fue originalmente identificada en tejidos neuronales, es expresada constitutivamente y es dependiente del calcio, 2) eNOS (isoenzima e) fue la primera identificada como constitutiva en las células endoteliales vasculares y es dependiente del calcio, 3) iNOS (isoenzima i) fue la primera descubierta como inducible por macrófagos y células del hígado por endotoxinas y citocinas. Esta isoforma no es dependiente de las concentraciones de calcio en un rango fisiológico. Es inducida por productos bacteriales y citocinas, la eNOS por estrés y estrógenos y la nNOS por estrógenos y testosterona (Knowles R., 1994).

El óxido nítrico es considerado como un mensajero intracelular que se presenta en casos de sepsis, isquemia e inflamación. Pero también es reconocido como altamente reactivo, y puede producir cierta citotoxicidad. A altas concentraciones de óxido nítrico este puede convertirse en superóxido el cual es altamente reactivo (Beckman J., 1991).

El IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y MIF (factor inductor de macrófagos) ocupan receptores de la célula blanca y transmiten una serie de señales de lectura para la expresión de síntesis de óxido nítrico. En contraste con otro grupo de citocinas como la IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  y MIP- $\nu$  ocupan estos receptores de la célula blanca y transmiten otra serie de señales que dan como resultado la inhibición de la producción de óxido nítrico (figura 4)

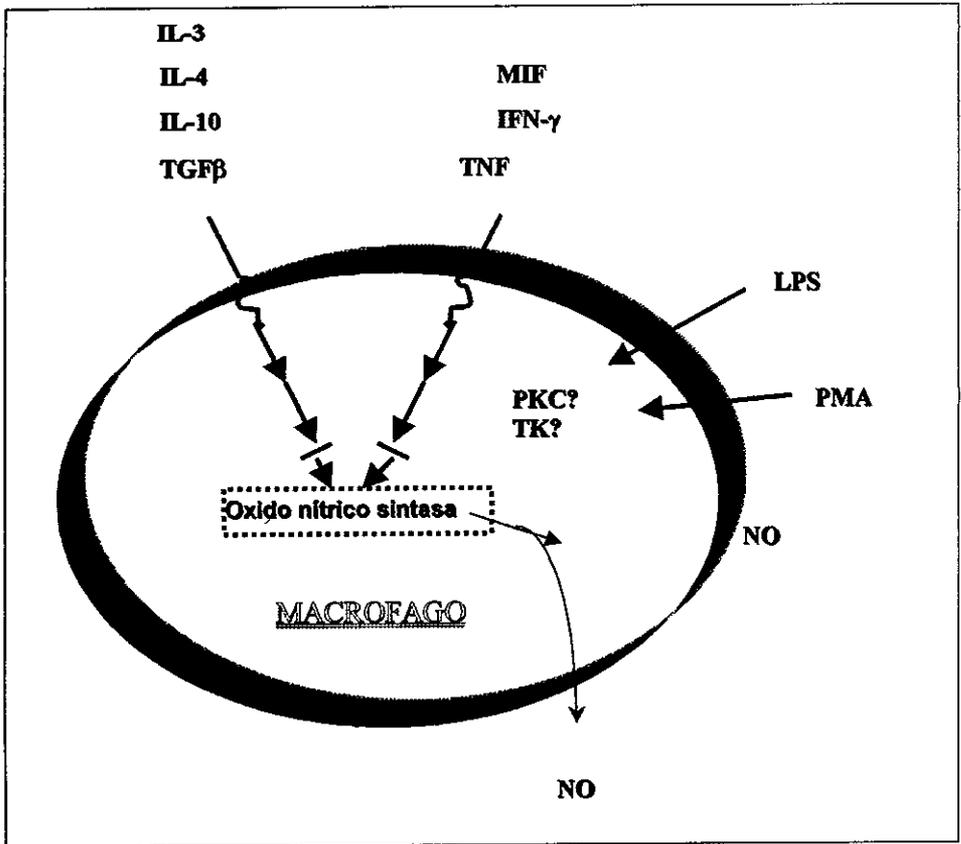


FIGURA 4 Se presentan las citocinas tanto activadoras como inhibidoras de la síntesis de óxido nítrico en el macrófago. IL-3 (Interleucina 3), IL-4 (Interleucina 4), IL-10 (Interleucina 10), TGFβ (Tumor Grow Factor beta), IFNγ (Interferon gama), TNF (Factor Necrosis Tumoral), LPS (Lipopolisacarido), PMA (Acetato miristato forbol), PKC (proteína cinasa), NO (Óxido nítrico), MIF (Factor inhibitor migratorio).

Los macrófagos producen cantidades detectables de óxido nítrico aproximadamente 6 horas después de la activación con IFN-γ y LPS. Esta producción alcanza una meseta 24 horas después de su activación, pero la actividad de síntesis se presenta 12 horas y después declina rápidamente (Donnell C., 1994).

## RECEPTORES Fc

Uno de los cambios más notables que sufren los macrófagos, tanto *in vivo* como *in vitro*, es la activación de un estado en el cual adquieren la capacidad de destruir microorganismos o células malignas. Esta activación esta acompañada de cambios biológicos y morfológicos, entre los que se incluyen la expresión de ciertos receptores de membrana. Los receptores de membrana llevan a cabo funciones de reconocimiento requeridas para controlar las respuestas a cambios en el microambiente celular. Entre los diferentes tipos de receptores que se expresan en las membranas de las células fagocíticas, se encuentran los receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (Fc), quienes proveen un enlace importante entre los componentes humorales (anticuerpos) y celulares (macrófagos, granulocitos, linfocitos) que participan en la respuesta inmune, ya que constituyen el sitio específico de la membrana celular capaz de reconocer y enlazar la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas. Entre los diferentes tipos celulares que expresan receptores Fc se encuentran los linfocitos T y B, células NK, células dendríticas, plaquetas, monocitos, macrófagos y granulocitos (Flores F., 1991).

Las inmunoglobulinas interactúan con moléculas presentes en la membrana de las células conocidas colectivamente como receptores Fc ya que se enlazan en la porción cristalizable de las IgG. La mayoría de los Fc, incluidos en los IgG pertenecen a la superfamilia de las IgG.

Los receptores Fc se detectaron por primera vez a principio de los años 60 en células macrófágicas encontrándose también, que estas células poseen la más alta densidad de estos receptores de entre todos los tipos celulares que toman parte en el sistema inmune. A pesar de que se han descrito los receptores Fc para IgM, IgA, IgE, la mayoría de los estudios se han enfocado a conocer la biología química de los Fc para IgG, debido a que estos se expresan en un número relativamente alto y a que se encuentran ampliamente distribuidos en múltiples poblaciones celulares (Joshep A., 1995).

El hecho de que los receptores Fc se presenten en una amplia variedad de tipos celulares, sugiere por una parte, que estos pueden desempeñar papeles importantes

dependiendo del tipo celular en que se expresen y del estado de diferenciación por otra parte, puede encontrarse una marcada heterogeneidad entre estos receptores.

En cuanto a la naturaleza química, a pesar de que la mayoría de estudios indican que estos receptores son moléculas de tipo glucoproteico, estudios de ultracentrifugación y tratamiento enzimático les atribuyen propiedades lipoproteicas. Estructuralmente, estas proteínas de membrana constan de una porción extracelular glucosilada, de un segmento transmembranal y una cola citoplasmática que corresponde al extremo carboxi-terminal (Flores F., 1991).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los macrófagos son células que tienen la propiedad funcional básica de capturar y eliminar materiales extraños y gastados. Algunas citocinas como la interleucina-1 e interferón- $\gamma$ , son proteínas capaces de activar a los macrófagos para ejercer sus funciones, sin embargo, estas citocinas administradas *in vivo* aun en bajas concentraciones pueden ser tóxicas y producir variados efectos adversos. Adicionalmente se ha comprobado la versatilidad de los liposomas como acarreadores de fármacos, por lo que se podrían utilizar para encapsular las citocinas mencionadas y evaluar su función *in vitro* como un antecedente para su uso en animales vivos, donde también estén presentes otros tipos celulares y factores humorales. Por lo anterior, en este proyecto se pretendió establecer el tipo de liposomas y los tiempos necesarios para activar a los macrófagos *in vitro*, con lo que sería posible en un futuro manipular su respuesta *in vivo*, pudiéndose aplicar en distintas enfermedades en las que participan estas células, tal como infecciones y el cáncer

## **HIPOTESIS**

Se sabe que las citocinas Interleucina 1 e Interferón gamma, son capaces de activar diversos procesos de defensa contra agentes extraños en los macrófagos, también se sabe que administradas *in vivo* aun en pequeñas cantidades pueden llegar a ser tóxicas; por último, se conoce la gran versatilidad de los liposomas como acarreadores de fármacos. Por lo anterior si nosotros logramos encontrar las condiciones necesarias para encapsular las citocinas mencionadas en liposomas y lograr una buena inducción en macrófagos peritoneales de ratón, estaremos en la posibilidad de aplicar nuestros resultados para estudios *in vivo*, haciendo llegar estas citocinas a su sitio de acción para ejercer su función sin presentar efectos tóxicos.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Estimular macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón con Interleucina-1, e Interferón y encapsulados en liposomas.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Inducir la aparición de receptores Fc en macrófagos peritoneales de ratón *in vitro* mediante la administración de citocinas encapsuladas en liposomas.

-Evaluar la aparición de receptores Fc inducidos en diferentes tiempos.

-Evaluar la producción de óxido nítrico causada por las *citocinas mencionadas* encapsuladas en liposomas.

# **MATERIAL Y METODOS**

## **MATERIAL BIOLOGICO**

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 de 6 a 8 semanas de edad como donadores de macrófagos de la cavidad peritoneal.

## **OBTENCION DE MACROFAGOS RESIDENTES**

Se sacrificaron los ratones, posteriormente se extrajeron los macrófagos por medio de una jeringa hipodérmica, la cual contenía ocho mililitros de PBS, inyectándolos en la cavidad peritoneal dando enseguida un ligero movimiento al animal con el objeto de suspender la mayor cantidad de células no adherentes de la cavidad peritoneal y poder recuperarlas al extraer el PBS inyectando con la misma jeringa. Se colocó el exudado en un tubo cónico de plástico, el cual se mantuvo previamente en hielo para evitar la adhesión de los fagocitos a sus paredes, se repitió el proceso de extracción de macrófagos residentes con cinco mililitros de PBS, las células obtenidas se lavaron en PBS dos veces mediante centrifugación a 1500 rpm durante tres minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en cinco mililitros de medio fresco (medio de cultivo), después se procedió a la cuenta celular.

Se sembraron  $3.5 \times 10^5$  células en placas de cultivo de 24 pozos, se incubaron por un periodo de una hora con la finalidad de que las células se adhirieran a la base del recipiente de cultivo. Transcurrido este tiempo se procedió a retirar el medio de cultivo en el que se encontraban contenidas todas aquellas células no adheridas, adicionando enseguida medio de cultivo enriquecido con 10% de suero fetal de bovino inactivado (medio suplementado). Después de 24 horas, se lavaron los pozos con medio fresco (cultivo estabilizado) y se adicionó medio suplementado con o sin citocinas a ensayar.

## EVALUACION DE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO

Se centrifugaron las placas, se recogieron 150  $\mu$ l del medio de cultivo y se colocaron en una placa para el lector de ELISA; además se colocaron cuatro pozos solo con medio de cultivo como testigo. Se adicionaron 40  $\mu$ l a cada pozo de una solución de sulfonilamida 10 mM, HCl (ácido clorhídrico) 2M y naftietilendiamina 1 mM en una proporción 2:1:1 respectivamente. Después de 10 minutos se obtiene una coloración rosa, la cual se cuantifica en el lector a una longitud de onda de 540-570 nm.

## PREPARACION DE ERITROCITOS RECUBIERTOS CON ANTICUERPO

Se prepararon eritrocitos al 2 % de la siguiente manera: se tomo de un botón de eritrocitos de sangre de carnero cantidad necesaria para estar al 2% en medio de cultivo que contenía IgG de conejo contra estroma de carnero titulada (1:600), se incubaron por un periodo de 30 minutos en la incubadora y se procedió a lavarlos por centrifugación para después dejarlos en solución al 2% de medio fresco.

## FORMACION DE ROSETAS

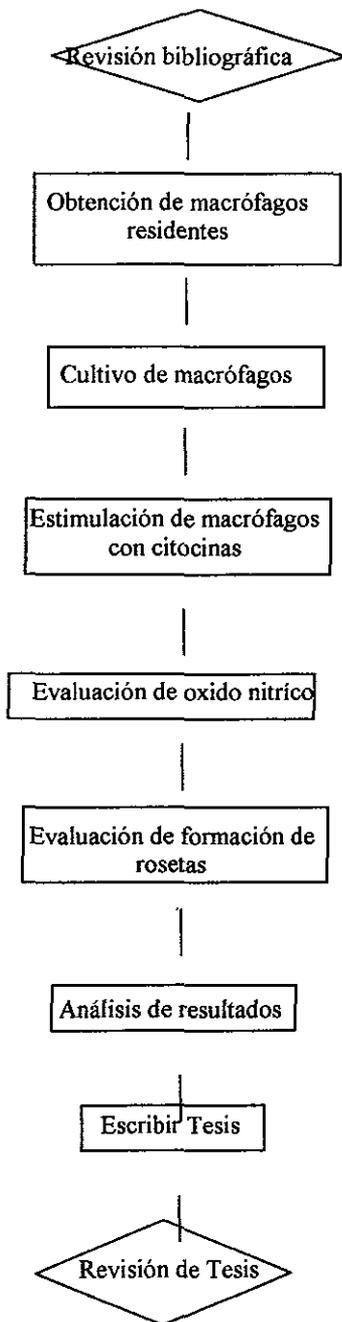
Se lavaron las cajas sembradas con PBS, posteriormente se colocaron 300  $\mu$ l de eritrocitos recubiertos con anticuerpo, se refrigeraron durante 1 hora, transcurrido este tiempo se lavaron tres veces con PBS, se colocaron 300  $\mu$ l de la mezcla de OPD (Ortofenilamina al 50% en PBS mas 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se incubaron 7 minutos en la oscuridad, se recogieron 200  $\mu$ l del sobrenadante y se colocaron en placas para lector de ELISA en donde se había colocado previamente cuatro pozos con solución de OPD como testigo. Se procedió a leer a una longitud de onda de 490 nm.

## ANALISIS ESTADISTICO

El análisis de varianza es una técnica que se utiliza para investigar las diferentes causas o fuentes que producen la variación de una medida observada o medida. El análisis de varianza se basa en una descomposición o partición aritmética de la suma de cuadrados (suma de los cuadrados de las desviaciones de los valores de la muestra y la media de la misma), el parámetro de la F de Fischer se utiliza para el análisis de varianza para estudios biológicos.

El análisis utilizado para el análisis estadístico fue precisamente el análisis de varianza para lo cual primero se tomaron todas las medidas de las densidades ópticas obtenidas para cada tipo de liposomas estudiados y después estos datos fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando como criterio de aceptación para obtener la diferencia fue la F de Fischer calculada y la obtenida y si este valor está por debajo de 0.5 se considera que es diferente significativamente al control. Ya que para este estudio el parámetro utilizado como referencia fue el control y todos los efectos determinados se realizaron comparándolos con el control.

DIAGRAMA DE FLUJO :



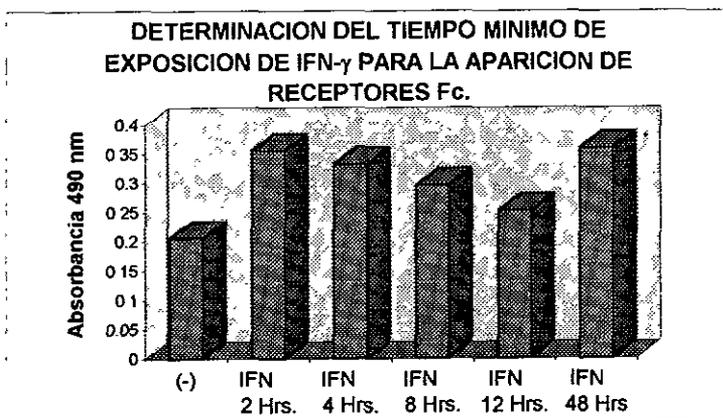
## RESULTADOS

### TIEMPO MÍNIMO DE EXPOSICIÓN A $INF-\gamma$ PARA LA INDUCCIÓN DE LA APARICIÓN DE RECEPTORES $F_c$ EN MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL.

Debido a que los liposomas tienden a aglutinarse en presencia de suero contenido en el medio suplementado y esto no les permitiría actuar como acarreadores, se procedió a determinar el tiempo mínimo necesario de exposición a  $INF-\gamma$  en ausencia de suero para obtener un efecto inductor de la aparición de receptores  $F_c$ . Se realizó una cinética de inducción con  $INF-\gamma$ , se emplearon cultivos enriquecidos de macrófagos que fueron estimulados en medio de cultivo durante 2, 4, 8 y 12 horas en presencia o ausencia de 50 UI/ml de  $INF-\gamma$ . Transcurridos estos tiempos los cultivos se lavaron dos veces con medio fresco y se cultivaron por dos días más con medio suplementado (sin citocina) Se colocaron cultivos enriquecidos: controles negativo y positivo, que fueron cultivados en medio suplementado dos días completos en ausencia o presencia de  $INF-\gamma$ . Al término de este tiempo, todos los cultivos fueron evaluados tanto para la aparición de receptores  $F_c$  como para la liberación de óxido nítrico.

En cuanto a la inducción a la aparición de receptores  $F_c$ , nuestros resultados indican que con una exposición de dos horas a  $INF-\gamma$ , se obtiene una respuesta en el aumento a la aparición de receptores  $F_c$  similar a la del control positivo, en los cultivos que se mantuvieron sin suero por más tiempo la aparición de receptores  $F_c$  se vio disminuida (Gráfica 1). Por otro lado, la evaluación de la liberación de óxido nítrico en estas condiciones presenta un efecto similar a lo descrito para la aparición de receptores  $F_c$  (Gráfica 2).

GRAFICA 1.

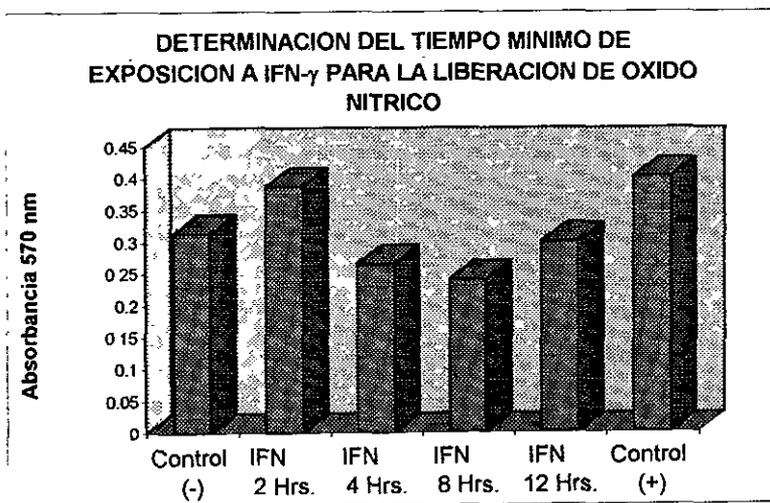


Se estimularon poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 con medio de cultivo con 50 UI/ml de IFN- $\gamma$ , durante 2, 4, 8 y 12 hrs. Transcurrido este tiempo, los cultivos se lavaron y se cultivaron en medio suplementado por dos días más; posteriormente se procedió a su evaluación.

Control (-) Células cultivadas 48 horas con medio suplementado.

Control (+) Células cultivadas 48 horas con IFN- $\gamma$  50 UI/ml en medio suplementado.

GRAFICA 2.



Se estimularon poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 en presencia de 50 UI/ml de IFN- $\gamma$  en medio de cultivo durante 2, 4, 8 y 12 hrs. Transcurridos estos tiempos, las células fueron lavadas y cultivadas dos días más en medio suplementado. Finalmente se procedió a su evaluación.

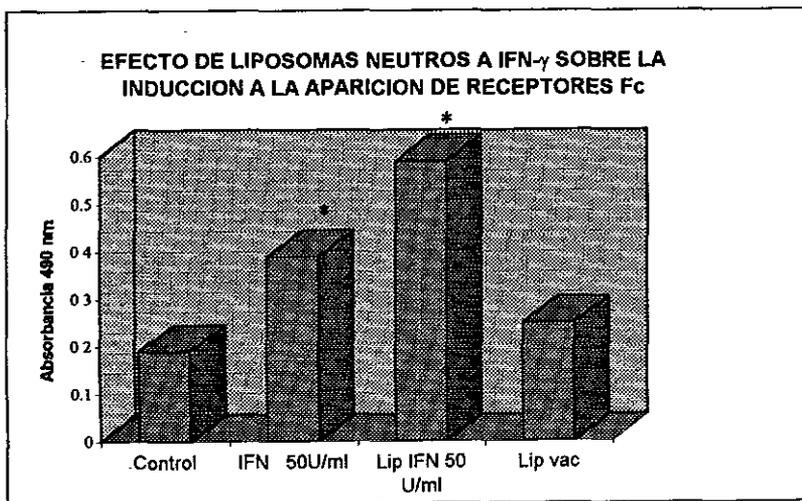
Control (-) Células cultivadas 48 horas en medio suplementado.

Control (+) Células incubadas 48 horas en presencia de IFN- $\gamma$  50 UI/ml en medio suplementado.

## EFEECTO DE IFN- $\gamma$ ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS NEUTROS

Una vez determinado que con dos horas de estimulación es suficiente para obtener una respuesta tanto para la aparición de receptores Fc, como para la liberación de óxido nítrico, se realizó la evaluación del IFN- $\gamma$  encapsulado en liposomas neutros, para lo cual se utilizaron cultivos de macrófagos peritoneales enriquecidos estimulados en presencia de liposomas neutros vacíos y liposomas neutros con IFN- $\gamma$  5UI/ml o IFN- $\gamma$  50 UI/ml. Los resultados obtenidos para la aparición de receptores Fc indicaron que los liposomas vacíos no presentan efecto en la aparición de receptores Fc, en cambio los liposomas llenos inducen un aumento en la aparición de receptores Fc similar a la del IFN- $\gamma$  libre (Gráfica 3). Sin embargo para la liberación de óxido nítrico se pudo observar que no se presentó liberación de óxido nítrico con liposomas vacíos y que los liposomas con IFN- $\gamma$  50UI/ml produjeron solo un ligero aumento en la liberación al igual que el IFN- $\gamma$  libre (Gráfica 4).

GRAFICA 3.

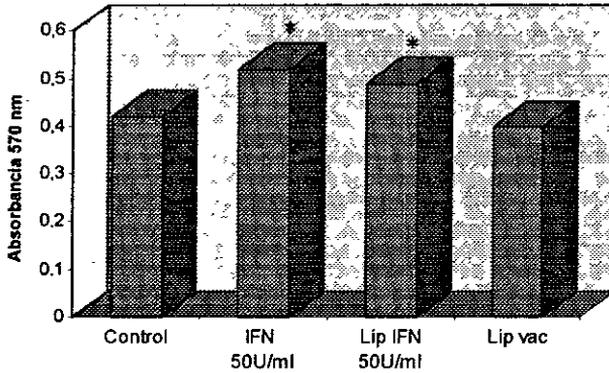


Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 para evaluar la expresión de receptores Fc. Las células fueron expuestas a medio de cultivo (control), IFN- $\gamma$  (50 UI/ml), liposomas neutros vacíos y con IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) por un período de 2 hrs, posteriormente se lavaron e incubaron por dos días más en presencia de medio suplementado. Finalmente se procedió a su evaluación.

\*Significativamente diferentes con respecto al control

GRAFICA 4.

DETERMINACION DE LA LIBERACION DE OXIDO NITRICO  
DESPUES DE EXPONER LAS CELULAS A LIPOSOMAS  
NEUTROS CON IFN- $\gamma$



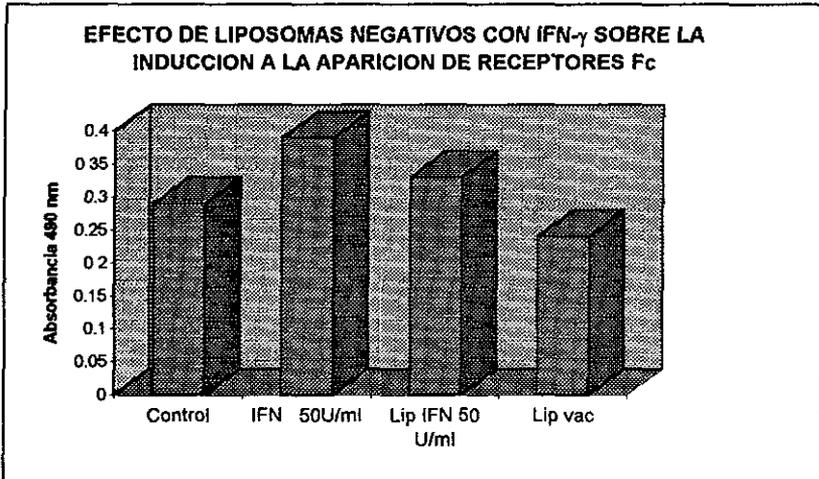
Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 para evaluar la liberación de óxido nítrico. Las células fueron expuestas a medio de cultivo(control). IFN- $\gamma$  (50 UI/ml), liposomas neutros vacíos y con IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) por un periodo de 2 hrs. posteriormente se lavaron e incubaron por dos días más en presencia de medio suplementado. Finalmente se procedió a su evaluación.

\*Significativamente diferentes al control.

EFFECTO DE IFN- $\gamma$  ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS NEGATIVOS

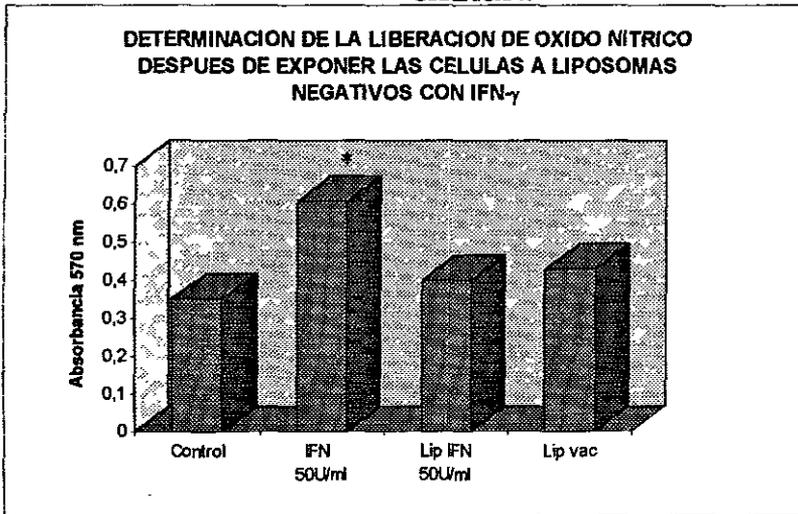
Cuando se utilizaron liposomas negativos encapsulando IFN- $\gamma$  50 UI/ml, los resultados indicaron que los liposomas vacíos presentaron un efecto similar al del control negativo en la aparición de receptores Fc y los liposomas con IFN- $\gamma$  produjeron un ligero aumento en la aparición de éstos (Gráfica 5). En cuanto a la liberación de óxido nítrico no se obtuvieron cambios con respecto al control tanto con la utilización de liposomas vacíos, como con liposomas llenos (Gráfica 6). Aquí es importante mencionar que se nota claramente una respuesta alterna en la que si se presenta un aumento en la aparición de receptores, se observa una disminución de la producción de óxido nítrico y viceversa únicamente en presencia de liposomas negativos.

GRAFICA 5.



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 para evaluar la expresión de receptores Fc. Las células fueron expuestas a medio de cultivo (control), IFN- $\gamma$  (50 UI/ml), liposomas negativos vacíos y con IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) por un período de 2 hrs; posteriormente se lavaron e incubaron por dos días más en presencia de medio suplementado, para proceder finalmente a su evaluación

GRAFICA 6.



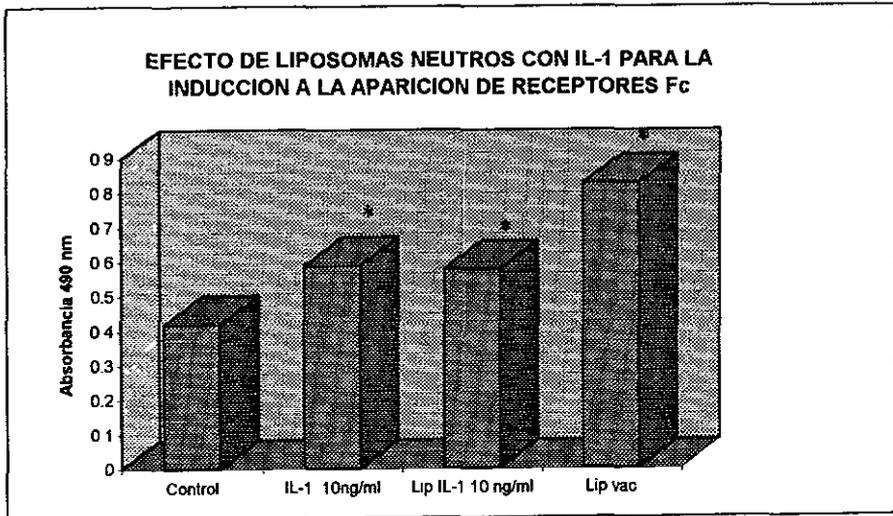
Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 para evaluar la liberación de óxido nítrico. Las células fueron expuestas a medio fresco (control), IFN- $\gamma$  (50 UI/ml), liposomas negativos vacíos y con IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) por un período de 2 hrs; posteriormente se lavaron e incubaron por dos días más en presencia de medio suplementado, para proceder finalmente a su evaluación.

\*Diferentes significativamente al control.

## EFFECTO DE LA IL-1 $\beta$ ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS NEUTROS

Con la finalidad de evaluar si la IL-1  $\beta$  encapsulada en liposomas induce la expresión de receptores Fc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón de la misma manera que la IL-1  $\beta$  libre, se utilizaron cultivos estabilizados de macrófagos residentes en presencia de 10 ng/ml de IL-1  $\beta$ , de liposomas vacíos, de liposomas neutros con 10 ng/ml de IL-1  $\beta$  y como control medio de cultivo fresco. Después de dos horas, se procedió a lavar las células y colocar medio suplementado. Los resultados muestran que para la evaluación de la aparición de receptores Fc en todos los casos se puede observar un aumento en la aparición de receptores Fc principalmente se observa este aumento en los liposomas vacíos (Gráfica 7). En cambio con lo que respecta a óxido nítrico no se observa ningún aumento en la liberación de óxido nítrico tanto para liposomas vacíos, liposomas llenos e IL-1 10 ng/ml sola (Gráfica 8).

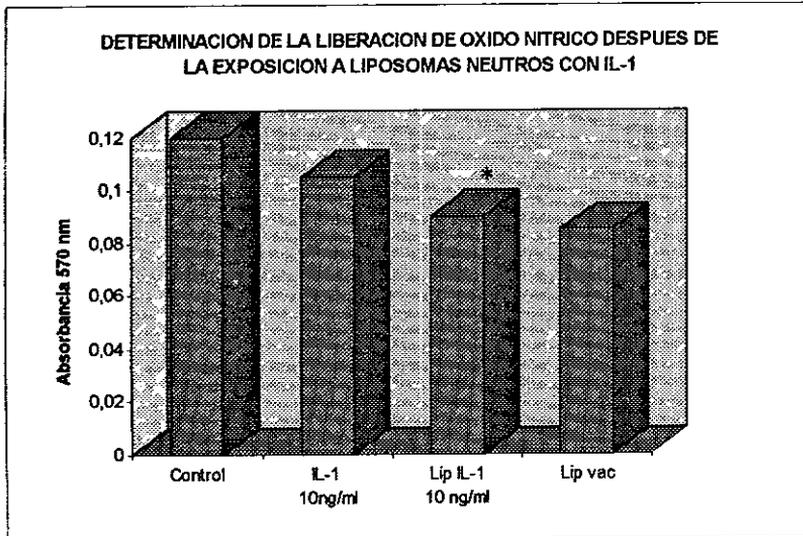
GRAFICA 7.



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 para evaluar la expresión de receptores Fc. Las células fueron expuestas a medio fresco (control), IL-1  $\beta$  10 ng/ml, liposomas neutros vacíos y con IL-1  $\beta$  10ng/ml, por un periodo de 2 hr. Posteriormente se lavaron e incubaron por dos días más en presencia de medio suplementado, para proceder finalmente a su evaluación.

\*Diferentes significativamente al control.

GRAFICA 8.



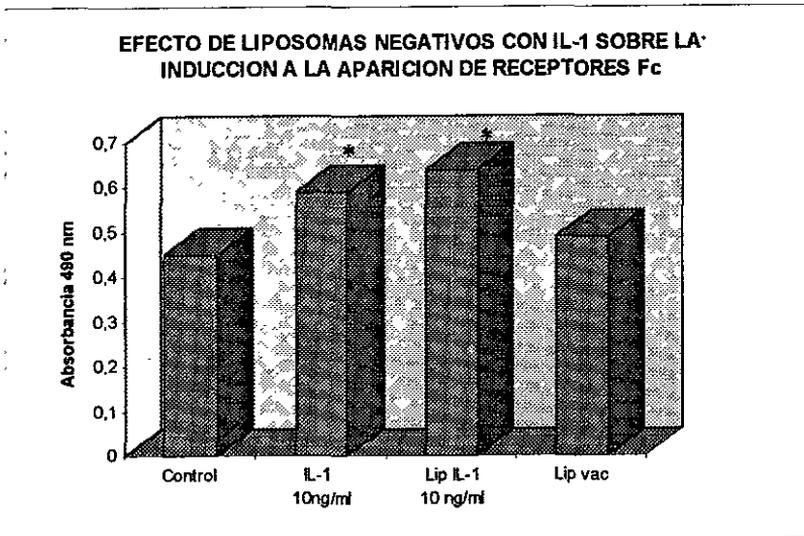
Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 para evaluar la liberación de óxido nítrico. Las células fueron expuestas a medio de cultivo (control), IL-1  $\beta$  10ng/ml, liposomas neutros vacíos y con IL-1  $\beta$  10ng/ml por un periodo de 2 hrs, posteriormente se lavaron e incubaron por dos días más en presencia de medio suplementado, para proceder finalmente a su evaluación.

\*Diferentes significativamente al control.

### EFEECTO DE IL-1 $\beta$ ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS NEGATIVOS

Una vez realizada la evaluación del efecto de liposomas neutros con IL-1 $\beta$  se procedió a evaluar el efecto de liposomas negativos encapsulado IL-1  $\beta$  10 ng/ml, liposomas negativos vacíos, liposomas negativos con 10 ng/ml de IL-1  $\beta$  y medio fresco como control. Los resultados indican que para la inducción de receptores Fc los liposomas negativos vacíos no presentaron efecto, mientras que los liposomas negativos con IL-1  $\beta$  (10 ng/ml) indujeron un fuerte aumento (Gráfica 9). En lo que respecta a la liberación de óxido nítrico, únicamente se observa un incremento en presencia de liposomas negativos vacíos. Es importante mencionar que en esta ocasión no se presentó el efecto inverso en la respuesta en presencia de liposomas negativos

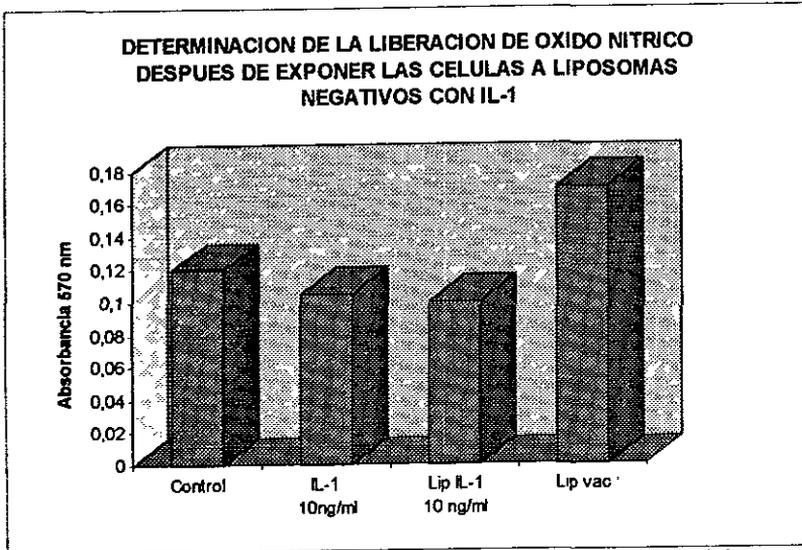
GRAFICA 9.



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 para evaluar la expresión de receptores Fc. Las células fueron expuestas a medio fresco (control), IL-1  $\beta$  10 ng/ml, liposomas negativos vacíos y con IL-1  $\beta$  10ng/ml por un período de 2 hrs; posteriormente se lavaron e incubaron por dos días más en presencia de medio suplementado, para proceder finalmente a su evaluación.

\*Diferentes significativamente al control

GRAFICA 10.



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD1 para evaluar la liberación de óxido nítrico. Las células fueron expuestas a medio fresco (control), IL-1  $\beta$  10 ng/ml, liposomas negativos vacíos y con IL-1  $\beta$  10ng/ml por un período de 2 hrs, posteriormente se lavaron incubaron por dos días más en presencia de medio suplementado, para proceder finalmente a su evaluación.

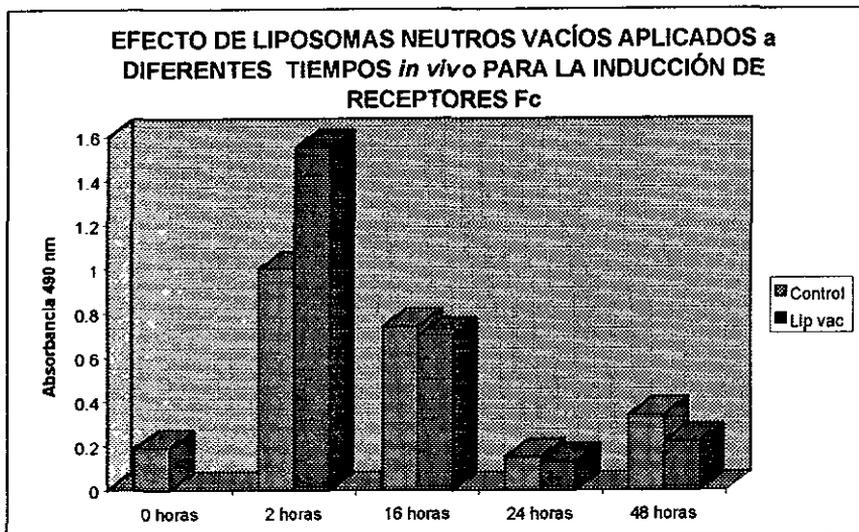
#### EFFECTO DE LIPOSOMAS NEUTROS ADMINISTRADOS *in vivo* EN LA ACTIVACION DE MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL

Con la finalidad de evaluar un posible efecto irritante o adverso de los liposomas *in vivo*, se procedió a inyectar ratones CD1 con 300  $\mu$ L de liposomas neutros vacíos y como control 300  $\mu$ L de medio de cultivo. Se sacrificaron grupos de cinco animales en 2, 16, 24 y 48 horas y se obtuvieron cultivos enriquecidos de macrófagos de la cavidad para su posterior evaluación tanto para la expresión de receptores Fc como para la liberación de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos indican que para la aparición de receptores Fc solamente se encuentran cambios con respecto al control de tiempo 0, a las 2 y 16 horas presentándose un aumento fuerte de la aparición de receptores y que solamente a las dos horas este aumento es mucho mayor que su propio control (Gráfica 11) Por otra parte, en la

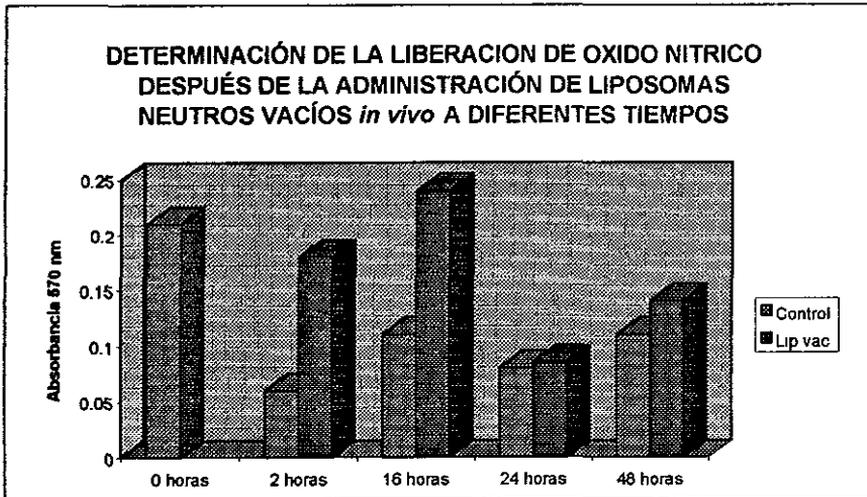
evaluación de la liberación de óxido nítrico, se observa en general una ligera disminución en comparación con el control de tiempo 0, sin embargo en el tiempo de 16 horas existe una diferencia fuerte de liberación con su propio control y ligera con respecto al tiempo 0 (sin estimulación alguna) (Gráfica 12)

GRAFICA 11.



Se inyectaron grupos de ratones CD1 con medio de cultivo o con liposomas vacíos y se sacrificaron a diferentes horas (2, 16, 24 y 48 horas) para la obtención de poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal y a su evaluación transcurrido este tiempo.

GRAFICA 12.



Se inyectaron grupos de ratones CD1 con medio de cultivo o liposomas vacíos y se sacrificaron a diferentes horas (2, 16, 24 y 48 horas) para la obtención de poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal y su posterior evaluación.

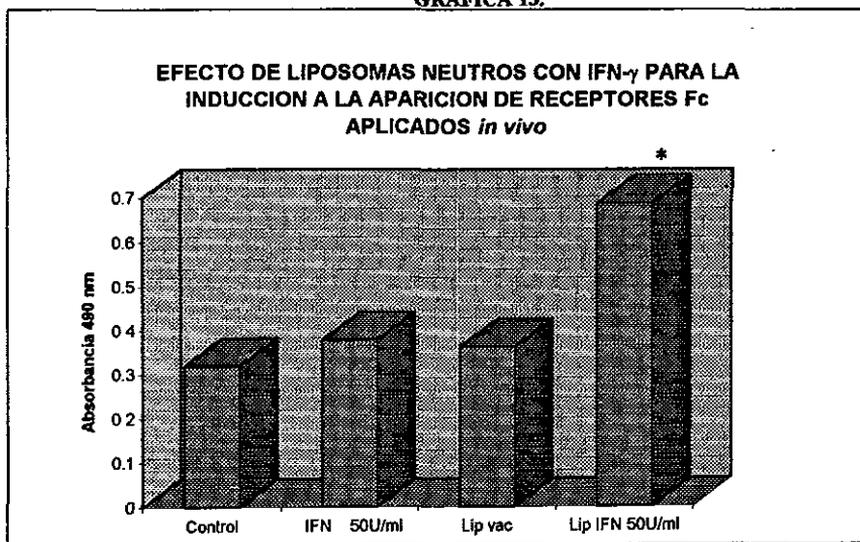
#### EFFECTO DE LIPOSOMAS NEUTROS EN LA ACTIVACION *in vivo* DE MACROFAGOS ENCAPSULANDO IL-1 e IFN- $\gamma$

Después de haber observado que no se presento efecto irritante alguno en la administración de liposomas neutros vacíos *in vivo*, como se puede observar en la Tabla 2, se realizo la evaluación del efecto de estos liposomas neutros encapsulando IFN- $\gamma$  50 UI/ml. Se inyectaron ratones CD1 con IFN- $\gamma$  50 UI/ml, liposomas neutros vacíos, liposomas neutros con IFN- $\gamma$  y medio fresco como control, después de dos horas de la administración se procedió a sacrificar a los ratones y extraer los macrófagos de la cavidad peritoneal, se enriqueció la población de macrófagos y se realizo la evaluación. Los resultados obtenidos muestran que para la aparición de receptores Fc, únicamente se obtuvo un aumento cuando se utilizaron liposomas conteniendo IFN- $\gamma$  50 UI/ml (Gráfica 13), en cuanto a la liberación de óxido nítrico no se obtuvo diferencia de secreción con respecto al control (Gráfica 14).

TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE CELULAS X 10 <sup>6</sup> (POR RATON)
SIN INOCULAR (TIEMPO 0)	6.6
2 (VEHICULO)	5.5+-1.5%
2 (LIPOSOMAS)	6+-1%
16 (VEHICULO)	6+-1%
16 (LIPOSOMAS)	6+-1%
24 (VEHICULO)	6.6+-0%
24 (LIPOSOMAS)	6.6+-0%
48 (VEHICULO)	6.3+-1.4%
48 (LIPOSOMAS)	6.25+-1.35%

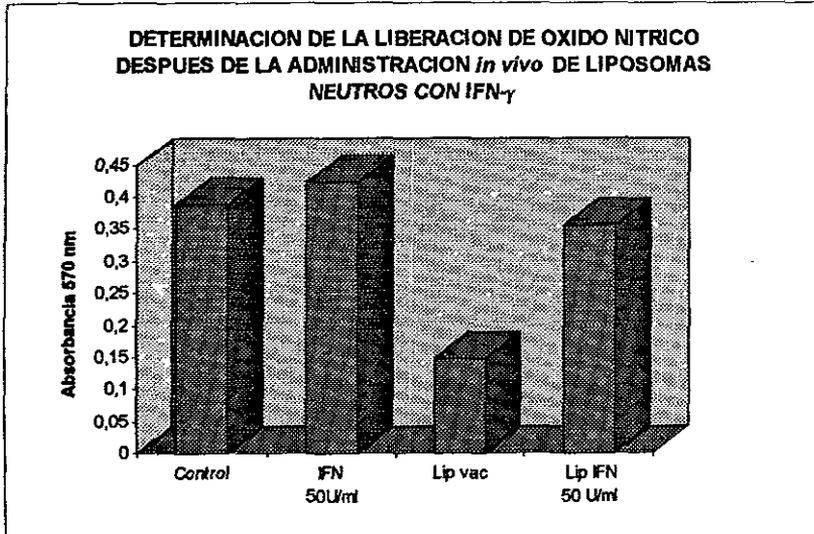
TABLA 2. Tabla de conteos celulares por ratón en donde se observa que no se presentó algún efecto irritante

GRAFICA 13.



Se inyectaron grupos de ratones CD1 con IFN- $\gamma$  (50 U/ml), liposomas neutros vacíos y liposomas neutros con IFN- $\gamma$  (50 U/ml) y medio de cultivo como control por un periodo de dos horas. Transcurrido este tiempo se procedió a sacrificarlos y obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal para su evaluación.

GRAFICA 14.



Se inyectaron grupos de ratones CD1 con IFN- $\gamma$  (50 UI/ml), liposomas neutros vacíos y liposomas neutros con IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) y medio de cultivo como control por un periodo de dos horas. Transcurrido este tiempo se procedió a sacrificarlos y obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal. Finalmente se procedió a su evaluación.

#### EFFECTO DE LIPOSOMAS NEGATIVOS EN LA ACTIVACION *in vivo* DE MACROFAGOS ENCAPSULANDO IL-1 e IFN- $\gamma$

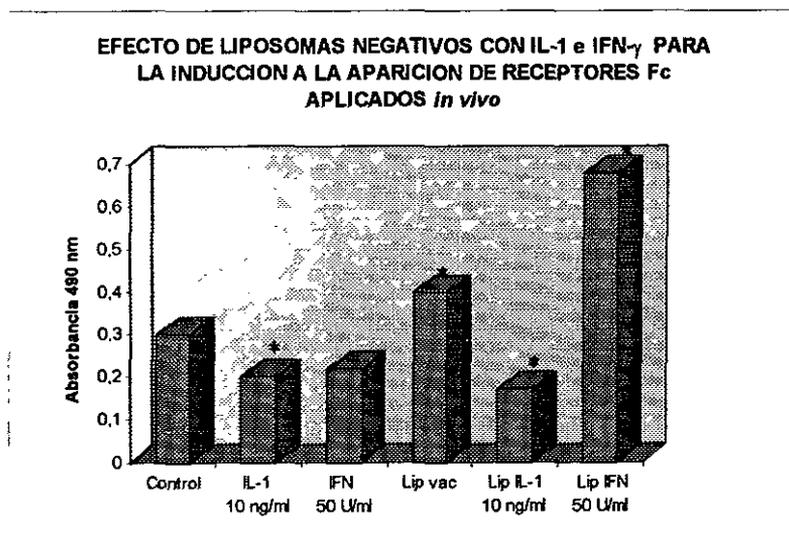
Después de haber determinado que no se presentaba algún efecto irritante con los liposomas vacíos *in vivo*, y liposomas neutros encapsulando IFN- $\gamma$ , se procedió a evaluar el efecto de liposomas negativos con IL-1 e IFN- $\gamma$  encapsuladas.

Se inyectaron grupos de cinco ratones CD1 con IL-1 (10 ng/ml), IFN- $\gamma$  (50 UI/ml), liposomas negativos vacíos, liposomas negativos con IL-1 10 ng/ml, liposomas negativos con 50 UI/ml de IFN- $\gamma$  y medio de cultivo como control. Después de 2 horas se procedió a sacrificar a los ratones y extraer los macrófagos de la cavidad peritoneal, se enriqueció la población y se procedió a su evaluación.

Los resultados obtenidos muestran que para la inducción a la aparición de receptores Fc, las citocinas libres y los liposomas con IL-1 no presentan un aumento comparados con el control, los liposomas vacíos presentan un ligero aumento, mientras que los liposomas con IFN- $\gamma$  producen un efecto considerable en la inducción a la aparición de receptores Fc (Gráfica 15).

Por otro lado, la evaluación de la secreción de óxido nítrico indicó que el uso de IL-1 $\beta$  libre o encapsulada no produjo respuesta alguna con respecto al control, mientras que los liposomas vacíos y con IFN- $\gamma$ , así como esta citocina libre indujeron un ligero aumento en esta liberación (Gráfica 16).

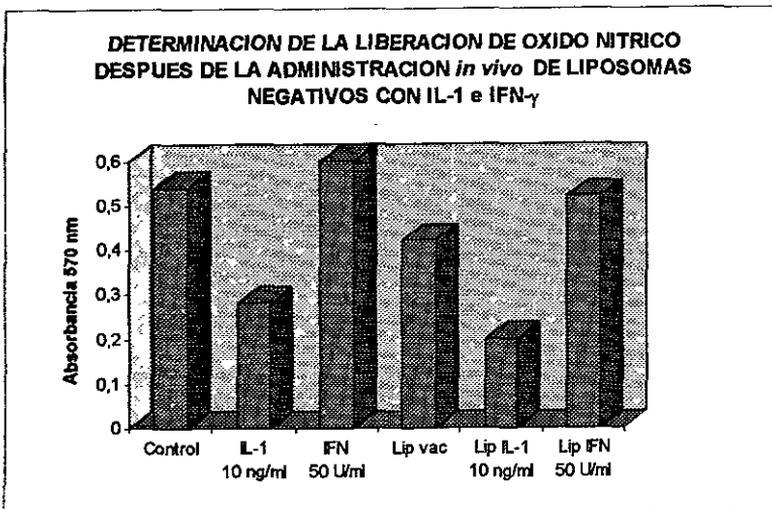
GRAFICA 15.



Se inyectaron grupos de ratones CD1 con IL-1 (10 ng/ml), IFN- $\gamma$  (50 UI/ml), liposomas negativos vacíos y liposomas negativos con IL-1 (10 ng/ml) o IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) y medio de cultivo como control por un período de dos horas. Transcurrido este tiempo se procedió a sacrificarlos y obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal. Finalmente se procedió a su evaluación.

\*Diferentes significativamente al control.

GRAFICA 16.



Se inyectaron grupos de ratones CD1 con IL-1 (10 ng/ml), IFN- $\gamma$  (50 UI/ml), liposomas negativos vacíos y liposomas negativos con IL-1 (10 ng/ml) o IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) y medio de cultivo como control por un período de dos horas. Transcurrido este tiempo se procedió a sacrificarlos y obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal. Posteriormente se procedió a su evaluación.

## DISCUSIÓN

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo (Flores F , 1991) se ha podido demostrar que citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$  e INF $\gamma$  son fuertes activadoras de los macrófagos *in vitro*, induciendo la aparición de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas; sin embargo, poco se sabe acerca del efecto causado por estas moléculas *in vivo*, debido a que al ser administradas en el torrente sanguíneo, pueden inactivarse o producir efectos adversos que pueden ir de leves a graves. En el presente trabajo se estableció como objetivo el encontrar las condiciones ideales para estimular a los macrófagos peritoneales *in vivo* con IL-1 $\beta$  e INF $\gamma$  utilizando liposomas como acarreadores y protectores.

Nuestros primeros resultados indican que 2 hrs de estimulación tanto con IL-1 $\beta$  como con INF- $\gamma$  son suficientes para producir un aumento en la aparición de receptores Fc, así como en la secreción de óxido nítrico, lo que indica que no es necesaria la permanencia de las citocinas durante todo el tiempo de cultivo necesario para la aparición de la respuesta. Por otro lado, es conocido que el suero aglutina a los liposomas, lo que les impide realizar sus funciones. Por lo anterior en el presente trabajo la estimulación siempre se llevo a cabo en ausencia de suero durante un tiempo de 2 hrs. En nuestros resultados el hecho de que la respuesta se vea disminuida tanto para la aparición de receptores Fc como para la liberación de óxido nítrico después de este tiempo, puede deberse a los efectos de la ausencia del suero ya que éste es un factor importante para la supervivencia de las células y para que se mantengan en buenas condiciones.

Es importante mencionar que resultados previos indican que el tiempo necesario para la expresión del receptor Fc en la membrana del macrófago es de 48 horas (Flores F., 1991); por otro lado, existen reportes de que la secreción de óxido nítrico comienza a darse entre 6 y 24 horas después de la exposición a inductores como INF- $\gamma$  y LPS y de que los productos estables de la descomposición de óxido nítrico (nitritos y nitratos) permanecen en

el medio de cultivo (Donnell C., 1991). Por lo anterior nuestros experimentos fueron evaluados dos días después del estímulo.

Se ha informado que el IFN- $\gamma$  se inactiva en pH ácido (Bach J., 1984) y presenta segmentos específicos caracterizados por la presencia de residuos de arginina y lisina que son esenciales para que esta citocina sea funcional (Zambrano S., 1993) y que le confieren carga positiva a la molécula. Por otro lado, se ha postulado que cada tipo celular tiene una combinación de lípidos y una carga eléctrica preferida, en el caso de los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón se ha determinado su preferencia por los liposomas con carga negativa. En el presente trabajo en los ensayos *in vitro* se obtuvo una buena respuesta con IFN- $\gamma$  acarreado en liposomas neutros, tanto para la aparición de receptores Fc como para la liberación de óxido nítrico; sin embargo, la administración del IFN- $\gamma$  en liposomas negativos produjo solo un incremento pequeño en la expresión de receptores Fc. Considerando las características del IFN $\gamma$  podría suceder que las cargas negativas de los lípidos ayudaran a su mejor encapsulación; sin embargo, estas cargas pudieran tener un efecto adicional en la conformación de la citocina que le impidiera ejercer su acción. Por otro lado, si los liposomas ejercen su acción mediante la liberación de la citocina en la membrana del macrófago, el IFN $\gamma$  al ser liberado podría ser activo nuevamente, explicando así el ligero efecto inductor presentado en la aparición de receptores Fc.

En otro orden de ideas, trabajos previos indican que al inyectar un agente extraño, tal como el caseinato de sodio, a la cavidad peritoneal la respuesta del organismo es la llegada de diferentes poblaciones celulares a su defensa, especialmente para los ratones CD-1, a las 16 horas después de la inyección se encuentra un pico máximo de granulocitos, tiempo después del cual empieza a bajar la población para dar paso a la llegada de macrófagos inducidos para la defensa, con un número máximo de estas células a los 4 días (Ríos R., 1984). Después de la inyección de liposomas vacíos a la cavidad peritoneal no se encontró diferencia en el número ni en el tipo de células inducidas, indicando con esto que los liposomas no ejercen un efecto irritante. Cabe mencionar que existe una ligera respuesta en la aparición de receptores Fc a las dos horas, la cual no puede ser inducida directamente

por este estímulo debido a que, como ya se menciona, son necesarias 48 horas para la expresión de la proteína en las membranas de los macrófagos; además se observa un aumento en la secreción de óxido nítrico similar a la de los controles que después de las 16 horas comienza a descender en ambos casos.

Sucede algo particular en el efecto de los liposomas neutros y negativos transportando IFN $\gamma$  *in vivo*, ya que se presenta un mayor efecto inductor de la aparición de receptores Fc con liposomas negativos en comparación a la inducida por los liposomas neutros; lo anterior es muy importante pues indica que las condiciones *in vivo* ofrecen resultados diferentes debido probablemente a que en el organismo completo intervienen diversos tipos celulares y reguladores metabólicos.

Por su parte la IL-1 $\beta$  es una citocina neutra sin embargo, la presencia de la arginina 127 es fundamental para su actividad biológica, pues una simple sustitución produce una reducción de hasta 100 veces dicha actividad sin perder su capacidad de enlace al receptor. Asimismo, estudios de cristalografía de rayos X indican que la presencia del ácido glutámico 212 es crítica para los efectos biológicos de esta citocina, debido a que la destrucción selectiva de los residuos de ácido glutámico produce una drástica pérdida de su actividad. Su mecanismo de acción puede ser tanto por medio de receptores, como por la unión directa de la IL-1 $\beta$  a la membrana del macrófago. Nuestros resultados muestran que únicamente la administración de la citocina en liposomas negativos tanto *in vivo* como *in vitro* produce una excelente respuesta en la aparición de receptores Fc y una moderada respuesta en la secreción de óxido nítrico, lo que puede implicar que la composición lipídica de éstos los hace más atractivos para los macrófagos; incluso los liposomas negativos vacíos presentan una ligera acción estimulante. Es importante mencionar que los liposomas neutros con IL-1 $\beta$  sólo pudieron prepararse con concentraciones 10 veces menores a las utilizadas normalmente, debido a que su coexistencia con este tipo de lípidos, no permite la formación del acarreador. El hecho de que los liposomas neutros con bajas concentraciones de IL-1 $\beta$  no fueran activos, puede deberse a la escasa cantidad de la citocina incluida en ellos. Por lo anterior, este tipo de liposomas no son un buen medio

para la encapsulación de la IL-1 $\beta$ , lo que nos lleva a concluir que el tipo de liposoma que se vaya a utilizar depende de la citocina y de las células a las que va dirigido.

Los macrófagos activados no sólo funcionan como fagocitos, sino también secretan específicamente una diversidad enorme de sustancias biológicamente activas en los tejidos circulantes, ejemplos de ellos son interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12), IFN- $\alpha$  y  $\beta$ , TGF- $\beta$  y óxido nítrico (Zambrano S., 1993). El óxido nítrico, como ya se mencionó, se considera como un mediador de la actividad del macrófago, esta actividad puede ser controlada o inhibida por varias moléculas, entre ellas IL-10 y TGF $\beta$  que son secretadas por ellos mismos. En nuestros resultados se puede observar que la liberación de óxido nítrico se ve disminuída en proporción al aumento de la aparición de receptores Fc, al utilizar ambas citocinas incluidas en liposomas negativos; lo cual puede interpretarse como una respuesta regulatoria a la actividad de citocinas inhibitorias en estas condiciones específicas.

Si consideramos que cada tejido y tipo celular tiene sus propias características, es lógico pensar que su respuesta al mismo estímulo será diferente; aunado a esto, en el presente trabajo, las características morfológicas y funcionales de las citocinas varían en presencia de diferentes combinaciones de lípidos y en el caso de los experimentos *in vivo* la presencia de una gran variedad de moderadores biológicos y otros tipos celulares hacen más complicada la elección del tipo de liposomas a utilizar.

Creemos que si bien es importante analizar las propiedades de las sustancias que se van a encapsular, debido a la complejidad del sistema, es más importante ensayar y encontrar las condiciones ideales para cada citocina, tipo celular y condiciones fisiológicas presentes, para poder inducir adecuadamente a las células y poder direccionar la respuesta inmune.

Por otro lado, al trabajar tanto *in vivo* como *in vitro* se espera encontrar diferencias, sin embargo, los modelos *in vitro* nos simplifican el trabajo para aproximarnos a las

condiciones ideales *in vivo* y nos indican cuales son los parámetros que debemos tomar en cuenta para ser controlados.

Con el presente trabajo, creemos que hemos establecido un buen modelo para la estimulación *in vivo* de macrófagos peritoneales y además hemos contribuido proporcionando información sobre la aplicación de los liposomas como sistemas acarreadores para direccionar una respuesta inmune.

## **CONCLUSIONES**

- Los liposomas son un buen modelo a utilizar para el acarreamiento de citocinas
- Es importante considerar las características de las sustancias a encapsular así como las propiedades de la célula blanco a las cuales va dirigido.
- Los liposomas negativos se pueden utilizar para el acarreamiento de IL-1 $\beta$  tanto *in vivo* como *in vitro*.
- Los liposomas neutros son buenos acarreadores de IFN- $\gamma$

## SUGERENCIAS

1. Realizar nuevamente los experimentos *in vivo* con ambos tipos de liposomas.
2. Al realizar los experimentos *in vitro* tratar de controlar más las condiciones del mismo, por ejemplo el pH del medio que sé este utilizando debido a que este es un factor muy importante que puede cambiar o modificar las condiciones de reacción o la forma de actuar de las células dependiendo de este.
3. Realizar pruebas de estabilidad de los liposomas como son tamaño del liposoma, concentración de citocina encapsulada, número de capas, temperatura de almacenamiento, reacciones de oxidación, la estabilidad del liposoma es una de las características más importantes que se deben de considerar ya que estos son muy inestables por lo tanto se deben de conocer muy bien las condiciones de trabajo para que estos puedan ejercer su función.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abbas K A., Lichtman H. A., Inmunología Celular y Molecular, 2ª ed , Ed Interamericana Mc Graw-Hill, México, D.F., 1995: 22-25.
2. Bach J. F., Inmunología, Ed. Limusa, México, 1984: 408,409
3. Barret J. T., Inmuloía Medica, Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, Mexico D.F., 1991 (2): 19-29.
4. Beckman J., Reactions and Diffusion of Nitric Oxide and Peroxynitrite, The Biochemist, 1994 (10): 8-10.
5. Bomford R., Henderson B., Interleukin-1, inflammation and disease, Ed. Elsevier, 1989: 31-35.
6. Carl R., Vladimir K., Gregory M., Magala R., Liposomes as Carriers of Peptide Antigens: Induction of Antibodies and Cytotoxic T Lymphocytes to Conjugated Peptides, Immunological Reviews, 1995 (15):145.
7. Cullis, P.R., Mayer, L.D., Bally M.B., Adv. Drug Deliv. Rev., Tecnology Liposomes 1989 (3): 267.
8. Davis, B. D, et al ., Tratado de Microbiología con inclusión de inmuloía y genética molecular , 3ª. ed., Ed ., Salvat Editores, México , 1990: 156-157 , 177-178 , 180 , 182 -184, 818 - 823.
9. Dinarello C., Interleukine-1 and Interleukine Antagonism, Blood, 1991 (8) 1627-1652.
10. Donnell C., Liew E., Immunological Aspects of Nitric Oxide, The Biochemist, 1994 (11): 19-22. .
11. Flores F., Inducción a la expresión de receptores Fc en macrófagos y granulocitos de ratón por interleucina-1 recombinante humana, Universidad Autónoma de México, Tesis para obtener el título de Biólogo, México, 1991: 33-35.
12. Floxwell B.M. J. Barret K. and M. Feldman, Cytokine Receptors: Structure and Signal Transduction Clin. Exp. Inmunol., 1992 (90): 161-169.
13. Gregory G., Overview of liposomes, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1991 (28): 39-48

- 14 Joseph A. B., *Inmunología*, 3ª ed., Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, México D F , 1991: 142, 143, 147,148.
15. Keller J., Cytokines of the lung, *J. Am. Rev. Rep. Dis.*, 1990 (141): 765-788.
16. Knowles R., *Nitric Oxide Synthases*, *The Biochemist*, 1994 (9): 3-6.
- 17 Lain F., Anthony D., Derrallynn H., Siamon G., Use of surface molecules and receptors for studying macrophages and mononuclear phagocytes, *Journal of Immunological Methods*, 1994 (7): 174, 95-102.
18. Lasic D., *Liposomes*, *Science & Medicine May/June*, 1996 (6): 34-43.
19. Male D., *cytokines and Cytokine Receptors*, 2 ed., Ed. Dirl Press at Oxford University Press, 1993: 21-25.
- 20 Michel J., Martinet N., Plenat F , In situ hybridization for localization of mRNAs in mononuclear phagocytes in cell culture and tissue sections, *Journal of Immunological Methods*, 1994: 174, 281-296.
21. Nico V., Annemarie S., Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications, *Journal of Immunological Methods*, 1994 (15): 174, 83-93.
- 22 Pieter J , Marella F., Jane S., Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies, *Journal of Immunological Methods*, 1994, 174 (5): 5-19.
23. Reynoso A., Rojas V., *Formulación de liposomas utilizando como nucleo Griseofulvina*, Universidad Nacional autonoma de México, Tesis para obtener el titulo de Químico Farmacéutico Biologo, México, D.F., Febrero 1997, 3, 18-21.
24. Ringden O., Meunier F., Tollemar J., Rico P., Tura S., Kuse E., Efficacy of amphotericin B encapsulated in liposomes in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1991(28) 73-82.
25. Rios R., *Aislamiento y Caracterización de subpoblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratón*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México D.F., 1984.
26. Roitt M. I., *Inmunología*, 2ª ed., Ed. Salcat Editores S.A., México, 1991: 5.1-5.4
27. Scragg A., *Biotecnología para Ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos* , Limusa Noriega Editores , México , 1996: 75, 99 , 400.

28. Stites , D , P. Inmunología Básica y Clínica ., 7a. ed., Ed. El manual moderno, México, 1993: 23-27, 101 -1110.
29. Valencia E., Los receptores Fc inducidos por Il-1 en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón son bloqueados por IgG, aumentan su afinidad mediante el tratamiento con Tripsina y son reconocidos por un anticuerpo contra inmunoglobulinas de ratón, Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis para obtener el título de Biólogo, México, 1993: 20-22.
30. Weinstein, J. N., Klausner R.D., Biochim. Biophys. Acta, 1981 (64): 270.
31. Weir D. M., Inmunología, 2ª ed., Ed. EL Manual Moderno, México, 1995: 122-125.
32. Zambrano S.A., Inmunología, Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, México, 1993: 138,139.

## ANEXO 1 ANALISIS ESTADISTICO

DETERMINACION DEL EFECTO DE LIPOSOMAS NEUTROS EN LA  
EVALUACION DE FORMACION DE ROSETAS *in vitro*

oneway do tra if carga==1 & eva==1, bonferroni

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.450806221	5	.090161244	2.96	0.0302
Within groups	.791681206	26	.030449277		
Total	1.24248743	31	.04008024		

Bartlett's test for equal variances:  $\chi^2(4) = 59.7296$  Prob> $\chi^2 = 0.000$

Note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:  
1 multiple-observation cells not used

		Comparison of do by trata (Bonferroni)				
Row Mean-	Col Mean	1	2	3	4	5
2		.291875				
		0.168				
3		.276875	-.015			
		0.232	1.000			
4		.235	-.056875	-.041875		
		0.183	1.000	1.000		
5		.085625	-.20625	-.19125	-.149375	
		1.000	1.000	1.000	1.000	
6		.285625	-.00625	.00875	.050625	.2
		0.192	1.000	1.000	1.000	1.000

Columnas

- (1) Control
- (2) IL-1 10 ng/ml
- (3) Lip IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml

Filas

- (2) IL-1 10 ng/ml
- (3) Lip IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN-g 50 UI/ml
- (6) Lip IFN- $\gamma$  50 UI/ml

**Criterio de aceptación.** El valor entre los valores observados de las evaluaciones realizadas debe de ser menor de 0.5 para ser considerado como diferente.

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION LIPOSOMAS NEUTROS *in vitro* EN LA DETERMINACION DE LA LIBERACION DE OXIDO NITRICO**

oneway do tra if carga=1 & eva=2, bonferroni

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.681183569	5	.136236714	9.22	0.0000
Within groups	.384009359	26	.014769591		
Total	1.06519293	31	.034361062		

Bartlett's test for equal variances:  $\chi^2(5) = 65.9284$  Prob> $\chi^2 = 0.000$

ESTA TESIS NO DEBE  
CALIR DE LA BIBLIOTECA

Comparison of do by trata  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5
2	-.16 0.616				
3	-.18 0.343	-.02 1.000			
4	-.023125 1.000	.136875 1.000	.156875 0.672		
5	.2525 0.033	.4125 0.001	.4325 0.000	.275625 0.015	
6	.22 0.098	.38 0.002	.4 0.001	.243125 0.046	-.0325 1.000

Columnas

- (1) Control
- (2) IL-1 10 ng/ml
- (3) Lip IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml

Filas

- (2) IL-1 10 ng/ml
- (3) Lip IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN-g 50 UI/ml
- (6) Lip IFN- $\gamma$  50 UI/ml

**Criterio de aceptación.** El valor entre los valores observados de las evaluaciones realizadas debe de ser menor de 0.5 para ser considerado como diferente

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION *in vitro* DE LIPOSOMAS NEGATIVOS EN LA DETERMINACION DE LA APARICION DE RECEPTORES Fc

oneway do tra if carga==2 & eva==1, bonferroni

Source	Analysis of Variance				
	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.386046843	5	.077209369	11.63	0.0000
Within groups	.172625009	26	.006639423		
Total	.558671853	31	.018021673		

Bartlett's test for equal variances:  $\chi^2(5) = 53.4914$  Prob> $\chi^2 = 0.000$

Comparison of do by trata  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5
2	.22375 0.002				
3	.26875 0.000	.045 1.000			
4	-.005 1.000	-.22875 0.002	-.27375 0.000		
5	.01875 1.000	-.205 0.022	-.25 0.003	.02375 1.000	
6	-.03375 1.000	-.2575 0.002	-.3025 0.000	-.02875 1.000	-.0525 1.000

Columnas

- (1) Control
- (2) IL-1 10 ng/ml
- (3) Lip IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml

Filas

- (2) IL-1 10 ng/ml
- (3) Lip IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN-g 50 UI/ml
- (6) Lip IFN- $\gamma$  50 UI/ml

**Criterio de aceptación.** El valor entre los valores observados de las evaluaciones realizadas debe de ser menor de 0.5 para ser considerado como diferente

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE *in vitro* DE LIPOSOMAS NEGATIVOS EN LA DETERMINACION DE LA LIBERACION DE OXIDO NITRICO**

oneway do tra if carga==2 & eva==2, bonferroni

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.753018018	5	.150603604	16.56	0.0000
Within groups	.236468757	26	.009094952		
Total	.989486774	31	.031918928		

Bartlett's test for equal variances:  $\chi^2(5) = 63.4963$  Prob> $\chi^2 = 0.000$

Comparison of do by trata (Bonferroni)					
Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5
2	-.125 0.628				
3	-.12625 0.600	-.00125 1.000			
4	.06625 1.000	.19125 0.045	.1925 0.043		
5	.37625 0.000	.50125 0.000	.5025 0.000	.31 0.000	
6	.17125 0.104	.29625 0.003	.2975 0.002	105 1.000	-.205 0.080

Columns

- (1) Control
- (2) IL-1 10 ng/ml
- (3) Lip IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml

Filas

- (2) IL-1 10 ng/ml
- (3) Lip IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN-g 50 UI/ml
- (6) Lip IFN- $\gamma$  50 UI/ml

**Criterio de aceptación.** El valor entre los valores observados de las evaluaciones realizadas debe de ser menor de 0.5 para ser considerado como diferente.

**EFECTO DE LA ADMINISTRACION *in vivo* DE LIPOSOMAS NEUTROS EN LA DETERMINACION DE LA APARICION DE RECEPTORES Fc**

oneway do tra if carga==1 & eva==1, bonferroni

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.362267203	3	.120755734	13638.32	0.0000
Within groups	.00010625	12	8.8541e-06		
Total	.362373453	15	.02415823		

Bartlett's test for equal variances:  $\chi^2(2) = 1.5904$  Prob> $\chi^2 = 0.451$

Note: Bartlett's test performed on cells with positive variance.

1 multiple-observation cells not used

Comparison of do by trata (Bonferroni)				
Row Mean- Col Mean	1	4	5	
4	.025 0.000			
5	.035 0.000	.01 0.003		
6	.36625 0.000	.34125 0.000	.33125 0.000	

Columnas

(1) Control

(4) Lip vac

(5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml

Filas

(4) Lip vac

(5) IFN-g 50 UI/ml

(6) Lip IFN- $\gamma$  50 UI/ml

**Criterio de aceptación.** El valor entre los valores observados de las evaluaciones realizadas debe de ser menor de 0.5 para ser considerado como diferente.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION *in vivo* DE LIPOSOMAS NEUTROS EN LA DETERMINACION DE LA LIBERACION DE OXIDO NITRICO

oneway do tra if carga==1 & eva==2, bonferroni

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.172668739	3	.057556246	3069.67	0.0000
Within groups	.000225	12	.00001875		
Total	.172893739	15	011526249		

Bartlett's test for equal variances: chi2(3) = 1.3081 Prob>chi2 = 0.727

Comparison of do by trata  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	4	5
4	-.2325 0.000		
5	.0375 0.000	.27 0.000	
6	-.0425 0.000	.19 0.000	-.08 0.000

Columnas

(1) Control

(4) Lip vac

(5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml

Filas

(4) Lip vac

(5) IFN-g 50 UI/ml

(6) Lip IFN- $\gamma$  50 UI/ml

**Criterio de aceptación.** El valor entre los valores observados de las evaluaciones realizadas debe de ser menor de 0.5 para ser considerado como diferente.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION *in vivo* DE LIPOSOMAS NEGATIVOS EN LA DETERMINACION DE LA APARICION DE RECEPTORES Fc

oneway do tra if carga==2 & eva==1, bonferroni

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.730367705	4	.182591926	943.21	0.0000
Within groups	.003678125	19	.000193586		
Total	.73404583	23	.031915036		

Bartlett's test for equal variances:  $\chi^2(4) = 19.5864$  Prob> $\chi^2 = 0.001$

Comparison of do by trata  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2	4	5
2	-.094375 0.000			
4	.12125 0.000	.215625 0.000		
5	-.05875 0.000	.035625 0.005	-.18 0.000	
6	.39875 0.000	.493125 0.000	.2775 0.000	.4575 0.000

Columnas

- (1) Control
- (2) IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml

Filas

- (2) IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN-g 50 UI/ml
- (6) Lip IFN- $\gamma$  50 UI/ml

**Criterio de aceptación.** El valor entre los valores observados de las evaluaciones realizadas debe de ser menor de 0.5 para ser considerado como diferente.

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION *in vivo* DE LIPOSOMAS NEGATIVOS EN LA DETERMINACION DE LA LIBERACION DE OXIDO NITRICO**

oneway do tra if carga==2 & eva==2, bonferroni

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	57403.4285	4	14350.8571	1.32	0.2979
Within groups	206302.904	19	10858.0476		
Total	263706.332	23	11465.4927		

Bartlett's test for equal variances:  $\chi^2(4) = 254.1305$  Prob> $\chi^2 = 0.000$

Comparison of do by trata (Bonferroni)					
Row Mean-					
Col Mean	1	2	4	5	
2	- .273125				
	1.000				
4	-.0975	.175625			
	1.000	1.000			
5	.05125	.324375	.14875		
	1.000	1.000	1.000		
6	131.11	131.383	131.207	131.059	
	0.912	0.535	0.910	0.913	

#### Columnas

- (1) Control
- (2) IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml

#### Filas

- (2) IL-1 10 ng/ml
- (4) Lip vac
- (5) IFN- $\gamma$  50 UI/ml
- (6) Lip IFN- $\gamma$  50 UI/ml

**Criterio de aceptación.** El valor entre los valores observados de las evaluaciones realizadas debe de ser menor de 0.5 para ser considerado como diferente.