

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"**

EVALUACIÓN "in vivo" DEL USO DE LIPOSOMAS COMO ACARREADORES DE LAS CITOCINAS IL-1 beta E INF gamma DIRIGIDA A MACRÓFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES SINGÉNICOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

DORA AMOR QUINTANA ZALDÍVAR

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA TERESA CORONA ORTEGA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, DIRIGIDO POR EL DR. BENNY WEISS STEIDER Y EN EL LABORATORIO DE BIOMEMBRANAS DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, DIRIGIDO POR LA DRA. ISABEL BAEZA RAMÍREZ.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES

Gracias por todo el amor que he recibido, es el motor de mi vida. Papá, donde quiera que estés

A MIS PADRINOS OCTAVIO Y MARY

Sin su apoyo y confianza en mi no habría sido posible mi carrera universitaria

A MIS TIOS LALO Y JUDY

Con todo mi amor y admiración

A MIS HERMANOS

Compañeros de viaje en la aventura de la vida

A DRA TERESA CORONA

Por su gran paciencia, apoyo y consejo en momentos difíciles

A LALO

Por todo tu apoyo, amistad y compañía.

INDICE

1. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
1.1 CITOCINAS	5
1.2 MACRÓFAGOS	9
1.3 RECEPTORES DE SUPERFICIE PRESENTES EN MACRÓFAGOS.....	12
1.4 LIPOSOMAS.....	13
1.5 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE O-DIFENILDITILENDIAMINA (OPD)..	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	19
5. METODOLOGÍA.....	20
5.1 MATERIALES Y REACTIVOS.....	21
5.2 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE POBLACIONES ENRIQUECIDAS DE MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL.....	22
5.3 DETERMINACIÓN DE LA APARICION DE RECEPTORES Fc MEDIANTE LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA CON o-FENILENDIAMINOCOLORURO.....	22
5.4 METODOLOGÍA DE ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA OPD.....	23
5.5 FORMACIÓN DE LIPOSOMAS	24
5.6 EFECTO <i>in vivo</i> DE LA ESTIMULACIÓN CON CITOCINAS ENCAPSULADAS CON LIPOSOMAS	24
5.7 DETERMINACION DE ARN DE LOS DIFERENTES RECEPTORES POR REACCION EN POLICADENA CON RETROTRANSCRIPTASA	25
5.8 DISEÑO ESTADÍSTICO	25
6. DIAGRAMA DE FLUJO.....	26
7. RESULTADOS.....	27

7.1 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE o-FENILENDIAMINDICLORURO PARA LA DETERMINACIÓN DE RECEPTORES Fc EN MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES CD-1.....	28
7.2 DETERMINACIÓN DE LA APARICION DE Fc→R in vitro EN MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES SINGENICOS CON INF→ E IL-↔ ENCAPSULADAS EN LIPOSOMAS	31
7.3 DETERMINACIÓN DE LA CARGA OPTIMA DE LIPOSOMAS CONTENIENDO CITOCINAS PARA INDUCIR LA APARICION DE RECEPTORES Fc→ EN MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES SINGÉNICOS	32
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
9. CONCLUSIONES.....	44
10. BIBLIOGRAFIA.....	45

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 CITOCINAS

Las fases efectoras tanto de la inmunidad natural como de la adquirida están mediadas, en gran parte, por hormonas protéicas llamadas citocinas, que son un grupo diverso de proteínas intracelulares de señalización que regulan no sólo las respuestas inmunitarias e inflamatorias locales y sistémicas, sino también la reparación de heridas, la hematopoyesis y muchos otros procesos biológicos. En la inmunidad humoral, las citocinas efectoras son producidas en gran parte por los fagocitos mononucleares y, por esta razón, se les denomina monocinas, mientras que en la inmunidad adquirida las citocinas son producidas principalmente por linfocitos T activados y a tales moléculas se les conoce como linfocinas.”

Las citocinas son compuestos muy potentes, que actúan en concentraciones de 10^{-10} a 10^{-15} M, fijándose a superficies receptoras específicas en las células blanco. A diferencia de las hormonas endócrinas, no son producidas por glándulas especializadas, sino por diversos tejidos y células individuales en respuesta a estímulos específicos y originan un conjunto característico de efectos en el crecimiento, la movilidad, la diferenciación o la función de sus células blanco.²

La primera descripción de un factor que regula la proliferación y diferenciación de células mieloides, fue hecha en 1906 por Carnot y Deflandre³ en Francia. Ellos encontraron a la eritropoyetina (Epo) como el factor responsable de la formación de células rojas o eritroides.

Los primeros estudios sobre citocinas realizados desde 1950 a 1970, describían los numerosos factores protéicos producidos por diferentes células que mediaban funciones específicas en bioanálisis particulares. En esta fase, se descubrieron interferones antivirales, pirógenos y factores activadores de macrófagos. Mas tarde, en la década de los 70's, se purificaron y caracterizaron un gran número de citocinas individuales, así como la producción de antisueros específicos neutralizantes. Durante la década de los 80's, se logró la clonación y expresión molecular de citocinas individuales y la producción de anticuerpos neutralizantes completamente específicos que permitieron su identificación definitiva.”

INTERLEUCINA 1 (IL-1)

Se le llama Interleucina 1 (IL-1), a dos polipéptidos relacionados pero distintos entre sí, IL-1 α e IL-1 β que se unen al mismo receptor y tienen propiedades biológicas idénticas. El término IL-1 se introdujo en 1979⁴ para describir un producto de macrófagos que estimulaba a las células T y B, pero que también tenía propiedades no-inmunológicas. En contraste, el término interleucina 2 (IL-2) se refiere al producto de los linfocitos con propiedades de estimulación de células T.⁵

Durante varios años se ha estudiado a los productos de macrófagos con actividad de IL-1 bajo diferentes nombres. En 1953 se describió un material pirogénico proveniente de

leucocitos activados⁶ al que se llamó pirógeno endógeno. Subsecuentemente, esta sustancia fue caracterizada y demostró tener una masa molecular de 14-17 kDa⁷. Al mismo tiempo, se descubrieron dos formas diferentes de pirógeno endógeno de monocitos humanos: una con un punto isoeléctrico (pI) de 5 y otra de 7⁸. Más tarde, el pirógeno endógeno fue co-purificado con una sustancia llamada mediador leucocítico endógeno, que induce la síntesis proteica hepática de fase aguda, disminuye los niveles plasmáticos de hierro y zinc, induce la neutrofilia y no puede separarse del pirógeno endógeno^{9,10}. En 1972 se describió una molécula producida por macrófagos peritoneales de ratón, que aumentaba la proliferación de timocitos en respuesta a dosis subóptimas de mitógenos como la concavalina A y la fitohemaglutinina, a esta molécula se le denominó factor activador de linfocitos (LAF, del inglés lymphocyte-activating factor)

Las dos formas diferentes de IL-1 ya han sido clonadas, la primera clonación de IL-1 β se realizó en monocitos sanguíneos humanos estimulados¹¹ y la de IL-1 α en una línea celular de macrófagos¹². Los genes para IL-1 α y IL-1 β también han sido secuenciados y localizados en el cromosoma 2. Cada gen contiene siete exones, pero muestran una homología de tan solo el 45% en su secuencia de ácidos nucleicos. Ambas proteínas se sintetizan con precursores de 31 kDa (271 aminoácidos para la IL-1 α humana y 269 para la IL-1 β). Las formas maduras de 17 kDa consisten de los aminoácidos 113-271 para la IL-1 α y de 117-269 para la IL-1 β .

Los estudios basados en el ensayo de timocitos se han complicado por el hecho de que las diferentes formas de IL-1, con diferentes pesos moleculares, no son equivalentemente activas: El precursor para IL-1 α es biológicamente activo, mientras que el precursor de IL-1 β no lo es¹⁵. De cualquier manera, estudios realizados usando péptidos intrínsecamente marcados a partir de RNAm sintético codificado para varias secuencias de IL-1 han revelado que el precursor para IL-1 α es biológicamente activo en células T (aunque tiene una actividad específica menor que la de la forma madura) y se une al receptor de IL-1¹⁶. Los estudios realizados empleando determinaciones específicas tanto de IL-1 α como de β por inmunoprecipitación, western blotting y radioinmunoensayo, han evidenciado que en células mononucleares humanas, la IL-1 α permanece principalmente asociada en la célula en su forma precursora, mientras que IL-1 β se libera al sobrenadante tanto en su forma precursora como en su forma madura de 17 kDa. Estos resultados pueden indicar que la IL-1 α juega un rol de unión membranal en el impulso de una respuesta inmune como, por ejemplo, la estimulación de linfocitos por interacciones directas célula-célula, mientras que IL-1 β actúa principalmente mediante efectos sistémicos luego de ser liberada de la célula e introducida en la circulación.

Existe sólo un 26% de homología en la secuencia de aminoácidos de los precursores de ambas IL-1 y un 30% entre las formas maduras de 17 kDa, aunque sus efectos biológicos son casi idénticos, mas aún, IL-1 α e IL-1 β se unen al mismo receptor en todas las células estudiadas hasta ahora¹⁷. Existen solo cinco regiones (llamadas A-E) en las que existen aminoácidos homólogos en ambas IL-1; estas regiones pueden identificar los sitios activos de estas moléculas. Específicamente, las regiones homólogas C (aminoácidos 150-162) y D (aminoácidos 165-186) pueden contener los mínimos sitios de reconocimiento. De hecho, un fragmento sintético de nueve residuos (163-171) induce la proliferación de timocitos y la producción de IL-2 por parte de las células del bazo¹⁸.

Actividad biológica de IL-1.

La IL-1 estimula el sistema inmune **directamente**, mediante la activación de los linfocitos, e indirectamente induciendo sustancias que a su vez los estimulan. En fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y linfocitos, la IL-1 estimula la producción de Interferones y factores hematopoyéticos estimulantes de colonias (CSFs; del inglés colony stimulating factors), así como factores de crecimiento y diferenciación de células T y B. En presencia de IL-1, aumenta la proliferación de células T y B en respuesta a factores de crecimiento, así como su diferenciación, producción de anticuerpos y la unión de las células asesinas naturales a sus células blanco⁵.

CUADRO 1

Actividades biológicas de IL-1
Cofactor en la activación de células B
Cofactor en la activación de células T
Promotor de la hematopoyesis
Regulador de la fiebre
Activador de neutrófilos
Activador de células vasculares del endotelio
Inductor de la liberación de proteínas de fase aguda
Inductor de proteólisis de células musculares
Inductor de síntesis de otras citocinas
Mitogénico para los fibroblastos

D.Male (1993) en Cytokines and cytokine receptors 2^a, (A.S. Hamblin editor). 2:23, IRL Press

INTERFERONES.

Los interferones (INF) son una familia de proteínas con la capacidad de ejercer distintos efectos sobre las funciones de las células. Su propiedad más importante, y la primera por la que fueron reconocidos¹⁹, es su capacidad de brindar a las células resistencia al crecimiento viral; en este sentido, los interferones constituyen el principal mecanismo de defensa de los vertebrados. Los interferones constituyen una familia grande de proteínas secretoras que tienen en común no sólo su actividad antiviral, sino también la propiedad de inhibir la proliferación de células de vertebrados y de modular respuestas inmunitarias²⁰.

Los interferones no ejercen sus efectos antivirales actuando en partículas de virus, sino que inducen un estado antiviral dentro de la célula huésped, lo que la hace inhóspita para la replicación viral. Aunque puede clasificarse a los interferones según su secuencia de aminoácidos, célula de origen, estímulo para la inducción u otros criterios, los interferones se han separado en dos tipos:

INF de tipo I, que comprenden las formas \Rightarrow y \Leftarrow de estas moléculas.

INF de tipo II, o interferón inmune, que es la forma →.

El INF→ comparte la propiedad antiviral de los demás interferones pero se diferencia entre otros aspectos significativos, en ser una molécula inmunorreguladora².

INTERFERON GAMMA (INF→^γ←).

El INF→ es un homodímero de polipéptidos con peso molecular de 18 kDa que puede glucosilarse en diversos grados, contiene subunidades de aproximadamente 21 a 24 kDa. Se origina a partir de un gen simple y no muestra semejanza apreciable con otros interferones. De igual modo, el receptor al cual se fija no está relacionado con el receptor para interferon de tipo I. Aunque el INF→ tiene cierta actividad antiviral (que condujo a su descubrimiento y al origen de su nombre) es mucho menos activo con respecto a los interferones de tipo I².

El INF→ es una linfocina que es secretada por casi todas las células T *CD8, por algunas T CD4 (particularmente las del subgrupo TH1, células T cooperadoras, TH, del inglés, helper T cells) y, en menor grado, por las células asesinas naturales. Cada uno de esos tipos celulares secreta INF→ sólo cuando está activado, como parte de una respuesta inmunitaria².

Casi todos los tipos celulares expresan receptores de INF→ y responden a esta citocina aumentando la expresión superficial de proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés: Major Histocompatibility Complex) clase I. Como resultado, casi toda célula en la vecindad de un linfocito que secreta INF→ se vuelve más eficaz en la presentación de antígenos endógenos y por tanto, constituye un mejor blanco para la muerte citotóxica si aloja un patógeno intracelular. A diferencia de los interferones tipo I, el INF→ también aumenta la expresión de proteínas de MHC clase II; de tal modo promueve también la presentación de antígeno a los linfocitos T CD4. También induce la expresión *de novo* de proteínas de MHC clase II en células endoteliales regulares y en algunas otras células epiteliales y del tejido conjuntivo, que no las expresan de otra manera, reclutando así tales tipos celulares para funcionar como células presentadoras de antígeno (APC, del inglés Antigen Presenting Cells) en sitios de actividad inmunitaria intensa².

El INF→ también es el activador de macrófagos más potente que se conoce. La exposición a INF→ aumenta considerablemente la actividad microbicida (y en grado menor, citotóxica) de los macrófagos, y los induce a secretar monocinas como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF alfa (citocina factor de necrosis tumoral, TNF, del inglés tumor necrosis factor). También activa neutrófilos, células asesinas naturales y células endoteliales vasculares. En presencia de INF→, las células endoteliales se vuelven más adhesivas para neutrófilos y pueden diferenciarse para formar vénulas altamente endoteliales, que atraen linfocitos de la circulación.

* La notación CD se emplea para reconocer y clasificar a los linfocitos. De acuerdo con este sistema, a un antígeno de superficie que identifica a una estirpe o un estadio de diferenciación en particular, que tiene una estructura definida, y que es reconocida por un grupo (en inglés, *cluster*) de anticuerpos monoclonales, se le denomina grupo de diferenciación (CD, del inglés, *cluster of differentiation*) (Abbas, 1995)

Aunque el INF \rightarrow tiende a promover la diferenciación de células B y de células T CD8 a células efectoras inmunitariamente activas, no favorece la proliferación de linfocitos y, de hecho, puede suprimirla en cierto grado. El INF \rightarrow aumenta la actividad de las células TH1 y, por tal razón aumenta la inmunidad mediada por células; sin embargo, inhibe la proliferación de células TH2 y de tal modo, tiende a suprimir la inmunidad humoral. No sólo disminuye la producción de IL-4 por las células TH2, sino también inhibe en gran medida los efectos de IL-4 sobre las células B, en particular al detener la producción de inmunoglobulina E.

1.2 MACRÓFAGOS.

Las estrategias de defensa más complejas y dinámicas del cuerpo son aquellas realizadas por células especializadas que se desplazan a través de este para buscar y destruir microorganismos y otras sustancias extrañas. En los seres humanos, hay tres grupos principales de células que proporcionan este tipo de defensa: Los linfocitos, los neutrófilos y la serie de monocitos-macrófagos; las dos últimas son células fagocíticas, que actúan principalmente englobando y digiriendo bacterias, desechos celulares y otras partículas de materia²¹

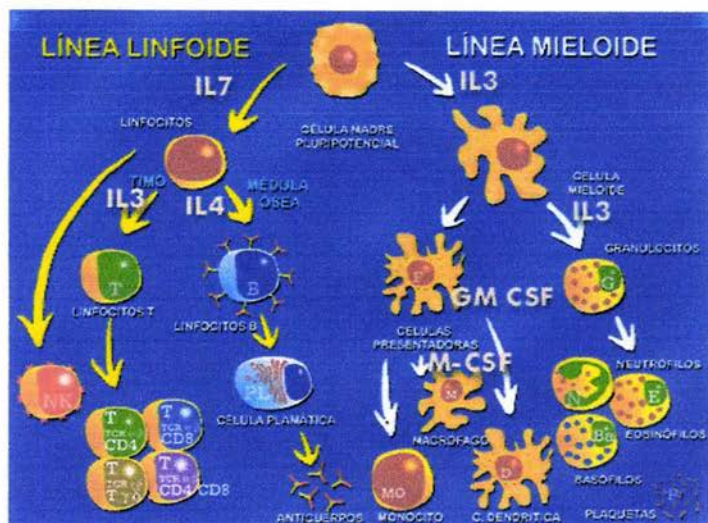
Los neutrófilos, monocitos y linfocitos, al igual que todas las demás células sanguíneas, se originan a partir de una célula madre precursora por medio de un proceso denominado hematopoyesis. La actividad hematopoyética se inicia en el mesénquima que rodea al saco vitelino durante la embriogénesis temprana, pero pronto se desplaza al hígado y bazo fetales, que actúan como los principales sitios de la hematopoyesis hasta el 4º o 5º mes de gestación; de ahí en adelante, el proceso se deriva cada vez más a la médula ósea, donde continúa el resto de la vida²²

Las características físicas de las células madre hematopoyéticas no se conocen aún por completo, se piensa que constituyen casi 0.01 % de todas las células de la médula ósea, y se definen por su capacidad de autorregeneración, así como su capacidad de dar origen a descendientes diferenciados de todos los tipos de eritrocitos y leucocitos. En general, las células individuales pueden convertirse de manera irreversible en cualquiera de las tres vías principales de diferenciación que producen eritrocitos, linfocitos o células mieloides. Tanto los neutrófilos como los monocitos son producto de la línea celular mielóide, como también los megacariocitos (las células que producen plaquetas)²¹

El crecimiento y maduración de las células dentro de cada línea celular están controlados de manera precisa por factores hormonales que existen en el microambiente de la médula ósea. Algunos de estos factores reguladores más importantes pertenecen a dos familias distintas de hormonas polipeptídicas conocidas como interleucinas y factores estimulantes de colonias. La diferenciación mielóide depende principalmente de dos de estos factores, conocidos como Interleucina-3 (IL-3) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, del inglés, granulocyte monocyte colony stimulating factor), los cuales aumentan la producción y maduración de todos los tipos de células mieloides. En las etapas tardías de la vía mielóide, actúan otros dos estimuladores de colonias denominados: factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), y factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), que favorecen el

crecimiento selectivo de granulocitos o monocitos, respectivamente. Los contactos directos de célula a célula con elementos del estroma de la médula ósea, componentes de la matriz extracelular y otras células hematopoyéticas, también desempeñan una función crítica, aunque aún no bien explicada, en la regulación de la hematopoyesis²³ (Ver figura 1).

FIGURA 1



Representación esquemática del proceso de hematopoyesis donde pueden observarse las vías de diferenciación de la célula madre pluripotencial para la formación de linfocitos y de monocitos. (www.revista-anaporc.com).

Los monocitos son células relativamente grandes (12 a 20 μm de diámetro), con núcleos arrionados, cromatina nuclear laxa, y citoplasma abundante con un contenido abundante de organelos necesarios para la síntesis de proteínas secretoras y de membrana así como lisosomas citoplásmicos. Los monocitos no son muy abundantes en la circulación periférica, donde representan de 1 a 6% de todas las células sanguíneas nucleadas; más tarde, se establecen en un sitio de residencia permanente donde se denominan macrófagos tisulares o histiocitos²¹.

El sistema fagocítico mononuclear es una línea celular simple que incluye a todos los fagocitos asociados con los tejidos que derivan de monocitos circulantes, independientemente de su ubicación o aspecto (Cuadro 2).

Cuadro 2

Células de la línea celular de monocitos-macrófagos.

Tejido	Designación del tipo celular
Sangre	Monocitos
Piel	Monocitos y precursores de monocitos (monoblastos, promonocitos)
Cualquier tejido sólido	Macrófagos residentes (histiocitos)
Páncreas	Células de Langerhans
Hígado	Células de Kupffer
Pulmón	Macrófagos alveolares
Huesos	Osteoclastos
Membrana sinovial	Células sinoviales tipo A
Sistema nervioso central	Microglia
Cavidad pleural	Macrófagos pleurales
Cavidad peritoneal	Macrófagos peritoneales
Granuloma	Células epitelioides, células gigantes multinucleadas.
Exudado inflamatorio crónico	Macrófagos del exudado

Un macrófago tisular vive alrededor de 2 a 4 meses. Durante este tiempo, algunos macrófagos permanecen inmóviles, mientras que otros se desplazan incesantemente por movimiento ameboide.

En cualquiera de los dos casos, la célula muestrea continuamente su ambiente circundante por pinocitosis, y a través de un extenso conjunto de receptores sobre su superficie. Siempre que encuentra ciertos estímulos, el macrófago sufre un proceso conocido como activación, en el cual aumenta rápidamente su metabolismo basal, motilidad y actividad fagocítica. La gama de estímulos que puede activar a los macrófagos es muy grande: Contacto directo con ciertos microorganismos o partículas inertes, con endotoxinas derivadas de bacterias o productos de desdoblamiento de tejidos del huésped, o componentes proteínicos de los sistemas del complemento o de coagulación de la sangre, que pueden conducir a la activación. La activación también puede aumentar con ciertas hormonas polipeptídicas (notablemente con una: el interferón gamma -IFN \rightarrow - que puede ser secretado por linfocitos vecinos).

Los macrófagos activados no sólo funcionan como fagocitos, sino también secretan específicamente una variedad de sustancias biológicamente activas a los tejidos circundantes. A diferencia de los neutrófilos, los macrófagos tienen la capacidad de controlar las acciones de los linfocitos, que constituyen una población más abundante y versátil de células defensoras. Los macrófagos afectan las respuestas linfocíticas en cuando menos dos formas principales: en primer lugar, los macrófagos secretan péptidos inmunorreguladores potentes, como el factor de necrosis tumoral y la IL-1, que

controlan la proliferación, diferenciación y función efectora del linfocito; en segundo lugar, los macrófagos activados se encuentran entre los tipos más importantes de células presentadoras de antígeno. Mediante estos dos tipos de interacciones reguladoras con los linfocitos, los macrófagos desempeñan una función fundamental en el inicio y coordinación de casi todos los tipos de respuestas inmunitarias.

1.3 RECEPTORES DE SUPERFICIE PRESENTES EN MACRÓFAGOS

Los receptores más importantes en la superficie de los macrófagos son los receptores a la porción Fc de las inmunoglobulinas, ya que son necesarios para una gran parte de sus funciones y son los principales marcadores de la madurez de estas células.

Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas tipo G (Fc→Rs) son ejemplos de moléculas con dominios conservados con secuencias divergentes para incrementar sus funciones. Comparten características comunes, todos tienen una secuencia líder en dos exones, las diferencias se dan en los genes para los dominios intracelulares y transmembranales²⁴⁻²⁶. Los dominios extracelulares de los receptores Fc presentan homología con los dominios Cg2 de las inmunoglobulinas, aunque su plegamiento puede no ser como el de una típica IgG^{24, 27, 28}

Existen tres tipos principales de Fc→R:

1) El Fc→RI de humano y de ratón, que se caracteriza por su alta afinidad por la IgG monomérica, la molécula humana pesa 70 kDa y la de ratón 67 kDa^{29, 30}. El Fc→RI humano está muy glucosilado, si se le retiran los azúcares su peso se reduce a unos 55 kDa, se encuentra presente en macrófagos, monocitos y neutrófilos tratados con INF→⁺. Este receptor participa en la liberación del anión superóxido, en la fagocitosis, en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y en la secreción de IL-6 y TNF→_α

La expresión del Fc→RI se ve incrementada por INF→ y lipoproteínas de baja densidad (LDLs). La IL-6 incrementa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en la que participan los Fc→RI sin aumentar el número de receptores presentes, mientras que la IL-4 los disminuye. Los glucocorticoides inhiben el aumento de los receptores mediado por INF→ en PMN (granulocitos polimorfonucleares³⁰; También la IL-1↵, la IL-2, el TNF→ y el TNF→ son inductores de su aparición, especialmente si se combinan con PMA (formol,miristol-acetato, del inglés phorbol,myristol acetate)³¹

2) El Fc→RII humano y el Fc→RIIb de ratón (caracterizados por su amplia distribución), se encuentran en casi todas las células sanguíneas, son glicoproteínas con peso de 40 kDa tanto en ratón como en humano. Este receptor es capaz de enlazar complejos inmunes, se le ha denominado antígeno de diferenciación CDW32. Existen varios anticuerpos contra este receptor en humano y se ha reportado sólo uno contra este tipo de receptor en ratón³². Se sabe que los medios condicionados por linfocitos en presencia de fitohemaglutinina incrementan los Fc→RII.

3) El Fc→RIII transmembranal de humano y Fc→RIIIa de ratón, caracterizados por ser los más numerosos.

En general, los tres tipos de receptores participan de forma diferencial en algunas enfermedades; por ejemplo, el Fc→RII soluble se correlaciona con mayor riesgo a contraer infecciones en pacientes neutropénicos y se ha asociado a enfermedades renales en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Por su parte, el receptor de tipo III está relacionado con la liberación de superóxidos que contribuyen al daño celular como secuela postinflamatoria³³.

Para la determinación de estos receptores se han desarrollado algunos métodos. Uno de ellos consiste en la formación de rosetas; esto es, un macrófago rodeado por una célula indicadora adecuada. Los macrófagos forman rosetas al fijarse en sus Fc→R eritrocitos de camero que han sido revestidos de anticuerpos antiertrocitos.

1.4 LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas microscópicas formadas por una o varias bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos, las cuales delimitan uno o varios compartimentos acuosos en el interior, su tamaño varía de 0.02 μ m hasta 10 μ m de diámetro³⁴.

La bicapa lipídica es la asociación molecular que adoptan los lípidos anfipáticos que tienen una forma molecular cilíndrica, como la fosfatidilcolina, en los cuales el diámetro de la región polar es muy similar al de las cadenas hidrocarbonadas. Como los extremos de la bicapa lipídica quedarían expuestos a un ambiente acuoso, la bicapa se cierra y forma una vesícula llamada liposoma. Esta asociación molecular es la estructura básica de todas las membranas biológicas³⁵.

Debido a su capacidad para atrapar moléculas biológicamente activas en su interior acuoso o en su bicapa lipídica, se han utilizado como acarreadores muy eficientes de un gran número de sustancias, modificando el perfil farmacológico del fármaco, lo que resulta en un aumento de su tiempo de vida media en la circulación. En el caso de algunas sustancias, se obtiene un aumento en su eficacia terapéutica y/o una drástica reducción de su toxicidad o efectos colaterales. Una aplicación muy importante de los liposomas es la posibilidad del tratamiento de algunos tipos de cáncer, debido a que el transporte liposomal de agentes citotóxicos a tejidos malignos evita las reacciones indeseables de tales fármacos a tejidos normales³⁶.

La barrera principal de los liposomas u otros sistemas de acarreo de fármacos para llegar hacia algunas células blanco distintas del hígado, bazo o páncreas, es el sistema fagocítico mononuclear, el cual remueve por fagocitosis todo el material extraño, incluyendo a los liposomas, con un tiempo de vida media del orden de minutos, por esta razón se han empleado los liposomas estéricamente estabilizados, que son aquellos a los que se les han añadido moléculas de polietilenglicol al fosfolípido, con la finalidad de que los liposomas tengan una mayor circulación en el torrente sanguíneo sin ser fagocitados,³⁷

La inclusión de cargas aumenta notablemente el volumen acuoso atrapado dentro de los liposomas, debido a la repulsión electrostática entre las bicapas adyacentes, la carga también afecta la interacción de los liposomas con las células³⁸.

Según el número de bicapas que poseen, los liposomas pueden clasificarse en vesículas unilamelares (ULV, del inglés unilamellar vesicles) que pueden ser pequeñas (SUV, del inglés small unilamellar vesicles) de 25 a 50 μm o grandes (LUV, del inglés large unilamellar vesicles) de entre 160 y 900 nm. y vesículas multilamelares (MLV, del inglés multilamellar vesicles) de aproximadamente 1 a 10 μm de diámetro³⁹.

Generalmente se utilizan LUV de 0.2 a 0.5 μm de diámetro, porque son muy estables e interactúan mejor con las células, formadas con lípidos anfipáticos que normalmente conforman las membranas celulares; además, al aplicar los liposomas en animales, se pueden dirigir hacia un grupo específico de células, uniendo en su superficie anticuerpos, proteínas virales, glucolípidos o lecitinas.

Generalmente los liposomas multilamelares se forman por agitación mecánica de una película muy fina de lípidos a los que se adiciona la solución acuosa con las moléculas que se van a encapsular³⁴; estas moléculas quedan atrapadas en los espacios acuosos, si son polares, o se insertan en la bicapa lipídica si son hidrofóbicas.

Las SUV se forman al someter a ultravibración una preparación de MLV³⁷, con lo cual se produce una población homogénea de liposomas pequeños (25-50 nm). El material que se desea encapsular se adiciona a la suspensión de MLV y como la sonicación rompe los liposomas grandes, el material externo puede ser atrapado al formarse los nuevos liposomas.

Las LUV se emplean principalmente para encapsular macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, los métodos más usados para formarlos son: quelación de Ca^{++} con EDTA de una suspensión acuosa de lípidos⁴⁰, inyección de lípidos disueltos en éter a una solución acuosa caliente⁴¹ y por evaporación en fase inversa⁴². Con este último método se forman liposomas de 0.1 a 1 μm de diámetro que pueden ser unilamelares o multilamelares.

1.5 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE O-DIFENILDITILENDIAMINA (OPD)

El método de O-difenildietilendiamina (OPD) permite obtener información acerca de la cantidad de rosetas formadas por la opsonización de eritrocitos con inmunoglobulina gamma (IGg) mediante una reacción peróxido peroxidasa que se produce al adherirse estos últimos a los receptores Fc presentes en macrófagos y otras células.

Con el fin de determinar si el método OPD es adecuado para fines de la evaluación comparativa de la cantidad de receptores Fc expresados en los experimentos

que se llevan a cabo en el presente trabajo, se realizó la estandarización de esta técnica usando algunos criterios de validación.

La validación se define como el proceso por el cual, mediante pruebas de laboratorio, se establece que la capacidad de un método satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas. La validación es importante para la interpretación de los resultados y cada técnica analítica tiene sus características las cuales varían según el objetivo de estudio⁴³.

Para la validación de un método analítico es necesario conocer perfectamente lo que se desea medir o cuantificar y conocer la exactitud requerida, así como la disponibilidad de los recursos en la aplicación del método seleccionado⁴³.

La validación evita los errores sistemáticos del método, estos errores se dan por causa de muchas fuentes. Según Wilson se clasifican en cuatro categorías: a) Sistema/calibración, b) interferencia directa, c) constantes y d) proporcionales.

El proceso de validación incluye la evaluación de parámetros estadísticos como son: precisión, exactitud, linealidad como medida del comportamiento del método⁴³.

En cuanto a métodos bioanalíticos, existen criterios para validación establecidos por la Food and Drug Administration (FDA), en los que se consideran los requisitos que debe cumplir un método para cuantificar analitos en matrices biológicas tales como sangre, orina, plasma o suero. Están incluidos también otros métodos bioanalíticos tales como procedimientos microbiológicos e inmunológicos o en otras matrices biológicas tales como fragmentos de tejidos epiteliales.

Cabe mencionar que es de suma importancia contar con un método analítico sensible y selectivo para la conducción de estudios preclínicos y/o farmacológicos. Los parámetros fundamentales para esta validación incluyen (1) exactitud, (2) precisión, (3) selectividad, (4) sensibilidad, (5) reproducibilidad y (6) estabilidad.

Exactitud

La exactitud de un método analítico se refiere a la concordancia entre los resultados del método con respecto a un valor considerado como cierto. La exactitud es determinada con varias réplicas de muestras analíticas con cantidades conocidas del analito.

Precisión.

La precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea, bajo las mismas condiciones (repetibilidad) y/o bajo diferentes condiciones (reproducibilidad). Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o de coeficientes de variación. La precisión es el grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Selectividad.

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a los componentes de la muestra

Estabilidad de la muestra analítica.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas después de permanecer por un tiempo determinado a diferentes condiciones ambientales (como temperatura ambiente, refrigeración, protección de la luz etc..) durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del analito de interés.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con células hematopoyéticas, especialmente macrófagos, el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la F.E.S Zaragoza, ha hecho importantes avances en el entendimiento de la diferenciación celular normal, evaluada a través de la aparición de los diferentes receptores inmunológicos para la porción Fc de las inmunoglobulinas. Se ha determinado que además del IFN \rightarrow 1 la IL-1 \Leftarrow y la IL-6⁴⁵ son inductoras de la aparición de receptores Fc en macrófagos normales y leucémicos de ratón⁴⁵. Además, se ha encontrado expresión diferencial de receptores Fc en diversos estados de diferenciación en presencia de IL-1 \Leftarrow , tanto en macrófagos normales como en líneas celulares que han demostrado *in vitro* la expresión diferencial de receptores Fc dependiendo del estado de diferenciación de los macrófagos, así como de diversas citocinas, sin embargo poco se sabe acerca del efecto de este proceso *in vivo*.⁴⁵

En otro orden de ideas, los liposomas son una herramienta de gran utilidad, debido a que garantizan que pequeñas concentraciones de cualquier sustancia lleguen al blanco adecuado reduciendo la toxicidad o efectos colaterales causados por el paso de las sustancias por el torrente sanguíneo. En la actualidad, estas partículas han sido ampliamente utilizadas en una diversidad de aplicaciones, tales como vehículos para la transfección de material genético, liberadores de fármacos en sitios específicos y como modelos de diferentes tipos de membranas biológicas normales y transformadas.

Debido a que prácticamente en cada región específica del cuerpo existen macrófagos residentes y a que en procesos infecciosos o inflamatorios llegan a sitios específicos gran cantidad de macrófagos inducidos, es importante encontrar las condiciones ideales para la evaluación *in vivo* de la interacción y acción diferenciadora de diversas citocinas sobre ambos tipos de poblaciones celulares. Lo anterior abre el camino para que, en un futuro, estos mediadores biológicos y diversos medicamentos puedan utilizarse de forma clínica, principalmente en el tratamiento de enfermedades relacionadas con los macrófagos, como autoinmunes y diversas formas de cáncer.

Por lo anterior, una contribución en el entendimiento de la diferenciación celular de los macrófagos, es el estudio *in vivo* de la influencia de diversas citocinas en este proceso. Este avance puede lograrse elaborando liposomas que contengan el material necesario para la investigación y administrándolos por la vía adecuada a ratones, para posteriormente proceder a la extracción y evaluación del grado de diferenciación de los macrófagos. En el presente trabajo se utilizaron IL-1 \Leftarrow e IFN \rightarrow encapsulados en liposomas para evaluar la expresión de receptores Fc (parámetros de diferenciación) en macrófagos peritoneales residentes de ratón.

Además, para determinar la expresión de los receptores Fc, es necesario contar con una técnica analítica capaz de detectar el aumento de la cantidad de receptores Fc en la superficie celular de una manera confiable. Tradicionalmente, los receptores Fc se detectan evaluando por rosetado la unión a éstos eritrocitos opsonizados con IgG⁴⁵; lo que hace una técnica subjetiva, en el presente trabajo se pretende la validación de una técnica objetiva, rápida y confiable de detección espectrofotométrica utilizando o-fenilendiamindicloruro (OPD) que reacciona con los eritrocitos presentes⁴⁶. Por otro

lado, como complemento y punto de comparación se evaluó la presencia de los receptores Fc utilizando secuencias específicas para cada tipo de receptor Fc para su análisis mediante la técnica de RT-PCR. Esta evaluación cobra importancia debido a que día con día se están asociando nuevas funciones a cada uno de los tipos de receptores Fc ; especialmente para los del tipo I y II se han establecido patrones de comportamiento e influencia en las diferentes formas de diferenciación que llevarán a la madurez y función completa de las subpoblaciones de macrófagos ³³, lo que nos coloca en la posibilidad de intervenir en la vía de diferenciación deseada para su manipulación, en el caso de que sea necesario realizarla, mediante citocinas encapsuladas en liposomas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la aparición de Fc→R *in vivo* en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos con INF→ e IL-1⇐ encapsulada en liposomas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarización de la técnica de Orto-feniletildiamina (OPD) para la determinación de Fc→R en la superficie celular de los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.

Determinar el tiempo necesario para la aparición de los Fc→R .

Detectar *in vitro* la carga eléctrica ideal de los liposomas a utilizar para la inducción de la aparición de Fc→Rs

Inducir *in vivo* la aparición de receptores Fc→ mediante el uso de INF→ e IL-1⇐ encapsulados en liposomas negativos.

Comparar dos técnicas de evaluación de la aparición de Fc→R (OPD y PCR)

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si se encapsulan en liposomas la IL-1 \leftarrow y el IFN \rightarrow y se proporcionan *in vivo* a subpoblaciones de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos, es posible evaluar su efecto en la diferenciación de estas células, detectando la expresión de Fc \rightarrow R, para conocer si el efecto observado *in vitro* puede ser generalizado a poblaciones de macrófagos no manipulados fuera del organismo.

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS): A 800 mL de agua se le adicionaron 8 g de cloruro de sodio 2.16 g de fosfato de sodio monobásico y 0.2 g de fosfato de potasio. Se ajustó el pH a 7.2 y se llevó al aforo de un litro.
- Solución de Alsever: A 900 mL de agua se le adicionaron 20.5 g de dextrosa, 8 g de citrato de sodio dihidratado, 0.55 g de ácido cítrico monohidratado y 4.2 g de cloruro de sodio. Se ajustó el pH de la solución a 6.1 y se llevó al aforo de 1 litro. Se esterilizó en autoclave a 20 lb por 20 minutos.
- Eritrocitos de carnero al 2%: Los eritrocitos de carnero se obtuvieron por punción en la yugular de un carnero (Facultad de Medicina, UNAM). La sangre obtenida se resuspendió en un volumen similar de solución de Alsever, en la que se puede mantener a 4°C hasta por 20 días.

Inicialmente se determinó la concentración óptima del anticuerpo para opsonizar a los eritrocitos mediante titulación. En una microplaca de 96 pozos (Dynatech, USA) se hicieron diluciones seriadas (desde 1:10 hasta 1:3000) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), a partir de una solución de 10 mg/ml de IgG de conejo contra eritrocitos de carnero. (Sigma Chemical USA), 50 ml de cada una de las diluciones se agregaron 50 ml de eritrocitos de carnero al 2% en PBS, se resuspendió e incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Mediante un análisis visual se eligió como concentración óptima de anticuerpo el título subaglutinante de los eritrocitos de carnero. La opsonización de los eritrocitos de carnero se consiguió incubándolos al 2% con la concentración óptima de anticuerpo (generalmente entre 1:600 y 1:1000) a 37°C durante 30 minutos con agitación constante. Finalmente se lavaron tres veces por centrifugación con PBS y se resuspendieron al 2%.

- Solución de hidrócloruo de ortofenilendiamina (OPD): Se disolvieron 0.5 mg en 1 mL en PBS y justo antes de usarse se añadió 0.009% de H₂O₂.
- Reactivo de Griess: sulfanilamida al 1%:dicloruro de naftilendiamina en ác.fosfórico a 2.5%:Ác clorhídrico 2N 2:1:1
- Mezcla Sevag: Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1
- Solución fijadora de Osmio-Milloning: Solución A: 0.226 g de fosfato monobásico de sodio en 10 mL de agua. Solución B: 0.252 g de hidróxido de sodio en 10 mL. Solución C: 0.054 g de glucosa en 1 mL. Solución D: 8.3 mL de solución A más 1.7 mL de solución B. Se mezclan 9 mL de solución D y 1 mL de solución C y se disuelve 1% de OsO₄.
- Medio de cultivo ISCOVE'S 1640 (Microlab, México) suplementado con suero fetal de bovino al 10% (GIBCO Labs, USA) inactivado previamente a 56°C
- Cajas Petri de 10 mm de diámetro o placas de 24 pozos (Nunc, Dinamarca).
- Material biológico: Se usaron ratones hembras o machos de las cepas CD-1, CBA, NIH o la F1 de la cruce de BALB/c X BLACK/c57 de 6-8 semanas de edad.
- Citocinas: Se utilizaron rh IL-1 α y rm IFN γ (IMMUNEX,USA).

Todos los cultivos se efectuaron en incubadoras a una temperatura de 37°C, con humedad saturante y 10% de CO₂.

5.2 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE POBLACIONES ENRIQUECIDAS DE MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL

5.2.1 Se sacrificaron ratones singénicos por dislocación cervical.

5.2.2 Se obtuvieron macrófagos de la cavidad peritoneal mediante lavado con medio de cultivo y centrifugación.

5.2.3 Se sembraron 5×10^5 de estas células en placas de microcultivo o 4×10^6 en cajas Petri. Una vez sembradas, se incubaron durante una hora.

5.2.4 Se retiró el sobrenadante y se lavaron las células adheridas con medio de cultivo (población enriquecida).

5.2.5 Se cultivaron estas células durante 24 horas en presencia de medio suplementado con suero fetal de bovino.

5.2.6 Se lavaron los pozos o las cajas con medio de cultivo (cultivo estabilizado) y se procedió a estimular, en ausencia de suero, a las poblaciones enriquecidas y estabilizadas con o sin citocinas libres o encapsuladas en liposomas.

5.2.7 Se evaluó la presencia de receptores Fc mediante la técnica de ortofeniletildiamina (OPD) y/o PCR. Cuando fue requerido, para evaluar los cambios morfológicos, y se fijaron y prepararon las células para microscopía electrónica.

5.3 DETERMINACIÓN DE LA APARICION DE RECEPTORES Fc MEDIANTE LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA CON o-FENILENDIAMINOCLORURO

5.3.1 Preparación del reactivo OPD. Se pesaron 5 mg del reactivo de OPD y se colocaron en un tubo de ensaye para diluir en 10 mL de solución buffer de fosfatos (PBS). Se agregaron 100 μ l de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Este reactivo se mantuvo en la oscuridad antes de su uso.

5.3.2 Preparación de eritrocitos. Se colocaron aproximadamente 3 mL de sangre de bovino en un tubo de ensaye cónico y se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante para obtener el botón de eritrocitos.

Se colocaron en un tubo de ensaye de fondo cónico con capacidad de 15 mL, 12 mL de medio de cultivo ISCOVE's, 20 μ l de Inmunoglobulina G anti-eritrocitos de carnero (IGg), y 240 μ l del botón de eritrocitos. Se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se lavaron y centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 minutos con medio ISCOVE's hasta que desapareció el color rojo del medio.

5.3.3. Formación de rosetas. Se realizó un lavado de las cajas que contenían las células activadas fijas con 300 μ l de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se retiró el PBS por medio de vacío y se colocaron 300 μ l de eritrocitos preparados como se

indicó anteriormente, Se refrigeraron durante una hora a 4°C y se lavaron tres veces con 300 μ l de PBS para cada lavado. Se agregaron 300 μ l de la mezcla de OPD y se incubaron durante 7 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se colocaron 200 μ l de rosetas así como 200 μ l de testigo de reactivo OPD en cajas de 96 pozos de espectrofotómetro para microplacas.

5.3.4. Determinación de las rosetas. Se determinó la absorbancia de las rosetas así como del testigo (OPD) a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro para microplacas (El-800, BIO-TEK Instruments, INC., USA)

5.4 METODOLOGÍA DE ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA OPD

5.4.1 Optimización de la técnica. Se realizó una prueba para determinar el número de lavados suficientes para eliminar aquellos eritrocitos que no fueran empleados para la formación de las rosetas por parte de los macrófagos, y que por lo tanto, se encuentren como sobrenadantes en el medio de cultivo de los pozos. Esta prueba consistió en realizar una serie de lavados por triplicado hasta obtener un valor aproximadamente constante de absorbancia. Se realizarán pruebas con 0, 1, 2, 3, 4 y 5 lavados.

Así mismo, se realizó una titulación del reactivo de IGg empleado para la validación, que consiste en probar concentraciones de IGg, hasta conseguir la concentración idónea para la formación de las rosetas.

5.4.2 Especificidad. Para realizar esta prueba se evaluó la absorbancia de los componentes empleados en la técnica por separado así como del blanco para luego compararla con la absorbancia obtenida con el tratamiento normal.

Los componentes probados fueron:

- Células + IGg sin eritrocitos.
- Células + eritrocitos sin IGg.
- Células + eritrocitos mas IGg sin OPD.
- Células + OPD sin eritrocitos ni IGg.
- Eritrocitos + IGg sin células.
- Blanco OPD.

5.4.3 Precisión del sistema. Esta prueba se realizó determinando el valor de absorbancia de 6 muestras con 3.5×10^5 células. Se consideró esta cantidad de células como valor central en la determinación (100 %.)

5.4.4 Reproducibilidad. Se determinó la variación en la respuesta obtenida al realizar la técnica en dos días y por dos analistas diferentes, por triplicado.

5.4.5 Estabilidad: Se determinó la variación en la respuesta de 3 muestras a una concentración de 3.5×10^5 células bajo condiciones ambientales de 25°C a partir de un tiempo inicial de 10 minutos y tras 2 y 4 horas de preparación.

5.5 FORMACIÓN DE LIPOSOMAS

Los liposomas neutros y negativos se prepararon mediante el método de Szoka (Szoka y Papahadjopoulos, 1978).⁴²

5.5.1 Preparación de liposomas neutros y negativos: Se usaron 10 μ moles de lípidos (Fosfatidilcolina (PC): Fosfatidiletanolamina (PE): Colesterol (CH), 4:2:4 y PC:Fosfatidilserina (PS):CH 6:3:1, respectivamente) disueltos en 1 mL de cloroformo, los cuales se colocaron en un matraz cónico de dos bocas de 50 mL de capacidad.

5.5.1.2 El disolvente se evaporó a presión reducida y se añadieron 1.2 ml de éter dietílico y 333 μ l de medio de cultivo con o sin citocinas. Se agitó con vortex durante 45 segundos a la máxima velocidad y se procedió a evaporar el solvente por 45 segundos más en agitación.

5.5.1.3 La suspensión lechosa de liposomas se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo sin suero.

5.5.1.4 Para eliminar la citocina no encapsulada, se lavó la suspensión por ultracentrifugación a 220,000 g y la pastilla de liposomas se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo.

5.5.1.5 La suspensión se filtró en membranas Millipore (Millipore, USA) con poros de 0.22 μ m de diámetro para obtener la preparación estéril.

5.5.2 Preparación de liposomas catiónicos o positivos: Se prepararon por sonicación, disolviendo 10 μ moles de lípidos (Espermidin-colesterol (EspCH): PC, 5:5) con 1 mL de cloroformo

5.5.2.1 Se evaporó el solvente con aire estéril, se adicionaron 333 μ l de medio de cultivo con o sin citocinas y se procedió a sonicar por tres ciclos de 5 segundos por 30 segundos de reposo

5.5.2.2 Se resuspendieron en 10 mL de medio de cultivo sin suero. Para eliminar la citocina no encapsulada, se procedió a lavar la suspensión por ultracentrifugación, manteniendo en todo momento a la suspensión estéril debido a que estos liposomas no pueden ser filtrados, ya que por sus características se adhieren a las membranas Millipore.

5.6 EFECTO *in vivo* DE LA ESTIMULACIÓN CON CITOCINAS ENCAPSULADAS CON LIPOSOMAS

5.6.1 Se inyectaron 600 μ l de liposomas en la cavidad peritoneal de los ratones a ensayar. Después de 2 horas de estimulación, los animales se sacrificaron y se procedió a obtener las células a evaluar mediante un lavado de cavidad peritoneal con medio de cultivo IMDM.

5.6.2 Se sembraron las células tanto en cajas de cultivo como en cajas Petri para obtener cultivos enriquecidos de macrófagos. Después del lavado, las placas continuaron dos días en cultivo con medio suplementado

5.6.3 Se evaluó la aparición de receptores Fc. Por otra parte, las células de las cajas fueron lisadas para la obtención de ARN.

5.6.4 Cinética dosis-respuesta a liposomas vacíos en la cavidad peritoneal.- Se inyectaron 300 μ l de medio IMDM o de liposomas neutros vacíos en la cavidad peritoneal de los ratones. Transcurridas 2, 16, 24, y 48 horas, se sacrificaron grupos de 5 animales y se procedió a enriquecer la población de macrófagos, como se describió anteriormente, y se evaluó su diferenciación funcional (aparición de Fc \rightarrow Rs).

5.7 DETERMINACION DE ARN DE LOS DIFERENTES RECEPTORES POR REACCION EN POLICADENA CON RETROTRANSCRIPTASA

5.7.1 Se obtuvieron entre 5 y 10 X 10⁶ células adherentes de la cavidad peritoneal de ratones y se lisaron en la caja con 1 mL de TRIZOL.

5.7.2 Las células se desprendieron de las cajas con ayuda de un gendarme de plástico y se colocaron en tubos eppendorf de microcentrifuga, se lavaron y se adicionaron 25 μ l de acetato de sodio 2 M y 1 mL de fenol saturado a 60°C homogeneizando al agregar cada reactivo.

5.7.3 Se incubó el contenido de cada tubo con 100 mL de mezcla Sevag durante 10 minutos a 4°C

5.7.4 Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se retuvo la fase acuosa

5.7.5 Se adicionaron 12.5 μ L de cloruro de sodio 5 M y 31.25 μ L de isopropanol frío.

5.7.6 Se permitió la precipitación durante toda la noche a -70°C

5.7.7 Se obtuvo por centrifugación el RNA y la pastilla se resuspendió en agua dietilpirocarbonatada para proceder a la cuantificación mediante la absorbancia en el espectrofotómetro a 260 nm

5.7.8 Para la retrotranscripción se utilizó 1 μ g de RNA en presencia de cloruro de magnesio, dNTPs, oligo dT, inhibidor de ARNasas, retrotranscriptasa y DTT, durante 1 hora a 42°C.

5.7.9 Los productos de la reacción fueron utilizados para la reacción en policaena en presencia de los oligonucleótidos adecuados mediante un ciclo de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de un minuto a 94°C, 1.5 minutos a 55°C y tres minutos a 72°C; y por último, un ciclo de 10 minutos a 72°C.

Los oligonucleótidos usados fueron:

Fc \rightarrow RI sentido.- CTGCAGGAGTGTCCATCACGGTCAAAGA

Fc \rightarrow RI antisentido.- GGATGTGAAACCAGACAGGAGCTGATGA

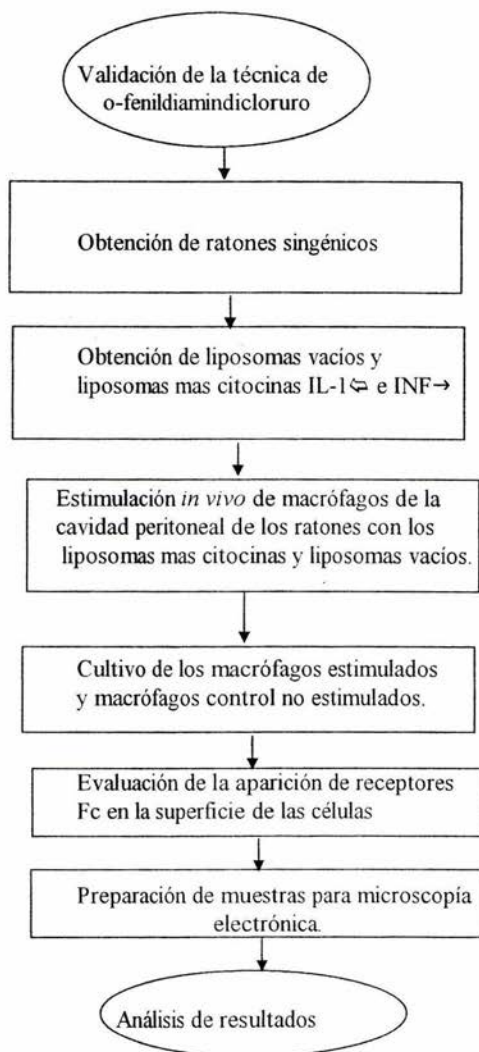
Fc \rightarrow RII sentido.- GGATGTGAAACCAGACAGGAGCTGATGA

Fc \rightarrow RII antisentido.- GCAGCTTCTTCCAGATCAGGAGGA

5.8 DISEÑO ESTADÍSTICO

Cada experimento se realizó al menos dos veces por cuadruplicado (Con excepción de los experimentos para la validación del método de OPD que fueron realizados una vez por triplicado), se realizó un análisis exploratorio de datos para comparar los diferentes tratamientos y los diferentes días en que fueron realizados. El análisis exploratorio se hizo con ayuda del paquete estadístico STATA y la comparación de las medias por día y tratamiento mediante una prueba de Bonferroni en el mismo paquete.

6. DIAGRAMA DE FLUJO.



7. RESULTADOS

7.1 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE O-FENILENDIAMINDICLORURO PARA LA DETERMINACIÓN DE RECEPTORES Fc EN MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES CD-1

Precisión del sistema.

La precisión es el grado de repetibilidad de un método analítico bajo condiciones normales de operación y su "normalidad" es expresada como la desviación estándar relativa de un número significativo de muestras.

De acuerdo a la ICH, la precisión puede desarrollarse a tres diferentes niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Se colocaron 3.5×10^5 células activadas en placas de microcultivo y se trataron en condiciones normales para la determinación de receptores Fc

ABSORBANCIA	NUMERO DE CÉLULAS
0.4280	3.5×10^5
0.4530	3.5×10^5
0.4610	3.5×10^5
0.3660	3.5×10^5
0.4250	3.5×10^5
0.4680	3.5×10^5

CRITERIO	TEORICO	EXPERIMENTAL
C.V.	15 %	9 %

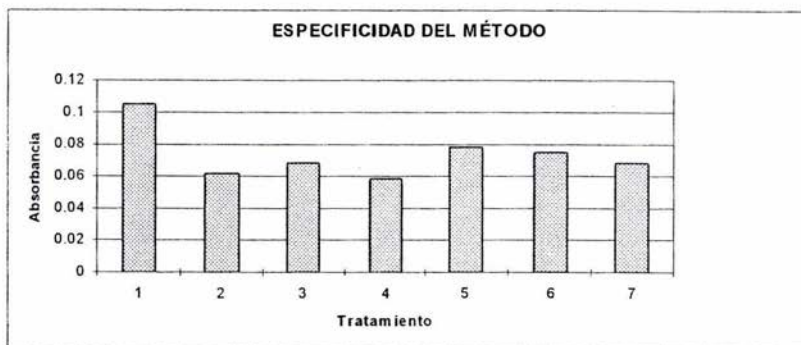
CONCLUSION:

SI CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LA PRECISION.

Especificidad del método

Para determinar si la respuesta obtenida en el método se debe únicamente al analito (receptor Fc opsonizado) de interés y que no existe interferencia con otros factores del método se realiza la especificidad del método.

FIGURA RV1



ESPECIFICIDAD DEL METODO

Se evaluaron por cuadruplicado las respuestas de absorbancia de cada uno de los componentes del tratamiento de las células. Puede observarse que con el tratamiento normal la respuesta es significativamente mayor a la obtenida con el resto de los componentes por separado.

1. Tratamiento normal.
2. Células + IGg sin eritrocitos.
3. Células + eritrocitos sin IGg.
4. Células + eritrocitos + IGg sin OPD.
5. Células +OPD sin eritrocitos ni IGg
6. Eritrocitos +IGg sin células.
7. Blanco OPD.

TRATAMIENTO	ABSORBANCIA						
	1	2	3	4	5	6	7
	0,091	0,064	0,079	0,056	0,071	0,101	0,065
	0,121	0,058	0,073	0,052	0,094	0,058	0,077
	0,120	0,063	0,067	0,068	0,074	0,068	0,070
	0,089	0,061	0,055	0,056	0,073	0,073	0,062
Promedio	0,105	0,062	0,069	0,058	0,078	0,075	0,069
Desv. std	0,0176	0,0026	0,0102	0,0069	0,0107	0,0184	0,0066
% C.V.	16,753	4,302	14,959	11,945	13,768	24,561	9,573

Reproducibilidad del método

Esta prueba consiste en analizar la muestra por triplicado por dos analistas bajo las mismas condiciones y en dos diferentes días.

	REPETICION	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	1	0.4280	0.4560
	2	0.4530	0.3200
	3	0.4610	0.4030
DIA 2	1	0.3660	0.3330
	2	0.3610	0.3080
	3	0.3860	0.4560

ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal	F _{0.05} tab
ANALISTA "A"	1	0.0027	0.0027	0.5416	38.510
DIA D	2	0.0099	0.0049	1.7229	6.510
ERROR	8	0.0229	0.0029		

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

EL MÉTODO ANALÍTICO ES REPRODUCIBLE POR LOS ANALISTAS.
 EL MÉTODO ANALÍTICO ES REPRODUCIBLE EN DISTINTOS DIAS POR UN MISMO ANALISTA

VARIACIÓN INTER ANALISTAS	1.9×10^{-4}
VARIACIÓN INTER DIAS	4.76×10^{-1}
REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	0.0535
MEDIA ARITMÉTICA TOTAL	0.3943
S TOTAL	0.567

CRITERIO	TEORICO	EXPERIMENTAL
C.V. TOTAL	15.0%	14.4%

Estabilidad de la muestra.

Esta prueba consiste en colocar la muestra por triplicado bajo condiciones ambientales establecidas y en tiempo determinado.

MUESTRAS A TEMPERATURA AMBIENTE 25°C

	INICIAL	2 Hs	4 Hs
	0.4763	0.4667	0.4656
	0.4723	0.4639	0.4628
	0.4698	0.4631	0.4616
$\sum X$	1.4184	1.3937	1.3900
$\sum X^2$	0.6706	0.6475	0.6440
MEDIA	0.4728	0.4646	0.4633
∇	0.0027	0.0015	0.0017

% RECUPERADO A PARTIR DE T=0		PROMEDIO
2 h	97.9845	98.2599
	98.2215	
	98.5739	
4 h	97.9886	97.9989
	98.2546	
	97.7535	

CONCLUSION.

LA MUESTRA ES ESTABLE A LAS 2 HORAS

LA MUESTRA NO ES ESTABLE A LAS 4 HORAS.

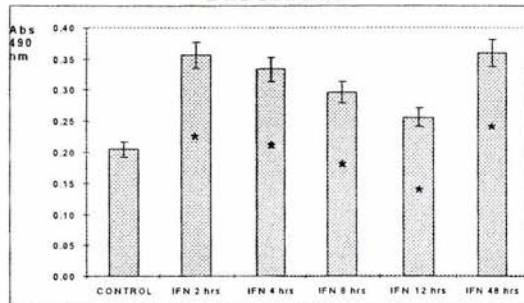
7.2 DETERMINACIÓN DE LA APARICIÓN DE Fc→R *in vitro* EN MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES SINGENICOS CON INF→ E IL-↔ ENCAPSULADAS EN LIPOSOMAS

Tiempo mínimo de estimulación in vitro con IFN γ para inducir la aparición de Fc γ Rs en macrófagos residentes de cavidad peritoneal.

Con la finalidad de determinar el tiempo mínimo de permanencia de la citocina para la inducción a la diferenciación *in vitro* de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, se realizaron lavados de dicha cavidad a ratones machos de la cepa CD-1 y se establecieron cultivos enriquecidos como se describe en la metodología.

Los macrófagos se estimularon con 50 UI/ml de IFN γ durante 2, 4, 8 y 12 horas, en ausencia de suero fetal de bovino. Transcurrido este tiempo, los cultivos fueron lavados, se les adicionó medio de cultivo suplementado y se incubaron a 37°C con 10% de CO₂. Al término de 48 horas, se procedió a evaluar la presencia de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas. Los resultados obtenidos mostraron que en ambos casos, 2 horas de estímulo es tiempo suficiente para que la inducción a la diferenciación se lleve a cabo (Figura R1);

FIGURA R1



DURACIÓN DEL ESTIMULO CON IFN→ PARA LA APARICIÓN DE Fc→Rs

Poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD-1, fueron estimuladas con IFN γ (50 UI/ml.) durante 2, 4, 8 y 12 horas. Después de la incubación, los cultivos se lavaron y se incubaron en presencia de medio suplementado, por 2 días más. Finalmente, se evaluó la aparición de Fc γ Rs.

Control: células cultivadas 48 horas en presencia de medio suplementado.

Control positivo (IFN 48 hrs) células cultivadas 48 horas en medio suplementado con 50 UI/ml de IFN γ

* significativamente diferente al control negativo.

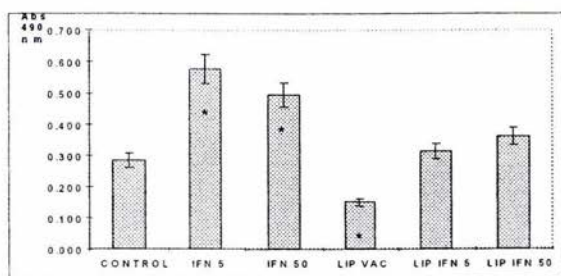
7.3 DETERMINACIÓN DE LA CARGA OPTIMA DE LIPOSOMAS CONTENIENDO CITOCINAS PARA INDUCIR LA APARICION DE RECEPTORES Fc γ EN MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES SINGÉNICOS

Efecto de la estimulación con liposomas neutros encapsulando IFN γ e IL-1 α a macrófagos peritoneales de ratones singénicos.

Debido a que el análisis exploratorio de los datos obtenidos con ratones CD-1 indicó que existe una variación cíclica en los resultados obtenidos para la aparición de Fc γ Rs; se realizaron ensayos en las mismas condiciones que para ratones CD-1, utilizando ya sea solo hembras o machos de la F1 de la cruce de ratones singénicos BALB/c y BLACK C-57, como donadores de macrófagos de la cavidad peritoneal. Además, por el hecho de que pudo observarse que los liposomas pueden funcionar con una concentración de citocinas 10 veces menor, se utilizaron tanto la concentración normal de estimulación (50 UI/ml de IFN γ y 10 ng/ml de IL-1 α) como 10 veces menos.

Al utilizar liposomas neutros para encapsular IFN γ para la inducción a la aparición de Fc γ Rs, únicamente los liposomas conteniendo 50 UI/ml fueron capaces de causar una ligera respuesta positiva de aproximadamente 15% más con respecto al control. Por su parte, el IFN γ libre indujo un aumento mayor (casi de 100%) de la aparición de Fc γ Rs en presencia de 5 UI/ml (Fig. R2).

FIGURA R2



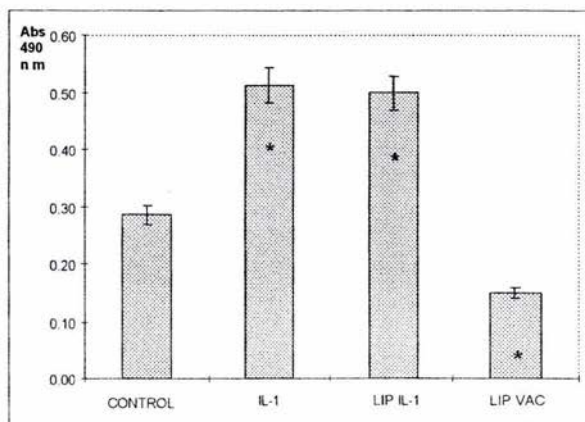
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON LIPOSOMAS NEUTROS CONTENIENDO IFN γ

Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig.R2). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 5 y 50 UI/ml de IFN- γ (IFN 5 Y 50) (controles positivos) y a liposomas neutros vacíos (LIP VAC) o con 5 y 50 UI/ml de IFN- γ (LIP IFN 5 Y 50) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo.

Por otro lado, al utilizar IL-1 α para estimular la diferenciación en las células peritoneales, no fue posible encapsularla en liposomas neutros en concentración de 10 ng/ml, ya que su presencia no permite la formación del cuerpo lipídico. Al utilizar liposomas conteniendo 1 ng/ml de esta citocina para inducir la aparición de Fc γ Rs se obtuvo una respuesta mínima similar a la de la citocina libre a la misma concentración (Figura R3).

FIGURA R3



APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON LIPOSOMAS NEUTROS CONTENIENDO IL-1 α

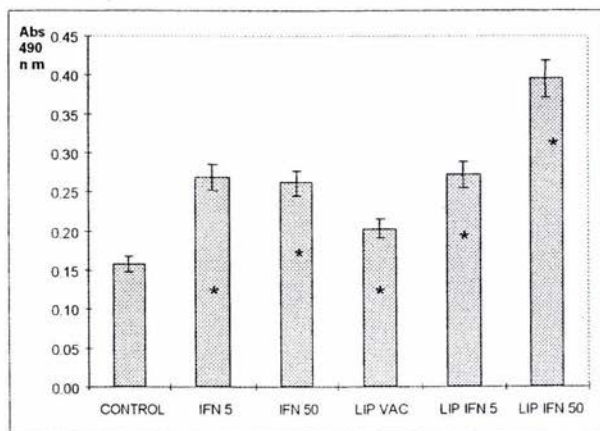
Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig. R3). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 1 ng/ml de IL-1 α (IL-1) (control positivo) y a liposomas neutros vacíos (LIP VAC) o con 1 ng/ml de IL-1 α (LIP IL-1) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo.

Uso de liposomas negativos como acarreadores de IFN γ para estimular la diferenciación de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos.

Al utilizar 5 o 50 UI/ml de IFN γ libre o encapsulado en liposomas negativos para inducir la diferenciación de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos, los resultados indicaron que tanto la citocina libre (ambas concentraciones) como los liposomas con 5 UI/ml produjeron una respuesta positiva similar (un aumento en la expresión de alrededor de 60% en comparación al control) en la inducción a la aparición de Fc γ Rs; por su parte, los liposomas con 50 UI/ml producen un aumento en la expresión de receptores superior al 100% con respecto al control. Es importante señalar que los liposomas negativos vacíos producen un aumento en la expresión de Fc γ Rs de aproximadamente 30% (Figura R4).

FIGURA R4



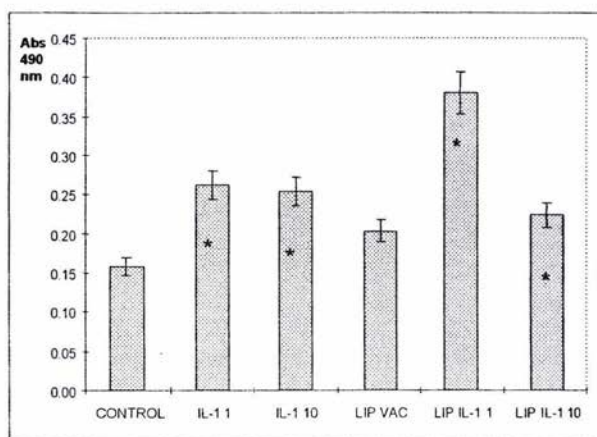
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO IFN \rightarrow

Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs. Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 5 y 50 UI/ml de IFN- γ (IFN 5 y 50) (controles positivos) y a liposomas neutros vacíos (LIP VAC) o con 5 y 50 UI/ml de IFN- γ (LIP IFN 5 y 50) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo.

Por otro lado, al utilizar en ensayos similares IL-1 α libre o asociada a liposomas negativos, los resultados mostraron que para la inducción a la aparición de Fc γ Rs ambas concentraciones de citocina libre tienen un efecto positivo similar (aproximadamente un 70% de aumento con respecto al control); además, que los liposomas vacíos y con 10 ng/ml inducen un ligero incremento (aproximadamente 35%) y que los liposomas negativos con 1 ng/ml de IL-1 α producen un fuerte efecto inductor (aproximadamente 150% más) comparado con su propio control (liposomas vacíos) y el del experimento (sin tratamiento alguno)

FIGURA R5



APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO IL-1 α

Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig. R5). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 1 y 10 ng/ml de IL-1 α (IL-1 1 y 10) (controles positivos) y a liposomas negativos vacíos (LIP VAC) o con 1 y 10 ng/ml de IL-1 α (LIP IL-1 1 Y 10) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

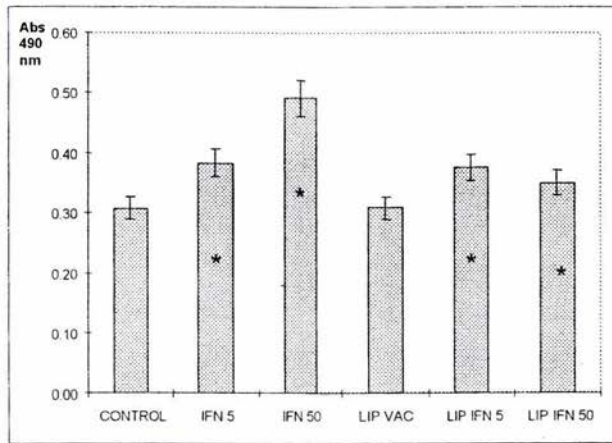
* Significativamente diferentes al control negativo.

Inducción a la diferenciación de macrófagos peritoneales de ratones singénicos por citocinas encapsuladas en liposomas positivos.

Al utilizar liposomas positivos para acarrear IFN γ , los experimentos indicaron que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para la inducción de Fc γ Rs, con respecto al efecto causado por la citocina libre (Figura R6).

Los resultados obtenidos para la inducción con IL-1 α indicaron que sólo la citocina libre produjo un incremento de aproximadamente 50% en la aparición de Fc γ Rs (Figura R7)

FIGURA 6



APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON LIPOSOMAS POSITIVOS CONTENIENDO IFN \rightarrow

Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig. 6)

Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 5 y 50 UI/ml de IFN- γ (IFN 5 Y 50) (controles positivos) y a liposomas positivos vacíos (LIP VAC) o con 5 y 50 UI/ml de IFN- γ (LIP IFN 5 Y 50) por un periodo de 2 horas.

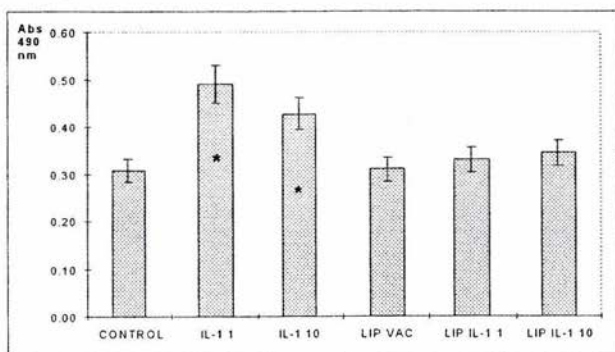
Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo.

Efecto in vivo de liposomas negativos encapsulando IFN γ en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos.

Con el objeto de evaluar el efecto *in vivo* del IFN γ encapsulado en liposomas sobre los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos, a grupos de 5 ratones se les inyectaron en la cavidad peritoneal 600 μ l de medio IMDM con citocina libre o encapsulada en liposomas negativos. Después de 2 horas de estimulación, los animales fueron sacrificados para obtener las células peritoneales y proceder a obtener cultivos enriquecidos de macrófagos residentes. Dos días después, las células fueron evaluadas para la aparición de Fc γ Rs. Los resultados indicaron que en estas condiciones, al igual que para ratones de cepa abierta, el IFN γ encapsulado favoreció fuertemente la aparición de estos receptores, induciendo un aumento en la expresión superior al 120%. Es importante mencionar que los liposomas vacíos también producen un incremento en la expresión de Fc γ Rs de aproximadamente 65%. (Fig R7)

FIGURA R7



APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON LIPOSOMAS POSITIVOS CONTENIENDO IL-1

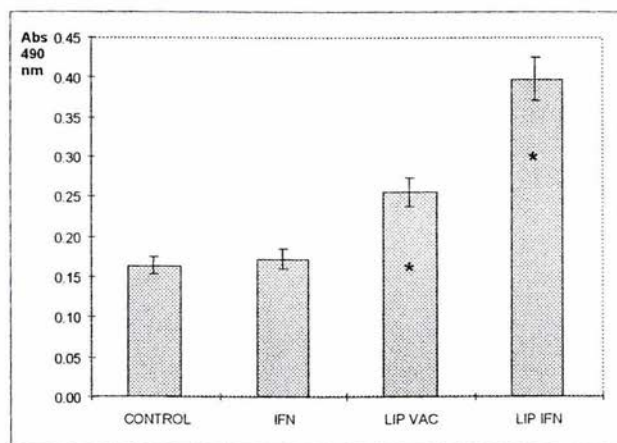
Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs. Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 1 y 10 ng/ml de IL-1 β (IL-1 1 y 10) (controles positivos) y a liposomas positivos vacíos (LIP VAC) o con 1 y 10 ng/ml de IL-1 β (LIP IL-1 1 Y 10) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo.

*Determinación del tipo de Fc γ Rs que aparecen al estimular *in vivo*, a macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones singénicos, con liposomas conteniendo IFN γ .*

Para determinar el tipo de Fc γ Rs inducidos *in vivo*, se obtuvo ARN de 8×10^6 células de cultivos enriquecidos obtenidos después de 2 horas de estimulación con o sin liposomas. Se procedió a analizar el ARN mediante la técnica de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los 2 tipos principales de Fc γ Rs de ratón, Fc γ RI y Fc γ RII. Este estudio se realizó con una alícuota de las células obtenidas para el experimento anterior, de esta forma, ambos experimentos se complementan ya que por un lado se está detectando el ARN mensajero producido como respuesta al estímulo y por el otro (experimento anterior), al sembrar las células y esperar 2 días más se detectó la expresión de los Fc γ Rs (Figura R8).

FIGURA R8



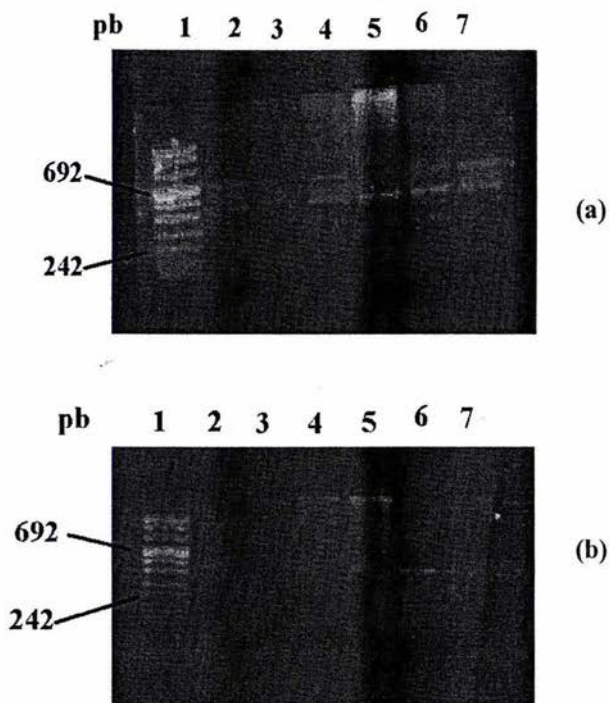
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS POR LA APLICACIÓN *in vivo* DE LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO IFN γ →

Se inyectaron grupos de ratones F1 (Black C57 X BALB C) con 600μ l IFN- γ (50 U/ml), liposomas negativos vacíos (LIP VAC) y con IFN γ (50 UI/ml) (LIP IFN); además medio de cultivo como control (CONTROL). Después de 2 horas se procedió a sacrificarlos y obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal que fueron cultivadas en medio suplementado por 2 días. Finalmente se procedió a la evaluación de la aparición de Fc γ Rs

* Significativamente diferentes al control negativo.

Los resultados obtenidos por RT-PCR mostraron la aparición de los 2 tipos de $Fc\gamma Rs$ *in vivo* (Figura R9). Cabe señalar que la técnica es cualitativa y sólo nos indica el tipo de receptores aparecidos.

FIGURA R9



DETERMINACIÓN DE LA APARICIÓN DE $Fc\gamma Rs$ DESPUÉS DEL ESTÍMULO CON LIPOSOMAS, MEDIANTE LA TÉCNICA DE RT-PCR

Se inyectó vía intraperitoneal, a ratones singénicos, $IFN\ \gamma$ libre o encapsulado en liposomas. Después de 2 horas, se procedió a sacrificar los ratones y obtener cultivos enriquecidos de macrófagos, las células fueron lisadas para obtener ARN, se procedió a purificarlo y a utilizar oligonucleótidos específicos para cada uno de los $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RII$ mediante la técnica de RT-PCR para detectar su presencia (a) $Fc\gamma RI$, y (b) $Fc\gamma RII$. Los carriles en las 2 figuras muestran: 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Control negativo, 4.- Células sin tratar, 5.- Células estimuladas con liposomas conteniendo $IFN\ \gamma$, 6.- Células tratadas con liposomas vacíos y 7.- Células con $IFN\ \gamma$ libre.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se ha demostrado que citocinas como IL-6, IL-1 \leftarrow e INF \rightarrow son fuertes activadoras de los macrófagos *in vitro*, induciendo la aparición de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas³³; no obstante, poco se sabe acerca del efecto causado por estas moléculas *in vivo*, debido a que al ser administradas en concentraciones óptimas por diversas vías pueden inactivarse rápidamente y producir efectos adversos desde leves a graves.⁴⁷ En el presente trabajo se estableció como objetivo el encontrar las condiciones adecuadas para estimular con citocinas a los macrófagos peritoneales *in vivo* mediante el uso de liposomas que son conocidos como acarreadores, concentradores y protectores³⁶

Es conocido que la presencia de suero en el medio de cultivo aglutina a los liposomas, lo que no les permite una adecuada interacción con sus células blanco. Por lo anterior y debido a que los resultados preliminares indican que 2 horas de estimulación con las citocinas son suficientes para producir un efecto inductor de la aparición de receptores Fc y a que no es necesaria la permanencia de éstas durante todo el tiempo de cultivo; los ensayos de estimulación se llevaron a cabo en ausencia de suero solamente por 2 horas; en consecuencia, es necesario tomar en cuenta que el hecho de que la respuesta *in vitro* se vea disminuida para la aparición de receptores Fc después de este tiempo, puede deberse a los efectos de la ausencia del suero en el cultivo.

Es importante mencionar que nuestros experimentos *in vitro* fueron evaluados 2 días después, ya que resultados previos indican que una vez presentado el estímulo, el tiempo necesario para la expresión del receptor Fc en la membrana del macrófago es de 48 horas³³

Al utilizar ratones singénicos como donadores de macrófagos peritoneales, encontramos que los liposomas negativos resultan ser muy buenos acarreadores de ambas citocinas produciendo un efecto inductor superior al de las citocinas sueltas; mientras que los liposomas neutros y positivos encapsulando ya sea IFN \rightarrow o IL-1 \leftarrow inducen una respuesta similar al de las citocinas libres. Ya que cada tipo celular interactúa con los liposomas de manera distinta debido a sus propiedades fisicoquímicas y/o biológicas, es necesario encontrar una combinación de lípidos y una carga eléctrica de los liposomas apropiadas para cada uno de ellos. En el caso de los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón existen evidencias de su afinidad por los liposomas con carga negativa³⁰. Lo anterior puede implicar que la composición lipídica de éstos los hace más atractivos para este tipo celular; lo que es congruente con el hecho de que incluso los liposomas negativos vacíos presenten una ligera acción estimulante.

La IL-1 \leftarrow es una citocina neutra; aunque estudios de mutagénesis sitio-específica indican que su polaridad es muy importante, debido a que la presencia de la arginina 127 es fundamental para su actividad biológica, una simple sustitución produce una reducción de ésta hasta 100 veces, 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 fuerte pérdida de su actividad biológica. Además, su mecanismo de acción puede ser tanto por medio de receptores, como por la unión inespecífica de la citocina a la membrana del macrófago⁴⁸

Es importante mencionar que al utilizar liposomas neutros para encapsular IL-1 α , los resultados mostraron que no hubo ningún efecto inductor; sin embargo, sería difícil saber si es por la característica de carga neutra de la partícula, o por que estos liposomas sólo pudieron prepararse con concentraciones 10 veces menores a las utilizadas, esto debido a que la presencia de mayores concentraciones de citocina producen una inestabilidad tal que no permite la formación del acarreador.

Por otro lado, el IFN- γ presenta segmentos específicos que se caracterizan por la presencia de residuos repetitivos de arginina y lisina, los cuales son esenciales para que esta citocina sea funcional⁴⁹; confiriéndole carga positiva a la molécula, consecuentemente el IFN- γ se inactiva en pH ácido⁵⁰. Considerando que el IFN- γ es una citocina con carga neta positiva, podría suceder que las cargas negativas de los lípidos que forman a los liposomas interaccionaran con ella ayudando a su mejor encapsulación y aunque esta interacción podría tener un efecto adicional en la configuración de la citocina impidiéndole ejercer su acción, sabemos que los liposomas pueden liberar a la citocina fusionándose a la membrana del macrófago, en este caso el IFN- γ al ser liberado podría ser activo nuevamente, explicando así el fuerte efecto inductor mostrado por esta citocina encapsulada en liposomas negativos.

En lo que se refiere a los resultados de estimulación *in vivo*, se encontró que sólo el INF- γ encapsulado produce un efecto inductor, mientras que la citocina libre no produce efecto alguno. Lo anterior puede deberse a que la concentración utilizada en forma libre de las citocinas es escasa para ejercer algún efecto. En el caso de los liposomas negativos vacíos al interaccionar con las células en estudio, se observa una ligera respuesta positiva, lo cual es congruente con lo informado en la literatura acerca de la preferencia de los macrófagos residentes por este tipo de liposomas.

Adicionalmente, al obtener ARN mensajero de las células de ratones singénicos estimuladas con liposomas *in vivo* y analizarlas por RT-PCR para determinar una posible expresión diferencial de los dos tipos principales de receptores Fc, se encontró que en todos los casos se expresan ambos tipos de receptores. Cabe aclarar que aunque el receptor Fc de tipo III no es muy abundante en estas células, si posee efectos importantes por lo que sería recomendable realizar su determinación posteriormente. Es importante mencionar que la técnica es cualitativa y que controlando muy estrictamente las condiciones experimentales pudiera hacerse semicuantitativa, lo cual nos llevaría a notar que aún cuando aparezcan los dos tipos de receptores, el aumento visto en los estudios de detección colorimétrica, puede deberse a un tipo particular de ellos.

Por otro lado, la técnica de o-fenilendiaminodicloruro demostró ser una técnica precisa, específica y relativamente estable a las 2 horas para determinar cuantitativamente los receptores Fc presentes en los experimentos realizados. Cabe señalar que para llevar a cabo la validación de esta sería necesario contar con una referencia de la respuesta de absorbancia con respecto a la cantidad de receptores Fc purificados al no contar con un estándar de referencia. Sin embargo, se observa que la respuesta de absorbancia es

proporcional a la cantidad de receptores Fc y puede considerarse una técnica semicuantitativa

Ya que la técnica OPD no distingue el tipo de receptores de los que se tratan, y que esta información también es necesaria para el mejor entendimiento del proceso de expresión de los receptores Fc, se empleó la técnica de RT-PCR que permite hacer esta distinción. Por lo anterior se puede afirmar que ambas técnicas pueden ser utilizadas complementariamente para obtener información completa sobre la respuesta de los macrófagos al ser estimulados.

9. CONCLUSIONES

- Teniendo en consideración los resultados aquí presentados, se puede afirmar que los liposomas negativos son muy buenos acarreadores de IL-1 \leftrightarrow e INF \rightarrow citocinas. Además, se muestra una vez más que los liposomas son excelentes acarreadores y protectores de los principios activos a encapsular y se presentan evidencias de interacciones particulares entre éstos y los lípidos que constituyen las partículas acarreadoras. Estas interacciones son de suma importancia para la aplicación de esta biotecnología en diversos modelos de estudio. Particularmente, este aspecto es congruente con los cientos de patentes de formulaciones lipídicas registradas cada año, las cuales van en aumento cada mes.

- Si consideramos que cada organismo, tejido y tipo celular tiene sus propias características, es lógico pensar que su respuesta a los estímulos será diferente; aunado a esto, en el presente trabajo, las características 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.

Por lo anterior, 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 organismo, citocina, tipo celular y condiciones fisiológicas presentes. En este sentido, el trabajo *in vitro* fue de gran utilidad para encontrar las condiciones óptimas para el trabajo *in vivo*.

- Con el presente trabajo, se ha establecido un buen modelo para la estimulación *in vivo* de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón, además se determinaron patrones de respuesta diferentes a los encontrados *in vitro*. En adelante será posible estimular directamente a este tipo celular con liposomas cargados de diferentes citocinas o fármacos en modelos experimentales de diversas patologías.

- La técnica de OPD es una técnica semicuantitativa precisa, específica y relativamente estable, mientras que la técnica por RT-PCR permite distinguir el tipo de FcR que fueron expresados en los experimentos anteriormente descritos.

- Finalmente, el presente trabajo pretende servir como una base para la aplicación de esta biotecnología en otros sistemas celulares, buscando primero la adecuada interacción de los activos a encapsular con el liposoma y posteriormente las condiciones ideales *in vitro* para en adelante estar en posibilidad de influenciar a prácticamente cualquier tipo celular *in vivo*.

10. BIBLIOGRAFIA.

- ¹ Abbas, Abul K, Litchman Andrew H, Pober Jordan S. (1995) Inmunología celular y molecular, 2ª edición. Interamericana Mc Graw Hill.
- ² Oppenheim JJ, Ruscelli F y Faltynek C (1996). En: Inmunología Básica y Clínica. Stites DP (Ed) 8a. Ed. El manual moderno. México. pp 23-27, 133-147.
- ³ Carnot P y Deflandre C. (1906). Sur l'activité hemopoiétique des différents organes au cours de la régénération du sang. CR Acad Sci Paris 143: 432.
- ⁴ Aarden L.A, Brunner TK, Cerrottini JC, Dayer JM, de Weck AL, Dinarello CA, DiSabato G, Farrar JJ, Gery I, Gillis S, Handschumacher RE., Henney CS, Hoffmann MK, Koopman WJ, Krane SM, Lachman LB, Lefkowitz I, Mischell RI, Mizel SB, Oppenheim JJ, PaetkeuV, Plate J, Rölinghoff M, Schimpl A, Shim AS, Simon PL, Smith KA, Wagner H, Watson JD, Wecker E, Wood DD (1979) Revised Nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors
- ⁵ Schindler R y Dinarello C.A, (1990) En: Growth Factors, Differentiation factors and Cytokines, A Habenicht (Ed). Spinger-Verlag Berlin Heidelberg, 85-102.
- ⁶ Benett IL Jr. Beeson PB () The effect of the injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits J Experim 98:477-492
- ⁷ Murphy PA, Cjesney J, Wood WB Jr (1974) Further purification of rabbit leucocyte pyrogen J Lab Clin Med 83:310-319
- ⁸ Dinarello CA, Goldin NP, Wolff SM (1974) Demonstration and characterization of two distinct human leucocytic pyrogens. J Ep Med 139:1369-1381
- ⁹ Merriman CR, Pulliman LA, Kampschmidt RF (1977) Comparison of leucocytic pyrogen and leucocytic endogenous mediator. Proc Soc Exp Biol Med 154:224-227
- ¹⁰ Dinarello CA, Rosenwasser LJ (1981) Lymphocyte activating properties of human endogenous pyrogen. En Handdon J, Chedid L, Mullen D, Sprafico F (eds) Advances in immunopharmacology pp 419-425. Pergamon Press, Oxford
- ¹¹ Auron PE, Wagner SJ, Webb AC, Cannon JC, Bernheim HA, Mc Adam KJ, Rossenwasser LJ, LoPreste G, Mucco SF, Dinarello CA (1987) Studies on the molecular nature of IL-1. J Immunol 138:1447-1456
- ¹² Lomedico PT, Gubler U, Hellmann CP, Dukovich M, Giri JC, Pan YE, Collier K, Semionow R, Chua AO, Mizel SB (1984) Cloning and expression of murine interleukin-1 in *Escherichia coli*. Nature 312:458-492.
- ¹³ Furutani Y, Notake M, Fukui T, Ohue M, Nomura H, Yamada M, Nakamura S (1986) Complete nucleotide sequence of the gene for the gene for the interleukine-1. Nucleic Acids Res 14:3167-3179.
- ¹⁴ Clark BD, Cannon JG, Schindler R, Shaw AR, Dinarello CA, (1988) Transcriptional and translational expression of the rabbit IL-1 and IL-1 genes Lymphokines Res 7:274
- ¹⁵ Mosley PA, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK, (1987) The interleukine-1 receptor binds the human interleukin-1 precursor but not the interleukin-1 precursor. J Biol Chem 262:2941-2944
- ¹⁶ Jobling SA, Auron PE, Gurka G, Webb AC, Mc Donald B, Rossenwasser LJ, Gehrke L. (1988). Biological activity and receptor binding of human prointerleukin-1 and subpeptides. J. Biol. Chem 263:16732-16738
- ¹⁷ Kilian et al (1986). Interleukin-1 and bind to the same receptor on T cells. J Immunol 136:4509-4514
- ¹⁸ Antoni G, Presentini R, Perini F, Tagliabue A, Ghiara P, Censini S, Volpini G, Villa L, Bortaschi D. (1987). A short synthetic peptid fragment from human interleukin-1 with immunostimulatory but not inflammatory activity. J Immunol 137: 3201-3204
- ¹⁹ Isaacs A, Lindenmann J (1957) The interferon. Proc R Soc Lon B 147:258-267.
- ²⁰ Hauser H, (1990) En: Growth Factors, Differentiation factors and Cytokines, A Habenicht (Ed). Spinger-Verlag Berlin Heidelberg, 243-253
- ²¹ Barret James T. (1991) Inmunologia Medica, Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, Mexico D.F. pp 19-29.

- ²² Lowry PA y PJ Quesenberry. (1992). Overview of haematopoiesis. En: Haematopoietic Growth Factors. Symann M., Quesenberry P.J. y G. Morstyn (eds.). Gardiner Cadwell Communications. UK p. 9-15.
- ²³ Foster O y Landy M. (1981). Heterogeneity of mononuclear phagocytes. London, Academic Press, p-279.
- ²⁴ Ravetch JV y CL Anderson. (1990). Fc \rightarrow R family: Proteins, transcripts and genes. En: Fc receptors and the action of antibodies. Metger H. (Ed.). Am Soc Microbiol, USA. p 211-235.
- ²⁶ Rhodes J, Jones DH y NM Bleehen.. (1983). Increased expression of human monocyte HLA DR antigens and Fc receptors in response to human interferon in vivo. Clin Exp Immunol 53:739-743.
- ²⁷ Kinet JP. (1989). Antibody cell interactions: Fc-Receptors. Cell 57: 351-354.
- Lane BC, Mitchell KJ, Titchel MS y SM Cooper. (1980). Structural evidence for distinct IgG subclass-specific Fc receptors on mouse peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 152:1147-1161.
- ²⁸ Hibbs ML, Classen BJ, Walker ID, Mckenzie ID y PM Hoggart. (1988). The structure of the murine Fc receptor for IgG. J. Immunol. 140: 344-350.
- ²⁹ Lane BC, Mitchell KJ, Titchel MS y SM Cooper. (1980). Structural evidence for distinct IgG subclass-specific Fc receptors on mouse peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 152:1147-1161.
- ³⁰ Van de Winkel JGJ. y CL Anderson. (1991). Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. J. Leuk. Biol. 49: 511-524.
- ³¹ Grattage LP, McKenzie IF y PM Hoggarth. (1992). Effects of PMA, citokines and dexametasone on the expression of cell surface Fc receptors and mRNA in U937 cells. Immunol. Cell. Biol. 70: 97-105.
- ³² Mellman JJ. y JC Unkeless. (1980). Purification of a functional mouse Fc receptors through the use of a monoclonal antibody. J. Exp. Med. 152: 1048-1069.
- ³³ Flores F. (1997) Expresión diferencial del ARNm para Fc \rightarrow RI y Fc \rightarrow RII inducida por factores de crecimiento hematopoyético en las líneas de macrófagos IC21 y de monocito-macrófagos P388 de ratón. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias Biomédicas (Inmunología). México.
- ³⁴ Bangham A, Standish. M y Watking J. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol 13: 238-252.
- ³⁵ Tanford, C. (1973). The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes. John Wiley and Sons. New York, London, Sydney and Toronto.
- ³⁶ Van Rooijen N. y Sanders A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. J. Immunol. Meth 174: 83-93.
- ³⁷ Lasic D. (1996). Liposomes. Science & Medicine 6:34-43.
- ³⁸ Pagano R y Weinstein J. 1978. Interactions of liposomes with mammalian cells. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 7: 435-468.
- ³⁹ Szoka, F y Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Ann Rev Biophys Bioeng 9: 467-508.
- ⁴⁰ Papahadjopoulos, D, Vail, W, Jacobson, K y Poste, G. 1975. Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. Biochem. Biophys. Acta 394: 483-491
- ⁴¹ Deamer D. y Banham A. (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method. Biochem Biophys Acta 443: 629-634.
- ⁴² Szoka, F y Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4194-4198.
- ⁴³ USP XXIII. (1995). United States Pharmacopeial Convention Inc., Washington, D.C., 1982-1983
- ⁴⁴ Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, (1991); SSA; Manual de Validación de Métodos analíticos; México, D.F; 6-35
- ⁴⁵ Santiago E, Mendoza JF, Corona T, López R, Flores F y Weiss Steider B (1993) Induction of Fc Receptors on murine macrophages and leukemic cells by interleukin 1; Europe Citokine Network 4: 223-228
- ⁴⁶ Mendoza JF (1993) Evidencia de que G-CSF es un factor de crecimiento de fibroblastos que induce la maduración de los granulocitos y que los macrófagos producen moléculas de 45 KD con estas actividades
- ⁴⁷ Duserre N, Lessard C, Paquette N, Perron Poulin L, Tremblay M, Beauchamp D, Ericson S.G., Benoit E.N. (1994) The effect of recombinant human interleukin-3 and recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor on Fc \rightarrow R expression and antibody-dependent cellular cytotoxicity of hematopoietic progenitor cells during *in vitro* myeloid maduratio. Exp. Hematol. 22:283
- ⁴⁸ Dinarello CA (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism Blood 77:1627

⁴⁹ Zambrano S.A. (1993) Inmunología, Ed. Interamericana Mc Graw Hill, México.

⁵⁰ Bach J.F. (1984) Inmunología, Ed Limusa, México.