



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Evaluación de la exposición del receptor opioide δ
(DOR) en la membrana plasmática de linfocitos
estimulados con liposomas que contienen PIP₂**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Axel García Cruz

Director: Dra. María Teresa Corona Ortega

Asesor: Dr. Benny Weiss Steider



Ciudad de México, Diciembre 2017



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL L-4, LABORATORIO DE ONCOLOGÍA CELULAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER, UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA CON EL APOYO DEL PROYECTO PAPIIT IN219315.

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	4
• Membrana celular	4
• Fosfatidilinositol (PI)	4
▪ Tráfico vesicular regulado por fosfoinosítidos	8
• Receptor opioide- δ (DOR)	10
• Sistema inmune	13
▪ Hematopoyesis	13
▪ Inmunidad innata	15
▪ Inmunidad adaptativa	15
• Linfocitos	16
▪ Células NK	16
▪ Linfocitos B	17
▪ Linfocitos T	17
• Anticuerpos	19
• Línea celular HepG2	21
• Línea celular Reh	21
• Liposomas	22
▪ Potencial Z	24
• Citometría de flujo	25
▪ Marcación de células con anticuerpos fluorescentes	26
▪ Anticuerpo contra receptor de opioides delta: Anti- δ_1 -Opioid Receptor (OPRD1)	28
▪ Anticuerpo secundario de fluorescencia: Anti-Rabbit IgG (whole molecule) FITC	29
• Dispersión de luz dinámica (DLS)	29
Planteamiento del problema	32

Hipótesis	33
Objetivos	34
Material y métodos	35
• Cultivo de la línea celular de referencia HepG2	37
• Desarrollo de la técnica de citometría de flujo y titulación del anticuerpo	37
• Extracción de linfocitos de sangre periférica	38
• Adecuación de la técnica para evaluación de DOR en membrana	39
• Preparación de liposomas catiónicos con PIP ₂	40
• Evaluación de tamaño y potencial Z de liposomas por DLS	41
Diseño experimental	42
Resultados	43
• Fabricación de liposomas	43
• Titulación del anticuerpo OPRD-1	49
• Expresión del DOR en linfocitos	53
• Expresión del DOR en la línea celular Reh	58
• Expresión del DOR en HepG2	62
Discusión de resultados	66
Conclusiones	72
Referencias	73

ABREVIATURAS

°C	<i>Grados Celsius</i>
AMP	<i>Adenosín monofosfato</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)</i>
CAPS	<i>Ca²⁺-dependent activator protein for secretion (proteína activadora para secreción dependiente de calcio)</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation (cúmulo de diferenciación)</i>
cm ²	<i>Centímetros cuadrados</i>
CO ₂	<i>Dióxido de carbono</i>
CTL	<i>Célula T citotóxica</i>
Da	<i>Dalton</i>
DAG	<i>Diacilglicerol</i>
DCV	<i>Dense Core Vesicles (vesículas de núcleo denso)</i>
DLS	<i>Dinamic Light Scattering (dispersión de luz dinámica)</i>
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)</i>
DOR	<i>Receptor δ opioide</i>
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1 (antígeno endosomal específico 1)</i>
ENTH	<i>Epsin N-terminal homology (homólogo a la epsina N-terminal)</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding (fragmento de unión a antígeno)</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable (fragmento cristizable)</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína)</i>
FSC	<i>Forward scatter (dispersión frontal)</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor (receptor acoplado a proteína G)</i>
hERG	<i>human Ether-a-go-go-Related Gene (gen humano ether-a-go-go)</i>
Ig	<i>Inmunoglobulina</i>
IP ₃	<i>Inositol 1,4,5-fosfato</i>
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin (hemocianina de lapa californiana)</i>
KOR	<i>Receptor κ opioide</i>
LIP-PI	<i>Liposomas con fosfatidilinositol 4,5-difosfato</i>
LIP-VAC	<i>Liposomas vacíos</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein (proteína activada por mitógenos)</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex (complejo mayor de histocompatibilidad)</i>
mL	<i>mililitros</i>
μ L	<i>microlitros</i>
MOR	<i>Receptor μ opioide</i>

NK	<i>Natural Killer cell (célula asesina natural)</i>
OPRD-1	<i>Anti-receptor de opioides δ 1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline (solución salina amortiguadora de fosfatos)</i>
PH	<i>Pleckstrin Homology (homólogo de pleckstrina)</i>
PI	<i>Fosfatidilinositol</i>
PI3K	<i>Fosfatidilinositol 3 cinasa</i>
PI(3)P	<i>Fosfatidilinositol 3-fosfato</i>
PI(3,4)P ₂	<i>Fosfatidilinositol 3,4-difosfato</i>
PI(3,4,5)P ₃	<i>Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato</i>
PI(3,5)P ₂	<i>Fosfatidilinositol 3,5-difosfato</i>
PI(4)P	<i>Fosfatidilinositol 4-fosfato</i>
PI(4,5)P ₂ /PIP ₂	<i>Fosfatidilinositol 4,5-difosfato</i>
PI(5)P	<i>Fosfatidilinositol 5-fosfato</i>
PI-L	<i>Fosfatidilinositol 4,5-difosfato libre</i>
PLC	<i>Fosfolipasa C</i>
PMAP	<i>Patrones Moleculares Asociados a Patógenos</i>
PRR	<i>Receptores de reconocimiento de patrones</i>
PX	<i>Fagocito oxidasa</i>
rpm	<i>Revoluciones por minuto</i>
SCAMP	<i>Secretory Carrier Membrane Proteins (proteína de membrana secretora asociada a transportador)</i>
SCN	<i>Sistema Nervioso Central</i>
SFB	<i>Suero Fetal de Bovino</i>
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein Receptor (receptor de proteínas de fijación soluble de NSF)</i>
SSC	<i>Side scatter (dispersión lateral)</i>
SYNJ1	<i>Sinaptotagmina 1</i>
SYNJ2	<i>Sinaptotagmina 2</i>
SV	<i>Synaptic Vesicle (vesícula sináptica)</i>
T _C	<i>Linfocito T citotóxico</i>
T _H	<i>Linfocito T cooperador</i>
T _{reg}	<i>Linfocito T regulador</i>
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein 2 (proteína de membrana asociada a vesículas)</i>

RESUMEN

El fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂) es un lípido de gran importancia en diferentes procesos fisiológicos; está implicado en la activación de vías de señalización para la remodelación citoesquelética, el tráfico vesicular y la moderación de la función de canales iónicos y transportadores.

Los liposomas, por otro lado, son nanovesículas lipídicas que permiten el acarreo y transporte de distintas moléculas a blancos celulares específicos, mejorando la eficacia en su actividad y reduciendo los efectos adversos o tóxicos que producen.

El equipo de trabajo del laboratorio 4 de la UMIEZ ha llevado a cabo investigaciones sobre células de naturaleza linfoide y de diversos tipos de carcinoma, como hepático y de cérvix, encontrando que la estimulación aplicada con un nanoliposoma que contiene al PIP₂ promueve la movilización y expresión de diferentes tipos de receptores de membrana.

En el presente trabajo se realizó la evaluación de este efecto promotor en la exposición de receptores sobre células del sistema inmune al aplicar el estímulo con el liposoma desarrollado para exponer el receptor opioide δ (DOR), el cual está presente en linfocitos en bajas densidades y su expresión es llevada a cabo mediante vías de secreción constitutivas en microvesículas y vías de secreción reguladas en vesículas de núcleo denso (DCV).

Aunado a esto, se desarrolló una técnica para la evaluación de receptores por citometría de flujo utilizando un anticuerpo dirigido contra receptores de opioides de manera selectiva y un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo ya que la evaluación de estos receptores se hace comúnmente midiendo la expresión de los mensajeros o cuantificando la proteína total de extractos para western blot y por inmunohistoquímica.

Se evaluó la expresión basal del receptor en células linfoides extraídas de sangre periférica y de la línea celular Reh de carcinoma linfático, la cual después se comparó con la expresión obtenida al aplicar un estímulo con liposomas, observando aumento en la fluorescencia emitida de hasta el 90% lo que es un indicio de incremento en la expresión del receptor para ambos tipos celulares. Se observó también que el liposoma juega un papel importante en la realización del efecto por parte del PIP₂, puesto que este lípido presentó mayor exposición del receptor en la membrana al estimular con liposomas que de forma libre en donde la fluorescencia fue sólo del 5% más en comparación con la expresión basal.

Con lo anterior se determinó la importancia del PIP₂ en el tráfico vesicular y la exposición de receptores a través de una técnica sensible y eficaz como la citometría de flujo, lo que provee las bases para la profundización en el estudio del DOR, como su función y expresión, en linfocitos y otras líneas celulares.

INTRODUCCIÓN

La membrana celular está compuesta por una bicapa lipídica que permite el aislamiento de las células del medio en el que se encuentran, sin embargo, tiene funciones más diversas y complejas pues de vital importancia para el correcto funcionamiento de las células. La membrana contiene moléculas proteicas dispuestas a través de ella que facilitan la permeabilidad de esta barrera biológica; éstas existen en forma de poros (*canales*) o proteínas más complejas conocidas como *transportadores*; estas son altamente selectivas y permiten el transporte transmembranal selectivo de sustancias indispensables para la célula. Entre las proteínas que se encuentran en la membrana también existen receptores que al activarse por su ligando traducen señales al interior de la célula para realizar diversas funciones y éste es el mecanismo principal que permite a las células comunicarse.

Existe gran variedad de lípidos con diversas propiedades que conforman a la membrana celular, estas propiedades les permiten participar diferencialmente en múltiples funciones; dentro de estos se encuentran los lípidos que poseen inositol, principalmente fosfatidilinositol (PI) al cual se le han asociado importantes acciones reguladoras a pesar de representar menos del 10% del total de lípidos de la membrana.

Uno tipo de PI es el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP_2) que está presente únicamente en la membrana celular y que ha demostrado importante actividad al unirse a receptores de fosfolípidos, resultando en la estimulación de la vía del inositol, movilizando el calcio intracelular e influenciando así el comportamiento de la célula. Así, el PIP_2 es capaz de mediar diferentes eventos intracelulares entre los que se destaca el tráfico vesicular y remodelación del citoesqueleto.

Por otro lado, el receptor de opioides δ (DOR) es un receptor del tipo acoplado a proteína G que se encuentra principalmente en las células del sistema nervioso central (SNC) y está relacionado con mecanismos mediadores del dolor y adicciones. Al igual que otros receptores, el DOR se expresa en la membrana celular, sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de estos receptores se encuentran al interior de las células en vesículas y sólo se exponen en respuesta a un estímulo. Así mismo, el DOR también se expresa en células de sistema inmune de tipo linfocito y aunque no está bien descrita su función en estas células, se sabe que los opioides actúan como moduladores inmunes, modificando respuestas a estímulos extracelulares, ya sean mitógenos, antígenos y anticuerpos que se ligan al receptor de células T.

El grupo de trabajo del laboratorio 4 de la UMIEZ ha desarrollado un nanoliposoma que tiene en su composición PIP_2 en concentración de orden picomolar y que ha mostrado inducir la expresión de diversos receptores en leucocitos normales y en líneas celulares epiteliales y linfocíticas.

Los liposomas son vesículas fosfolipídicas nanométricas que poseen una o más membranas en forma de bicapas lipídicas/fosfolipídicas y que ofrecen la posibilidad de incorporar diferentes moléculas en su estructura, esto con el fin de hacer más selectiva la administración de un fármaco, proteína o lípido a un blanco específico, favoreciendo así el efecto terapéutico deseado y disminuyendo los efectos adversos o tóxicos producidos por los mismos.

De esta manera se utilizó el nanoliposoma con PIP_2 (LIP-PI) desarrollado para dirigir este lípido a células linfocíticas aisladas y emplearlo en forma de indicador o modelo para determinar el efecto de promoción de la aparición en la superficie celular de receptores opioides. Esto ofrece la posibilidad de relacionar al LIP-PI con actividad sobre las células para exponer receptores opioides que puedan encontrarse al interior de la membrana a la superficie y explorar de esta manera una posible aplicación o uso de dichos receptores para efecto diagnóstico o de tratamiento de las diversas patologías y funciones en las que se ven implicados.

MARCO TEÓRICO

- Membrana celular

La membrana celular es una capa semipermeable cuya principal función es delimitar y aislar a la célula. Está compuesta por una bicapa de fosfolípidos, los cuales representan su base estructural. Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que están en contacto con un medio acuoso al interior y al exterior de la célula de manera que se organizan para formar la bicapa lipídica de la membrana ^{1,2}.

Hay más de mil clases de fosfolípidos que se encuentran en las membranas de las células eucarióticas, los cuales varían en su distribución de un tipo celular a otro y de un organelo a otro ².

La membrana celular contiene moléculas proteicas a través de ella que la hacen permeable, estas proteínas actúan en forma de canales que permiten a la célula el transporte selectivo de iones, solutos y otras moléculas a través de la membrana, el cual se puede llevar a cabo de forma pasiva o activa ¹⁻³.

Existen diferentes tipos de proteínas transmembranales que van a permitir el intercambio de sustancias, entre las que se encuentran los transportadores activos (bombas de iones y acarreadores de solutos), canales de agua (acuaporinas) y canales iónicos (o poros); éstos últimos facilitan un transporte pasivo, altamente selectivo y rápido de iones (por ejemplo, de decenas de miles de iones por segundo por canal) respondiendo a un gradiente electroquímico a través de la membrana que permite a las células comunicarse en milisegundos ³.

Los transportadores, canales y bombas se encargan de los iones y moléculas que cubren un amplio rango de los procesos biológicos que son esenciales para el funcionamiento y comunicación intercelular ³.

Se ha descubierto que existe una interferencia e incluso una interacción física entre las distintas proteínas que conforman canales iónicos y transportadores dando lugar a lo que se ha descrito como complejos “canportadores” ³.

- Fosfatidilinositol (PI)

El fosfatidilinositol es un glicerofosfolípido presente en las membranas celulares que contiene inositol unido mediante un enlace di-éster fosfato en la posición D1 (figura 1) y es el más abundante de los lípidos del inositol presente en las membranas de las células eucarióticas. Es un componente escaso ya que representa únicamente el 10% de los lípidos de las membranas ^{4,5}.

Del fosfatidilinositol derivan unos compuestos conocidos como fosfoinosítidos, los cuales son intermediarios fosforilados formados a partir de una fosforilación reversible en alguno o algunos de los tres grupos hidroxilo del PI, los cuales desempeñan una importante función en una amplia variedad de procesos biológicos ^{6,7}.

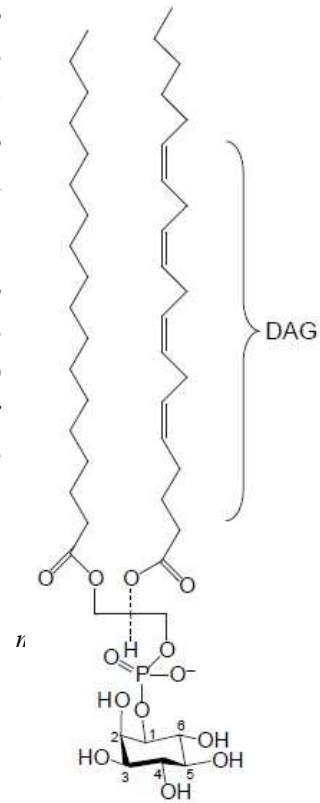
Hay siete diferentes especies de fosfoinosítidos los cuales se encuentran entre las moléculas más versátiles conocidas, todas son moléculas activas que llevan a cabo una amplia variedad de funciones de regulación celular además de servir como intermediarios para la síntesis de otras especies fosforiladas ⁵⁻⁸.

Ya que diversas funciones celulares, incluyendo transducción de señales, división y migración celular, endocitosis y exocitosis son controladas en las membranas celulares, los fosfoinosítidos que se encuentran en aquí desempeñan una función clave en la regulación de estos procesos mediante la reclusión reversible de diversas proteínas citosólicas y complejos proteicos a puntos específicos de éstas ^{8,9}.

Los diferentes tipos de fosfoinosítidos se distribuyen en diversos dominios en las membranas y mediante GTP-asas y PI-cinasas se inter convierten en sus diferentes especies contribuyendo cada una en gran medida al mantenimiento de la identidad de las membranas y al funcionamiento celular ⁸.

Se ha determinado, mediante marcajes, la principal distribución de algunos de los fosfoinosítidos importantes en las funciones celulares en las distintas membranas; en particular el fosfatidilinositol 4-fosfato [PI(4)P] que es un lípido clave del aparato de Golgi, el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂) y el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato [PI(3,4,5)P₃] en la membrana plasmática y el fosfatidilinositol 3 fosfato [PI(3)P] presente como un lípido de endosomas y autofagosomas (figura 2) ⁸.

De estos fosfoinosítidos, el PIP₂ es uno de los más comunes y abundantes pese a que este representa menos del 10% de los lípidos del PI y tan solo el 0.5-1% del total de los lípidos presentes en la membrana celular, se encuentra principalmente en la parte interna de la membrana y ha mostrado ejercer papeles importantes en el reclutamiento de proteínas en la membrana ^{9,10}.



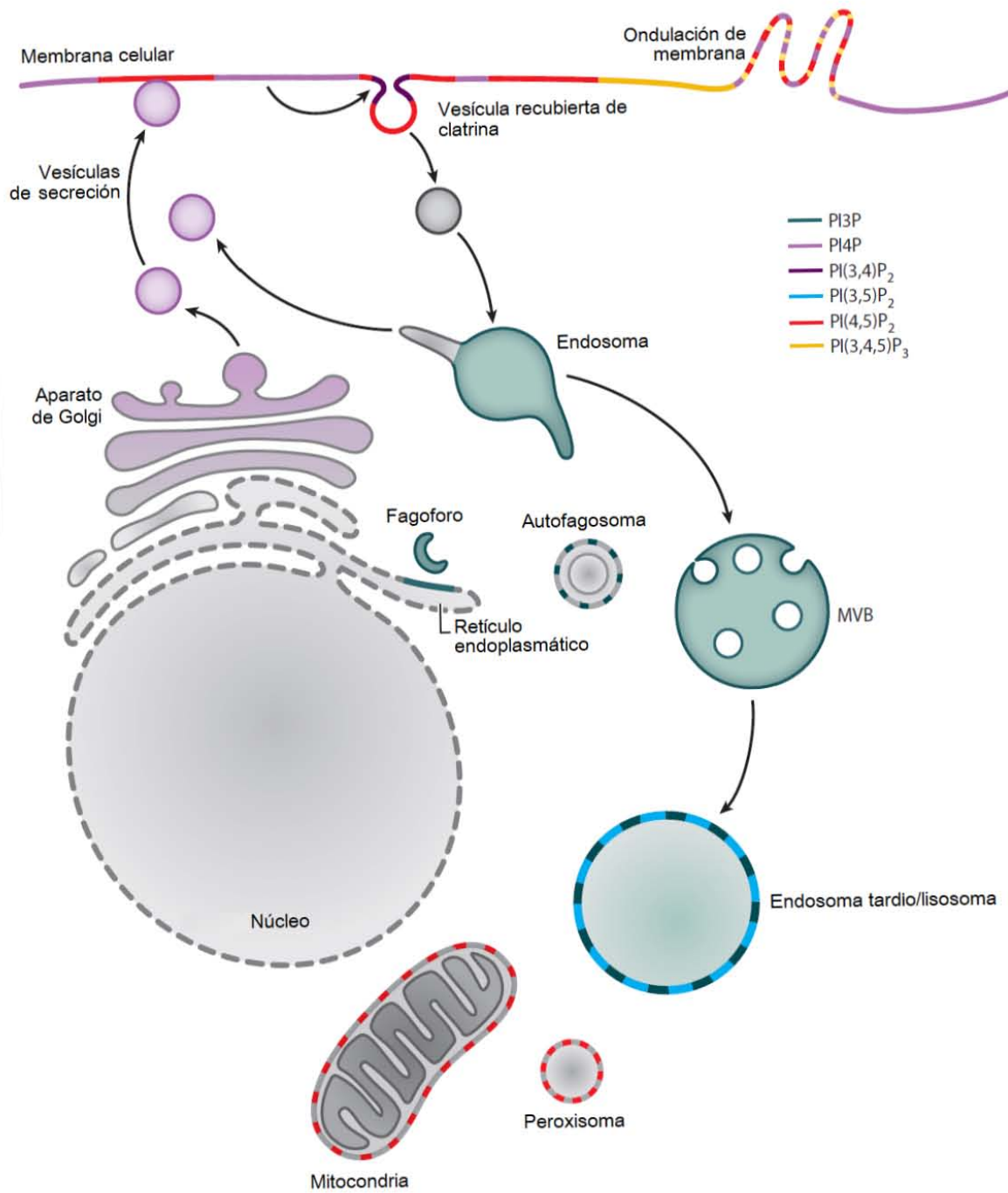


Figura 2. Distribución principal en membranas celulares de los fosfoinosítidos, (fosfatidilinositol 5 fosfato [PI(5)P] es omitido debido a falta de datos). Se muestra solo las principales zonas donde abundan en células eucarióticas, no se muestran las zonas de menor localización. Tomado de Schink KO, Tan k, Stenmark H. Phosphoinositides in control of membrane dynamics. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2016;32(1): 147⁸.

En un principio el PIP₂ fue identificado como un importante precursor de moléculas de señalización denominadas mensajeros secundarios, los cuales son producidos y liberados al interior de la célula en respuesta a diversos estímulos externos ^{2, 10}. La hidrólisis del PIP₂ por acción de la fosfolipasa C (PLC) forma diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) que están implicados en la generación de señales de calcio, formación de adenosín monofosfato (AMP) cíclico y producción de prostaglandinas ^{2,10,11}.

Actualmente, se ha descubierto que el PIP₂ participa de manera crucial en una variedad de funciones adicionales y es importante no solo como generador de segundos mensajeros sino como regulador de procesos biológicos por sí mismo (figura 3), como son reorganización citoesquelética ⁹, deformación, fusión y fisión de la membrana ¹²⁻¹⁶, tráfico y movimiento vesicular ^{6,12,14}, regulación de canales y transportadores ^{5,13,15}, fagocitosis ^{13,17} y endocitosis ^{12,18,19}.

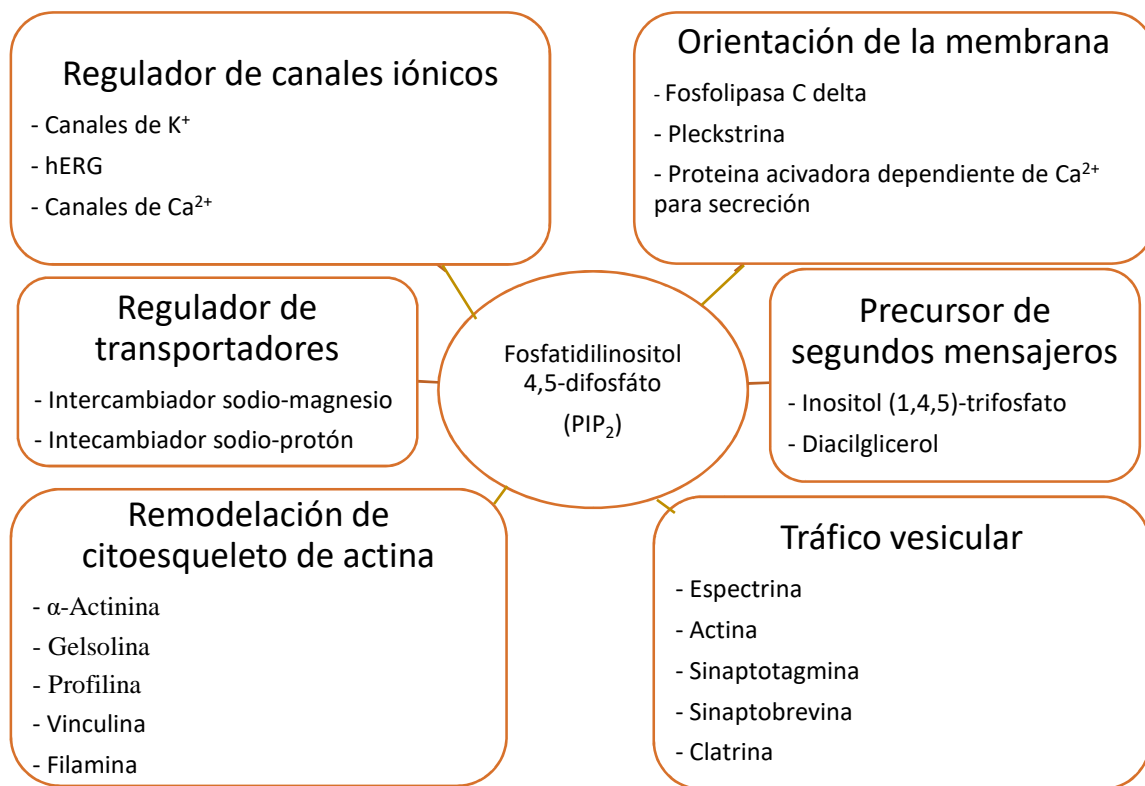


Figura 3. Algunas funciones celulares del PI(4,5)P₂ la membrana. PIP₂ regula la actividad de varios canales iónicos y transportadores, la organización del citoesqueleto de actina, las activación y localización de proteínas involucradas en el tráfico vesicular y el reclutamiento de ciertas proteínas específicas del citoplasma a la membrana. Tomado de Suh B, Hille B. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bifosfato. Curr Opin Neurobiol. 2005;15(3): 372 ¹⁵.

Debido a que cientos de proteínas tienen dominios que reconocen fosfoinosítidos específicos, la concentración de éstos cambia constantemente y las cantidades presentes en la membrana alteran seriamente las actividades celulares, incluso puede llegar a funcionar de forma incorrecta si se encuentran deficientes ^{4,14}. Algunos de los dominios efectores sobre los cuales actúan los fosfoinosítidos incluyen el homólogo de pleckstrina (PH), fagocito oxidasa (PX), homólogo a la epsina N-terminal (ENTH) y dominios Fab1p, YOTB, Vac1p y EEA1 (FYVE) ⁵.

En la regulación del tráfico de vesículas sinápticas, el PIP₂ ha demostrado ser esencial y para la exocitosis de vesículas de núcleo denso (DCV) es primordialmente requerido para el '*priming*', un paso posterior al acoplamiento de las vesículas a la membrana y que precede a la fusión disparada por Ca²⁺ ^{8,13}.

- Tráfico vesicular regulado por fosfoinosítidos

El transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático hasta la membrana ocurre en diferentes pasos; primero se forma una vesícula transportadora a la salida del retículo para ser llevada al aparato de Golgi, aquí, el cargamento es ordenado y se forman las vesículas de secreción que serán transportadas a la membrana. Aquí el PI(4)P y el PIP₂ juegan un papel crucial durante el proceso de formación, transporte y exocitosis de las vesículas ^{8,13,18}. Las vesículas son transportadas por la proteína Myo2 del motor de miosina V a través de filamentos de actina hacia el sitio de exocitosis, durante su trayecto, las vesículas van adquiriendo las proteínas necesarias del complejo exocítico. Este proceso de reclusión es regulado por el PI(4)P. Cuando la vesícula lleva a la membrana plasmática, los componentes adicionales del complejo exocítico son ensamblados para anclar la vesícula a la membrana en el sitio de expulsión; éste sitio es determinado por una variedad de proteínas y lípidos, principalmente el PIP₂, donde actúa como un lípido activador de proteínas en la membrana, que es la maquinaria necesaria para el anclaje y expulsión de las vesículas ^{8,13}.

Se han identificado ciertos complejos proteicos activados por el PIP₂ como el receptor de proteína de fijación soluble NSF (SNARE), proteína de membrana 2 asociado a vesículas (VAMP-2), proteína de membrana 2 de secreción asociada a acarreador (SCAMP2), sinaptotagmina, sinaptojanina 1 y 2 (SYNJ1, SYNJ2) entre otras ^{6,9,13} que están involucrados en el tráfico vesicular y que alteran su actividad en función de la concentración en la membrana del PIP₂ ¹³⁻¹⁵ (figura 4).

Debido a que la principal función del PIP₂ es el reclutamiento y activación de estas proteínas en la membrana, la regulación de la exocitosis vesicular depende de la concentración en la membrana de este fosfoinosítido. Diversos estudios han demostrado que la distribución en la membrana de este lípido es irregular y que éste se encuentra en microdominios con concentración correspondiente de

aproximadamente 6% molar, aunque no se ha demostrado a qué se debe esto
13,16,20.

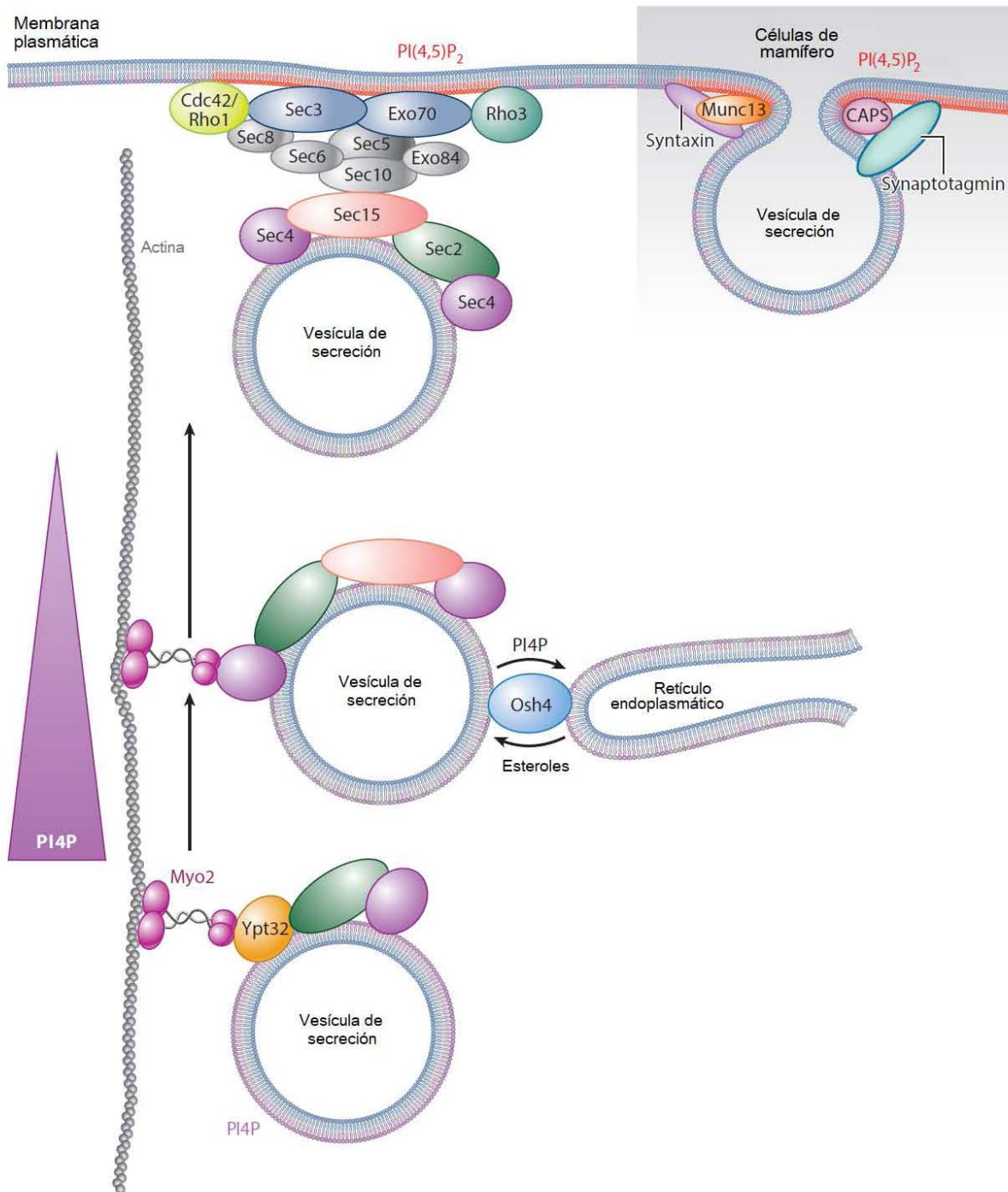


Figura 4. Exocitosis vesicular regulada principalmente por PI(4)P y PIP₂ y las proteínas que son reclutadas como parte de la maquinaria necesaria para llevar a cabo el anclaje y la expulsión. Tomado de Schink KO, Tan k, Stenmark H. Phosphoinositides in control of membrane dynamics. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2016;32(1): 149

Adicionalmente se ha sugerido que los sitios en la membrana favorables para la exocitosis vesicular están enriquecidos en PIP_2 (figura 5) el cual podría contribuir a la fusión de la membrana por medio de diversos mecanismos ¹³⁻¹⁵.

Aunque aún no está claro cuál de todas las vías activadas por PIP_2 y sus proteínas son esenciales para el tráfico vesicular, este lípido a ciertas concentraciones en microdominios intrínsecamente sirve como factor indispensable para mediar el reclutamiento y activación de proteínas que promueven la fusión de la membrana ¹⁶.

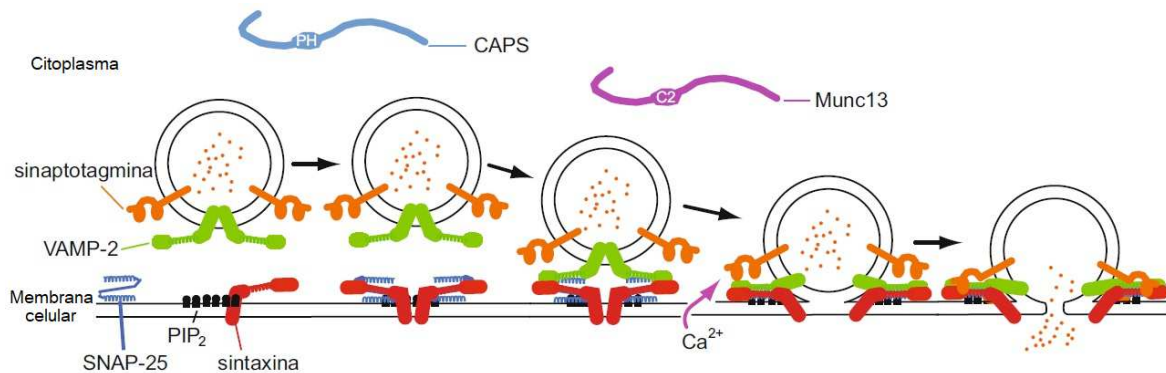


Figura 5. Pasos secuenciales de 'priming' y fusión activados por Ca^{2+} para exocitosis vesicular mediada por PIP_2 . Se muestra una formación hipotética del complejo SNARE que involucra SNAP-25 de la membrana y sintaxina y VAMP-2 de la vesícula. La sintaxina interactúa con el PIP_2 en los microdominios de la membrana con una segregación progresiva del lípido al sitio de fusión. Las proteínas CAPS y Munc13 se unen al PIP_2 lo que medía el reclutamiento de estas proteínas al sitio de fusión para promover la formación del complejo SNARE. La sinaptotagmina dispara la fusión mediante su interacción con el SNARE y la membrana sobre la unión de Ca^{2+} . Tomado de Martin T, Balla T, Wymann M, et al. Role of PI(4,5)P₂ in vesicle exocytosis and membrane fusion. In: Balla T, Wymann M, York J, editors. Phosphoinositides II: The diverse biological functions. New York: Springer; 2012: P. 113 ¹³.

- Receptor opioide- δ (DOR)

El receptor opioide delta (DOR) es un receptor del tipo acoplado a proteína G (GPCR) y miembro clave dentro de la superfamilia de receptores opioides, es expresado principalmente en el sistema nervioso central (SNC) y su función está implicada en la regulación del mismo sistema nervioso y el control del dolor ²¹.

Los GPCR se integran en siete dominios heptahelicoidales α ²² transmembranales y constituyen la tercera familia más grande de genes y regulan una gran cantidad de funciones fisiológicas, principalmente en el SNC. Toda la familia de receptores opioides pertenece a este tipo de GPCR y su activación promueve la transducción de señales al interior de las células por medio de diferentes vías para realizar sus funciones reguladoras ^{21,23,24}.

Generalmente se ha descrito a las GPCR como moléculas presentes únicamente en membrana plasmática, se encuentran en forma de complejos pre-ensamblados con receptores específicos que son activados una vez en la membrana; sin embargo, estudios farmacológicos y de marcaje inmunológico con oro han revelado que el DOR se encuentra localizado principalmente en el citoplasma de las células bajo condiciones normales, esto sugiere que el DOR es una de las pocas GPCR que son enviadas a la membrana por medio de vías de secreción reguladas, aunque esto no supone que se descarte su expulsión por otra vía ²⁵⁻²⁷.

En general, los receptores recién sintetizados son procesados en el complejo de Golgi y armados en múltiples microvesículas en la vía de secreción constitutiva para ser transportados a la membrana plasmática, mientras que receptores, polipéptidos de secreción y algunas proteínas son recolectadas en DCV para ser almacenadas en el citoplasma y ser liberadas a la membrana en respuesta a un estímulo que incrementa los niveles intracelulares de Ca^{2+} (figura 6). Algunos estudios con anticuerpos específicos han mostrado que el DOR está localizado principalmente al interior de la célula y está comúnmente relacionado precisamente con las DCV ²⁸.

Se ha demostrado que sólo pocos receptores de este tipo se encuentran en la membrana; el DOR está internamente y localizado cerca de la misma, listo para ser liberado rápida y fácilmente; estímulos como la despolarización de la membrana, tratamiento con capsaicina e interacción prolongada con análogos opioides pueden inducir una expresión de DOR en la membrana por secreción de vía constitutiva o regulada. La remodelación del citoesqueleto, particularmente de los filamentos de actina, forman la red por la cual las proteínas son movilizadas, lo que permite al complejo de Golgi transportar las nuevas proteínas sintetizadas ^{25,28}.

Cabe resaltar que existen tres clases de receptores opioides (MOR, KOR Y DOR), y adicionalmente, estudios farmacológicos sugieren la posible existencia de al menos dos subtipos de cada receptor, aunque lo anterior no es ampliamente aceptado, existen eventos subyacentes como la heterodimerización en la membrana, donde los receptores opioides pueden formar homodímeros y heterodímeros. La dimerización suele alterar las propiedades farmacológicas de los receptores respectivos, por ejemplo, DOR forma heterodímeros con MOR y KOR. Así, los heterodímeros MOR-DOR y DOR-KOR muestran menos afinidad para los agonistas muy selectivos ²⁴.

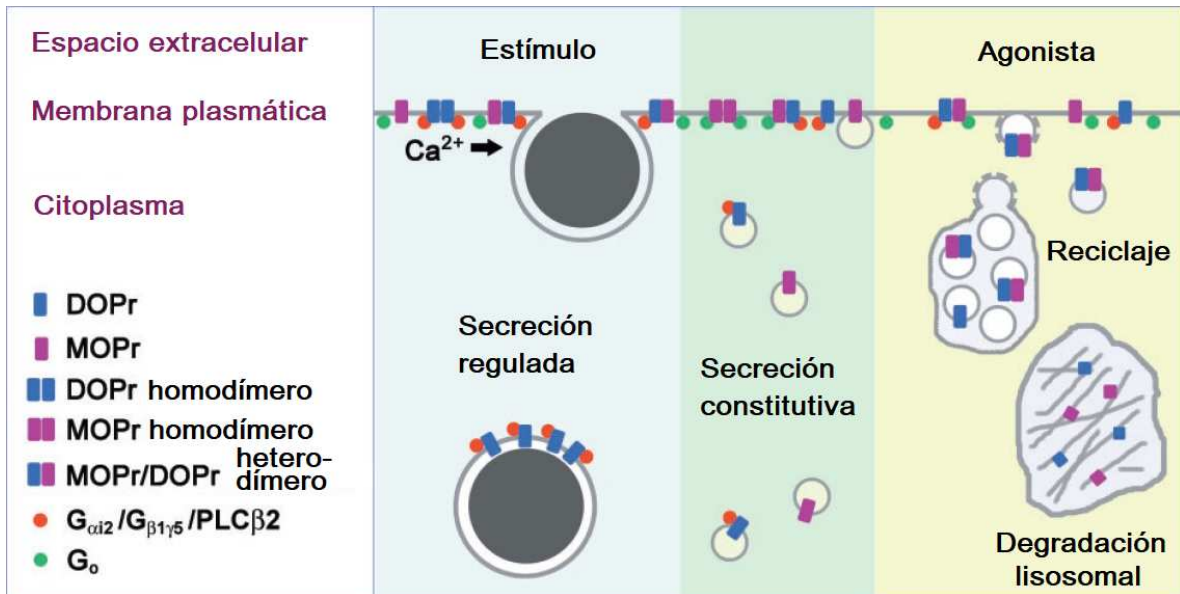


Figura 6. Translocación intracelular de los DOR y moléculas de señalización relacionadas en neuronas nociceptivas aferentes. Los complejos pre-ensamblados de DOR en DCV llevados a la membrana en respuesta a un incremento en la entrada de Ca^{2+} . El receptor o complejo de proteína G también puede estar asociado a microvesículas en la vía de secreción constitutiva. En la membrana el receptor puede interaccionar con receptores opioides μ (MOR) los cuales interaccionan con moléculas de señalización durante el tratamiento con agonistas opioides. Posterior al tratamiento con agonistas, los heterómeros de receptores son internalizados para ser degradados por lisosomas o reciclados en la membrana. Tomado de Zhang X, Bao L, Li S. Opioid receptor trafficking and interaction in nociceptors. *Br J Pharmacol.* 2015;172(2): 369²⁸.

Las proteínas de los DOR están ampliamente distribuidas en todo el cuerpo, principalmente en SNC, encontrado en altas concentraciones en el bulbo olfatorio, córtex, estriado y la amígdala. A lo largo de las vías del dolor, se encuentra en terminaciones nerviosas periféricas, neuronas de ganglios de la raíz dorsal y materia gris de médula espinal, así como núcleo parabraquial, hipotálamo, tálamo, área gris periacueductal y medula rastrorventral^{20,24}. Cabe hacer notar que se ha demostrado su presencia en células de tipo no neuronal, activando cascadas de señalización para regular la función de los canales iónicos y las vías como la cascada de las MAP cinasas y fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)²⁵.

Estudios han informado la presencia de DOR en células involucradas en la respuesta inmune. Se ha demostrado la expresión de transcritos de los tres tipos de receptores opioides además de la evidencia de la expresión en la superficie celular de receptores DOR y MOR²⁹⁻³¹.

La expresión en bajas densidades de DOR en una limitada población de células linfoides B y T en humanos ha sido comprobada mediante estudios de citometría de flujo y de unión a radioligandos, estos receptores en células del sistema inmune

son comúnmente los mismos o muy similares a los receptores opioides de tipo neuronal ²⁹⁻³¹.

- Sistema inmune

Se denomina sistema inmune a las células y moléculas encargadas de protegernos contra agentes infecciosos que ingresen al organismo. Cuando un microorganismo, toxina u otro agente dañino entra en algún tejido se activa la respuesta inmune, sin embargo, ésta se puede desencadenar debido a una sustancia externa sin que sea necesariamente infecciosa, así se dice que el sistema inmune distingue entre lo propio y lo ajeno. De manera general el sistema se divide en dos tipos: inmunidad innata e inmunidad adaptativa o adquirida; las que a su vez cuentan con dos tipos de respuestas inmunes clasificadas de acuerdo a su naturaleza, la inmunidad humoral y la inmunidad celular ³²⁻³⁵.

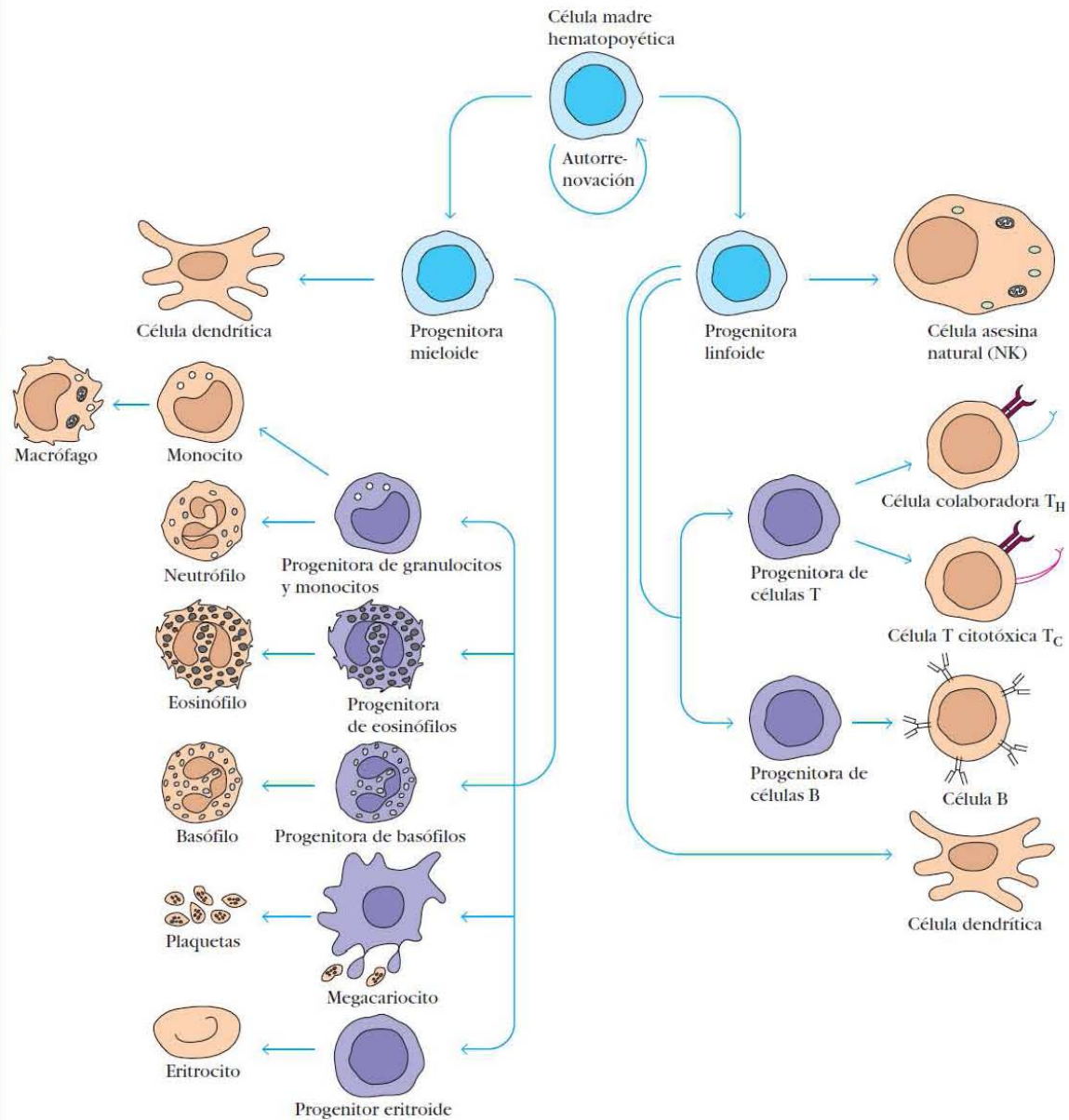
La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra infecciones y consta de mecanismos de resistencia que se presentan comúnmente antes del inicio de la infección y son inespecíficos. La inmunidad adaptativa, por su lado, consta de mecanismos más especializados en los cuales un agente patógeno es diferenciado de manera específica y la defensa contra éste aumenta conforme se tienen más exposiciones al mismo agente, además genera una respuesta de memoria y es capaz de generar defensa con un gran número de receptores que surgen por recombinación genética ^{34,35}.

La inmunidad innata y adaptativa no ejercen su función de manera independiente a pesar de llevarse a cabo por mecanismos distintos, de hecho, son interdependientes y cooperan para defender el organismo a través de sustancias reguladoras de la respuesta inmune que activan la función de las diferentes células efectoras, incrementando así la inmunorreactividad ³⁴.

- Hematopoyesis

Las células del sistema inmune se originan, al igual que todas las células de la sangre, en la médula ósea en un proceso llamado hematopoyesis, en el cual, a partir de unas células denominadas células primordiales hematopoyéticas pluripotenciales, se originan otras células primordiales con menos potencial de desarrollo y que son las progenitoras inmediatas de eritrocitos, plaquetas y leucocitos, las cuales se dividen en dos líneas, mieloide y linfoide; algunas de éstas células se van a desarrollar y madurar en la misma médula ósea, y después migran a diferentes sitios, tejidos, al torrente sanguíneo o a las diversas zonas del sistema linfático, como vasos o ganglios ³⁴ (figura 7).

Hematopoyesis



Las células madre hematopoyéticas, que se autorrenuevan, dan origen a progenitoras linfoides y mieloides. Todas las células lin-

foides descienden de células progenitoras linfoides, y todas las células de linaje mieloide provienen de progenitoras mieloides.

Figura 7. Proceso de hematopoyesis (o cascada hematopoyética) llevado a cabo en la médula ósea y diferenciación de las diferentes células progenitoras de líneas celulares sanguíneas. Tomado de Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby*, 6ta ed. McGraw-Hill Interamericana. México 2007. P. 25³⁴.

- Inmunidad innata

En la inmunidad innata participan muchos tipos celulares distintos, las células principalmente implicadas son los neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y las células NK o asesinas naturales. La mayoría de las células que participan en este tipo de inmunidad son las provenientes de la línea leucocitaria mieloide y su función la llevan a cabo mediante receptores comunes contra los agentes patógenos, induciendo así la fagocitosis y la formación de las diferentes moléculas mediadoras de la respuesta inmune, conocidas como inmunidad humoral ^{32,34,35}.

Los mecanismos humorales de la inmunidad innata los constituyen una variedad de moléculas solubles, así como receptores de membrana; entre ellas se encuentran péptidos antimicrobianos como defensinas y catelicidinas, los interferones, las proteínas del complemento, proteína C reactiva, los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), receptores de reconocimiento de patrones (PRR), etc. ^{32,34}.

- Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa es capaz de reconocer y eliminar microorganismos y moléculas extrañas de manera altamente selectiva ya que, a diferencia de la inmunidad innata, las reacciones de la inmunidad adaptativa no son iguales en todos los individuos de una especie, sino que varían en respuesta a antígenos específicos en cada individuo. Sus cuatro atributos característicos son: especificidad, diversidad, memoria y reconocimiento propio ^{34,35}.

Así, la inmunidad adaptativa es la defensa que actúa cuando un agente extraño logra evadir la inmunidad innata y es capaz de montar una repuesta inmune más rápida y eficaz cuando se vuelve a exponer al mismo agente patógeno ^{32,34,35}.

El mecanismo humoral con el que cuenta la inmunidad adaptativa son los anticuerpos, glucoproteínas que son adaptadores capaces de activar las funciones fagocíticas e inhibitorias del sistema inmune. Los anticuerpos constan de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras también idénticas unidas entre sí mediante enlaces disulfuro; los extremos amino terminales de los dos pares de cadenas forman una hendidura dentro de la cual se unen a antígenos, ésta es la región variable que cambia para su unión a diferentes sitios de los agentes extraños, llamados antígenos. Los antígenos son cualquier sustancia que el sistema adaptativo puede reconocer y a la que puede responder ^{34,35}.

Los componentes celulares de la inmunidad adaptativa son los linfocitos, quienes son las células especializadas que reconocen los antígenos extraños y responden, por lo que también son los mediadores de la respuesta inmune humoral. También

se encuentran las células presentadoras de antígenos, las cuales inician el primer paso en la inducción de la inmunidad adaptativa, y las células efectoras ^{32,36}.

- Linfocitos

Los linfocitos constituyen aproximadamente 20 a 40% de las células blancas de la sangre; los diferentes tipos de linfocitos llevan a cabo funciones específicas dentro de la respuesta inmune, éstos al madurar se encargan de reconocer y atacar de manera específica patógenos individuales. En general se dividen en tres categorías básicas: linfocitos B, linfocitos T, cada uno de los cuales cuentan con su familia característica de receptores de antígeno, y células NK.

Los linfocitos B y T que aún no han interactuado con su antígeno se denominan linfocitos no capacitados y son células pequeñas de aproximadamente 6 µm de diámetro, tienen pocas mitocondrias, un aparato de Golgi y retículo endoplasmático poco desarrollados y en general con un corto periodo de vida. Una vez que interactúan con su antígeno avanzan en su ciclo de vida celular y crecen a células de aproximadamente 15 µm de diámetro llamadas linfoblastos, que pueden diferenciarse en células plasmáticas o de memoria, éstas últimas después de la exposición a un antígeno y de las cuales depende la inmunidad a largo plazo. Dichas células se parecen a las células pequeñas no capacitadas, pero se diferencian de éstas por la presencia o ausencia de ciertas moléculas en su superficie y aparecerán con mayor facilidad ante una segunda exposición a su antígeno específico ³²⁻³⁴.

Los diferentes linajes de linfocitos se distinguen por la expresión de receptores de membrana reconocidos por anticuerpos específicos que reaccionan a una molécula particular, conocidas de manera general como grupos de diferenciación o CD (del inglés *cluster of differentiation*), y de las cuales se han descrito más de 250 tipos ³⁵.

- Células NK

Las células NK son linfocitos granulares grandes que forman parte del sistema inmune innato y que poseen actividad citotóxica contra una gran gama de células tumorales e infectadas por virus. Representan del 5 al 10% de los linfocitos y pueden realizar su función a pesar de no contar con los marcadores de superficie característicos de los linfocitos B y T. Estas células expresan un receptor de membrana (CD16) para una región específica de un anticuerpo que ya ha sido identificado y producido por otra célula y pueden, a través de su unión a estos anticuerpos, destruir sus células blanco (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo) ^{34,35}.

- Linfocitos B

Las células B maduran y se desarrollan en la médula ósea y se distinguen de las demás poblaciones de linfocitos y de todas las células por su síntesis y expresión de anticuerpos para reconocimiento de antígeno. Presentan un citoplasma típico con un retículo endoplasmático abundante, para apoyar su alta producción de proteínas, dispuesto en capas concéntricas y así mismo muchas vesículas de Golgi³⁴.

Cada célula B está programada genéticamente para codificar un receptor de superficie específico de un antígeno determinado y poseen alrededor de 1.5×10^5 moléculas de anticuerpo en su superficie^{32, 35}.

Luego de que un antígeno se une a una célula, los linfoblastos del linaje de células B se distinguen en células plasmáticas o efectoras, que sintetizan y expulsan su anticuerpo en grandes cantidades, de cientos hasta más de mil millones por segundo, y tienen un tiempo de vida de una a dos semanas, aunque es posible encontrar algunas poblaciones longevas en médula ósea³³⁻³⁵.

También pueden diferenciarse en células de memoria, que tienen un tiempo de vida mayor que los linfocitos no capacitados y que presentan en su membrana el mismo anticuerpo que su célula progenitora, al contrario de las efectoras que expulsan su anticuerpo producido y tienen nada o poco unido a membrana^{32,34,35}.

- Linfocitos T

Las células T maduran en el timo (de ahí su nombre) y durante este proceso se diferencia para expresar un anticuerpo de unión a antígeno llamada receptor de célula T. Éste, al contrario de las células B, sólo reconoce un tipo específico de antígeno unido a proteínas de membrana llamadas complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que son glucoproteínas genéticamente diversas presentes en las membranas celulares e intervienen en el proceso conocido como presentación de antígeno³⁵.

Existen dos tipos principales de MHC, las de clase I que presentan prácticamente todas las células nucleadas y las de clase II que sólo son expresadas por ciertos tipos de células especializadas en presentación de antígeno^{34,35}.

Cuando un linfocito T reconoce un antígeno asociado a MHC sobre una célula, el linfocito prolifera y se convierte en un tipo específico de célula T^{32,34}.

Existen dos poblaciones bien definidas de células T, las células T colaboradoras (T_H) y células T citotóxicas (T_c) y un subtipo caracterizado como células T reguladoras (T_{reg}). Cada una de estas poblaciones se distingue entre sí por los grupos de glucoproteínas de membrana CD4 o CD8 presentes en cada una³⁵.

Las células T_H exhiben en su membrana CD4, mientras que las T_C son positivas a CD8 y la proporción de éstas en la sangre periférica es normalmente 2:1 pero suele afectarse dependiendo del estado inmunológico que presente una persona. Las células efectoras de la subpoblación T_H se diferencian después de ser activadas por la interacción antígeno-MHC y su trabajo es facilitar la activación de linfocitos B, linfocitos T_C, macrófagos y células participantes de la respuesta inmune. De igual forma, el reconocimiento de un complejo antígeno-MHC por parte de una célula T_C resulta en su diferenciación y activación en célula efectora conocida como linfocito T citotóxico (CTL) y esta tiene el papel de vigilar células del cuerpo y eliminar aquellas que exhiban algún antígeno extraño en MHC clase I, por ejemplo, células infectadas por virus ^{34,35}.

Las células T_{reg} exhiben en su superficie antígeno CD4⁺ y CD25⁺, pero estas a diferencia de las células T_H, que son CD4⁺, suprimen inmunoreacciones, es decir, son reguladoras negativas de la respuesta inmune ^{34,35} (ver tabla1).

Los tres tipos de subpoblaciones de células T, al ser activadas, pueden diferenciarse tanto en células efectoras, con su actividad definida específica, o en células T de memoria ³²⁻³⁶.

Tabla 1. Algunos marcadores CD para células de la línea linfóide. Tomado de Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby, 6ta ed. McGraw-Hill Interamericana. México 2007. P. 34* ³⁴.

Designación CD	Función	Linfocito B	Linfocito T _H	Linfocito T _C	Célula NK
CD2	Molécula de adhesión; transducción de señales	-	+	+	+
CD3	Elemento de traducción de señales del receptor de célula T	-	+	+	-
CD4	Molécula de adhesión que se une a moléculas MHC clase II; transducción de señales	-	+	-	-
CD8	Molécula de adhesión que se une a moléculas MHC clase I; transducción de señales	-	-	+	+
CD32	Receptor para la fracción Fc de IgG	+	-	-	-
CD45	Transducción de señales	+	+	+	+
CD56	Molécula de adhesión	-	-	-	+

- Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas de glucoproteínas encargadas de la inmunidad adaptativa que se encuentran en el suero sanguíneo, principalmente corresponden a la fracción de la globulina γ y a otras fracciones menos abundantes de la globulina α y β , por lo que también son denominadas inmunoglobulinas (Ig). Existen diferentes tipos de inmunoglobulinas que se identifican entre sí debido a que varían en composición de aminoácidos, tamaño, carga y contenido de hidratos de carbono, siendo la principal la IgG también están las IgA, IgM, IgD e IgE; la IgG consta además de 4 subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 ^{34,35}.

La molécula de anticuerpo está formada por cuatro regiones o cadenas peptídicas, dos cadenas ligeras (polipéptidos de aproximadamente 22,000 Da) y dos cadenas pesadas (aproximadamente de 55,000 Da o más) idénticas entre sí. Cada cadena pesada se une a una cadena ligera mediante enlaces disulfuro e interacciones no covalentes para formar un heterodímero de cadena pesada-ligera; las dos combinaciones idénticas de cadena pesada-ligera se unen a su vez mediante puentes disulfuro e interacciones no covalentes para formar la estructura de anticuerpo básica de cuatro cadenas (figura 8A). Aproximadamente los 110 primeros aminoácidos de la región amino terminal, ya sea de cadena ligera o pesada, varían mucho entre anticuerpos de distinta especificidad. Los segmentos de secuencia variable, llamados región Fab (del inglés *fragment antigen binding*), son los que tienen actividad de unión a un antígeno específico y la región Fc (*fragment crystallizable*, debido a su cristalización durante su almacenamiento en frío) es la región constante, sin actividad antigénica, y lleva a cabo las funciones efectoras del sistema inmune (figura 8B) ³³⁻³⁵.

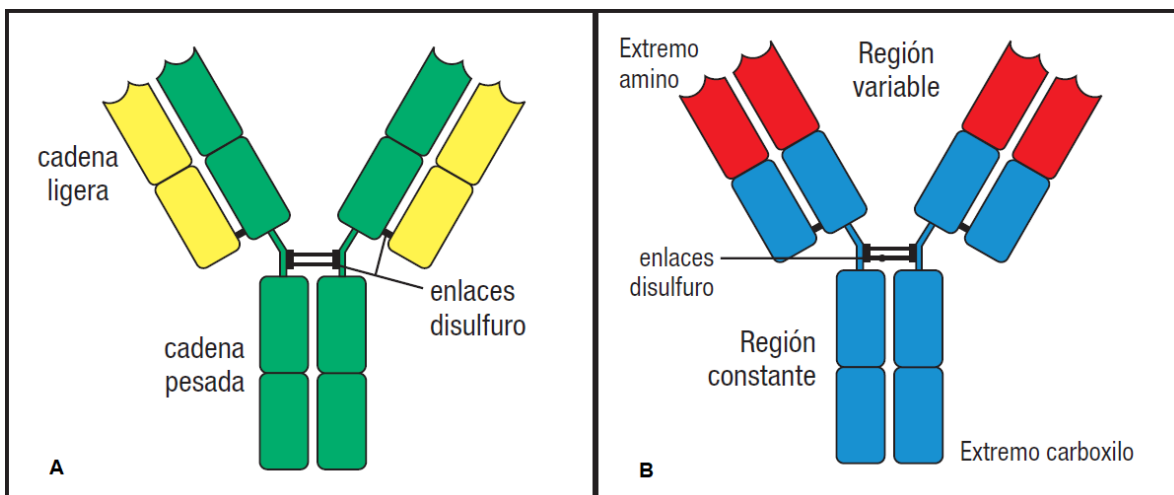


Figura 8. Se ilustra la estructura de una molécula de anticuerpo. A) El anticuerpo consta de dos cadenas pesadas (verde) y dos ligeras (amarillo). B) La fracción variable Fab (rojo) de especificidad antigénica y la región constante Fc (azul). Tomado de Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de Janeway*. 7ma ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2009. Pp. 112-113 ³³.

Un antígeno es específico para un anticuerpo, el cual reconoce solo una pequeña parte de su estructura que se conoce como determinante antigénico o epítipo (figura 9). Los antígenos por lo regular tienen muchos epítipos diferentes que pueden ser reconocidos por anticuerpos diferentes, lo que induce la respuesta y proliferación de diversas clases de linfocitos B ³⁴⁻³⁶.

Esta respuesta se determina de anticuerpo policlonal y facilita la localización, fagocitosis y lisis del antígeno lo que le confiere una clara ventaja para la protección por parte de la inmunidad adaptativa ³⁴.

Para la investigación esta heterogeneidad de anticuerpos que aumenta la protección *in vivo*, suele reducir la eficacia de un antisuero para su uso *in vitro* por lo que es preferible el uso de un anticuerpo específico contra un solo epítipo de un antígeno derivado de una sola clona o célula, conocido como antígeno monoclonal ^{33,34}.

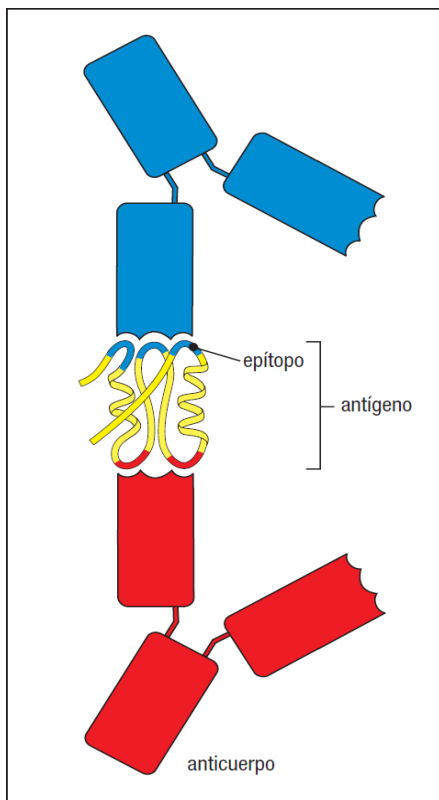


Figura 9. Región de unión específica a un antígeno (epítipo). Tomada de Murphy K, Travers P, Walport M. Inmunobiología de Janeway. 7ma ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2009: Pp. 17

El desarrollo de la técnica que permite la producción de un anticuerpo monoclonal se debe al trabajo de Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975 ³³.

La producción de un anticuerpo monoclonal se realiza al fusionar una célula B activada por la unión a su antígeno con una célula de mieloma, esto va a resultar en la formación de una célula llamada hibridoma. Esta célula híbrida resultante va a poseer las ventajas de crecimiento inmortal de la célula de mieloma y la producción de anticuerpo específico del linfocito B ^{34,36}.

Estas clonas de hibridoma pueden ser cultivadas de manera indefinida y secretan grandes cantidades del anticuerpo ^{33,34}.

El antisuero policlonal obtenido de un animal inmunizado contra determinado antígeno específico, contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales, cada uno específico para diferente epítipo de la molécula compleja de antígeno. Con el antisuero obtenido se lleva a cabo la formación de los hibridomas que se cultivan para posteriormente ser separados de acuerdo a su afinidad o especificidad de epítipo ^{32,34}.

- Línea celular HepG2

Línea celular de ATCC caracterizada proveniente de *Homo sapiens*. Son células derivadas de hígado de un individuo caucásico masculino de 15 años de edad con carcinoma hepatocelular, poseen morfología epitelial y son adherentes ³⁶.

Algunos genes que expresa son transferrina, albumina, α 2-macroglobulina, haptoglobina, ceruloplasmina. Expresa receptores de insulina y factor de crecimiento insulínico tipo 2 ³⁶.

La línea celular se ha descrito como apta para transfección y hospedador; no se tiene evidencia de expresión de virus de hepatitis B en su genoma y no es tumorigénica. Su indicación de cultivo es en medio completo Eagle (ATCC) con 10% de SFB e inyección de CO₂ al 5% ³⁶.

- Línea celular Reh

Línea celular ATCC proveniente de *Homo sapiens* con morfología linfoblastoide y de cultivo en suspensión (no adherentes). Derivadas de leucemia linfocítica aguda con expresión de genes CD3 A, B, C, CD4 y CD10 ³⁷.

Cultivo indicado en medio completo RPMI-1640, 10% de SFB, CO₂ 5% ³⁷.

- Liposomas

Los liposomas son vesículas fosfolipídicas nanométricas que poseen una membrana con estructura de bicapa, están compuestos de una o más bicapas lipídicas/fosfolipídicas concéntricas o no, (figura 10) que pueden contener otro tipo de moléculas (como proteínas) entre sus estructuras. Pueden ser unilamelares o multilamelares y dependiendo del número de bicapas que contengan son capaces de acomodar compuestos entre sus compartimientos acuosos o lipídicos ³⁸.

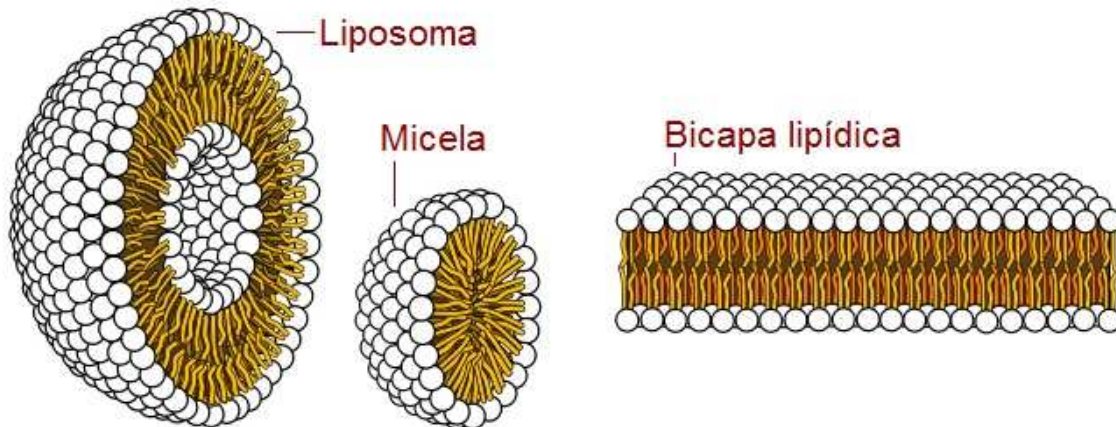


Figura 10. Composición de los liposomas. Bicapa que forman los lípidos de la membrana de la vesícula. Al contrario de las micelas, los liposomas tienen un compartimiento hidrofílico en su interior lo que le permite incorporar o encapsular una variedad de moléculas con diferentes propiedades. Tomado de: Universidad de Salamanca. Dpto. de Sistemas de la Fundación General de la Universidad [Internet]. Salamanca; España, 2007-2014 [consulta 20 noviembre 2017]. Disponible en: <https://dicciomed.eusal.es/palabra/liposoma> ³⁹.

Además de las moléculas de lípidos y fosfolípidos, los liposomas contienen otras moléculas como esteroides en su estructura, el esteroide más ampliamente utilizado para la fabricación de liposomas es el colesterol, el cual da estabilidad a la vesícula y disminuye el paso de solutos a través de la membrana ^{38,40}.

Los liposomas presentan muchas ventajas en su función de sistemas acarreadores de fármacos debido a que la composición de su membrana le permite transportar moléculas ya sean hidrofílicas o lipofílicas hacia las células; son relativamente estables, biocompatibles y permiten aumentar la eficacia terapéutica o disminuir efectos tóxicos y secundarios del principio activo ⁴⁰⁻⁴².

El mecanismo más comúnmente descrito mediante el cual el liposoma libera su contenido es mediante adsorción de la vesícula a la superficie celular seguida de una endocitosis (figura 11). Se han encontrado diversos factores que afectan la interacción del liposoma con la célula, como la composición específica de la bicapa del tipo celular que se tenga, las propiedades fisicoquímicas del fármaco y

el tamaño, composición, carga eléctrica y fluidez de la membrana del acarreador vesicular ^{41,43}.

Los liposomas catiónicos son un tipo especial de liposomas que se fabrican con lípidos sintéticos pues no existen de forma natural; al estar cargados positivamente, interactúan espontáneamente con las membranas celulares ⁴³.

Adicionalmente, nuevas técnicas de encapsulación han permitido el desarrollo de nanoliposomas que son vesículas de capa lipídica submicrométricas que comparten las mismas características químicas, estructurales y termodinámicas, sin embargo, los nanoliposomas proveen mayor superficie de contacto dándoles el potencial de incrementar su solubilidad, aumentan la biodisponibilidad, mejoran la liberación controlada y permiten la orientación precisa del material encapsulado en mayor medida ⁴¹⁻⁴³.

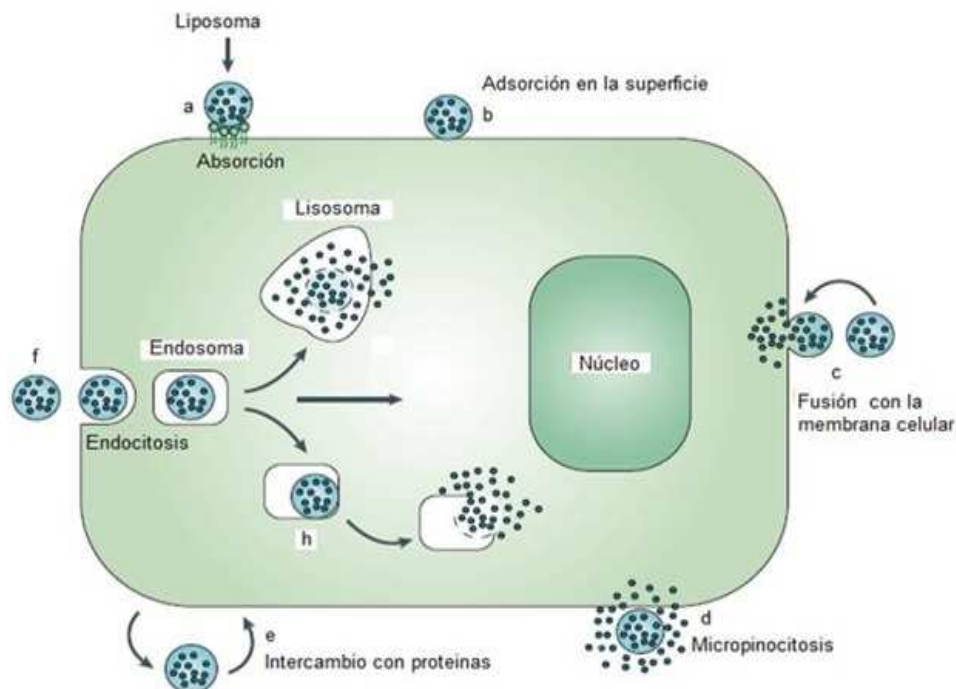


Figura 11. Se muestra el mecanismo más aceptado mediante el cual los liposomas interactúan con la membrana plasmática de sus células diana. a) El liposoma presenta una fusión a la membrana plasmática de la célula, la cual ocurre muy rara vez ⁴⁰, b) el liposoma se adhiere a la superficie. c) en el caso de una fusión con la membrana de la célula, el contenido de la vesícula se libera al interior de la célula, d) cuando el liposoma se adhiere la liberación es mediante pinocitosis, e) se pueden activar vías endocíticas no específicas que internalicen al liposoma a la célula, f) una vez que sucede la endocitosis del liposoma, este es desintegrado por acción de lisosomas produciendo la liberación de su contenido al citoplasma celular. Tomado de: Acosta-Gutiérrez JA. Estudio de estabilidad biológica in vivo en ratones atímicos de la cepa nunu de un producto antineoplásico conformado por IL-2 en un sistema nanoacarreador [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2012 ⁴⁴.

- Potencial Z

La mayoría de las dispersiones coloidales en medios acuosos inducen consigo una carga eléctrica. Existen diversas formas de originar la carga en la superficie de las partículas del sistema, dependiendo de la naturaleza de las partículas y del medio en el que se encuentran ⁴⁵.

Una partícula cargada positiva o negativamente atraerá a iones de la carga contraria presentes en el medio, formando así una capa de iones alrededor de la partícula. El desarrollo de una carga neta en la superficie de la partícula afectará la distribución de los iones del medio en la interfase, aumentando su concentración en la capa cercana a la superficie, y formando de esta manera una doble capa alrededor de cada partícula que conforma el sistema disperso. La región interna de la doble capa se denomina capa de Stern, que es donde los iones están unidos fuertemente a la superficie de la partícula y la región externa, llamada capa difusa, es donde los iones están menos firmemente asociados a la superficie ⁴⁵.

La capa difusa marca un límite teórico en el que los iones y las partículas existen como una entidad estable; cuando la partícula se mueve, los iones de la capa se mueven con ella. El potencial que existe en este límite (superficie de corte hidrodinámico) es el potencial Z (figura 12) ⁴⁵.

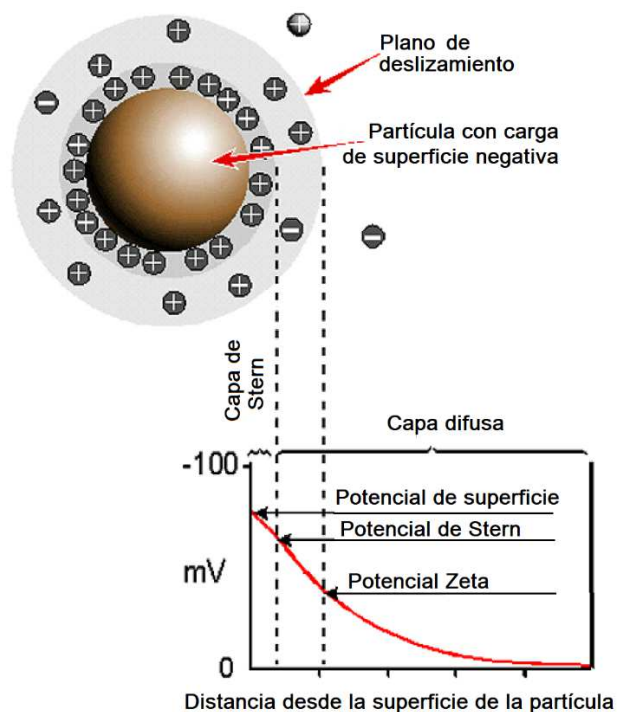


Figura 12. El potencial de las cargas delimitado por la capa difusa hasta la zona de corte hidrodinámico o plano de movimiento de cargas es el potencial Z. Tomado de: Malvern Instruments Limited. Zeta potential – An introduction in 30 minutes. Grovewood Road, Malvern: Worcestershire, UK. WR14, 1XZ; 2017. Technical note. P. 10 ⁴⁵.

El potencial Z es una propiedad física que posee cualquier partícula en un sistema disperso y es utilizada para optimizar formulaciones de suspensiones o emulsiones prediciendo interacciones con superficies y mejorando la formación de películas y recubrimientos ⁴⁵.

Ha sido ampliamente reconocido que el potencial Z es un muy buen indicador de la magnitud de la interacción entre partículas y su medición es comúnmente usada para determinar la estabilidad de sistemas coloidales, ya que entre mayor sea el potencial en un sistema, las partículas de este estarán más separadas debido a la repulsión de cargas, manteniendo así la integridad del sistema. Cuando el potencial disminuye, las partículas son susceptibles de acercarse más entre ellas, originando así floculados, coágulos o sedimentos y rompiendo la esencia de sistema disperso ⁴⁵.

- Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica analítica cuantitativa de células o partículas que fluyen individualmente en una suspensión a través de un haz de luz que después detecta y correlaciona las señales que resultan de la iluminación de esas partículas para así darnos información sobre el tamaño, forma, complejidad y número de partículas que estamos analizando ⁴⁶.

El citómetro de flujo es el instrumento que permite el análisis de partículas que se encuentran en suspensión y que pasan en un flujo continuo a través de un sistema de tubos capilares y son analizadas por un interrogador como eventos separados. Un evento es cualquier cosa que ha sido interpretada por el instrumento, correcta e incorrectamente, como una sola partícula. Son sutilezas las que pueden causar una mala interpretación, por ejemplo, si el citómetro no es suficientemente rápido, dos partículas muy cercanas entre sí pueden ser detectadas a modo de un solo evento, sin embargo, la mayoría de las partículas que son detectadas por el citómetro como eventos son realmente células individuales ⁴⁶.

La luz que emite el láser contra las partículas a analizar va a ser dispersada dependiendo de las características de la misma, por lo cual el citómetro va a medir dos parámetros principales que son el *forward scatter* (FSC) que es la luz difractada detectada en el eje de incidencia del láser y se relaciona con la superficie y área celulares; y el *side scatter* (SSC) que es la luz reflejada y refractada detectada en un ángulo de 90° con respecto a la incidencia del haz de luz y se relaciona con la complejidad interna de la célula y su granularidad ⁴⁶.

El sistema de laser del citómetro es capaz de producir diferentes longitudes de onda y que va a ser dispuesto a través del interrogador para posteriormente ser detectado y analizado por el sistema informático (figura 13) ⁴⁶.

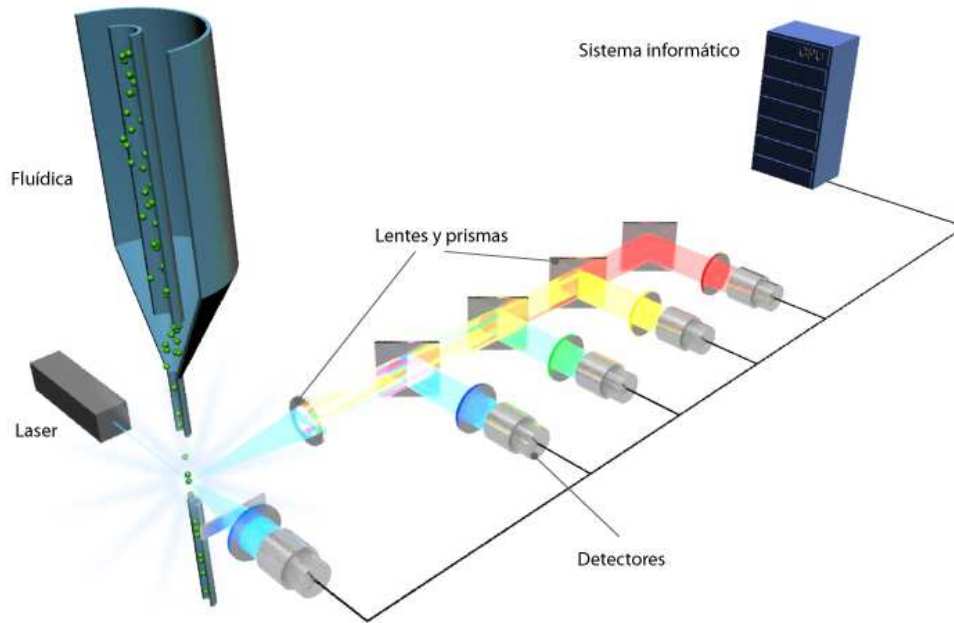


Figura 13. Fundamento de la técnica de citometría. La luz dispersada por las partículas en flujo es detectada por el sistema de sensores y posteriormente las señales son interpretadas por un sistema computarizado que hace su análisis de forma y complejidad. Tomado de: Díaz-Martínez V, Martos MC. Citometría de flujo: midiendo células [Internet] c2011[actualizado 25 abril 2011; consultado 21 noviembre 2017] Disponible en: https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a_tecnica_citometra ⁴⁷.

Inicialmente la citometría de flujo fue utilizada para el análisis de células sanguíneas debido a que estas eran ideales para la técnica, puesto que se encuentran de manera individual y no requieren de una manipulación previa al análisis mediante citometría ⁴⁶.

Las células de un cultivo o las de líneas celulares también son factibles de analizar mediante citometría, sin embargo, las adherentes necesitan tratamientos previos para removerlas de la superficie dónde se encuentran para su cultivo. La técnica también ha sido adaptada para su uso con bacterias, plancton y espermatozoides, e inclusive ha sido utilizada para el análisis de partículas como virus, núcleos celulares, cromosomas, fragmentos de DNA y perlas de látex ⁴⁶.

- Marcación de células con anticuerpos fluorescentes

Debido a que el SSC es un indicativo de la complejidad de una célula, se pueden utilizar diversas moléculas, denominadas fluorocromos, que al interactuar con diferentes sitios en la célula le van a proporcionar una determinada fluorescencia. La fluorescencia se puede definir como la luz de una longitud de onda específica que es emitida cuando una molécula absorbe luz de alta energía y la emite en forma de fotones con una menor energía ⁴⁶.

La emisión de luz es detectada por el citómetro e interpretada como la granularidad o complejidad de la célula y, por lo tanto, su medición es un indicativo de la función, expresión, fenotipo o actividad relacionada de la célula de acuerdo a la unión o afinidad del fluorocromo ⁴⁶.

Generalmente se utilizan inmunoglobulinas monoclonales contra antígenos de la superficie de las células, marcadas con colorantes fluorescentes y poseen ciertas propiedades específicas tal sea tener alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz), alto rendimiento cuántico (emisión de luz), elevada fotoestabilidad y corto estado de excitación ⁴⁶.

En las técnicas de inmunofluorescencia e inmunofenotipaje un fluorocromo se conjuga a una inmunoglobulina que actúa como un marcador con el que se pueden diferenciar distintos anticuerpos al unirse a su epítipo específico de afinidad, lo que le va a aportar la fluorescencia para ser detectado, es decir, una vez que se une un anticuerpo a su antígeno, se añade un segundo anticuerpo con una molécula fluorescente conjugada que se va a unir a una región específica del primer anticuerpo, confiriéndole una luminosidad al ser evaluado por el citómetro. A estos anticuerpos se les conoce como anticuerpos secundarios de fluorescencia y pueden estar conjugados a diferentes fluorocromos (figura 14) ⁴⁶.

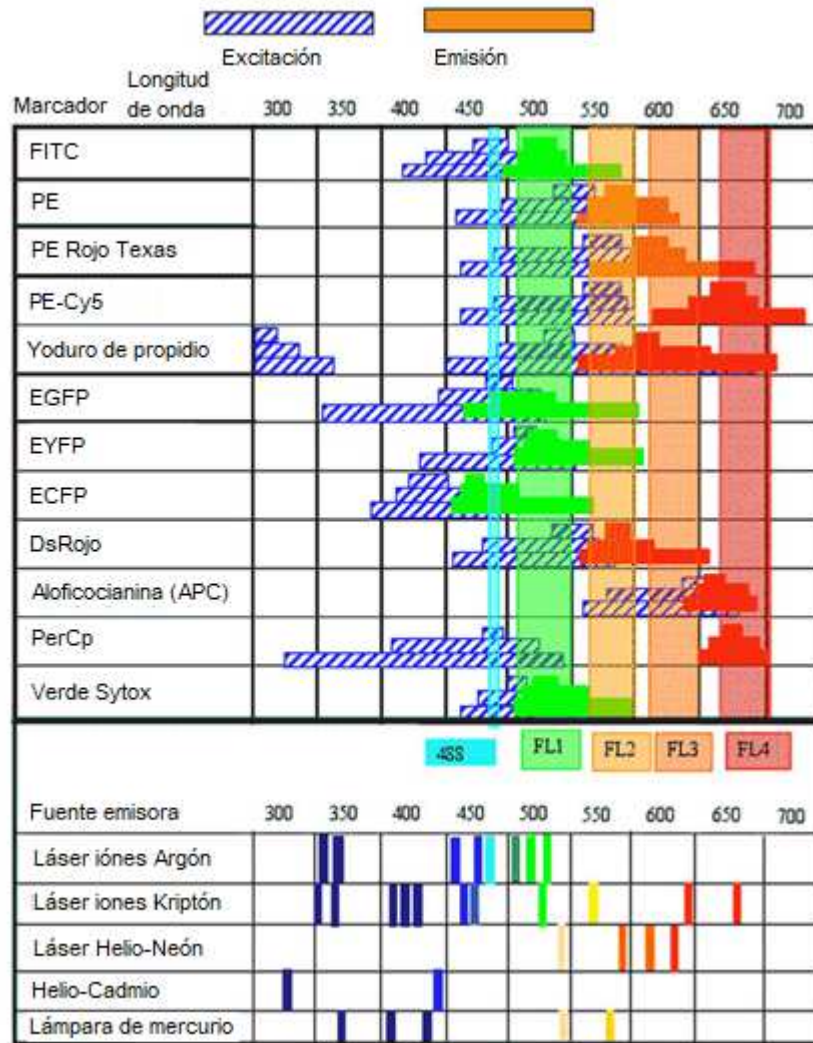


Figura 14. Fluorocromos más comúnmente utilizados en las técnicas de inmunofluorescencia y sus rangos de longitud de onda a las cuales absorben y emiten la energía en forma de luz. Tomado de: *Flow cytometry [Internet] Centaur: Brussels. [Consultado 22 noviembre 2017] Disponible en: <http://www.apoptosed.com/prod02.htm>*⁴⁸.

- Anticuerpo contra receptor de opioides delta: Anti- δ_1 -Opioid Receptor (OPRD1)

El anticuerpo específico utilizado para la detección del receptor de opioides δ en las células es el Anti- δ_1 -Opioid Receptor de la marca *Sigma-Aldrich*. El anticuerpo es desarrollado en conejo utilizando un péptido sintético conjugado a KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés o Hemocianina de lapa californiana) como inmunógeno; el péptido corresponde al dominio extracelular N-terminal del receptor δ -opioides humano y purificado utilizando el péptido inmunizante inmovilizado en agarosa⁴⁹.

El anticuerpo es provisto en una solución amortiguadora de sales de fosfato y con pH 7.7, contiene 0.01% de azida de sodio como agente conservador y se encuentra a una concentración de 1.1 mg/mL ⁴⁹.

- Anticuerpo secundario de fluorescencia: Anti-Rabbit IgG (whole molecule) FITC

Mediante citometría de flujo se hará la detección del DOR con la ayuda de un anticuerpo secundario de afinidad aislado de antígeno específico conjugado a FITC y desarrollado en cabra del proveedor *Sigma-Aldrich* ⁵⁰.

El anticuerpo contra conejo IgG-FITC es desarrollado en cabra y purificado utilizando IgG de conejo como inmunógeno. El anticuerpo específico de afinidad al antígeno es obtenido del antisuero de cabra IgG anti-conejo mediante purificación inmuno-específica que remueve todas las proteínas del suero de cabra, incluidas las inmunoglobulinas, que no se unen específicamente a la IgG de conejo. Posteriormente la molécula es conjugada a isiotiocianato de fluoresceína (FITC) *Sigma-Aldrich*, isómero I y finalmente el conjugado anticuerpo-FITC es dializado para remover FITC no conjugada ⁵⁰.

El producto es provisto en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH 7.4, contiene 1% de BSA (albúmina de suero bovino) con 15 mM de azida de sodio como un conservador y se encuentra con un contenido de anticuerpo IgG específico contra conejo de al menos 1.0 mg/mL ⁵⁰.

- Dispersión de luz dinámica (DLS)

También referida como espectroscopia de correlación de fotones o dispersión cuasi-elástica de luz, la dispersión de luz dinámica es una técnica utilizada para medir el tamaño de las partículas en una suspensión de acuerdo a su movimiento aleatorio en el medio en el que se encuentran (movimiento Browniano). Entre más grande sea la partícula, ésta será más lenta, y entre más pequeña se moverá más rápido ⁵¹.

Debido a que la viscosidad afecta el movimiento de las partículas a través del medio, es necesario realizar la medición a una temperatura definida y estable. La velocidad del movimiento Browniano es definida por una propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional ⁵¹.

El tamaño de la partícula se calcula entonces a partir del coeficiente de difusión traslacional con la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Donde:

$d(H)$ = diámetro hidrodinámico

D = coeficiente de difusión traslacional

k = constante de Boltzmann

T = temperatura absoluta

η = viscosidad

Debe notarse que el diámetro está calculado de acuerdo a la difusión de la partícula en el líquido, por lo que se refiere a él como diámetro dinámico; así el resultado del diámetro obtenido con la técnica de DLS es la correspondiente a una esfera con el mismo diámetro dinámico que la partícula analizada ⁵¹.

Por otra parte, el coeficiente de difusión traslacional depende no solamente del tamaño de la partícula en sí, además, afectará cualquier estructura que se encuentre sobre la superficie que modifique la velocidad de difusión, al igual que la concentración y tipo de iones en el medio ⁵¹.

Los iones en el medio y su concentración pueden afectar a la velocidad de difusión de la partícula cambiando el espesor de la doble capa eléctrica (llamada *longitud de Debye*). Un medio con poca conductividad producirá una doble capa de iones extensa alrededor de la partícula, reduciendo su velocidad de difusión, resultado en una medición de un diámetro hidrodinámico más grande y de forma contraria, un medio con alta conductividad suprimirá la doble capa de iones resultando en una mayor velocidad de difusión y, por tanto, menor tamaño medido ⁵¹.

La medición entonces en el equipo se realiza mediante un arreglo de fuente de luz que hace incidir un haz de determinada longitud de onda sobre la muestra, un detector que recibe las señales de luz dispersada por las partículas en la suspensión y un correlador que interpreta las señales y hace un cálculo de tamaño mediante una serie de algoritmos ⁵¹.

El equipo que realiza medición de tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión de luz dinámica se compone, similar al citómetro, de una fuente de luz de determinada longitud de onda, la cual pasa por un módulo donde se encuentra la celda que contiene la muestra y detector que mide las fluctuaciones del haz lumínico y va a traducirlas mediante un análisis de intensidades (figura 15) ⁵¹.

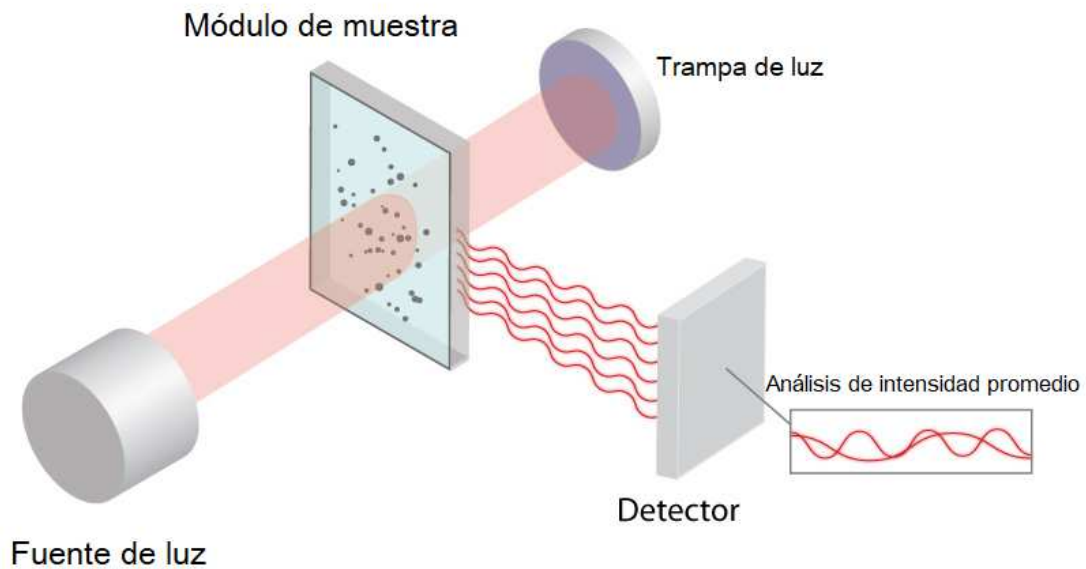


Figura 15. El detector recibe la señal de una serie de zonas o “puntos” producidos a causa de la dispersión de la luz por parte de las partículas, y debido al movimiento Browniano de éstas, la luz dispersada va a ser detectada como una fluctuación de los puntos, y a su vez va a ser correlacionada con la velocidad y, por ende, su tamaño. Tomado de: *Dynamic light scattering* [Internet] Illinois: PTL Particle Technology Labs; c2017 [consultado 22 noviembre 2017]. Disponible en: <https://particletechlabs.com/analytical-testing/particle-size-distribution-analyses/dynamic-light-scattering> ⁵².

Es importante resaltar que la dispersión de la luz por parte de las partículas está dada en función del diámetro de éstas y de la longitud de onda aplicada en $I \propto \frac{1}{\lambda^4}$ y $I \propto d^6$ donde I = intensidad de luz dispersada, d = diámetro de partícula y λ = longitud de onda, de acuerdo a la teoría de dispersión de Rayleigh. Esto quiere decir que, en una población de partículas con tamaños distintos, las partículas de mayor tamaño van a aportar alrededor de 10^6 veces más luz dispersada que las partículas diez veces más pequeñas, haciendo que la luz dispersada por las partículas más pequeñas sea extremadamente pobre para hacer la medición y que se obtiene una dispersión de luz mayor conforme disminuye la longitud de onda utilizada ⁵¹.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El fosfatidilinositol 4,5 difosfato es un lípido presente en la membrana plasmática de las células eucarióticas que ha mostrado desempeñar diversas funciones reguladoras por medio de la activación de diferentes mecanismos y vías de señalización que al encontrarse deficiente en las membranas puede llevar a un mal funcionamiento de los procesos celulares ^{4,6}, e inclusive alteraciones en su concentración han sido implicadas en patologías incluyendo síndrome de Down ⁵³ y desorden bipolar ⁵⁴.

Por otro lado, se sabe que las células del sistema inmune cuentan con la presencia del receptor opioide δ (DOR) en bajas densidades ²⁹⁻³¹ y se ha descrito que su expresión se lleva a cabo mediante vías de secreción constitutivas y vías de secreción reguladas ya que se encuentra principalmente al interior de las células en zonas cercanas a la membrana y es activada por el aumento en los niveles de Ca^{2+} ^{25,28}. También es importante indicar que la función de los receptores de opioides presentes en linfocitos se debe a la función de éstos como moduladores de respuesta inmune, sin embargo, la significancia real de este papel de los opioides no ha sido aún cerciorada ⁵⁵.

El principal problema que se enfrenta es que no existe un método que emplee anticuerpos que se unan a receptores opioides de manera selectiva y para evaluarlos se usa la expresión de los mensajeros, la proteína total de extractos para inmunoblot o inmunohistoquímica, donde se utilizan anticuerpos formados por péptidos específicos de cada receptor que normalmente se encuentran transmembranales o internalizados en la célula, así, el desarrollo de una técnica mediante citometría de flujo que utiliza un anticuerpo que se une a una fracción N-terminal de la región extracelular del DOR hace posible que su detección sea más fácil, con mayor sensibilidad y eficacia.

Con la investigación que se lleva a cabo en el presente trabajo se puede evaluar la capacidad que tiene el PIP_2 encapsulado en el LIP-PI para promover la exposición de receptores DOR en la membrana plasmática y determinar la importancia y mecanismo que tiene este lípido en sus funciones reguladoras, principalmente en la de aparición de proteínas de membrana. Además, abre la posibilidad de explorar las funciones que tiene el receptor en las células linfoides y cómo las lleva a cabo, así también la eficacia de los liposomas catiónicos en su función de nanovesículas acarreadoras y los efectos que produce al interactuar con las células tanto linfocíticas como epiteliales.

HIPÓTESIS

El PIP₂ es un lípido presente en la membrana plasmática que tiene importante actividad reguladora en el tráfico vesicular y la remodelación citoesquelética; así mismo el DOR es un receptor que se encuentra principalmente en el interior de la membrana plasmática en vesículas que son secretadas por vía constitutiva o regulada.

Al estimular los linfocitos con liposomas con PIP₂, se favorecerá el movimiento de vesículas al exterior de la membrana celular, lo que expondrá a los receptores que éstas contienen; así, se observará un aumento en la expresión del DOR en la membrana comparada con la expresión del receptor antes de aplicar el estímulo, o la expresión basal que presentan estas células.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del PIP₂ administrado en un sistema nanoacarreador catiónico en la expresión del DOR en la membrana de linfocitos aislados de sangre periférica.

Objetivos particulares

- Desarrollar una técnica mediante citometría de flujo para la detección del DOR en la membrana plasmática de las células utilizando un anticuerpo primario selectivo y un anticuerpo secundario de fluorescencia.
- Determinar la presencia de DOR empleando la técnica de citometría de flujo y una línea celular de referencia para la titulación del anticuerpo y adecuarla para su uso en células linfoides.
- Medir la expresión del DOR en las células linfoides con una técnica estandarizada a partir de un ensayo inmunológico con el anticuerpo dirigido a receptor.
- Comparar la expresión del DOR en la membrana de los linfocitos antes y después de aplicar el sistema nanoacarreador con PIP₂.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de la parte experimental se utilizarán las técnicas de cultivo celular, citometría de flujo y fabricación de liposomas en condiciones asépticas.

Para las cuales se utilizarán el siguiente material.

Cultivo celular

- Equipo
 - ✓ Campana de flujo laminar
 - ✓ Incubadora con inyección de CO₂
 - ✓ Centrífuga
 - ✓ Microscopio invertido
- Instrumentos
 - ✓ Micropipetas
- Material
 - ✓ Puntas para micropipeta
 - ✓ Botellas de cultivo
 - ✓ Cajas de Petri
 - ✓ Tubos para centrífuga
 - ✓ Cámara de Neubauer
 - ✓ Contador celular
- Soluciones, medios y reactivos
 - ✓ Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)
 - ✓ Verseno
 - ✓ Medio RPMI 1640 con Mycokill y ciprofloxacino
 - ✓ Medio DMEM con Mycokill y ciprofloxacino
 - ✓ Suero Fetal de Bovino (SFB)
 - ✓ Azul tripano

Obtención de linfocitos

- Equipo
 - ✓ Centrífuga
 - ✓ Campana de flujo laminar
- Instrumentos
 - ✓ Micropipetas
- Material
 - ✓ Ligadura
 - ✓ Algodón
 - ✓ Tubo Vacutainer con EDTA de cualquier capacidad.
 - ✓ Camisa para aguja
 - ✓ Agujas para tubo Vacutainer
 - ✓ Tubos cónicos de vidrio
 - ✓ Cajas de Petri
- Soluciones y reactivos
 - ✓ Etanol al 70%
 - ✓ Histopaque®-1077 densidad 1.077 g/mL
 - ✓ PBS

Citometría de flujo

- Equipo
 - ✓ Micro centrífuga
 - ✓ Refrigerador
 - ✓ Incubadora
- Instrumentos
 - ✓ Micropipetas
 - ✓ Citómetro de flujo BD FACSAria II
- Material
 - ✓ Puntas para micropipeta
 - ✓ Tubos FACS para citometría
 - ✓ Micro tubos para centrífuga Eppendorf

Fabricación de liposomas

- Equipo
 - ✓ Campana de flujo laminar
 - ✓ Tanque de nitrógeno filtrado
 - ✓ Sonicador
 - ✓ Cronómetro
- Instrumentos
 - ✓ Micropipeta
 - ✓ Balanza analítica
 - ✓ Jeringa Hamilton 50 μ L
- Material
 - ✓ Tubos de ensayo esterilizadas
 - ✓ Varillas de vidrio esterilizadas

Dispersión de luz dinámica

- Instrumentos
 - ✓ Zetasizer nano Z
- Material
 - ✓ Celdas de plástico
 - ✓ Celda capilar con electrodos

- Soluciones y reactivos
 - ✓ PBS
 - ✓ Paraformaldehido 2%
 - ✓ Anticuerpo primario OPRD-1 *Sigma-Aldrich*
 - ✓ Anticuerpo secundario IgG anti-rabbit con FITC *Sigma-Aldrich*
 - ✓ Metanol filtrado

- ✓ Pipeta Pasteur esterilizadas
- ✓ Microtubos para centrífuga Eppendorf

- Soluciones y reactivos
 - ✓ PBS
 - ✓ Cloroformo grado biotecnológico
 - ✓ Lípido catiónico
 - ✓ Fosfatidilcolina
 - ✓ Fosfatidilinositol difosfato (PIP₂) 4,5-

- Soluciones y reactivos
 - ✓ Agua destilada
 - ✓ PBS

- **Cultivo de la línea celular de referencia HepG2**

Se descongeló un crio-vial de células de la línea HepG2 en SFB/DMSO, se transfirió su contenido a un tubo cónico de plástico con tapa y se adicionó 1 mL de PBS, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se decantó el líquido sobrenadante para recuperar el botón celular.

Se resuspendieron las células en 1 mL de medio DMEM con 10% de SFB, se sembraron en una botella de cultivo de 25 cm², se adicionó medio con SFB para obtener un volumen total de 3 mL y se colocó la botella en la incubadora a 37 °C y 5% de inyección de CO₂.

La botella se mantuvo en la incubadora durante aproximadamente 2 semanas, tiempo en el cual se estuvo revisando periódicamente para que las células siempre conservaran condiciones óptimas de desarrollo.

Una vez que las células alcanzaron un ritmo de crecimiento constante en la fase exponencial y la botella de cultivo se encontraba a aproximadamente 85 -90% de confluencia se retiró el medio y se adicionaron 3 mL de verseno, se colocó nuevamente en la incubadora durante 10 minutos y posteriormente se despegaron las células dando un leve golpe al costado de la botella; el verseno con las células se recuperó trasvasándolo en un tubo cónico de plástico y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, el líquido sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en 3 mL de medio DMEM con 10% SFB que se repartieron en 3 botellas de cultivo colocando 1 mL en cada una y se completó el volumen a 3 mL con medio con SFB y se colocaron en la incubadora. Este proceso de resiembra se repitió en dos ocasiones para obtener el pleno acondicionamiento de las células.

Una vez que las células alcanzaron nuevamente un 85 – 90% de confluencia en cada botella se mantuvieron en estas condiciones hasta su utilización.

- **Desarrollo de la técnica de citometría de flujo y titulación del anticuerpo**

Se retiraron las botellas de cultivo de la incubadora, a las cuales se les decantó el medio, se adicionaron 3 mL de verseno para despegarlas, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron los botones celulares de cada botella en PBS para posteriormente colocar todas las células en un solo tubo, del cual se tomó una muestra de 10 µL de la suspensión celular la cual se transfirió a un microtubo de 200 µL, se resuspendió con 10 µL de una solución de azul tripano y se procedió a determinar la densidad celular viable en la cámara de Neubauer.

Se depositaron aproximadamente de 5×10^5 a 1×10^6 células en seis microtubos de 2 mL que se etiquetaron con las siguientes condiciones:

- Blanco
- Anticuerpo primario
- Anticuerpo secundario
- Anticuerpo OPRD-1 concentración 2.5 $\mu\text{g/mL}$
- Anticuerpo OPRD-1 concentración 5 $\mu\text{g/mL}$
- Anticuerpo OPRD-1 concentración 10 $\mu\text{g/mL}$

Se centrifugaron los microtubos a una velocidad de 1500 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante, se fijaron las células adicionando 200 μL de paraformaldehído 2%, se colocaron en refrigeración durante 20 minutos, posteriormente se centrifugaron a 1500/2500 rpm durante 5 minutos y se lavaron con PBS. Se resuspendieron suavemente las células 200 μL de metanol filtrado y previamente enfriado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, exceptuando el blanco, y se dejaron en refrigeración durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugaron nuevamente y se retiró el metanol para lavar con PBS.

Se prepararon 3 soluciones de trabajo del anticuerpo OPRD-1 a las 3 concentraciones establecidas y el anticuerpo secundario preparado en una solución de trabajo de 2/1000 μL y se colocó el anticuerpo correspondiente (en el caso del blanco se adicionó PBS) en una cantidad de 200 μL a los tubos, teniendo siempre precaución de que el anticuerpo secundario no entrara en contacto con la luz.

Se incubaron los tubos con cada condición en refrigeración durante la noche y posteriormente se adicionaron 800 μL de PBS a cada microtubo para después centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado más con PBS.

Una vez lavadas las células se transfirieron a 6 tubos FACS y se analizaron en el citómetro de flujo.

- **Extracción de linfocitos de sangre periférica**

Mediante punción venosa en el antebrazo de donadores voluntarios se obtuvieron aproximadamente de 10 a 15 mL de sangre que se recolectaron en tubos con EDTA como anticoagulante.

En un tubo cónico de vidrio se colocaron 5 mL de Histopaque® a los cuales se les agregó la sangre en proporción 1:1 y dejándola caer por las paredes lentamente teniendo mucho cuidado de no romper la interfase formada entre el Histopaque® y la sangre.

Una vez adicionada la sangre se colocaron los tubos en la centrífuga, con cuidado de no destaparlos y no agitarlos, y se centrifugaron durante 30 minutos a 2500 rpm y sin freno al final del ciclo de centrifugación.

Transcurrido el tiempo se retiró el anillo de células mononucleares formado introduciendo con mucho cuidado la punta de la micropipeta para no romper las interfases formadas entre el suero-células mononucleares-Histopaque®-botón celular.

Las células recuperadas se centrifugaron nuevamente a 2500 rpm durante 15 minutos y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio RPMI 1640, se colocaron en una caja de Petri y se les añadió medio RPMI 1640 con 10% SFB hasta cubrir toda la superficie de la caja, se introdujo la caja a la incubadora y se dejaron durante un lapso de 3 a 24 horas hasta su uso. Este procedimiento se realizó siempre como máximo 24 horas antes de hacer el análisis por citometría.

- **Adecuación de la técnica para evaluación de DOR en membrana**

Para realizar la determinación del receptor en la membrana celular ya con el anticuerpo titulado se procedió de la misma forma en la preparación de la muestra.

- ✚ Para linfocitos

Se recuperaron sólo las células no adherentes, los linfocitos, retirando cuidadosamente con una micropipeta el medio de la caja de cultivo, sin despegar el resto de las células adherentes. La centrifugación se realizó a 2500 rpm durante 5 minutos.

- ✚ Para HepG2 y Reh

Se retiraron de incubación las botellas de cultivo, se adicionó verseno para despegar las células y se recuperó dentro de un tubo cónico, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos.

Una vez que se obtienen las células el procedimiento seguido es el mismo para los tres tipos celulares

Se resuspendieron las células en 1 mL de PBS, se tomaron 10 μ L de la suspensión celular y se colocaron en un microtubo de 200 μ L donde se resuspendió con 10 μ L más de solución de azul tripano y se realizó el conteo.

Se depositaron aproximadamente de 5×10^5 a 1×10^6 de células en 1 mL de PBS separándolas en seis microtubos de 2 mL para las siguientes condiciones:

- Blanco
- Células basales
- Células permeabilizadas
- Células estimuladas con liposomas vacíos
- Células estimuladas con liposomas con PIP₂
- Células estimuladas con PIP₂ libre

Se centrifugaron a 1500/2500 rpm (HepG2/linfocitos), se lavaron con PBS y se colocó el estímulo correspondiente. En el caso de las células estimuladas con liposomas, se adicionaron 500 µL de liposomas por cada 1x10⁶ células.

Posteriormente se colocaron en la incubadora los microtubos con estímulo y se dejaron durante 30 minutos, las células blanco, basales y permeabilizadas se mantuvieron en refrigeración.

Transcurrido el tiempo de estímulo se retiraron los microtubos de la incubadora, se centrifugaron y se realizó un lavado con PBS, a continuación, se fijaron las células adicionando 200 µL de paraformaldehído 2% y colocaron en refrigeración durante 20 minutos, se completó el volumen a 1 mL, se centrifugaron y lavaron nuevamente.

Se resuspendieron suavemente las células de la condición 'Permeabilizadas' con 200 µL de metanol filtrado y previamente enfriado a -20 °C y se dejaron en refrigeración durante 15 minutos. Se retiró el metanol y se lavaron.

Se resuspendieron las células en 100 µL de la solución de trabajo del anticuerpo primario OPRD-1 (2.5 µg/mL), exceptuando el blanco, se incubaron durante toda la noche, se adicionaron 900 µL de PBS a cada microtubo y se centrifugaron a 2500/3000 rpm durante 5 minutos.

Se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado más con PBS; posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario preparado en una solución de trabajo 2 µL de anticuerpo en 1000 µL de PBS resuspendiendo el botón de cada microtubo en 100 µL y se incubó durante 45 minutos a 37 °C cubriendo de la luz en todo momento.

Se llevó el volumen total de los microtubos a 1 mL con PBS, se centrifugó y lavó nuevamente. Por último, se resuspendió el contenido de cada tubo en 500-1000 µL de PBS y se transfirieron a tubos FACS para analizar en el citómetro de flujo.

- **Preparación de liposomas catiónicos con PIP₂**

Para la preparación de los lotes de liposomas utilizados en los ensayos se utilizó el siguiente método:

Se mezclaron en un tubo de ensayo un fosfolípido y un lípido catiónico en proporción 1:1 en cloroformo hasta obtener una mezcla homogénea, se evaporó el disolvente mediante una corriente de nitrógeno y se adicionó el PIP₂ en concentración picomolar a partir de un stock.

Posteriormente se agitó vigorosamente y se sometió a varios ciclos de sonicación, después de los cuales se llevó a un volumen definido con una solución amortiguadora de pH específico y se acondicionaron en viales de 2 mL. Todo se realizó en campana de flujo laminar y bajo condiciones específicas de trabajo de acuerdo al procedimiento normalizado del laboratorio.

Por último, se tomó una muestra del lote fabricado y se llevó a analizar al citómetro de flujo, para determinar sus características físicas, corroborar la homogeneidad de las partículas y para comparar su similitud con datos de lotes de referencia.

- **Evaluación de tamaño y potencial Z de liposomas por DLS**

La evaluación del potencial Z y del tamaño de partícula se llevó a cabo en un Zetasizer nano Z de la marca Malvern Instruments.

Primero se midió una alícuota de 1000 µL de LIP-PI como muestra y se colocó en una celda o cubeta de plástico específica para el equipo.

Posteriormente se seleccionaron las condiciones de lectura de la muestra y se ejecutó el análisis

Se retiró la celda del instrumento y se colocó una nueva muestra del mismo volumen en una celda capilar para determinación del potencial Z.

Se repitieron los pasos anteriores para la muestra de LIP-VAC y en ambas muestras de liposomas se determinó el tamaño de partícula y potencial Z a temperaturas de 20 °C y 37 °C.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

Experimental. Retrospectivo con seguimiento. Longitudinal. Comparativo. Estudio experimental aleatorio controlado.

Población objetivo

Receptor opioide δ (DOR)

Población a estudiar

Linfocitos extraídos de sangre periférica

- a. Criterios de inclusión: Sangre de individuos sanos.
- b. Criterios de exclusión: Sangre de individuos que presenten cualquier enfermedad infecciosa o crónica.
- c. Criterios de eliminación: Muestras de sangre contaminadas posteriores a su extracción.

Variables

- Independientes

Blanco, no hay estímulo ni alteración en la membrana.

Permeabilización de membrana celular.

Estímulo de liposomas cargados con PIP₂.

- Dependientes

Expresión de DOR en la membrana plasmática

RESULTADOS

- **Fabricación de liposomas**

Para la fabricación de liposomas se empleó un lípido catiónico sintetizado en el por el equipo de trabajo del laboratorio 4 de la UMIEZ con un método diseñado aquí mismo, por lo que en la utilización de un nuevo lote de lípido es necesario realizar un control de propiedades físicas y verificar la formación de las microvesículas utilizando el nuevo lípido sintetizado (imagen 1).

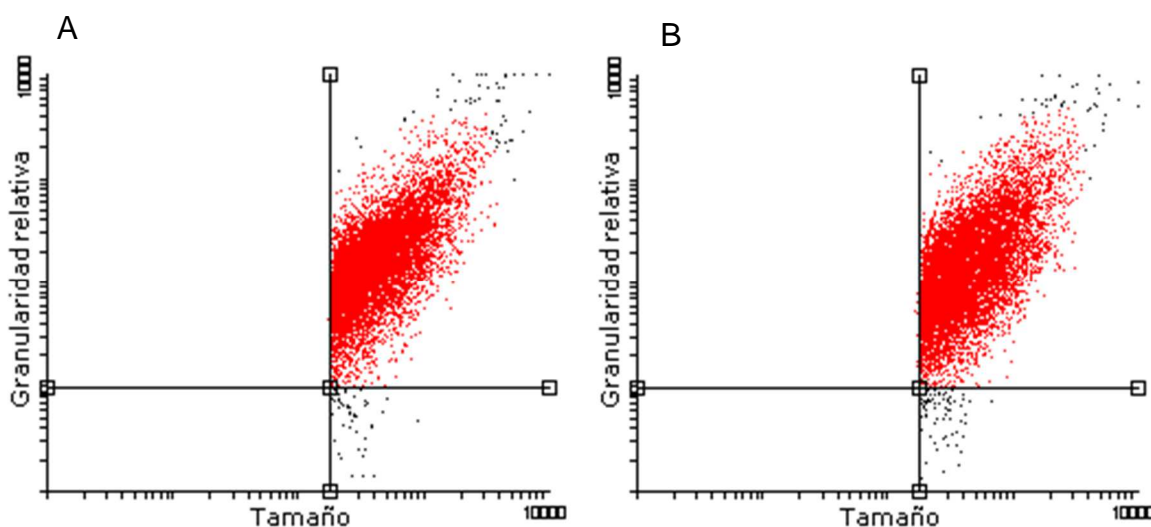


Imagen 1. A. Gráfico dispersión de los eventos correspondientes a los liposomas fabricados con el lípido de referencia. B. Eventos correspondientes a los liposomas fabricados con el nuevo lote de lípido sintetizado.

Se obtuvo una dispersión de la población similar en ambos lotes de liposomas; la imagen 1B muestra que la distribución de granularidad relativa (o complejidad) y tamaño de las nanovesículas fabricadas con el lípido de nueva síntesis es similar a las que muestran los liposomas fabricados con el lípido de referencia mostrados en la imagen 1A.

Los lotes fabricados se nombran con un código dependiendo de lo que contengan o qué otros componentes se agreguen a su estructura. Para la prueba de similitud entre los lotes de liposomas se utilizaron solo el fosfolípido y el lípido catiónico de la formulación base, es decir, sin PIP₂ o vacíos, por lo que el código interno asignado es LIP-VAC; así, para liposomas con lípido de referencia usaremos el código LIP-VAC LR y LIP-VAC LS para el fabricado con el nuevo lote de lípido sintetizado.

En la tabla 1 se presentan los datos de los eventos analizados de cada lote de liposomas.

Tabla 1. Eventos obtenidos para cada lote fabricado.

	LIP-VAC LR	LIP-VAC LS
Eventos totales	10000	10000
Eventos región Superior derecha	9903	9860
% Similitud	99.57	

Se observa que las poblaciones presentan una similitud mayor al 99% de acuerdo a los eventos en la región especificada por el lípido de referencia.

También se empleó la técnica de DLS para evaluar el tamaño y el potencial Z de los liposomas tanto LIP-PI y LIP-VAC a temperaturas de 20 °C y 37 °C.

Para LIP-VAC a 20 °C se obtuvo un decaimiento rápido del coeficiente de correlación (gráfico 1A) lo que indica que las partículas son en general de tamaño pequeño, además de que el intercepto se encuentra comprendido en 0.9 diciendo que la población presenta una baja dispersión de tamaños, es decir, varía poco.

En el gráfico 1B se representa la distribución del tamaño de las partículas analizadas de acuerdo a su intensidad, se puede ver en el primer pico una población de aproximadamente 200 nm de tamaño y una segunda población de aproximadamente 2500 nm.

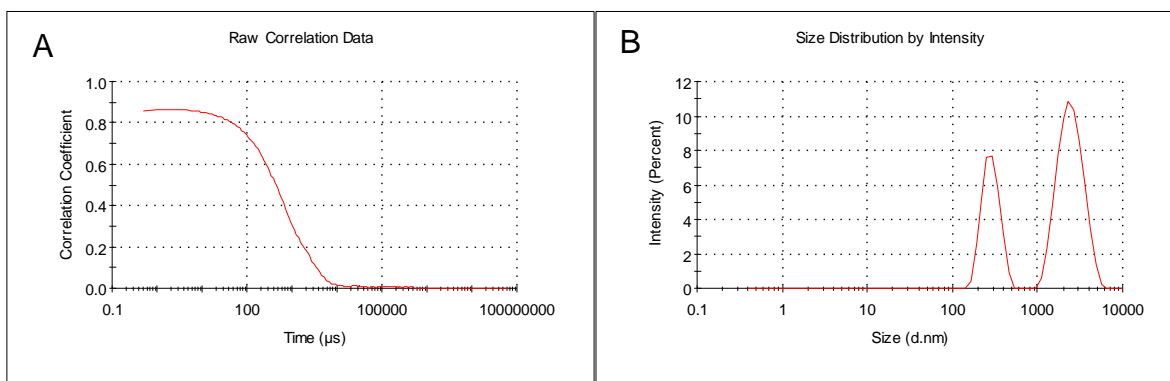


Gráfico 1. Medición de tamaño de partícula de LIP-VAC a 20 °C. A. Coeficiente de correlación vs tiempo; B. Distribución de la población de acuerdo a su tamaño vs intensidad.

El gráfico 2A muestra que LIP-VAC a 37 °C presenta un decaimiento de su coeficiente de correlación similar al que se observó a 20 °C y de igual forma un intercepto cercano a 0.9 lo que indica poca variación entre los tamaños de partícula analizados.

Se ve la aparición de tres picos en el gráfico 2B que indica la existencia de tres poblaciones distintas en tamaño en la muestra; la primera de aproximadamente 90 nm, la segunda de 800 nm y la tercera, mucho más grande, de 3 μm.

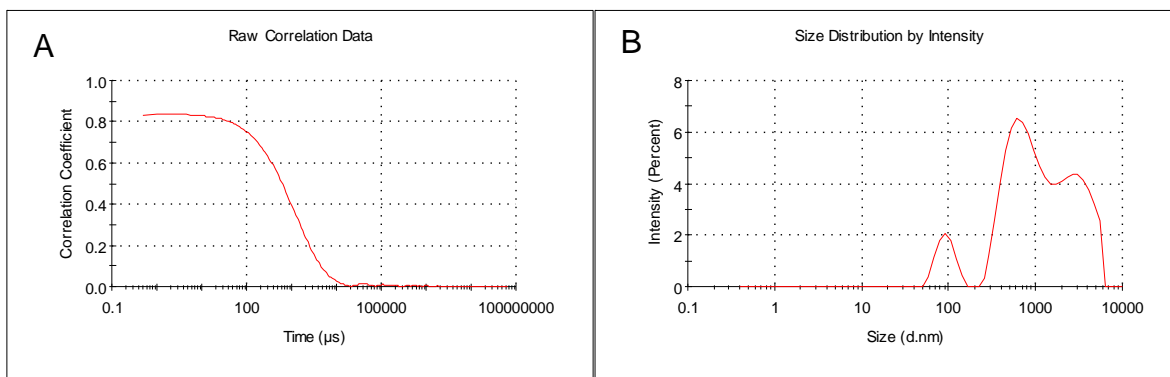


Gráfico 2. Medición de tamaño de partícula a 37 °C de LIP-VAC. A. Correlación de tamaño de partículas a través del tiempo. B. Distribución de intensidad vs tamaño de la población.

Cuando se realiza la determinación para el tamaño de partícula, de manera análoga el software (Malvern Zetasizer v7.12) entrega datos numéricos de la muestra que analiza como: tamaño promedio en la muestra (Z average), intercepto de la gráfica de correlación y tamaño máximo con porcentaje de intensidad de cada pico mostrado en la gráfica de distribución intensidad vs tamaño.

En la tabla 2 se encuentran los datos para ambas temperaturas analizadas de LIP-VAC. Se debe notar que para 37 °C los tamaños de partícula son menores, sin embargo, la intensidad es menor para el más pequeño, así como la existencia de un tercer pico ausente en 20 °C que muestra un tamaño mucho mayor.

Tabla 2. Resultados de LIP-VAC para cada temperatura.

	Tamaño (nm)		Intensidad (%)	
	37 °C	20 °C	37 °C	20 °C
Pico 1	93.72	286	8.4	33.8
Pico 2	833.2	2516	58.3	66.2
Pico 3	3171	0	33.3	0
	Z average		Intercepto	
	671	668	0.912	0.929

De igual forma se analizaron los lotes de LIP-PI encontrando a 37 °C, de acuerdo al gráfico 3A, que el tamaño de partícula aparentemente no es muy poli disperso y al igual que en los resultados de LIP-VAC, el decaimiento es rápido y por consiguiente el tamaño de las partículas es pequeño.

El gráfico 3B muestra tres picos que de la misma forma indican tres poblaciones con tamaños comprendidos entre aproximadamente 50 nm para el primer, 250 nm para el segundo y 2000 nm para el tercero con intensidades crecientes del pico uno al tres.

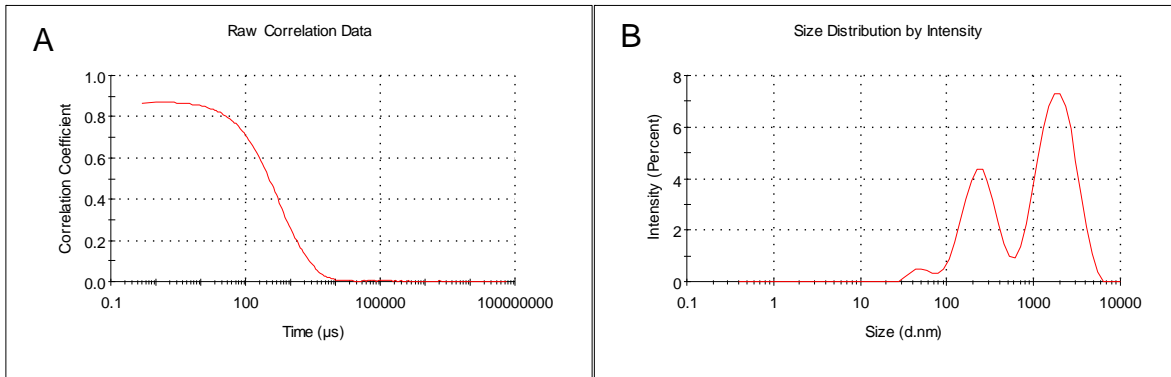


Gráfico 3. Análisis de tamaño de partícula de LIP-PI a 37°C. A. Correlación tamaño vs tiempo; B. Distribución de población intensidad de señal vs tamaño.

A 20 °C los resultados de LIP-PI de tamaño de partícula de igual forma similares a lo obtenido a 37 °C y a LIP-VAC, en el gráfico 4A se ve el intercepto con un valor cercano a 0.9 y un rápido decaimiento del coeficiente de correlación.

Los tres picos que se observan en el gráfico 4B representan poblaciones de aproximadamente 100 nm, 600 nm y 3000 nm respectivamente para los picos uno, dos y tres, sin embargo, hay que advertir la altura del pico dos que indica una mayor intensidad inclusive que las partículas más grandes.

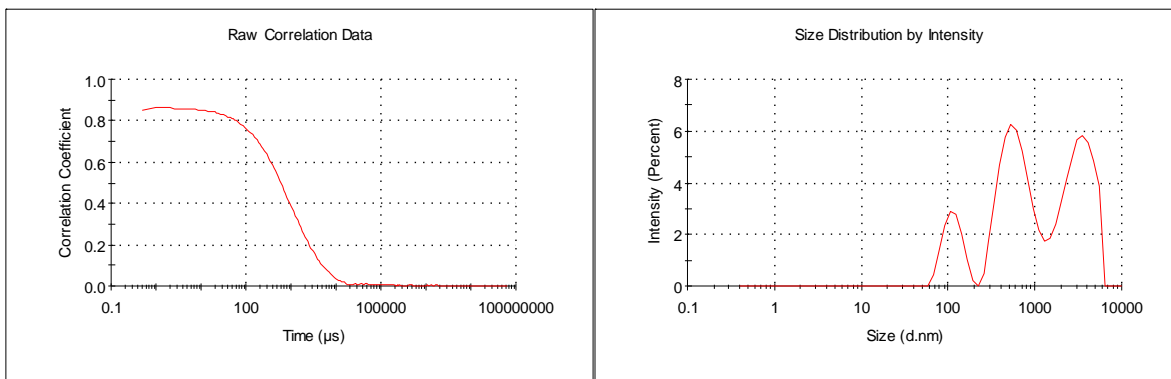


Gráfico 4. Determinación del tamaño de partícula de LIP-PI a 20°C. A. Correlación del tamaño de partícula vs tiempo; B. Distribución intensidad vs tamaño de partícula de la población.

De la misma forma se obtuvieron los datos numéricos para las determinaciones a las dos temperaturas de las muestras LIP-PI que se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados a cada temperatura de LIP-PI.

	Tamaño (nm)		Intensidad (%)	
	37 °C	20 °C	37 °C	20 °C
Pico 1	53.59	114.1	2.5	12.9
Pico 2	261.8	628.1	33.8	43.6
Pico 3	2034	3276	63.7	43.4
	Z average		Intercepto	
	512.7	615.6	0.932	0.926

El equipo Zetasizer nano Z puede realizar también mediciones de potencial Z cambiando la muestra a una celda capilar con electrodos. La determinación la lleva a cabo aplicando una corriente en la celda que va detectar las cargas de los iones en el medio.

Para LIP-VAC se obtuvo un potencial Z de 38.4 mV a 37 °C y 36.5 mV a 20 °C. El gráfico 5A muestra la variación en la fase, o carga, en la muestra con respecto al tiempo que se aplica la corriente en el medio para la temperatura de 37 °C y el gráfico 5B a 20 °C.

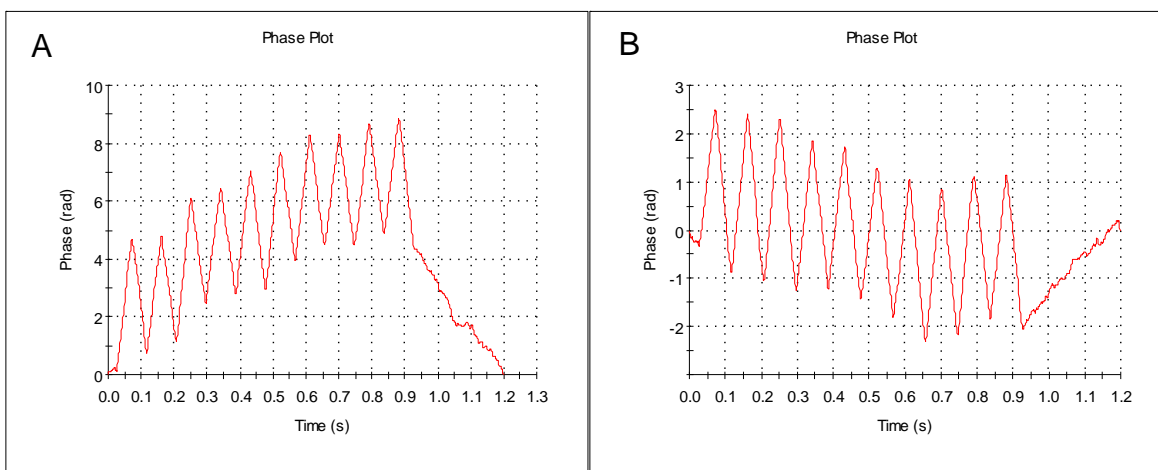


Gráfico 5. Determinación del potencial Z de la muestra de LIP-VAC A. Corresponde al análisis a 37°C; B. Análisis a 20°C.

De la misma forma se realizó la determinación de potencial Z para LIP-PI a ambas temperaturas. El gráfico 6A muestra la variación de carga conforme se aplica la corriente a través del tiempo para 37 °C con un potencial Z obtenido de 21.6 mV y en el gráfico 6B se muestra la variación de fase, o carga, con respecto al tiempo a 20 °C con un potencial Z de 30.7 mV.

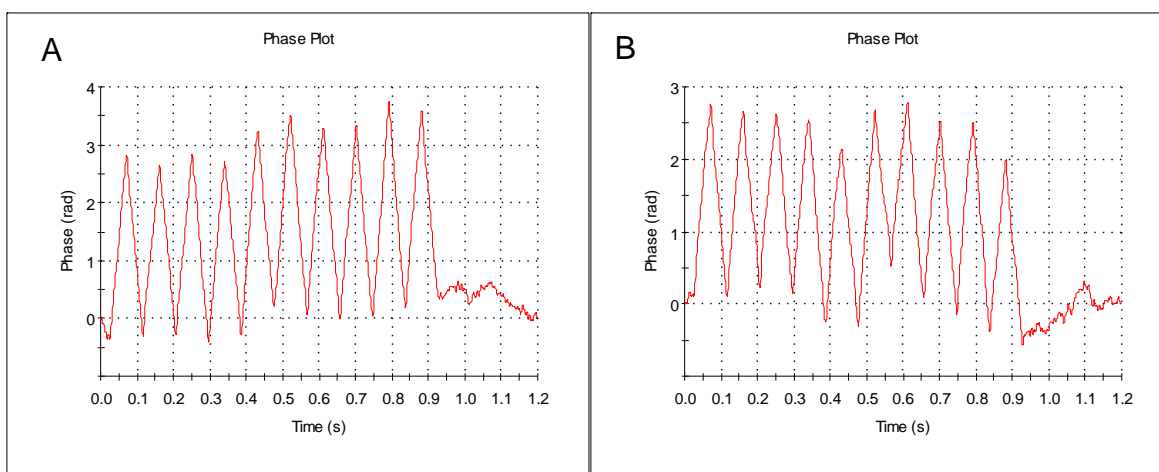


Gráfico 6. Determinación del potencial Z de la muestra de LIP-PI. A. Análisis a 37°C; B. Análisis a 20°C.

De la misma forma, el software nos entrega resultados numéricos de determinación del potencial Z para cada una de las muestras, las cuales se recopilan en la tabla 4.

Se aprecia una disminución del potencial Z en LIP-PI debido al aumento en la temperatura y mayor diferencia de potencial para LIP-VAC en ambas temperaturas comparado con los valores de potencial Z de LIP-PI.

Tabla 4. Resultados del promedio de potencial Z obtenido para cada uno de los liposomas a ambas temperaturas.

	Potencial Z (mV)	
	37°C	20°C
LIP-VAC	38.4	36.5
LIP-PI	21.6	30.7

- **Titulación del anticuerpo OPRD-1**

El anticuerpo utilizado para medir la presencia del DOR es un anticuerpo dirigido a la fracción N-terminal del receptor, especificado para su uso en inmunohistoquímica y no probado con otras técnicas, por lo que fue necesario determinar su aptitud de uso para la técnica de citometría de flujo.

Para su prueba y titulación se utilizó la línea celular HepG2 como un blanco positivo ya que expresa DOR de manera natural (imagen 2) ²¹.

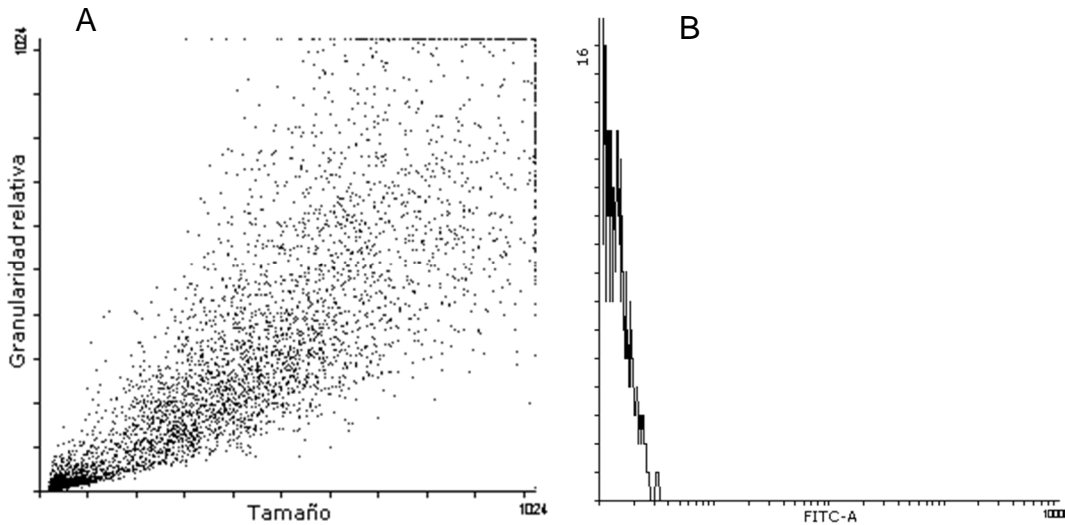


Imagen 2. Análisis de células blanco de HepG2. A. Gráfico de dispersión tamaño celular vs granularidad relativa o complejidad. B. Histograma de intensidad de fluorescencia vs eventos.

La evaluación de las células blanco localiza la distribución de la población celular. En la imagen 2A se observan cuáles son las características de las células, la distribución con base en tamaño y complejidad, así mismo, en la imagen 2B se muestra la fluorescencia 'natural' de las células a causa de las insaturaciones y propiedades de los lípidos que conforman sus membranas y aunque el histograma indica que la fluorescencia es poca, se requiere medirla para posteriormente apreciar la diferencia de fluorescencia emitida por los anticuerpos adheridos a las células.

Se debe hacer notar que la diferencia de escalas en el eje de las abscisas entre ambas graficas se debe a que la medición de las características físicas de la célula está comprendida en un rango lineal, que no sufre cambios súbitos entre una y otra, al contrario del histograma, donde cada punto que se desplaza sobre el eje supone un aumento drástico en la fluorescencia y para poder apreciar los cambios se requiere de una escala que abarque una mayor cantidad de valores.

Cabe también señalar que los resultados fueron tratados con el programa computacional *Flowing Software 2 versión 2.5.1* el cual no permite añadir valores a las escalas de las gráficas, solo entrega datos numéricos para su análisis.

Para el desarrollo de la técnica se evaluó la fluorescencia emitida por cada anticuerpo utilizado de forma independiente para determinar si existía inespecificidad debido a una posible afinidad por otros sitios de unión a proteínas.

La imagen 3A muestra el desplazamiento de la población debido a la fluorescencia del anticuerpo primario OPRD-1, la imagen 3B muestra la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario y la imagen 3C es un histograma superpuesto que compara la fluorescencia detectada de cada población celular, en la que tomando como referente la región 1 comprendida entre barras azules, se puede apreciar la diferencia entre ambos anticuerpos y las células blanco.

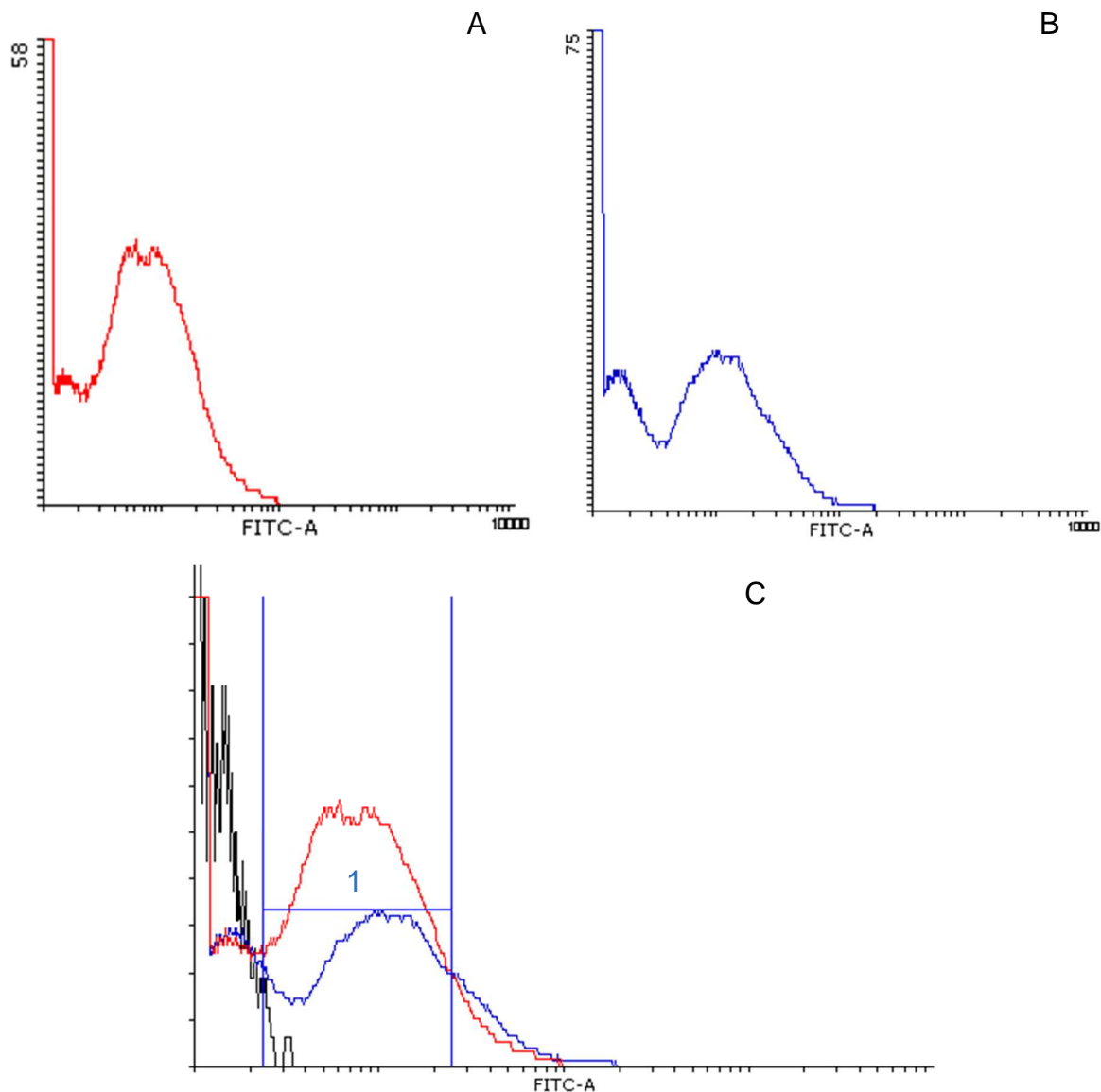


Imagen 3. Fluorescencia emitida por las células con la adición de los anticuerpos. A. Anticuerpo primario OPRD-1; B. Anticuerpo secundario de fluorescencia FITC; C. Histograma de superposición con células blanco (gris), anticuerpo primario (rojo) y anticuerpo secundario (azul).

Tanto las células con anticuerpo primario como secundario se desplazaron a la misma región de fluorescencia notablemente mayor que la del blanco, sin embargo, los eventos fueron menores para la población del segundo anticuerpo, donde el pico llega a una menor altura marcada por la región 1 (imagen 3C).

Para la titulación del anticuerpo OPRD-1, que está indicado por el proveedor para su empleo con la técnica inmunohistoquímica en una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, se probaron tres concentraciones diferentes que se eligieron reduciendo a la mitad la concentración indicada y a la mitad nuevamente la concentración resultante, siendo así las concentraciones probadas 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (imagen 4), esto debido a que la citometría de flujo es una técnica de mayor sensibilidad.

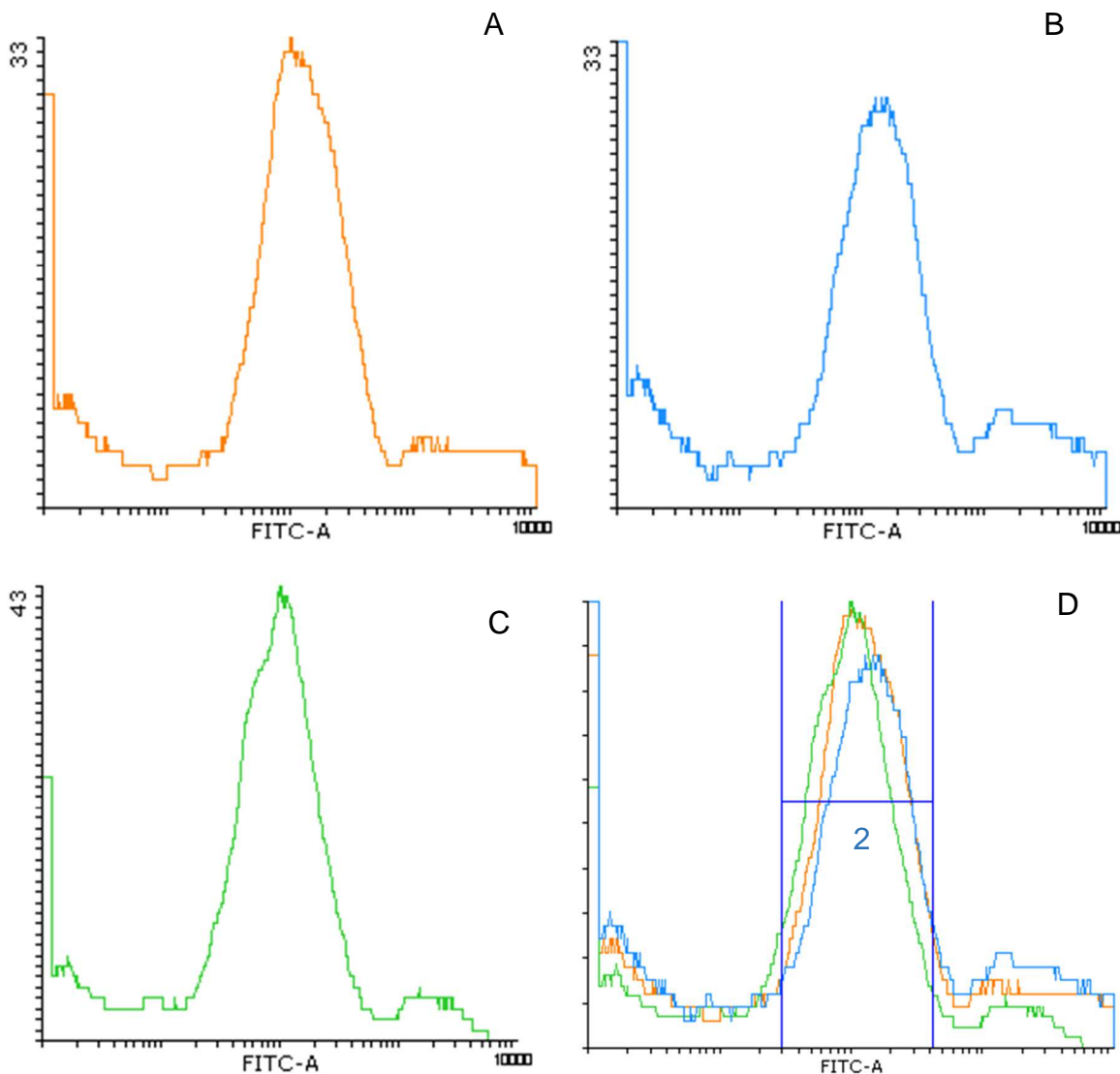


Imagen 4. Histogramas con la emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de anticuerpo primario OPRD-1 y anticuerpo secundario acoplado a FITC. A: 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (anaranjado), B: 5 $\mu\text{g/mL}$ (azul), C: 10 $\mu\text{g/mL}$ (verde), D: Histograma de superposición con las tres concentraciones comprendidas en la región 2.

Se puede advertir en la imagen 4D que cada una de las poblaciones se encuentra en la misma región (región 2) para cada concentración probada, lo cual nos indica la buena afinidad y especificidad de los anticuerpos puesto que la intensidad de fluorescencia emitida por cada una de las poblaciones es igual y no existe variación en la unión con el antígeno independientemente de la concentración a la cual se agregue el anticuerpo.

La tabla 5 nos muestra una comparación entre los eventos analizados para cada determinación. Se aprecia una cantidad de alrededor de cinco mil eventos totales por cada análisis, esto debido a las pérdidas sufridas en los lavados.

Tabla 5. Eventos obtenidos y su porcentaje de desplazamiento de población.

	Eventos	Eventos desplazados	% población desplazada	% eventos en región 2
10 $\mu\text{g/mL}$	5448	3959	73%	100%
5 $\mu\text{g/mL}$	5066	2941	58%	74%
2.5 $\mu\text{g/mL}$	5107	3260	64%	82%

Es importante indicar que el cien por ciento de eventos en la región dos para 10 $\mu\text{g/mL}$ se debe a que éstos son tomados como referencia del total de eventos desplazados, ya que ésta es la concentración indicada por el proveedor; así, los otros dos porcentajes están dados con base en el número de eventos desplazados por la primera concentración con el objetivo simple de observar la similitud entre las poblaciones más fácilmente.

En la imagen 5 se aprecia un histograma de superposición con la fluorescencia emitida en cada condición para hacer la comparación entre poblaciones.

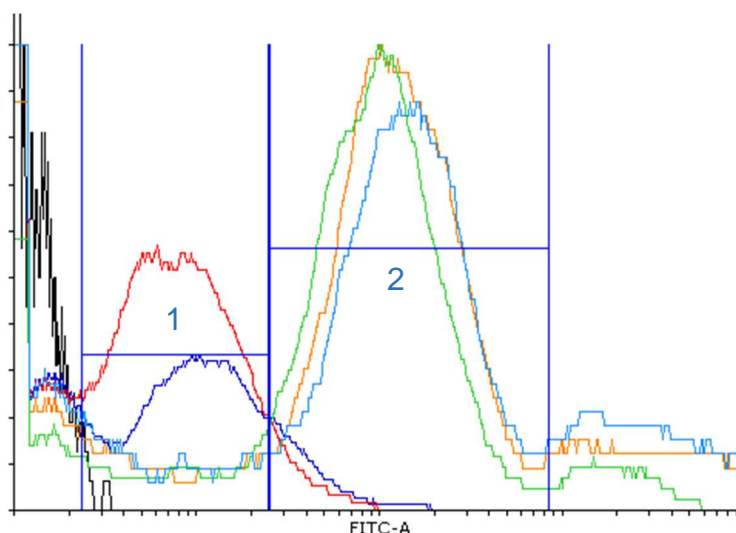


Imagen 5. Fluorescencias emitidas por las células blanco (gris), anticuerpo primario (rojo), anticuerpo secundario (azul marino), 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (anaranjado), 5 $\mu\text{g/mL}$ (azul claro), y 10 $\mu\text{g/mL}$ (verde).

Con la superposición de las gráficas (imagen 5) se puede diferenciar el notable desplazamiento en la fluorescencia que presentan las células al aplicarles ambos anticuerpos (líneas azul claro, verde y anaranjado) que se encuentran en la región dos, en comparación con los anticuerpos aplicados de forma individual (líneas azul marino y roja) que se encuentran en la región uno y que a su vez están alejadas de las células blanco, con lo que podemos asegurar una selectividad y especificidad por parte de los anticuerpos a sus respectivos antígenos, así como la sensibilidad de la técnica al determinar la concentración de trabajo óptima de los anticuerpos.

- **Expresión del DOR en linfocitos**

Se utilizó la técnica desarrollada para la evaluación del receptor en las células de hígado y se adecuó para su utilización en linfocitos analizando su expresión de manera basal y la obtenida al aplicar distintos estímulos.

Al igual que con HepG2, se determinaron la fluorescencia basal y características físicas de las células blanco (imagen 6).

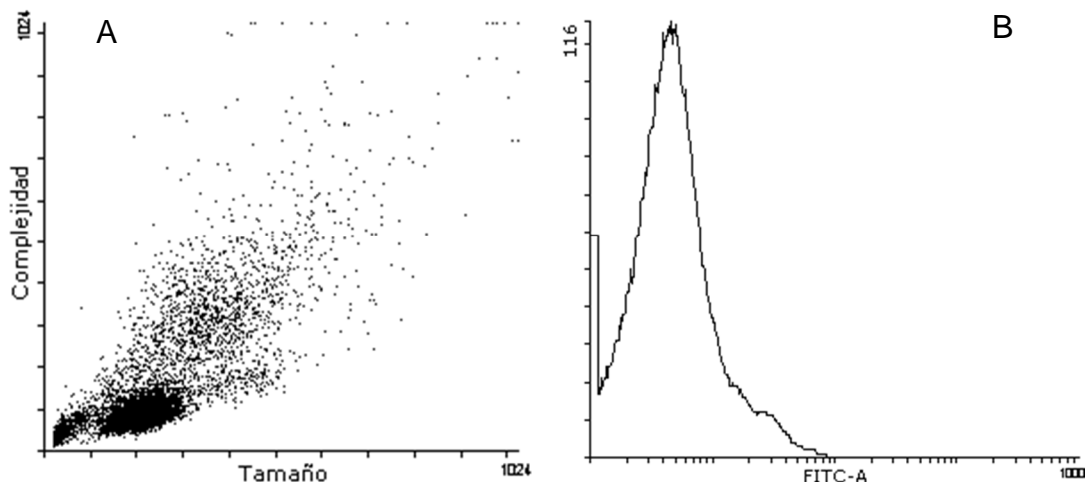


Imagen 6. A. Gráfico de dispersión de eventos para la población de linfocitos y; B. histograma que muestra la distribución de la población de acuerdo a la fluorescencia emitida.

En la imagen 6A se observa la población de linfocitos de acuerdo a su tamaño y complejidad más pequeña en comparación con la línea de referencia y asimismo se puede apreciar la formación de dos subpoblaciones, probablemente debidas a los distintos tipos de linfocitos, sin embargo, comparten de manera general sus características físicas. En la imagen 6B se puede identificar la fluorescencia natural de las células y la distribución de éstas.

Inicialmente se hicieron las determinaciones en células permeabilizadas y sin permeabilizar para evaluar la expresión basal del receptor sin ningún estímulo, encontrando que estas células, en efecto, cuentan con la presencia del DOR tanto al interior como en su superficie (imagen 7).

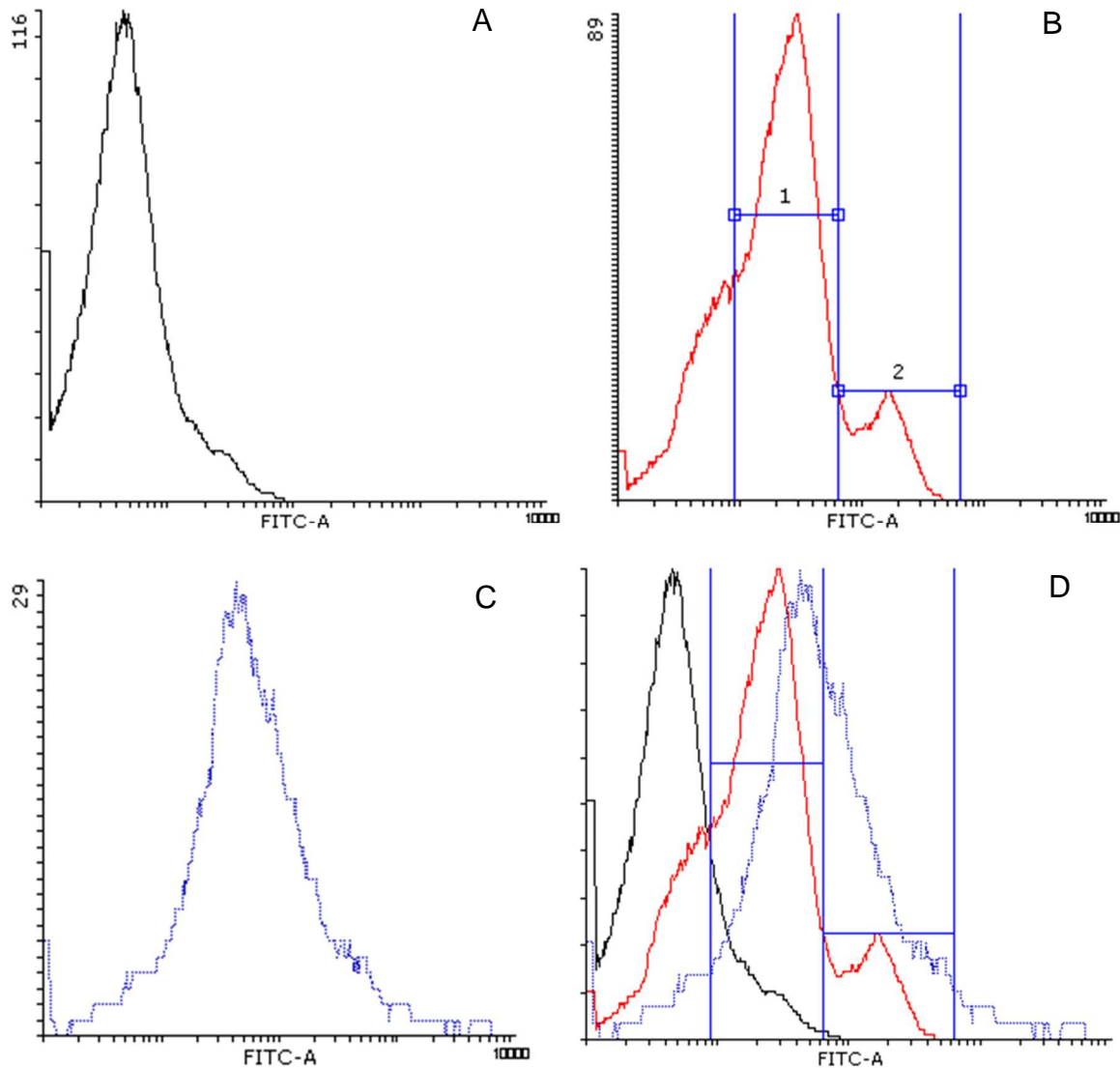


Imagen 7. Histogramas de distribución de población de acuerdo a su fluorescencia. A. Blanco; B. Expresión basal del DOR en superficie; C. DOR en células permeabilizadas y D. Comparación del desplazamiento con respecto a las células blanco; basal en membrana (rojo), basal total (azul).

En la imagen 7B se aprecia la formación de dos picos con diferentes intensidades de fluorescencia marcados con dos regiones. En la región uno se puede observar una mayoría en la población expresando ese nivel de fluorescencia, mientras que la población mostrada en la región dos es menor debido a la altura del pico, sin embargo, es más fluorescente. La imagen 7C muestra la fluorescencia de las células permeabilizadas.

El histograma de superposición de la imagen 7D indica un desplazamiento relevante de las poblaciones con expresión del DOR en comparación con las células blanco, en especial en la región dos, así como la distribución homogénea que parece tener la línea azul entre ambas regiones.

La aparición del segundo pico visto en las imágenes 7B y 7D posiblemente está dada por la expresión mayoritaria del receptor en alguna subpoblación linfocítica y se debe observar que en la expresión máxima alcanzada por cada pico visto en la imagen 7D, las células permeabilizadas muestran notablemente un mayor desplazamiento en la fluorescencia.

La tabla 6 nos muestra los valores de cada determinación para las poblaciones de linfocitos analizadas.

Tabla 6. Datos de los eventos obtenidos.

	Total de eventos	Eventos		Total	% desplazado		% total desplazado
		R1	R2		R1	R2	
Basal	10000	6425	1246	7671	64%	12%	76%
Permeadas	3612	1772	1367	3139	49%	38%	87%

A pesar de que la distribución de las células permeadas está entre ambas regiones y no cuenta con un segundo pico claramente marcado como en el caso de las basales en superficie (imagen 7D), la tabla 6 nos da los valores de los eventos y porcentajes correspondientes a cada región.

También se obtuvieron los datos de las células una vez que se aplicaron los estímulos con LIP-VAC, LIP-PI y PI-L. La imagen 8 contiene las gráficas de los histogramas con las distribuciones de cada población de linfocitos y sus estímulos correspondientes.

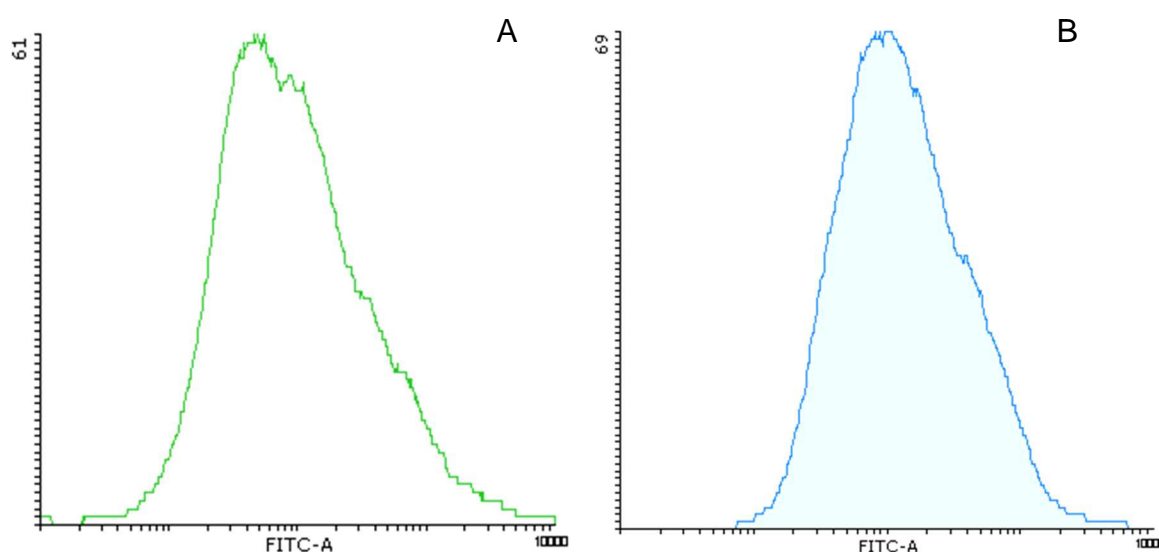


Imagen 8. Histogramas de distribución de acuerdo a la fluorescencia. A. Estímulo con LIP-VAC (verde); B. Estímulo con LIP-PI (azul claro).

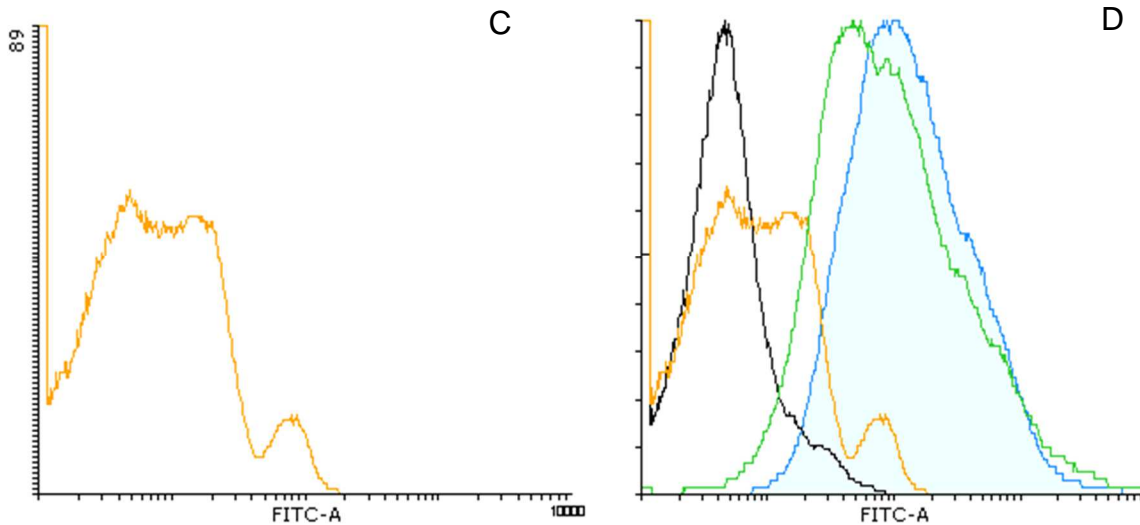


Imagen 8. Histogramas del aumento en la fluorescencia y desplazamiento de la población al aplicar los diferentes estímulos. C. Estímulo con PI-L; D. Histograma de superposición de las poblaciones; PI-L (dorado), LIP-VAC (verde), LIP-PI (azul claro) y células blanco (negro).

Se puede observar en la imagen 8C que el estímulo con PI-L produce tres picos que se pueden distinguir en las regiones tanto de las células blanco, las células con expresión basal y las estimuladas con liposomas en la imagen 8D, esto podría decir que las distintas subpoblaciones de linfocitos se están viendo afectadas de forma diferente por el estímulo.

Igualmente, la imagen 8D muestra la similitud entre la máxima fluorescencia provocada por LIP-VAC y LIP-PI, sin embargo, no se debe ignorar la diferencia que existe, aunque sea mínima, ya que se debe recordar que en la escala logarítmica un aumento en la gráfica, aunque sea pequeño, supone un cambio importante en la intensidad de la fluorescencia.

Aunado a lo anterior, se aprecia en la imagen 8D el incremento drástico que sufren las células en su fluorescencia al aplicar los estímulos, puesto que, en comparación con las células blanco, indicadas por la línea negra, el desplazamiento provocado por los liposomas es muy grande.

En la imagen 9 se muestra el histograma de superposición con las regiones de mayor desplazamiento y se distingue la similitud entre algunos de los picos alcanzados por los distintos estímulos.

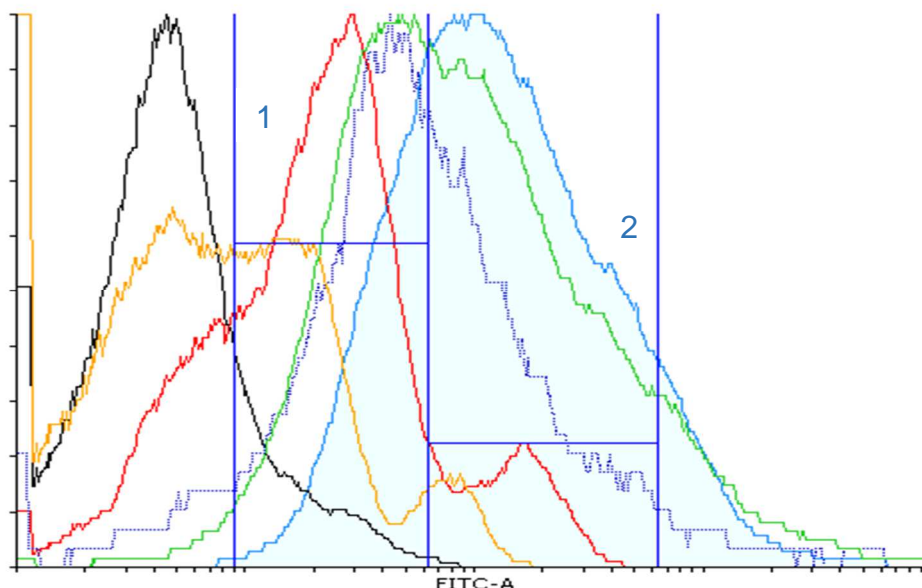


Imagen 9. Histograma de superposición de todas las fluorescencias emitidas por las células en respuesta a los diferentes estímulos. Se muestran las células blanco (negro), la expresión basal en membrana (rojo), permeadas (línea punteada azul), PI-L (dorado), LIP-VAC (verde) y LIP-PI (azul con área resaltada).

El incremento en la fluorescencia de cada condición es considerable con respecto al blanco, no obstante, de acuerdo a la imagen 9 las regiones uno y dos remarcan aún más las diferencias que existen entre el estímulo con LIP-PI (azul claro) y la expresión basal en superficie (rojo) lo cual indica el pronunciado efecto del liposoma con PIP_2 . Asimismo, se nota la similitud entre el efecto de LIP-VAC y la expresión basal total a pesar de la pequeña fracción de la población que se encuentra en la región dos, con efecto semejante al LIP-PI.

La tabla 7 muestra los datos obtenidos en las determinaciones, donde de igual forma aparecen los valores de cada condición correspondientes a las regiones uno y dos observadas en la imagen 9.

Tabla 7. Número de eventos y porcentajes de población para cada condición.

	Total de eventos	Eventos		Total	% desplazado		% total desplazado
		R1	R2		R1	R2	
Basal	10000	6425	1246	7671	64%	12%	76%
Permeadas	3612	1772	1367	3139	49%	38%	87%
LIP-VAC	10000	4056	4860	8916	40%	49%	89%
LIP-PI	10000	2535	6556	9091	25%	66%	91%
PI-L	10000	3560	467	4027	36%	5%	41%

Con base en los resultados podemos hacer la comparación del efecto producido por cada uno de los estímulos sobre la expresión del DOR en la membrana de los linfocitos, observado mediante el aumento de la fluorescencia. Más puntualmente, en la imagen 10 se puede observar mejor el cambio en la expresión producido por el liposoma con PIP₂ con respecto a la expresión basal en la membrana de los linfocitos.

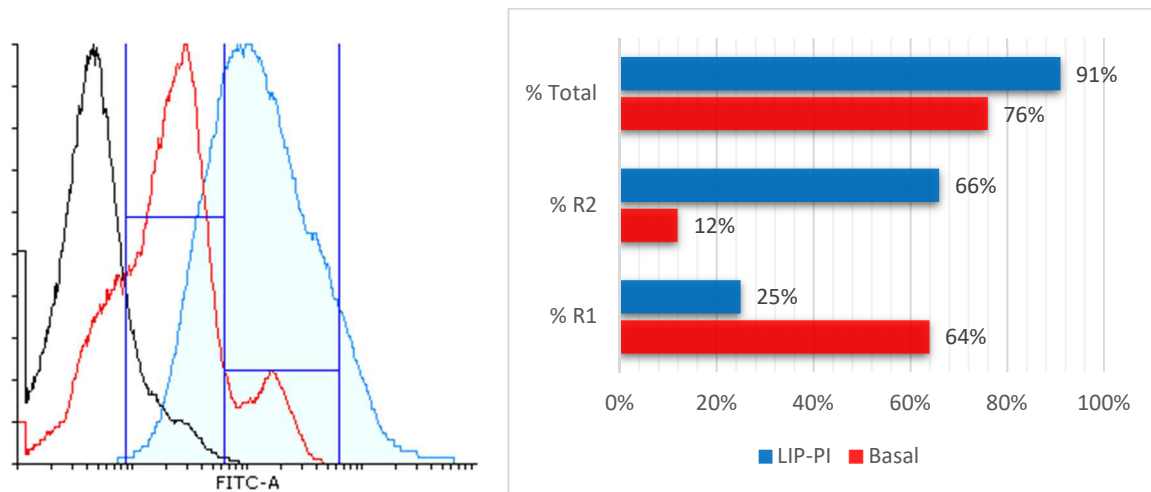


Imagen 10. Histograma de superposición con la distribución de eventos de acuerdo a la fluorescencia de linfocitos estimulados con LIP-PI con respecto a la fluorescencia basal que expresan el DOR en la membrana de estas células. En la gráfica de barras se ilustra más claramente la diferencia entre la expresión del receptor que se presenta en ambas condiciones.

Los resultados de la imagen 10 indican que, en comparación con las células blanco, el 76% presentó un aumento de fluorescencia que se traduce en la proporción de la población de linfocitos que muestra una aparición basal del DOR en la membrana y que al aplicar el estímulo con LIP-PI aumenta al 91% del total de los linfocitos. Además, la fracción de la población con expresión basal que está en la región dos, pasa del 12% al 66% después de aplicar el estímulo, lo que significa, en primera instancia un aumento en la aparición del receptor en la mayoría de las células de la población total.

- **Expresión del DOR en la línea celular Reh**

Se determinó también la expresión del DOR en la línea celular Reh de tipo linfoide, los resultados fueron concordantes a lo obtenido con los linfocitos aislados de sangre periférica.

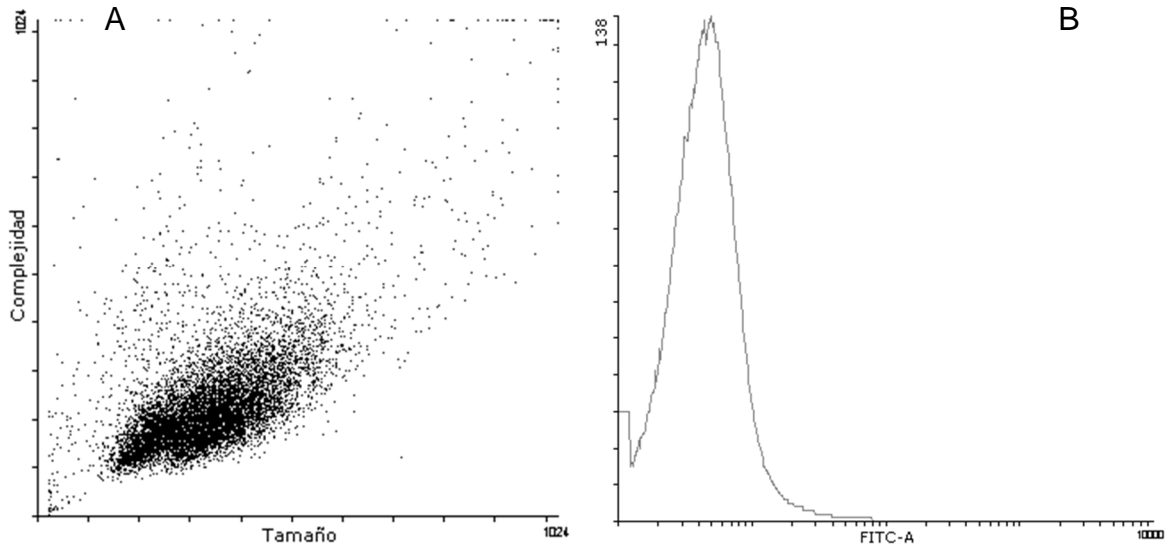


Imagen 11. Diagrama de dispersión de eventos (A) de la población blanco de células Reh e histograma (B).

Para la línea celular Reh se siguió el mismo procedimiento y primero se determinaron la granularidad relativa y tamaño de las células (imagen 11A), así como su fluorescencia natural (imagen 11B).

Hay que observar, en la imagen 11A, que el tamaño de las células así como su complejidad (o granularidad relativa) es más homogénea que los linfocitos y sus características son similares entre sí ya que se encuentran en un rango definido.

Para la determinación del DOR y se colocaron las mismas condiciones para la evaluación de los diferentes estímulos (imagen 12).

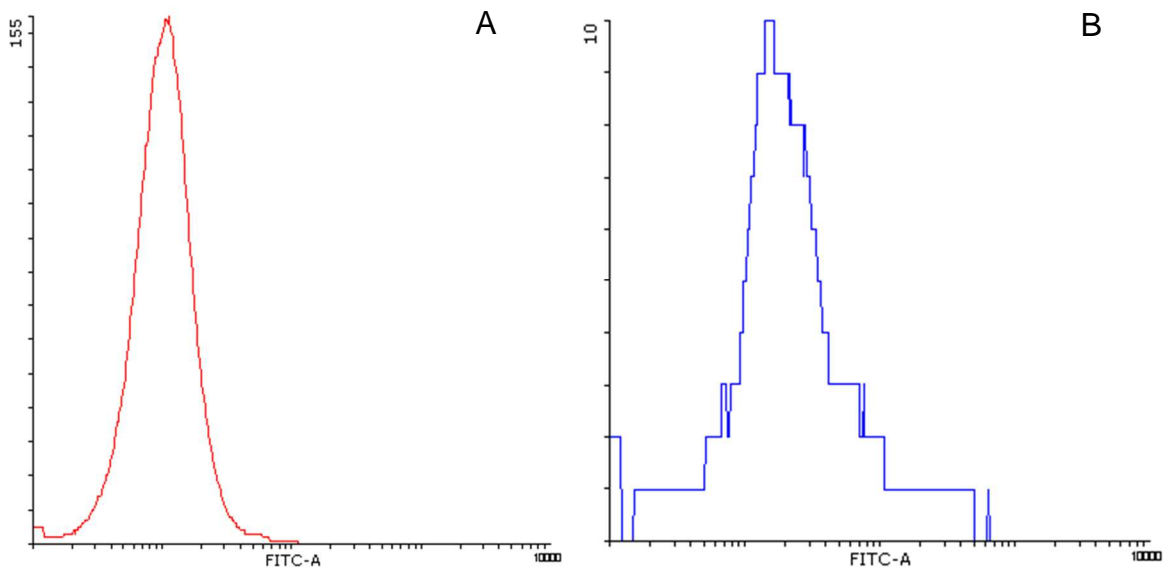


Imagen 12. Histogramas que representan la fluorescencia emitida por las células al aplicarles diferentes estímulos; A. Expresión basal del DOR; B. Células permeadas/expresión total del DOR.

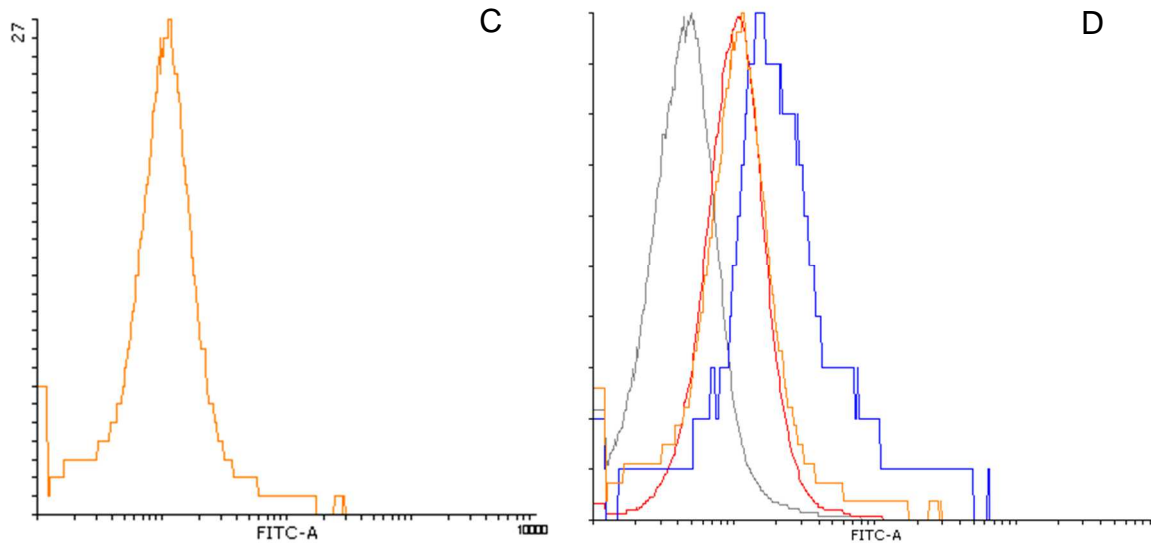


Imagen 12. Histogramas para: C. Estímulo con PI-L; D. Histograma de superposición con células blanco (gris), expresión basal en membrana del receptor (rojo), estímulo con PI-L (anaranjado) y células permeadas o expresión total del DOR (azul).

Primero hay que notar que la forma que presentan las líneas de la imagen 12B y 12C se debe a la baja cantidad de eventos analizados por el citómetro a causa de la pérdida de las células durante los lavados del procedimiento, no obstante, en la imagen 12D se aprecia que la diferencia entre las fluorescencias existe entre las células blanco y las condiciones de permeabilización, expresión basal y PI-L, en donde la expresión basal en superficie y PI-L es la misma y sólo las células permeabilizadas dieron un notable aumento en la fluorescencia.

En la imagen 13 aparecen los resultados de las condiciones con LIP-PI y LIP-VAC.

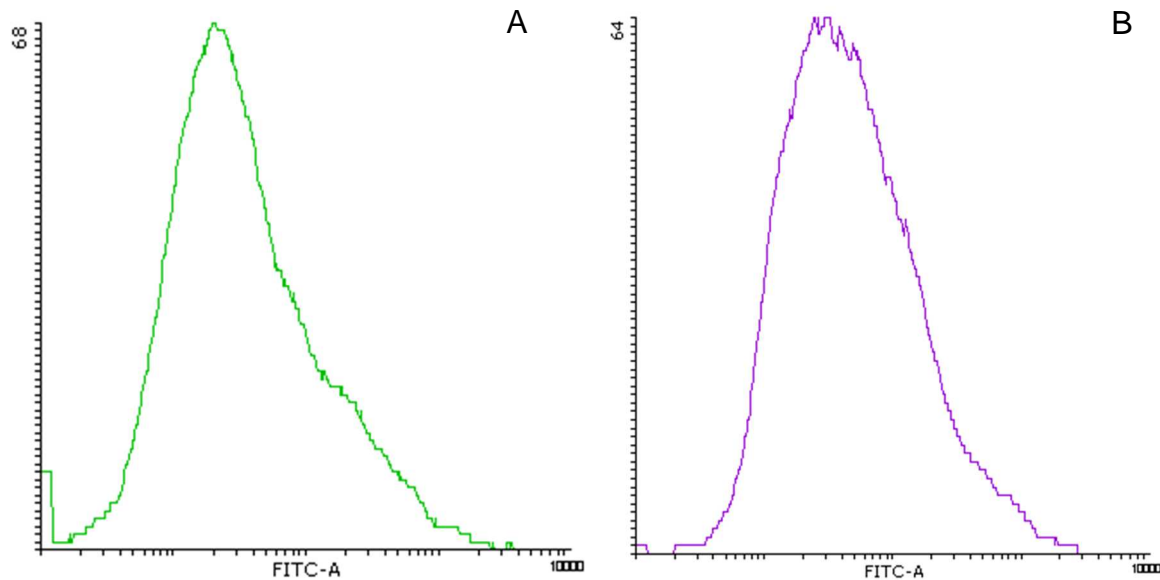


Imagen 13. Histogramas que muestran el aumento en la fluorescencia de las células que expresan el receptor al aplicar es estímulo con LIP-VAC (A), y el estímulo con LIP-PI (B).

La imagen 14 muestra la comparación entre las fluorescencias de las poblaciones sometidas a los diferentes estímulos y se ve cómo, al igual que en los linfocitos, el LIP-PI está teniendo un efecto de mayor desplazamiento, en la región dos, en donde la expresión de DOR es superior en comparación con las células blanco y las expresadas de forma basal en superficie. De igual manera, el efecto de LIP-VAC es similar al que presenta LIP-PI.

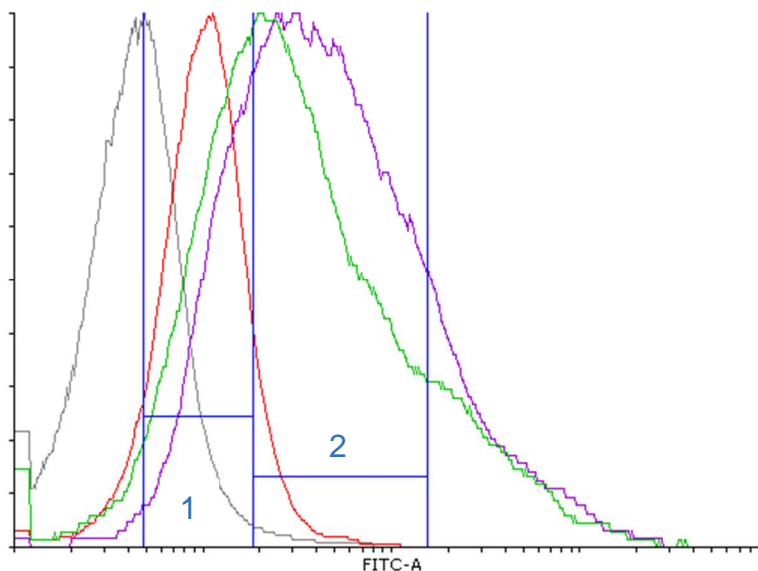


Imagen 14. Histograma de superposición donde se observa la comparación en la fluorescencia de cada condición aplicada a las células, blanco (gris), basal en membrana (rojo), LIP-VAC (verde) y LIP-PI (lila).

La tabla 8 recopila los datos y muestra la comparación entre los eventos analizados en cada una de las condiciones establecidas.

Tabla 8. Comparación de la población desplazada de acuerdo a su fluorescencia en cada una de las condiciones establecidas.

	Total de eventos	Eventos desplazados	% población desplazada
Basal	10000	8143	81%
Permeadas	1044	901	86%
LIP-VAC	10000	5990	60%
LIP-PI	10000	7283	73%
PI-L	2094	1353	65%

Se debe mencionar que en la tabla 8 para las células de basa, permeadas y PI-L se presenta la población desplazada a la región uno y para las células de LIP-VAC y LIP-PI se muestra la población desplazada a la región dos con respecto a la población inicial blanco.

- **Expresión del DOR en HepG2**

Por último, también se realizó la experimentación sobre la línea celular HepG2 para medir el efecto de los diferentes estímulos sobre la expresión del DOR.

Se obtuvieron los siguientes resultados para la medición del blanco (imagen 15).

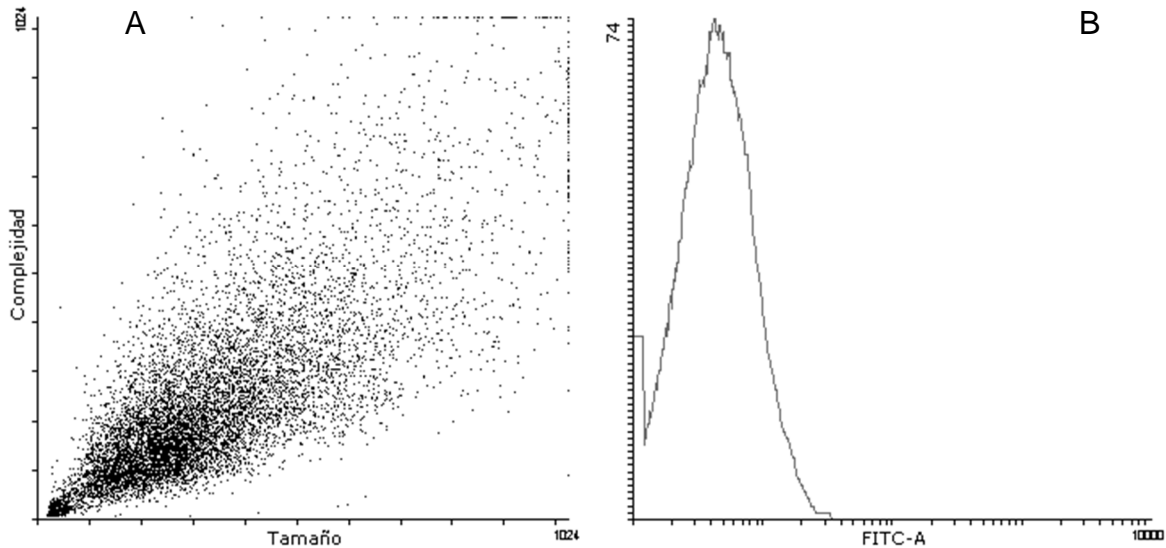


Imagen 15. A. Diagrama de dispersión de eventos; B. Histograma de fluorescencia presentada por la población de células blanco.

En la imagen 15A se encuentra el gráfico de dispersión de la población de células HepG2 y en la imagen 15B el histograma de distribución de la población de acuerdo a la fluorescencia natural de las células.

Es necesario destacar que para el ensayo de titulación del anticuerpo realizado con ésta misma línea celular, se trabajó únicamente con células permeadas debido a que esto representa la totalidad del receptor presente en la célula, en este caso se tomaron las mismas condiciones que en los tipos celulares linfocitos y Reh.

Las gráficas de fluorescencia de la expresión basal del receptor en la superficie celular y el receptor total, o en células permeabilizadas, se muestra en la imagen 16, aquí se describe una fluorescencia mayor a la presentada por las población blanco.

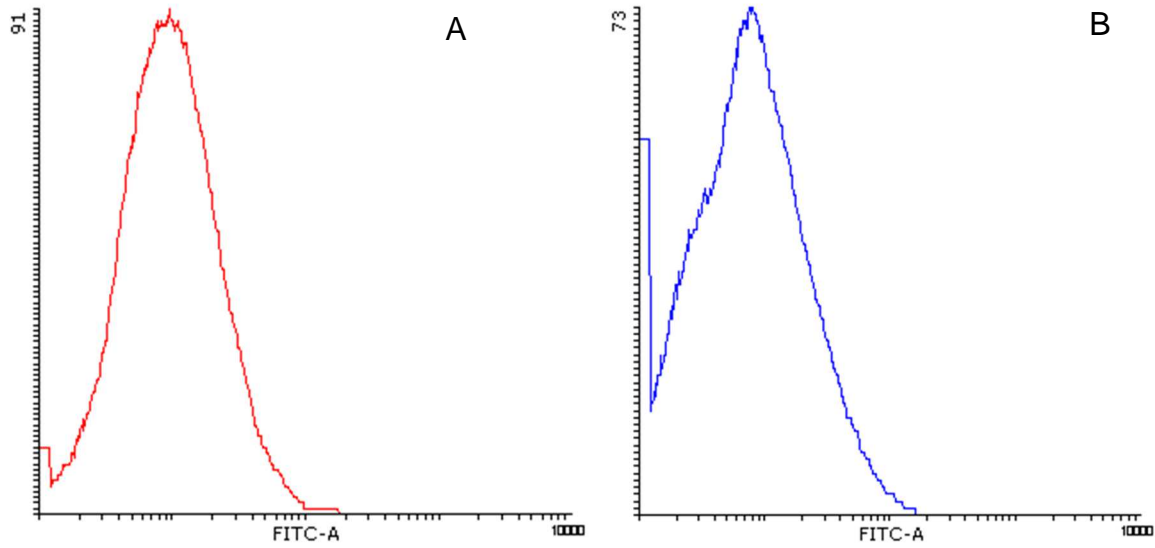


Imagen 16. Histogramas donde se muestra la expresión basal del DOR; A. En membrana y; B. En células permeadas o expresión total.

Los resultados de la estimulación con PI-L y la comparación de las poblaciones mediante el histograma de superposición se observan en la imagen 17.

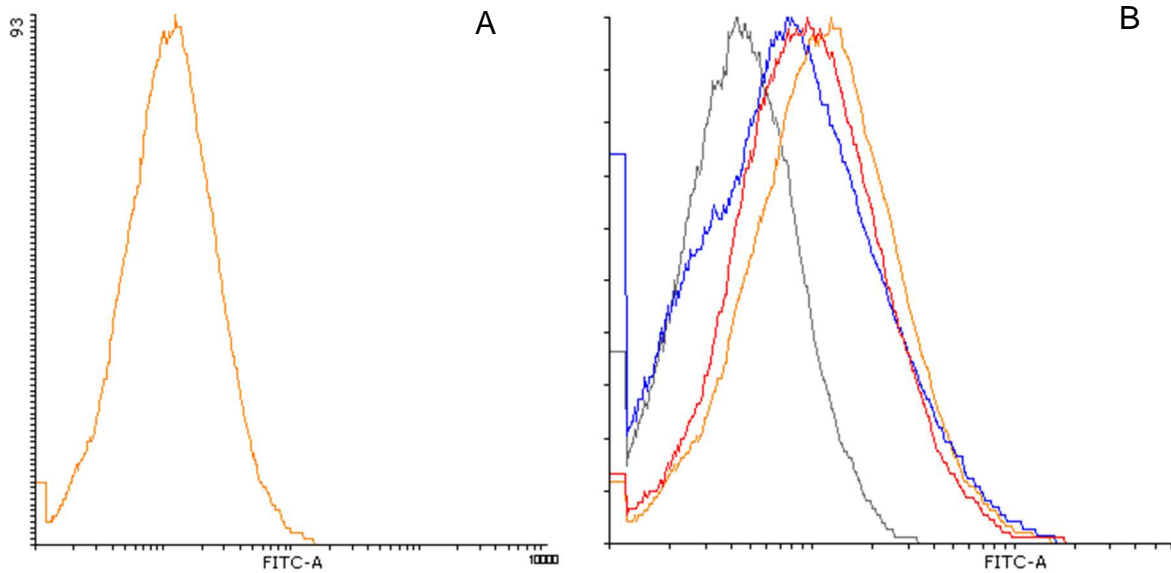


Imagen 17. A. Fluorescencia debida al estímulo con PI-L. B. Histograma de de las células blanco (gris), células con expresión basal en membrana (rojo), expresión total o células permeadas (azul) y estimuladas con PI-L (anaranjado).

En la imagen 17B es posible apreciar que tanto la expresión basal en superficie, como la expresión total e del receptor (células permeabilizadas) son prácticamente iguales, es decir, se podría decir que la expresión en superficie que presenta esta línea celular son todos los receptores que tiene.

Además, también en la imagen 17B también se ve que el PI-L no tiene un efecto muy estimulante en la expresión del DOR, de acuerdo a lo observado en los dos tipos celulares anteriores.

En la imagen 18 se muestran los histogramas para los estímulos con LIP-VAC y LIP-PI.

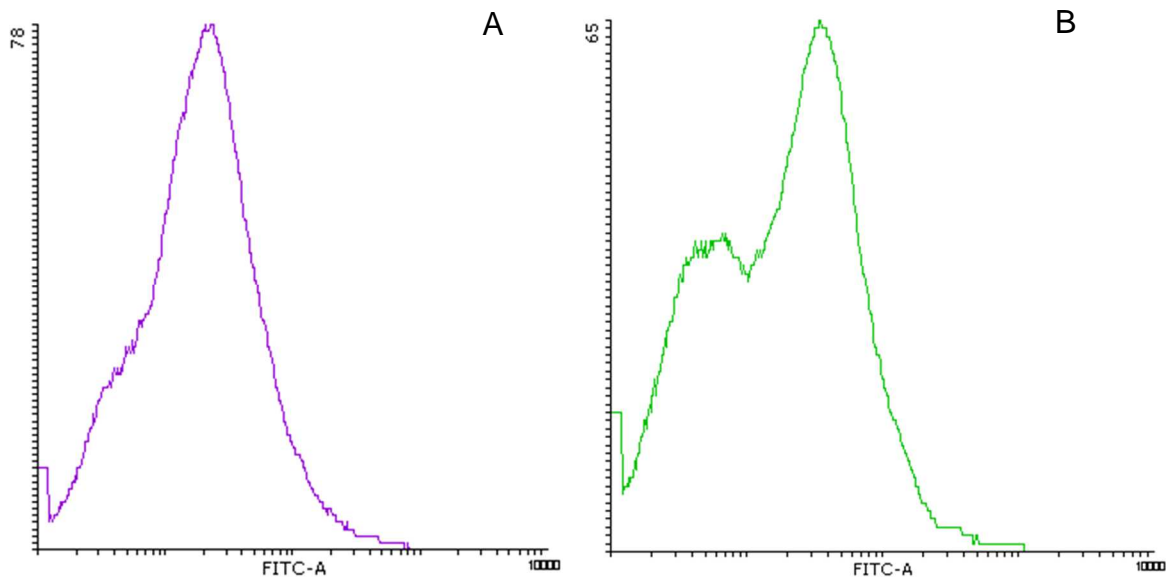


Imagen 18. Histogramas con la fluorescencia de las células al aplicarles el estímulo con LIP-PI (A) y con LIP-VAC (B).

En la imagen 17B de puede apreciar como el estímulo con LIP-VAC promueve el desplazamiento de la población en dos secciones identificadas con dos picos claramente visibles, el primer pico presenta una menos intensidad que el segundo mientras que en 17A solo se percibe la presencia de un pico bien definido.

Se describen las diferencias entre las fluorescencias de cada población de las diferentes condiciones o estímulos en el histograma de superposición de la imagen 19.

En las regiones uno de la imagen 19 se muestran el pico de máxima fluorescencia para la expresión basal en membrana y en la región dos la zona de mayor desplazamiento de población dado por el pico de LIP-VAC.

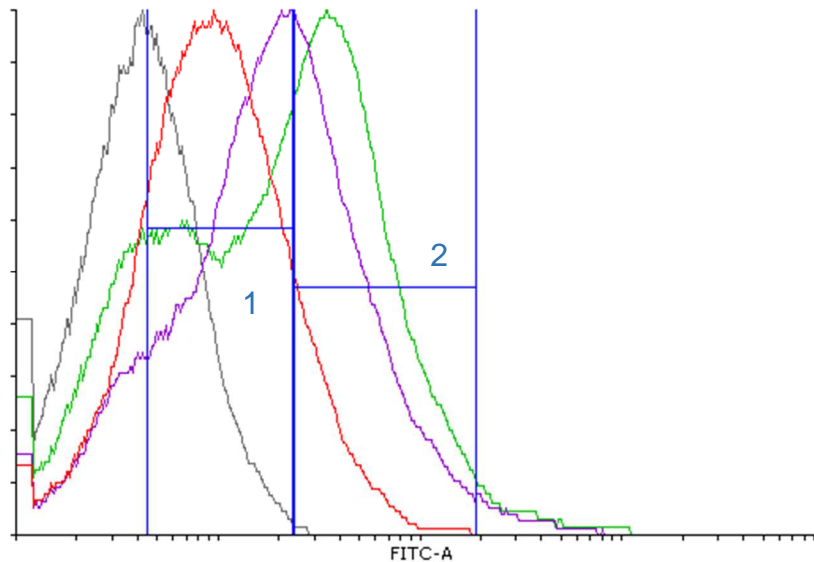


Imagen 19. Comparación de las fluorescencias emitidas por las células blanco (gris), expresión basal en membrana (rojo), estímulo con LIP-PI (lila) y estímulo con LIP-VAC (verde).

También debe de notarse que el pico para la expresión máxima de fluorescencia del estímulo con LIP-PI se encuentra en el límite entre las regiones uno y dos, además de ser ligeramente menor que la expresión de LIP-VAC, al contrario de lo observado en los tipos celulares anteriores, sin embargo, ambas son mayores a la expresión basal y, claramente, a la fluorescencia de las células blanco.

La tabla 9 presenta el resumen de los datos de los eventos analizados para cada condición para la expresión del DOR en la línea HepG2.

Tabla 9. Datos de los eventos y poblaciones desplazadas de cada condición con respecto a la población blanco de la línea celular HepG2.

	Total de eventos	Eventos		Total	% desplazado		% total desplazado
		R1	R2		R1	R2	
Basal	10000	6904	1325	8229	69%	13%	82%
Permeadas	10000	5277	1258	6535	53%	13%	65%
LIP-VAC	10000	3538	4383	7921	35%	44%	79%
LIP-PI	10000	4699	3887	8586	47%	39%	86%
PI-L	10000	6810	1809	8619	68%	18%	86%

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los estudios sobre la actividad del fosfatidilinositol 4,5-difosfato y otros fosfoinosítidos han demostrado que este lípido y sus análogos no solo son importantes en la regulación del tráfico vesicular, sino que también son importantes mediadores de segundos mensajeros y mecanismos celulares⁸⁻¹⁶. La presencia de estos fosfoinosítidos en las células resulta importante al grado de desarrollar ciertas patologías o disfunciones en actividades celulares si se cuenta con una disminución de su concentración en las células^{54,55}.

El fosfatidilinositol 4,5-difosfato en específico ha demostrado ser importante para la movilización y expulsión de vesículas al exterior de la membrana plasmática mediante la movilización de proteínas y complejos proteicos en las zonas de la membrana para llevar a cabo la exocitosis^{8, 13,18}.

Una de las proteínas que es movilizada en vesículas desde el complejo de Golgi cuando se sintetiza es el receptor δ opioide, ya sea por vía constitutiva o regulada, el receptor se expone en la membrana en respuesta a ciertos estímulos^{25,28}.

El receptor se encuentra principalmente en las células del sistema nervioso central, que es donde ejerce su principal función de mediador del dolor y analgesia al interactuar con sus variados ligandos²¹, sin embargo, tiene presencia en otras células del cuerpo como en linfocitos, donde se ha sugerido que podrían ser mediadores de la respuesta inmunológica²⁹⁻³¹.

Aunado a lo anterior, los liposomas, son vesículas formadas por diferentes lípidos en soluciones acuosas empleados en forma de dianas terapéuticas debido a que son capaces de encapsular e integrar en su estructura una variedad amplia de moléculas con diferentes características, mejorando así la eficiencia en el efecto de los activos y reduciendo su toxicidad o efectos adversos⁴⁰⁻⁴³.

En el laboratorio 4 de la UMIEZ, el equipo de trabajo ha desarrollado un nanoliposoma catiónico, que es capaz de interactuar fácilmente con las membranas biológicas gracias a su diferencia de cargas y a su vez incorporar en su estructura moléculas proteicas como la interleucina 2 o lípidos como el fosfatidilinositol 4,5-difosfato. De esta forma se evaluó el efecto del liposoma que contiene PIP₂ en su estructura para observar su efecto estimulante y regulador de la expresión de receptores en los linfocitos y determinar si esta función reguladora también afecta la expresión del DOR en estas células.

Inicialmente se realizó la caracterización y las determinaciones de calidad del liposoma fabricado. Debido a que su carga positiva se la confiere un lípido sintetizado en el laboratorio, de igual manera desarrollado por nuestro equipo de trabajo, fue necesario evaluar la aptitud de éste para poder fabricar los liposomas.

Las técnicas de citometría de flujo y dispersión de luz dinámica fueron las utilizadas para hacer el análisis de los liposomas; éstos tienen un tamaño ya caracterizado de acuerdo a los estándares del laboratorio, por lo que una vez que se fabricaron con el nuevo lípido sintetizado se realizó una comparación mediante citometría de flujo para evaluar la similitud entre las poblaciones de nanovesículas.

Como se puede observar en los resultados, las poblaciones de liposomas tienen una similitud de más del 99%, lo cual nos indica que las poblaciones tienen la misma distribución en cuanto a tamaño y forma (o granularidad) medida con el citómetro, así mismo el lípido mostró la aptitud de uso como materia prima en la fabricación de liposomas catiónicos.

Por otra parte, la DLS permitió evaluar el tamaño de los liposomas y proporcionó información útil con la que no se contaba previo a la realización de este trabajo, el cual es potencial Z. Mediante el análisis con esta técnica se observó que el tamaño de los liposomas es variado al existir diferentes poblaciones del orden de 90 nm hasta 3000 μm . Cabe mencionar que debido a la forma de medición existen diferencias entre el citómetro de flujo, la microscopía y la DLS.

Para ambos liposomas, tanto LIP-VAC como LIP-PI se observa que la distribución de la población es muy dispersa, presentando inclusive hasta tres tamaños distintos por muestra, sin embargo, hay que recordar que de acuerdo a la teoría de la DLS, la correlación que se da entre las partículas de una suspensión nos indica qué tan variado es el tamaño de una partícula que se analiza con respecto a otras de la población que ya han sido analizadas ⁵¹, es decir, si la correlación muestra un intercepto de 1 eso sería un indicativo de que todas las partículas son del mismo tamaño. Del mismo modo, el tiempo que tarda en decaer la curva de correlación nos indica el tamaño de las partículas, entre más rápido caiga, más pequeñas son las partículas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la diferencia en tamaño cambia con la temperatura. Se observó que cuando aumenta la temperatura, aparentemente disminuye el tamaño de las partículas, no obstante, debe notarse que la intensidad en la señal de las poblaciones más grandes también presenta un cambio mayor con respecto a la de las poblaciones con menor tamaño. Así, de acuerdo a la teoría de la dispersión de Rayleigh, las partículas más grandes dispersan con mayor intensidad la luz hasta en un orden de 10^6 lo cual indica que las partículas de mayor tamaño no son necesariamente más abundantes que las de menor tamaño ⁵¹ y que al aumentar la temperatura el cambio abrupto en la intensidad podría deberse a que las partículas presentan floculación y agrupamiento mientras que a 20 °C simplemente se detectan partículas de mayor tamaño de forma individual.

Por otra parte, los resultados de potencial Z indican que además de ser una suspensión estable, se puede verificar la carga positiva de las vesículas. En el caso de LIP-PI se determinó que a 37 °C pierden un poco la estabilidad que, de manera general, se considera con un potencial comprendido entre -30 a 30 mV, sin embargo, hay que considerar que los medios con un pH neutro tienden a dirigir a una suspensión al punto isoeléctrico, debido a la anulación de las cargas, por ende, los liposomas que se encuentran en una solución amortiguadora de pH 7.2-7.4 se pueden considerar una formulación bastante estable, al mantener la repulsión entre las partículas debido a las cargas individuales sin contar con una polaridad por parte de iones en el medio a pH básicos o ácidos ⁴⁵. En el caso de nuestros liposomas la pérdida de estabilidad a 37 °C indicaría su capacidad de fusionarse o de liberar su contenido cerca o en las células blanco.

Los resultados obtenidos para las nanovesículas determinaron que son un sistema ideal para poder ser utilizados como acarreadores debido a sus características y estabilidad y una vez que esto fue determinado se procedió a hacer el desarrollo de la técnica para los experimentos con el DOR y su expresión en linfocitos.

La titulación se llevó a cabo en la línea celular HepG2 debido a que estas células epiteliales expresan el ARN con el gen codificante para el receptor y asimismo la proteína sintetizada ²¹. Aunque la expresión del receptor se da primordialmente en líneas derivadas del SNC y éstas son utilizadas para el blanco positivo, no se contaba con los recursos para obtener alguna de estas líneas celulares, por lo que HepG2 fue de gran ayuda y una alternativa adecuada para hacer la titulación del anticuerpo.

Se puede observar, que HepG2 mostró una expresión basal de DOR al aplicar el anticuerpo y no sólo ayudó a determinar la funcionalidad del método, también se consiguió determinar la sensibilidad y afinidad del anticuerpo para poderse trabajar a bajas concentraciones. El anticuerpo con una concentración cuatro veces menor a la recomendada por el proveedor desplazó 84% la población a la zona donde se encuentra la totalidad de los eventos desplazados, con respecto al blanco, a una concentración de 10 µg/mL.

También, las pruebas de afinidad de anticuerpos demostraron la eficacia del anticuerpo secundario para unirse al anticuerpo primario de manera selectiva y no causar fluorescencia similar al aplicarse directo a las células, al igual que al anticuerpo primario no produjo fluorescencia considerable al adicionarse y evaluarse sin la presencia del segundo anticuerpo.

Esto demostró la sensibilidad del anticuerpo para detectar el DOR y su funcionalidad con la técnica de citometría de flujo.

La técnica desarrollada con los anticuerpos se llevó a las células linfocíticas en las que también se adecuó al observarse una expresión del DOR por parte de estas células.

La presencia del DOR en células linfocíticas aisladas de sangre periférica se da en un 11% más en células permeadas que en la membrana con respecto a la población blanco, lo cual, en primera instancia demuestra la presencia del DOR como parte del funcionamiento de los linfocitos y la existencia de una mayor cantidad de receptor al interior de la membrana, que es la forma en que primordialmente, la literatura indica, se encuentra en las células. Es de notar, como lo indica la imagen 7B, la formación de un segundo pico en la distribución de la población que expresa el receptor, sin embargo, el aumento de la fluorescencia en esta zona apenas representa un 12% de la población, lo cual podría ser un indicativo de una mayor expresión en cierta parte de la población de linfocitos.

Al aplicar un liposoma que tiene en su composición PIP₂, se pudo observar un mayor desplazamiento de población y aunque un desplazamiento significativo no necesariamente supone una mayor expresión del receptor, el aumento en la fluorescencia sí resulta suficiente para afirmar que hay una mayor afinidad por parte de las células al anticuerpo.

Al compararse el desplazamiento de población efectuado por el LIP-PI con respecto a las células basales, debe también notarse el fuerte efecto que está provocando el LIP-VAC al desplazar a la población un 89% con respecto a las células blanco. El hecho de desplazarlas en sí, supone un efecto de estimulación por parte del liposoma mayor aún que el del PI-L, ya que éste logró un desplazamiento del 41% total y apenas un 5% a la zona de mayor fluorescencia.

De acuerdo a las propiedades de las nanovesículas como moléculas acarreadoras⁴³, el hecho de que PI-L cause un efecto estimulante menor que los liposomas da como resultado la comprobación de su eficacia como molécula transportadora, ya que así se está demostrando que la partícula es susceptible de incorporar PIP₂ en su estructura y llevarlo directamente a las membranas celulares donde éste tiene su efecto.

La incorporación del PIP₂ la membrana por parte del LIP-PI y el efecto que tiene por su parte LIP-VAC muestran la eficacia de las nanovesículas para incorporarse a las membranas celulares⁴⁰, y en el caso de los liposomas catiónicos utilizados, esto podría deberse a la interacción con la carga negativa neta de las membranas.

Como se determinó en los resultados, la estimulación por parte del LIP-VAC es muy similar a la provocada por el LIP-PI lo que hace surgir la duda del por qué se está dando este efecto de movilización en el liposoma sin PIP₂; y una posible respuesta se podría encontrar en las cargas de los lípidos de la membrana celular.

Debido a que muchas proteínas contienen dominios polibásicos, cuando se acoplan a algunos fragmentos hidrofóbicos crean una partición selectiva en la membrana plasmática. La unión a la membrana depende de interacciones electrostáticas con lípidos aniónicos que enriquecen la parte interna de la membrana plasmática, principalmente fosfatidilserina ⁵⁶.

Sin embargo, este enriquecimiento de lípidos aniónicos en la membrana, por sí solo no es suficiente para la localización de dominios polibásicos, se requiere la presencia de fosfoinosítidos, principalmente PI(4,5)P₂ PI(4)P. Y esto se ve reflejado por la capacidad de los dominios polibásicos de secuestrar moléculas de PI(4,5)P₂ en el plano de una membrana rica en fosfatidilserina *in vitro*. Por lo tanto, los fosfoinosítidos satisfacen el requerimiento de lípidos polianiónicos en los dominios polibásicos en el ambiente electrostático de la membrana plasmática ⁵⁶.

De esta manera, la interacción electrostática entre el liposoma catiónico, inclusive estando vacío, y los lípidos de la membrana también podría estimular dominios polibásicos para crear una invaginación o partición en la membrana susceptible a expulsión de vesículas debido a la movilización de maquinaria proteica exocítica a esa zona de la membrana ⁵⁶. Por lo tanto, si el DOR es una proteína preferentemente contenida en vesículas al interior de la membrana, se determinó que el aumento en la fluorescencia al momento de estimular ya sea con LIP-PI o LIP-VAC es un indicativo de una movilización vesicular al interior de la célula que expone su cargamento en la membrana plasmática, ya que la suposición de una síntesis *de novo* desde el retículo endoplasmático es poco probable debido al tiempo de estímulo de 30 minutos que se realizó con los liposomas previo a la fijación de la célula. A pesar de esto, no se ignora el mayor efecto que está teniendo el LIP-PI sin duda mucho mayor al LIP-VAC, puesto que a pesar de que éste último también desplaza un porcentaje de la población considerable, la intensidad de fluorescencia provocada por el PIP₂ rebasa, a causa de la escala logarítmica, la exposición promovida del LIP-VAC.

Contrastando estos resultados con los que se pueden observar en la línea celular Reh, es posible aseverar que sucede lo mismo, a pesar de que estas células tienen en un principio mayor expresión basal del receptor, que muestra un desplazamiento del 81% con respecto a las células blanco y una movilización prácticamente nula por parte del PI-L, esto confirma el efecto realizado por parte de ambos liposomas y por supuesto del PIP₂ que ejerce mejor su actividad gracias al direccionamiento proporcionado por la nanovesícula.

Se debe hacer mención que, para el caso de las células permeadas, no fue posible obtener una cantidad de eventos significativa para hacer una comparación con las demás condiciones, puesto que solo se obtuvieron apenas más de mil eventos, y aunque los datos parecen indicar una expresión de receptor de un 86%

no se puede determinar un efecto significativo. A pesar de lo anterior, los resultados observados para LIP-PI y LIP-VAC encajan de forma adecuada en el perfil descrito por las células linfocíticas aisladas, sin olvidar que Reh es una línea celular también de origen linfoide.

Los ensayos en HepG2 se realizaron con el propósito de observar el efecto estimulante de los liposomas en la movilización vesicular en esta línea celular de referencia que cuenta con expresión basal de DOR, y así como se pudo ver en las líneas linfoides, también los liposomas desplazaron la población vista en forma de aumento en la fluorescencia del 44% en la región de mayor fluorescencia para el caso de LIP-VAC y del 39% por parte de LIP-PI.

El aumento de expresión en la membrana de DOR provocado por el LIP-VAC mayor en comparación con LIP-PI podría deberse a la composición lipídica de la membrana de HepG2, y a los dominios polibásicos de ésta ^{21,56} que es una línea celular epitelial, a diferencia de las dos anteriores de origen linfoide, sin embargo, el efecto de movilización es claramente apreciable por parte de los dos liposomas y el desplazamiento de 18% en la región de mayor fluorescencia por parte de PI-L que concuerda completamente con lo observado con todas las líneas celulares.

De esta manera, los resultados remarcan la importancia del PIP₂ y sus funciones como regulador del tráfico vesicular en las células que, además, se ven mejoradas al ser dirigido a las células en los liposomas catiónicos e interactuar con las membranas celulares, sin embargo, con los resultados obtenidos se deja abierta la incógnita de determinar el mecanismo al cual debe su actividad el LIP-VAC desarrollado en el laboratorio que se utiliza en este trabajo y determinar si el efecto también se presenta en otras líneas celulares y con otros receptores.

Por último, debe resaltarse la importancia de los resultados no solo en las funciones del PIP₂ sino también del DOR, ya que el receptor aparece en células linfocíticas debido a su origen ²⁹⁻³¹ y el modelo de aumento en la expresión de estos receptores puede ser utilizado para indagar más en las funciones de este receptor en células linfoides, ya que como se ha indicado, parece tener actividad como reguladora de algunos mecanismos inmunológicos. La inducción en la expresión del receptor en linfocitos con liposomas podría dar lugar a un estudio con analgésicos opioides, tanto agonistas como antagonistas, para así determinar el papel de su actividad, estructura, y función. Ya que existen investigaciones que vinculan su expresión y represión en linfocitos a la par de células del SNC posiblemente su actividad como moduladores, no solo de la respuesta inmune, sino como moduladores del dolor ^{57,58}, DOR es una opción de investigación acerca del cómo se da esta respuesta al estímulo activado por los análogos y ligandos en personas que sufren de adicciones, depresión y dolor ^{54,57,58}.

CONCLUSIONES

- Se determinó que el PIP_2 tiene un efecto de movilización vesicular sobre los linfocitos que favorece la expresión del DOR cuando se administra en un sistema nanoacarreador
- Se logró emplear un anticuerpo específico contra DOR y un anticuerpo secundario de fluorescencia para el desarrollo de una técnica de citometría de flujo que resultó en la evaluación del receptor en las células.
- Se consiguió determinar que el método es sensible para la detección del receptor a través de la titulación del anticuerpo y se adecuó la técnica para la determinación del DOR en linfocitos.
- Se compararon los efectos de los distintos estímulos aplicados en las células y así se determinaron los efectos de cada uno sobre la expresión del DOR en la membrana de las líneas celulares utilizadas.

REFERENCIAS

- 1 Despopoulos A. Color Atlas of Physiology. 5th ed. Germany: Thieme; 2003.
- 2 Deo DD, Bazan NG, Hunt JD. Lipid Second Messengers and Receptors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 2004;3: 182-187.
- 3 Neverisky DL, Abbott GW. Ion channel–transporter interactions, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2016;51(4), 257-267.
- 4 Michell RH. Inositol phospholipids in membrane function. *Trends. Biochem. Sci.* 1979;4(6):128-131.
- 5 Downes CP, Gray A, Lucocq JM. Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends. Cell. Biol.* 2005;15(5): 259-268.
- 6 Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, De Matteis MA. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J.* 2008;27(19): 2457-2470.
- 7 Mayinger P. Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1821(8): 1104-1113.
- 8 Schink KO, Tan k, Stenmark H. Phosphoinositides in control of membrane dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2016;32(1):143-171
- 9 Takenawa T, Itoh T. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001;1533(3): 190-206.
- 10 Berridge M. Phosphatidylinositol hydrolysis: A multifunctional transducing mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1981;24: 115-140
- 11 Osborne NN, Tobin AB, Ghazi H. Role of Inositol Trisphosphate as a Second Messenger in Signal Transduction Processes: An Essay. *Neurochem. Res.* 1988;13(3):177-191.
- 12 Martin TFJ. PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001;13(4): 493-499.
- 13 Martin T, Balla T, Wymann M, et al. Role of PI(4,5)P₂ in vesicle exocytosis and membrane fusion. In: Balla T, Wymann M, York J, editors. *Phosphoinositides II: The diverse biological functions*. New York: Springer; 2012. PP. 111-130.
- 14 Martin TFJ. PI(4,5)P₂-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1851(6): 785-793.
- 15 Suh B, Hille B. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2005;15(3): 370-378.
- 16 James DJ, Khodthong C, Kowalchuk JA, Martin TFJ. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J. Cell Biol.* 2008;182(2): 355-366.

- 17 Grinstein S. Imaging signal transduction during phagocytosis: phospholipids, surface charge, and electrostatic interactions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010;299(5): 876–881.
- 18 Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* 2006;443(7112): 651-657.
- 19 Posor Y, Eichhorn-Grünig M, Haucke V. Phosphoinositides in endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1851(6): 794-804.
- 20 Aoyagi K, Sugaya T, Umeda M, Yamamoto S, Terakawa S, Takahashi M. The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J. Biol. Chem.* 2005;280(17): 17346–17352.
- 21 Tang B, Li Y, Yuan S, Tomlinson S, He S. Upregulation of the δ opioid receptor in liver cancer promotes liver cancer progression both *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Oncol.* 2013;43(4): 1281-1290.
- 22 Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, et al. Crystal structure of Rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 2000;289(5480): 739-745.
- 23 Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000;40: 389-430.
- 24 Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2012. Pp. 52.
- 25 Gendron L, Mittal N, Beaudry H, Walwyn W. Recent advances on the δ opioid receptor: from trafficking to function. *Br. J. Pharmacol.* 2015;172(2): 403-419.
- 26 Cahill CM, Holdridge SV, Morinville A. Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2006;28(1): 23–31.
- 27 Pasquini F, Bochet P, Garbay-Jaureguiberry C, Roques BP, Rossier J, Beaudet A. Electron microscopic localization of photoaffinity-labelled delta opioid receptors in the neostriatum of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1992;326(2): 229–244.
- 28 Zhang X, Bao L, Li S. Opioid receptor trafficking and interaction in nociceptors. *Br. J. Pharmacol.* 2015;172(2): 364-374.
- 29 Bidlack JM. Detection and function of opioid receptors on cells from immune system. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000;7(5): 719-723.
- 30 Sharp BM. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav. Immun.* 2006;20(1): 9-14.
- 31 Sharp BM. Opioid receptor expression and function. *J. Neuroimmunol.* 2004;143(1-2): 3-5.

- 32 Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Ganong. Fisiología Médica. 23ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
- 33 Murphy K, Travers P, Walport M. Inmunobiología de Janeway. 7ma ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
- 34 Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Inmunología de Kuby, 6ta ed. McGraw-Hill Interamericana. México 2007.
- 35 Brostoff J, Male D, Roitt I. Inmunología. 5ta ed. Elsevier España. Madrid 2000.
- 36 ATCC product sheet Hep G2 [HEPG2] ATCC® HB8065
- 37 ATCC product sheet Reh ATCC® CRL8286
- 38 Gregoriadis G. Liposomes as drug carriers. John Wiley & Sons, A Wiley-Interscience Publication. New York, 1988.
- 39 Universidad de Salamanca. Dpto. de Sistemas de la Fundación General de la Universidad [Internet]. Salamanca; España, 2007-2014 [consulta 20 noviembre 2017]. Disponible en: <https://dicciomed.eusal.es/palabra/liposoma>
- 40 Bonicelli MG, Giansanti L, Lerino M, Mancini G. Interaction of cationic liposomes with cell membrane models. J. Colloid. Interface Sci. 2011;355(1): 1-8.
- 41 Barenholz Y, Bombelli C, Bonicelli MG, di Profio P, Giansanti L, Mancini G, Pascale F. Influence of lipid composition on the thermotropic behavior and size distribution of mixed cationic liposomes. J. Colloid. Interface Sci. 2011;356(1): 46-53.
- 42 Aleandri S, Bombelli C, Bonicelli MG, Bordi F, Giansanti L, Mancini G, Lerino M, Sennato S. Fusion of gemini based cationic liposomes with cell membrane models: implications for their biological activity. Biochim. Biophys. Acta. 2013;1828(2): 382-390.
- 43 Springer Protocols. Methods in Molecular Biology, ed. Weissig V. Liposomes, Methods and Protocols. Vol. 1. Pharmaceutical nanocarriers. Humana Press, New York, 2010.
- 44 Acosta-Gutiérrez JA. Estudio de estabilidad biológica in vivo en ratones atómicos de la cepa nunu de un producto antineoplásico conformado por IL-2 en un sistema nanoacarreador [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2012.
- 45 Malvern Instruments Limited. Zeta potential – An introduction in 30 minutes. Grovewood Road, Malvern: Worcestershire, UK. WR14, 1XZ; 2017. Technical note.
- 46 Hawley TS, Hawley RG. Flow Cytometry Protocols. 3rd ed. Methods in molecular biology 699, Springer Protocols. Humana Press, London 2011.

- 47 Díaz-Martínez V, Martos MC. Citometría de flujo: midiendo células [Internet] c2011[actualizado 25 abril 2011; consultado 21 noviembre 2017] Disponible en: https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a_tecnica_citometra
- 48 Flow cytometry [Internet] Centaur: Brussels. [Consultado 22 noviembre 2017] Disponible en: <http://www.apoptosed.com/prod02.htm>
- 49 Sigma Product Information Anti- δ_1 -Opioid Receptor, Development in Rabbit, Affinity Isolated Antibody. Product number 05014, LOT 104K0917, 14, Agosto 2007. Sigma-Aldrich, Inc.
- 50 Sigma Product Information Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-FITC Development in Goat, Affinity Isolated Antigen Specific Antibody, 6, Diciembre 2010. Sigma-Aldrich, Inc.
- 51 Malvern Instruments Limited. Dynamic Light Scattering– An introduction in 30 minutes. Grovewood Road, Malvern: Worcestershire, UK. WR14, 1XZ; 2017. Technical note.
- 52 Dynamic light scattering [Internet] Illinois: PTL Particle Technology Labs; c2017 [consultado 22 noviembre 2017]. Disponible en: <https://particletechlabs.com/analytical-testing/particle-size-distribution-analyses/dynamic-light-scattering>
- 53 Berry GT, Wang ZJ, Dreha SF, Finucane BM, Zimmerman RA. In vivo brain myo-inositol levels in children with Down syndrome. *J. Pediatr.* 1999;135(1): 94-97.
- 54 Harwood AJ. Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Mol. Psychiatry.* 2005;10(1): 117-126.
- 55 Sacerdote P, Limiroli E, Gaspani L. Experimental Evidence for Immunomodulatory Effects of Opioids. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013
- 56 Hammond GRV, Balla T. Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. Review. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1851(6): 746-758.
- 57 Bidlack JM, Khimich M, Parkhill AL, Sumagin S, Sun B, Tipton CM. Opioid Receptors and Signaling on Cells from the Immune System. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2006;1(3): 260-269.
- 58 Liang X, Liu R, Chen C, Ji F, Li T. Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. *Transl. Perioper. Pain Med.* 2016;1(1): 5–13.