

00381
10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INDUCCIÓN A LA APARICIÓN DE RECEPTORES Fc Y A
LA SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR
MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN
UTILIZANDO LIPOSOMAS COMO ACARREADORES DE
LAS CITOCINAS IL-1 beta E INF gamma.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. EN C. MARIA TERESA CORONA ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER
CO-DIRECTOR: DR. MIGUEL ANGEL IBÁÑEZ HERNÁNDEZ

MEXICO, D.F.

MARZO 2000



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.

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

AGRADECIMIENTOS

En el momento de hacer un alto en el camino para pensar en todas aquellas personas que han colaborado en la culminación de un gran esfuerzo de vida, vienen a la mente un cúmulo de imágenes y recuerdos, desde los estudios de licenciatura, sería interminable nombrar a todos, especialmente recuerdo a Maïena, Citlali, Irma y Romeo, después a Martha Saicedo mi inseparable compañera en el posgrado, a todos mi agradecimiento por existir y por ser espejos de mi propia persona.

Al Dr. Benny Weiss por los años de apoyo, paciencia y esperanza; por saber que siempre se cuenta con él.

Al Dr. Miguel Ibáñez por su confianza, paciencia, asesoría, apoyo técnico y minuciosa revisión del trabajo escrito.

A la Dra. Isabel Soto por su amistad y apoyo en las sesiones bibliográficas, en la revisión de documentos técnicos en inglés y por su detallada revisión del trabajo experimental.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez por su amistad, asesoría y apoyo para la obtención de las fotografías en el microscopio electrónico.

Al Dr. Miguel Betancourt Ruiz por la minuciosa revisión y comentarios que mejoraron el trabajo escrito.

Al Dr. Heliodoro Ceis Sandoval por su aportación en comentarios y sugerencias para la culminación de esta Tesis.

A la Dra. Guadalupe Zavaña por la minuciosa revisión de la Tesis y sus sugerencias para mejorar la presentación.

A la Dra. Isabel Baeza por su apoyo y confianza al permitirme realizar parte del trabajo experimental en las instalaciones de su laboratorio.

A la Maestra Ernestina Jbaldo por su paciencia y apoyo incondicional asesorando el procesamiento de las muestras para la observación en el microscopio electrónico.

A la Maestra Rosalva Rangel por amistad y su constante asesoría desde la elaboración del proyecto hasta la obtención y discusión de resultados.

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza por su amistad y asesoría para el planteamiento del proyecto de Tesis, además por su apoyo científico y personal durante el desarrollo de la misma.

Al Dr. Julio Cáceres Cortés, quien contando con una particular personalidad, supo dar el acompañamiento amistoso y apoyo logístico para el desarrollo del trabajo de esta Tesis.

A la Dra. Martha Legorreta por su apoyo moral y por la donación de lotes de ratones singénicos.

A la Maestra Lourdes Vega por el manejo y donación de los ratones FI.

Al Maestro Ramón Soto por facilitar los lipidos para iniciar el proyecto y por su constante apoyo en revisión bibliográfica, facilitando imágenes y por el estudio en prospectiva del proyecto.

Al Dr. Ignacio Regia y a la Maestra Patricia Demaree, especialistas en química orgánica, por su amistad y apoyo logístico durante el desarrollo del trabajo experimental.

Al Dr. Isaías Saigado, el profesor de estadística mas sabio que he conocido; por las facilidades para la utilización del paquete estadístico STATA y por su asesoría en el planteamiento del diseño experimental.

A la alumna Miriam Villa por su invaluable apoyo en la revisión bibliográfica y en la validación de las técnicas de determinación de óxido nítrico y de cultivo celular.

A la alumna Dora Quintana por su apoyo en la validación de la técnica colorimétrica de detección de Fc y Rs.

A la alumna Hirán Morán por su apoyo en la revisión bibliográfica y en el manejo de diversos grupos de ratones para los experimentos in vivo.

A la Señorita Ana María Cruz por su invaluable asistencia técnica para la presentación final de la Tesis.

Al Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Gastroenterología, Laboratorio de Biología Molecular por las facilidades prestadas para la realización de la técnica de detección de Fc y Rs por PCR.

Al Dr. Edelmiro Santiago y sus colaboradores Biólogo Gerardo Ramos, Biólogo Ignacio Martínez Martínez y Q.F.B. Beatriz Manrique por su asesoría técnica y por la validación de la técnica de detección de los Fc y Rs por PCR.

A todos mis amigos que gracias a Dios son muchos en diferentes escenarios, miedo me da mencionar alguno porque no habría razón de que no estuvieran todos, más en general a todos mis amigos de Encuentros Conyugales, a los asesores espirituales y a mis amigos de la comunidad casa-escuela-trabajo.

A mis padres y familiares que conforman las familias Corona Ortega y Valdés Vega porque gracias a que ellos existen se ha formado la persona completa que soy ahora; especialmente, a mi hermano Enrique por su cariño y apoyo financiero.

A mi propia familia, a mi esposo Francisco Valdés por la confianza y apoyo que siempre me ha brindado, por todas aquellas ocasiones en las que supo tenderme una mano amiga, por hacer más ligero y alegre el compromiso de salir adelante con todos aquellos otros que tenemos; así como a mis hijos Brenda, Albertina, Luis y Miguel por la comprensión y ayuda que siempre me han regalado y por ser los principales recipientes de mi testimonio de vida.

Finalmente gracias al Amor, mi forma favorita de llamar a Dios, presente en todas las personas mencionadas porque sin Él no existiría.

INDICE DE FIGURAS

Figura T1. Esquematación de la hematopoyesis	19
Figura T2. Representación simplificada de los elementos celulares que conforman el microambiente hematopoyético	22
Figura T3. Micrografía electrónica de un macrófago residente de la cavidad peritoneal.....	35
Figura T4. Representación esquemática de la familia de los Fc γ R.....	38
Figura T5. Representación esquemática de liposomas multilamelares y unilamelares	43
Figura T6. Lípidos anfipáticos.....	46
Figura T7. Polimorfismo lipídico.....	48
Figura T8. Diferentes estados de la bicapa lipídica.....	49
Figura T9. Representación esquemática de una micela invertida	52
Figura R1A. Duración del estímulo con IFN- γ para la aparición de Fc γ Rs.....	79
Figura R1B. Duración del estímulo con IFN- γ para la secreción de óxido nítrico.....	79
Figura R2A. Aparición de Fc γ Rs estimulados con liposomas neutros que contienen Fc γ Rs.....	81
Figura R2B. Secreción de óxido nítrico inducida por liposomas neutros que contienen IFN- γ	81
Figura R3A. Aparición de Fc γ Rs inducidos por liposomas negativos conteniendo Fc γ Rs	82
Figura R3B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas negativos conteniendo IFN- γ	82

Figura R4A. Aparición de Fc y Rs inducidos por liposomas neutros que contienen IL-1 β	85
Figura R4B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas neutros que contienen IL-1 β	85
Figura R5A. Aparición de Fc y Rs inducidos por liposomas negativos conteniendo IL-1 β	85
Figura R5B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas negativos conteniendo IL-1 β	85
Figura RA. Los macrófagos no cambian su morfología al ser estimulados con liposomas.....	87
Cuadro 1. Número de células obtenidas por grupo	89
Figura R6A. Aparición de Fc y Rs inducidos por liposomas vacíos Aplicados <i>in vivo</i>	90
Figura R6B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas vacíos Aplicados <i>in vivo</i>	90
Figura R7A. Aparición de Fc y Rs inducidos por liposomas negativos con IL-1 β e IFN- γ aplicados <i>in vivo</i>	92
Figura R7B. Determinación de la liberación de óxido nítrico después de la administración <i>in vivo</i> de liposomas negativos con IL-1 β e IFN- γ	92
Figura R8A. Aparición de Fc y Rs inducidos por la aplicación de liposomas Neutros con IFN- γ <i>in vivo</i>	93
Figura R8B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas neutros con IFN- γ <i>in vivo</i>	94
Figura RB. Interacción de los liposomas con los macrófagos	95
Figura R9A. Aparición de Fc y Rs inducidos con liposomas neutros conteniendo IFN- γ	98
Figura R9B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas neutros conteniendo IFN- γ	98

Figura R10A. Aparición de Fc γ Rs inducidos con liposomas neutros conteniendo IL-1 β	99
Figura R10B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas neutros conteniendo IL-1 β	100
Figura R11A. Aparición de Fc γ Rs inducidos con liposomas negativos conteniendo IFN- γ	101
Figura R11B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas negativos conteniendo IFN- γ	102
Figura R12A. Aparición de Fc γ Rs inducidos con liposomas negativos conteniendo IL-1 β	103
Figura R12B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas negativos conteniendo IL-1 β	104
Figura R13A. Aparición de Fc γ Rs inducidos con liposomas positivos conteniendo IFN- γ	105
Figura R13B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas positivos conteniendo IFN- γ	106
Figura R14A. Aparición de Fc γ Rs inducidos con liposomas positivos conteniendo IL-1 β	107
Figura R14B. Secreción de óxido nítrico estimulada por liposomas positivos conteniendo IL-1 β	108
Figura R15A. Aparición de Fc γ Rs inducidos por la aplicación <i>in vivo</i> de liposomas negativos conteniendo IFN- γ	109
Figura R15B. Determinación de la liberación de óxido nítrico después de la administración <i>in vivo</i> de liposomas negativos con IFN- γ	110
Figura RC. Determinación de la aparición de Fc γ Rs después del estímulo con liposomas, mediante la técnica de RT-PCR.....	111

ABREVIATURAS
O SIGLAS
UTILIZADAS

ABREVIATURAS O SIGLAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
APCs	Células presentadoras de antígenos; del inglés: antigen presenting cells
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Enzima que degrada el ARN
C	Carbono
CSFs	Factores estimuladores de colonias, del inglés: Colony Stimulating Factor
CTLs	Linfocitos T citotóxicos, del inglés: cytotoxic T lymphocyte
dNTP	Desoxiribonucleótido trifosfato
dT	Desoxitimidina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético, del inglés: Ethylenediaminetetraacetic Acid
EP	Pirógeno endógeno, del inglés Endogen Pyrogen

Epo	Eritropoyetina
Fc	Fracción cristalizabile de las inmunoglobulinas
FcγRs	Receptores para las inmunoglobulinas tipo G
G-CSF	CSF que estimula granulocitos
GM-CSF	CSF que estimula tanto macrófagos como granulocitos
H _{II}	Arreglo lipídico de fase hexagonal II.
IFNs	Interferones
IgG	Inmunoglobulina G
ILs	Interleucinas
Kda	Kilodaltones
LAF	Factor activador de linfocitos, del inglés: lymphocyte activating factor
LDLs	Lipoproteínas de baja densidad, del inglés: low density lipoprotein
LIF	Factor inhibidor de leucemias, del inglés: leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolisacáridos de paredes bacterianas
LUV	Vesículas unilameares grandes, del inglés; large unilamellar vesicles

MAF	Factor activador de macrófagos, del inglés: Macrophage Activating Factor
M-CSF	CSF que estimula macrófagos
MGI	Factor inductor de macrófagos y granulocitos, del inglés: Macrophage and Granulocyte Inducer)
MGI-1G	MGI que induce la formación clonal de granulocitos-neutrófilos
MGI-1GM	MGI que estimula la formación clonal tanto de macrófagos como de granulocitos
MGI-1M	MGI que estimula la proliferación de macrófagos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (clase I ó II), del inglés major histocompatibility complex
MLV	Vesículas multilameles, del inglés: multilamellar vesicles
NK	Célula asesina natural, del inglés: Natural Killer
PMA	Forbol miristato acetato, del inglés: phorbol myristate acetate
PMN	Granulocitos polimorfonucleares
RT-PCR	Reacción en polícadena con transcriptasa reversa, del inglés: Reverse transcriptase polychain reaction
SCF	Factor de células totipotenciales, del inglés: stem cell factor

SUV	Vesículas unilamelares pequeñas, del inglés: small unilamellar vesicles
Tc	Temperatura de transición
TGF β	Factor de crecimiento tumoral beta, del inglés: tumor growth factor beta
TNF (γ ó β)	Factor de necrosis tumoral (gama ó beta), del inglés: tumor necrosis factor
ULV	Vesículas unilamelares, del inglés: unilamellar vesicles
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

ABSTRACT

Fc receptors and nitric oxide secretion induced by cytokines IL-1 β and IFN γ encapsulated in liposomes in murine peritoneal macrophages.

Liposomes are lipid vesicles constituted by concentric bilayers of amphipatic lipids separated by an acuose phase. Fatty acids, like phosphatidilcolinc, are dispersed in water to form a bilayer and exclude water, in the acuose phase several hydrophilic molecules, like cytokines, antigens, antibodies or chemical drugs can be dissolved and trapped in those vesicles. Hydrophobic molecules can be dissolved and trapped in those vesicles. Hydrophobic molecules can be incorporated between bilayers themselves. It should be stressed the importance of the concentric number, lipidic composition, electric charge and the administration route of liposomes to ensure that they get to the desired target.

In many cases, due to the phagocytic capacity of macrophages, liposomes are produced accordingly to be phagocytosed by the macrophages themselves.

Taking into consideration that $IL-1\beta$ and $IFN\gamma$ are good differentiating agents for monocytic cells and that liposomes are effective carriers, they were encapsulated in liposomes to evaluate their activity on resident macrophages from the mouse peritoneal cavity. Our results showed that negative liposomes are effective cytokine carriers and that there are differences in macrophages activation produced by them, either *in vivo* or *in vitro*.

The possibilities that these carriers could interact with encapsulated material and the target cells are discussed, and therapeutic alternatives for liposomes are proposed.

RESUMEN

Los liposomas son vesículas formadas con lípidos anfipáticos constituidas por bicapas concéntricas separadas por un compartimiento acuoso. Los liposomas se forman cuando fosfolípidos como la fosfatidilcolina se dispersan en agua, al formarse, las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicos se acomodan en bicapas para liberarse del agua; en la porción líquida pueden disolverse diversas moléculas hidrofílicas como medicamentos, citocinas, antígenos o anticuerpos; las cuales quedarán atrapadas en el interior acuoso de las vesículas. Si el material que se desea incorporar son moléculas hidrofóbicas, éstas pueden ser incluidas dentro de las bicapas mismas. Es importante mencionar que el número de bicapas concéntricas, la composición lipídica, la carga eléctrica y la vía de administración pueden ser variadas de tal forma que los liposomas lleguen hacia donde se desee. En muchos casos, debido a que los macrófagos son las células fagocíticas principales, los liposomas son fabricados con la intención de que sean ingeridos por ellos.

Con el propósito de evaluar la efectividad de los liposomas como transportadores de citocinas inductoras de macrófagos y debido a que se conoce tanto la importante acción diferenciadora de estas células por las citocinas IL-1 β e IFN γ ; como la versatilidad y seguridad de los liposomas como

acarreadores de sustancias; en el presente trabajo se encapsularon dichas citocinas en varios tipos de liposomas y se utilizaron para activar a macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón. Nuestros resultados indicaron que los liposomas negativos son acarreadores efectivos de las citocinas y que existen diferencias en la activación de los macrófagos producida por ellas, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Además, se discuten las posibilidades que tienen estos acarreadores de interactuar con la materia encapsulada y la célula blanco y se proponen alternativas de su uso para fines terapéuticos.

INTRODUCCIÓN

Los liposomas son *esferas preparadas artificialmente* constituidas por bicapas fosfolípídicas concéntricas separadas por un compartimiento acuoso. Los liposomas se forman cuando fosfolípidos como la fosfatidilcolina se dispersan en agua, al formarse, las cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos se acomodan en bicapas para liberarse del agua; en la porción líquida pueden disolverse diversas moléculas hidrofílicas como medicamentos, citocinas, antígenos o anticuerpos; las cuales quedarán atrapadas. Si el material que se desea incorporar son moléculas hidrofóbicas, éstas pueden ser incluidas dentro de las bicapas mismas. Es importante mencionar que el número de bicapas lipídicas concéntricas, la composición del fosfolípido, la carga eléctrica de éste y la vía de administración pueden ser variadas de tal forma que los liposomas puedan ser dirigidos hacia donde se desee. En muchos casos, debido a que los macrófagos son las células fagocíticas principales, los liposomas son fabricados con la intención de que sean ingeridos y digeridos por ellos, en los últimos años, su utilización se ha convertido en una poderosa herramienta para manipular a estas células, ya sea para inhibirlas o activar diversas funciones.

En la actualidad, se han presentado muchos estudios acerca del comportamiento de los macrófagos al recibir directamente sustancias encapsuladas en liposomas; es importante mencionar que se han encontrado variadas diferencias en los efectos y distribución obtenidos al utilizar las

mismas sustancias introducidas de forma libre por vía intravenosa. Lo anterior puede explicarse debido a que algunas sustancias libres no cruzan fácilmente las membranas celulares y porque la mayoría de las sustancias tienen una vida media extremadamente corta en el torrente sanguíneo, siendo captadas y transformadas rápidamente en el riñón y el hígado.

Las sustancias encapsuladas en liposomas pueden ser administradas *in vivo* por diferentes vías, de acuerdo a la población blanco deseada. Existe la posibilidad de llegar al sitio deseado modificando a los liposomas para no ser ingeridos por los macrófagos; sin embargo, si la población blanco son los macrófagos, existe una muy alta probabilidad de que las sustancias encapsuladas en liposomas comunes entren en ellos y modifiquen su función. Con este enfoque, se ha avanzado mucho en la administración de medicamentos optimizando la vía de administración y la dosis necesaria; además, se han eliminado poblaciones específicas de macrófagos para un mejor conocimiento de su participación *in vivo* en diversos procesos biológicos.

En el presente trabajo, se encapsularon IL-1 β e IFN γ en liposomas para ser administradas a macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón, debido a que se conoce la importante acción diferenciadora de macrófagos de estas citocinas. Posteriormente se evaluaron los cambios inducidos en estas células en tiempos determinados, tanto *in vivo* como *in vitro*, ya sea en la morfología celular o en su estado de activación; medido por la expresión de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y por la producción de óxido nítrico.

MARCO TEÓRICO

A. CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA HEMATOPOYESIS

1.- Sistema hematopoyético

El sistema hematopoyético es el encargado de proporcionar todas las células sanguíneas de nuestro cuerpo, en la actualidad se sabe que todas estas células derivan de una célula precursora indiferenciada y pluripotencial, conocida como célula madre o tronco (Dexter y Spooncer, 1987; Spangrude, 1991). Esta célula madre hematopoyética posee 2 cualidades fundamentales: la autorrenovación y la pluripotencialidad. La autorrenovación se define como la capacidad de la célula madre para autoperpetuarse asegurando su progenie y la de los demás linajes sanguíneos, por su parte, la pluripotencialidad se define como la facultad para originar cualquiera de los tipos celulares que forman la sangre (Jandi, 1991).

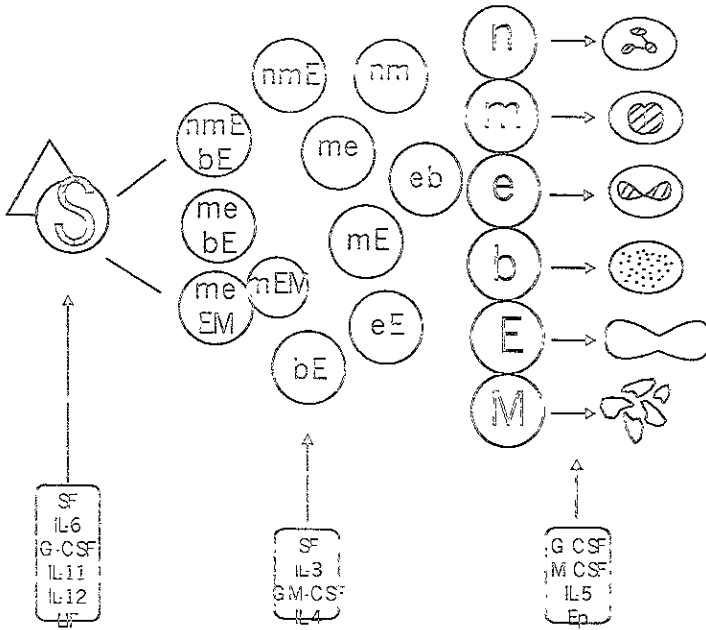
El sistema hematopoyético junto con otros tejidos con un alto recambio celular, experimenta de forma constante la autorrenovación y la diferenciación. El proceso biológico por el cual se generan todas las células sanguíneas es conocido como hematopoyesis (Dorshkind, 1991). En humanos, en la etapa fetal

la hematopoyesis se inicia en islotes sanguíneos del saco vitelino, posteriormente se instala definitivamente en la médula ósea de los huesos largos (Allen y Dexter, 1990). Actualmente, se ha demostrado que, en ratones, las primeras células tallo hematopoyéticas pueden detectarse antes que en el saco vitelino, a los 7 días de gestación en una región denominada mesonefros aortagonada o esplanopleura aórtica y que estas células son CD34⁺ y c-Kit⁺ (Mervin et al., 1997; Mokoyama et al., 1998).

El proceso hematopoyético que se lleva a cabo en la médula ósea originará a los 8 tipos de células sanguíneas, hipotéticamente el proceso puede dividirse en 4 compartimientos:

1. El de células madre que poseen una alta capacidad de autorrenovación.
2. El de células progenitoras de los diferentes linajes hematopoyéticos que tienen la capacidad de aumento en el número de ellas mismas.
3. El de células en maduración.
4. El de células funcionales las cuales están aptas para realizar su papel biológico (Figura T1), (Mendoza, 1993).

Figura 71. Esquematación de la hematopoyesis.



Se muestra la célula tallo (S) de donde se originan diferentes precursoras comunes que bajo la influencia de diversas citocinas darán origen a todos los componentes sanguíneos. Abreviaturas: n: neutrófilo, m: macrófago, e: eosinófilo, b: basófilo, E: eritrocito, M: megacariocito, SF: Factor steel, IL: interleucina, CSF: Factor estimulador de colonias, EP: entropoyetina, LIF: Factor inductor de linfocitos (Kaushansky, 1997).

2.- Microambiente celular hematopoyético

Existe un aspecto que ha despertado el interés de numerosos investigadores, que se refiere al mecanismo por el cual una célula madre indiferenciada permanece en estado de latencia, se autorrenueva o entra a una ruta determinada de diferenciación.

En un primer modelo para explicar el proceso, Till y colaboradores en 1964, después de la irradiación de la médula ósea y su posterior reconstitución en ratones, postularon que la regulación de la hematopoyesis era un proceso "estocástico", basándose en el análisis de la proliferación aleatoria de las células sanguíneas (Till et al., 1964).

Posteriormente, Curry y Trentin, propusieron la teoría del microambiente inductivo hematopoyético (Curry y Trentin, 1967) y debido a que el papel del microambiente puede ser considerado en función de la producción de moléculas humorales reguladoras. A finales de los 80's, Van Zant y Goldwasser postularon un modelo determinístico, donde la diferenciación de la célula precursora pluripotente es el resultado de la competencia que se establece entre moléculas inhibidoras y estimuladoras (Van Zant y Goldwasser, 1979). Posteriormente, Nakahata retomó el modelo estocástico desarrollado por Till y colaboradores, lo aplicó a la diferenciación hematopoyética y lo denominó "modelo de diferenciación estocástico progresivo" (Nakahata et al., 1982; Kurnit et al., 1985).

En 1991, se propuso que la diferenciación hematopoyética es determinística y está controlada por influencias internas y externas (Novak y Stewart, 1991; Brown et al., 1991). Se postuló que el microambiente hematopoyético y el programa genético de las células hematopoyéticas son los determinantes para el desarrollo de un tipo sanguíneo en particular. Más adelante, una revisión completa realizada por Ogawa acerca de la diferenciación hematopoyética indica que se ha demostrado que la expresión forzada de receptores para citoquinas no cambia el 'potencial' de diferenciación de las células

progenitoras primarias y que no existe especificidad en sus vías de señalización; por lo que postula que el modelo estocástico en el que las citocinas juegan un papel permisivo y no instructivo para la diferenciación de estas células, es el más congruente (Ogawa, 1998). De esta forma, en la actualidad es conveniente ser más conservadores y manejar el proceso como estocástico.

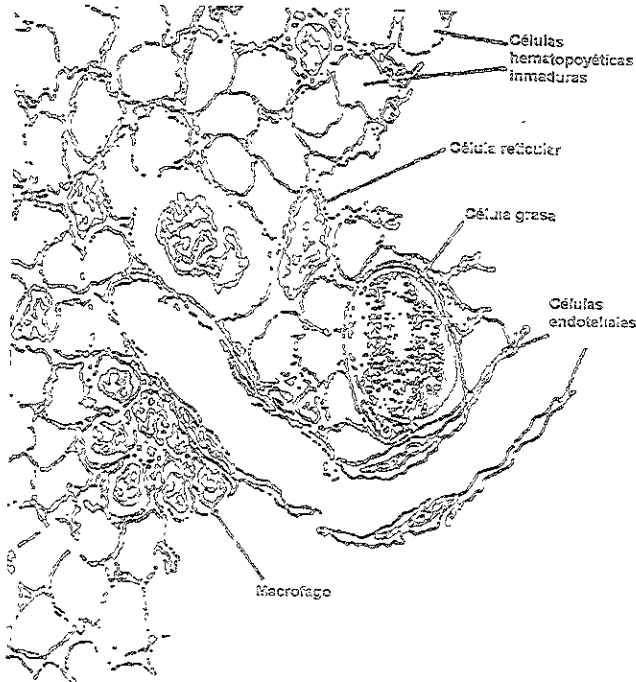
Mediante diversos estudios realizados *in vivo* con la médula ósea de vertebrados superiores, se ha podido establecer que el microambiente hematopoyético está formado por 2 grandes componentes: El sistema celular hematopoyético y los componentes de la matriz extracelular.

El sistema celular hematopoyético está constituido por células reticulares, células adventicias y adipocitos. La célula reticular representa la célula estromal básica de las áreas hematopoyéticas de la médula ósea (Westen y Bainton, 1979; Ailen y Dexter, 1990; Dorshkin, 1990), son las dominantes en el estroma medular, tienen una morfología dendrítica y extensiones citoplasmáticas en forma de hojas ramificadas, lo que permite formar una malla esponjosa sobre la que descansan las células hematopoyéticas (Figura T2).

Las células adventicias o endoteliales cubren las áreas de la superficie luminal de los sinusoides endoteliales y regulan el flujo de las células hematopoyéticas maduras hacia el torrente sanguíneo (Chamberlain et al., 1975; Becker y DeBruyn, 1976). Los adipocitos son típicos de la médula ósea no hematopoyética y probablemente se derivan de la acumulación de lípidos por las células adventicias (Weiss, 1981), su principal función es recubrir los espacios de la médula ósea no hematopoyética con lo que restringe el proceso hematopoyético a la epífisis de los huesos largos.

Los componentes de la matriz extracelular consisten en sustancias secretadas por las propias células estromales, como la fibronectina, colágena, laminina y algunos glicoproteoglicanos (Zuckerman y Wicha, 1983; Wight et al., 1986). Estos componentes de la matriz son los responsables de la adherencia de una célula con otra y con su sustrato, además se sabe que ejercen efectos reguladores sobre la hematopoyesis (Weinstein, et al., 1989).

Figura T2. Representación simplificada de los elementos celulares que conforman el microambiente hematopoyético (Dexter, 1989).



3.- Citocinas involucradas en las funciones hematopoyéticas.

Las citocinas son proteínas pequeñas, péptidos o glucoproteínas sintetizadas o secretadas por distintas células del cuerpo, con pesos moleculares de 6 a 60 kDa. Son compuestos potentes en extremo que actúan en concentraciones de 10^{-10} a 10^{-15} mol/lit, para estimular algunas funciones en las células blanco después de interacciones específicas entre ligando y receptor. Una sola citocina purificada puede tener efectos diferentes sobre el crecimiento y diferenciación de muchos tipos de células; como consecuencia, las citocinas pueden presentar un traslapamiento considerable en sus efectos biológicos sobre células blanco linfoides, mieloides y del tejido conectivo. Muchas citocinas se requieren para la activación de diferentes tipos celulares (Barret, 1991).

La primera descripción de un factor que regula la proliferación y diferenciación de células mieloides, fue hecha en 1906 por Carnot y Deflandre en Francia. Ellos encontraron a la eritropoyetina (Epo) como el factor responsable de la formación de células rojas o eritroides (Carnot y Deflandre, 1906; Jelkmann, 1992). El siguiente aporte acerca de los factores humorales que regulan la hematopoyesis se realizó en 1965 cuando el grupo presidido por Leo Sachs en Israel, describió la presencia de un factor producido por células estromales, capaz de estimular la formación de células pertenecientes al linaje macrófago-granulocito, al cual nombró MGI (Factor inductor de macrófagos y granulocitos, del inglés Macrophage and Granulocyte Inducer) (Pluznik y Sachs, 1965; Bradley y Metcalf, 1966).

Sachs describió 2 tipos de MGIs, el primero se caracteriza por mantener la viabilidad de las células en cultivo y de estimular su proliferación (MGI-1); y el segundo estimula preferentemente su diferenciación terminal (MGI-2) (Lipton y Sachs, 1981; Sachs, 1987; Sachs, 1992). En los años 90s, Sachs postuló que existen 3 tipos de MGIs del tipo 1: el MGI-1M que estimula la proliferación de macrófagos, el MGI-1G que induce la formación clonal de granulocitos-neutrófilos y el MGI-1GM que estimula la formación clonal de ambos tipos celulares. Además, describió las células que secretan cada inductor, así como los pesos moleculares de los mismos (Sachs, 1992). Posteriormente Metcalf y sus colaboradores renombraron los 3 MGIs-1, descritos por Sachs, como CSFs (Factores estimuladores de colonias, del inglés: Colony Stimulating Factor), a saber: M-CSF, G-CSF y GM-CSF respectivamente. Después de que en las décadas de los 60s y 70s no existió un consenso acerca del nombre de los factores, en la actualidad se les conoce como CSFs debido a que Metcalf, junto con otros investigadores, fueron los primeros en purificar estos factores, secuenciarlos, caracterizarlos molecularmente y obtenerlos en forma recombinante (Morstyn y Burgess, 1988; Metcalf, 1992). Aunque en un principio, debido a los primeros resultados experimentales, se pensó que estos inductores eran célula-específicos, ahora se sabe que sus funciones biológicas pueden ser redundantes y compartidas por varios tipos celulares (Bazan, 1990).

Los CSFs son polipéptidos monoméricos de varios cientos de aminoácidos, solamente el M-CSF es un dímero compuesto de unidades de aproximadamente 14.5 kDa. Los pesos moleculares de los CSFs oscilan entre los 20 y los 70 kDa, encontrándose variaciones en los pesos moleculares dependiendo de grado de glicosilación de estas moléculas (Golde y Gasson,

1988; Dexter, 1989; Heyworth et al., 1990). Los CSFs pertenecen a la familia de las citocinas, dentro de los cuales también se encuentran las interleucinas, los interferones y los factores de crecimiento (Aggarwal y Gutterman, 1992).

Las interleucinas (ILs) son citocinas que fueron descritas como moléculas producidas por los leucocitos cuya característica principal era participar en las respuestas inmunes o inflamatorias (Oppenheim, 1981). Recientemente con el avance de la biología molecular, se ha facilitado la purificación y caracterización de estas citocinas y se han podido evaluar sus diversos efectos biológicos en leucocitos y otros tipos celulares (Aggarwal y Gutterman, 1992, Metcalf, 1992).

Las ILs pueden participar en diferentes etapas del desarrollo hematopoyético, en la actualidad se conocen 18, que han sido plenamente caracterizadas (Soto et al., 1999). Entre ellas, la IL-1 actúa en células multipotenciales haciéndolas susceptibles a responder a otros factores (Dinarello, 1991). Nuestro grupo de trabajo ha confirmado efectos directos de esta citocina estimulando la diferenciación en células mieloides (Santiago, 1993). La IL-3 es conocida como un factor proliferador múltiple con actividad de CSF (Ericson, 1994). La IL-4 y la IL-6 combinadas con CSFs estimulan la formación de colonias mieloides y por sí solas ejercen efectos activadores principalmente en células del tipo monocito-macrófago (VanSnick, 1990; Paul, 1991). La IL-10, IL-11 e IL-13 inhiben la respuesta inflamatoria (Dazan, 1996; Santucci, et al., 1996; Trepicchio, et al., 1996; Nicoletti, et al., 1997), mientras que la IL-15 posee la cualidad reguladora tanto inhibidora como estimuladora de la respuesta inflamatoria (Alleva, 1997).

La IL-1 es producida en gran parte por monocitos y macrófagos activados, es estimuladora y reguladora de efectos en términos de crecimiento y diferenciación de numerosos tipos celulares, además tiene importantes efectos reguladores en el sistema inmune y en la respuesta inflamatoria.

Los primeros estudios sobre la IL-1 datan de 1953 cuando, Bennet y Besson describieron un material pirogénico, producido por leucocitos activados que llamaron pirogéno endógeno (EP, del inglés Endógen Pirogen). Más tarde, en 1972 Gery y Waskman describieron una molécula producida por macrófagos peritoneales de ratón, que aumentaban la proliferación de timocitos en respuesta a dosis subóptimas de mitógenos como la concavalina A y la fitohemaglutinina, ellos llamaron a esta molécula factor activador de linfocitos (LAF, del inglés: lymphocyte activating factor) (Dinarello, 1991).

En 1974 Murphy y colaboradores, caracterizaron el EP y demostraron que esta molécula tenía un peso molecular entre 14 y 17 Kda. Al mismo tiempo, Dinarello y su grupo describieron 2 EPs producidos por monocitos humanos, uno con punto isoelectrico (pI) de 5 y el otro de 7 (Dinarello, 1991).

De esta manera la IL-1 ha sido referida en la literatura por diferentes nombres los cuales describen diferentes actividades de esta proteína, algunos sinónimos de IL-1 incluyen: pirogéno leucocítico, mediador endógeno leucocítico, factor de proliferación de timocitos, proteína mitogénica, factor reemplazante de células T, factor estimulador de células B, factor diferenciador de células B, factor de células mononucleares, factor activador de osteoclastos,

factor inductor de macrófagos y granulocitos y factor inductor de la proteólisis de músculo. Sin embargo, en 1979, los inmunólogos decidieron nombrar a todos estos factores en base a sus similitudes biológicas y bioquímicas como IL-1. La IL-1 con pI de 5 se denominó IL-1 α y la de pI de 7, IL-1 β (Dinarello, 1991; Calcagno et al., 1982; Santiago et al., 1993).

Otra característica muy interesante de la IL-1 es que a pesar de que sus 2 formas (α y β) presentan solamente un 25% de homología, secuencias cortas de aminoácidos de fuerte homología pueden permitir a las 2 proteínas unirse al mismo receptor y ambas compiten por este en diversos tipos celulares tales como monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B. La producción de IL-1 es estimulada por inductores inmunológicos entre los que se incluyen linfocitos T activados, complejos inmunes, productos microbianos, levaduras, virus y lectinas, así como agentes inflamatorios. Probablemente las endotoxinas, en particular la molécula de lípido A (componente activo de los lipopolisacáridos), sean activadores más potentes de la producción de IL-1 en los fagocitos mononucleares (Dinarello, 1991)

El receptor para IL-1 fue purificado de la línea de células T EL4 de ratón, pesa 80 kDa en su forma glicosilada y está formado de 3 dominios; uno extracelular de 319 aminoácidos uno transmembranal de 21 y uno citoplásmico de 217. Es una proteína de 60 kDa que está glicosilada en abundancia y tiene un tamaño complejo de 80 kDa. En las células T en reposo se presentan muy pocas moléculas de receptor para la IL-1, pero después de la exposición al antígeno se presenta un incremento de 10 veces. Se cree que la unión de la IL-1 al receptor activa a la célula T mediante la vía proteína G-

cAMP, en vez de hacerlo por el sistema Ca⁺fosfatidilinositol-proteincinasa C. De gran importancia es que este receptor pertenece a la familia de las inmunoglobulinas (Barret, 1991).

La mayoría de las actividades de IL-1 muestran una característica común, todas son parte del complejo grupo de respuesta conocido como respuesta de fase aguda, que lleva a cabo el organismo ante invasiones microbianas, reacciones inmunológicas y procesos inflamatorios. Finalmente, el hecho de que IL-1 se haya conservado a lo largo del proceso evolutivo sugiere que su función esencial es la de actuar como un orquestador de los mecanismos adaptativos del individuo (Dinarelo, 1991).

Una característica interesante de la IL-1 β es que carece de la secuencia hidrofóbica que caracteriza a las proteínas de secreción por lo que no es claro el mecanismo a través del cual IL-1 β es llevada fuera de la célula. Algunas evidencias tales como la ausencia de IL-1 β en el retículo endoplásmico y su presencia en el citosol y fracciones lisosomales, hacen suponer que la IL-1 β esta asociada y es liberada a través de vesículas lisosomales (Dinarelo, 1991).

Los inteferones (IFNs) son una gran familia de glicoproteínas de secreción que tienen actividad antiviral (Roitt,1991). Se ha demostrado que los inteferones son producidos por células infectadas por casi cualquier virus animal de ADN ó ARN; ya sea en los cultivos de tejidos o en el animal. El nombre de inteferon se derivó de la capacidad de estas moléculas de "inteferir" con la replicación viral en células expuestas (Stites, 1993).

Los interferones purificados, obtenidos de cultivos de diversos tipos celulares, están constituidos por proteínas pequeñas de entre 20 y 30 kDa, extraordinariamente estables a un pH bajo, y moderadamente resistentes al calor (Stites, 1993).

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

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

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

Los receptores para interferón están presentes en la mayoría de las células. La unión de los interferones a sus receptores es de alta afinidad. La unión es saturable hasta con 7000 receptores de interferon tipo I y 13000 tipo II por célula, en algunas líneas celulares en cultivo. Sin embargo, algunas células expresan mucho menos receptores para interferón, los linfocitos pequeños en reposo solo tienen 250 para IFN α y 500 para IFN γ de alta afinidad por célula.

Después de unirse los interferones a los receptores de superficie, los complejos de interferón y receptor se agregan en pozos recubiertos y se internalizan por endocitosis mediada por el receptor. Al menos parte del interferón internalizado se degrada en los lisosomas. Aún no se han definido los eventos bioquímicos que traducen la señal del receptor superficial para el interferón hacia el resto de la célula a fin de producir las diversas respuestas biológicas.

Aunque al parecer, la totalidad de las células animales son capaces de producir interferón, las células de la médula ósea, del bazo y los macrófagos parecen tener una participación especial. Debido a sus características, los interferones se han dividido en 2 grandes grupos (Zambrano,1993):

- IFN de tipo I que comprenden las formas α y β de estas moléculas.
- IFN tipo II o interferón inmune que es la forma γ .

En los ratones, el IFN- γ es codificado por un solo gen que se encuentra en el cromosoma número 16. La secuencia del IFN- γ es aproximadamente 12% homóloga a la del IFN- α . La proteína madura es de 146 aminoácidos, no

presenta cisteínas; por lo tanto, es incapaz de formar puentes disulfuro y está glicosilada. El IFN- γ es lábil a pH 2, propiedad que se usa a menudo como un método simple para identificación, posee secuencias específicas ricas en residuos de arginina y lisina, sin los cuales carece de funcionalidad, característica que lo hace una citocina básica. Se produce durante las reacciones inmunes por linfocitos T estimulados por antígeno, mitógeno o lectina, o por linfocitos granulocíticos grandes con actividad tipo célula asesina natural (NK (del inglés: Natural Killer), (Scragg, 1996).

El receptor para IFN- γ presenta una constante de disociación de aproximadamente $1 \text{ a } 10 \times 10^{-12} \text{ M}$, su número es de aproximadamente 1000 en células normales, que es una cantidad mucho menor que el número de receptores que se presentan para las hormonas, como insulina, o factores de crecimiento. El gen que codifica para el receptor está localizado en el cromosoma 6. El receptor tiene un peso molecular de 90 kDa y la unión al IFN- γ requiere de un factor especie específico (Zambrano, 1993)

El IFN- γ incrementa la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés: major histocompatibility complex) clase I y II y la expresión de receptores para la inmunoglobulina G tipo I y III en monocitos-macrófagos, por lo que participa en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, en la fagocitosis, en la secreción de enzimas lisosomales y en la producción del anión superóxido (Zambrano, 1993).

El IFN- γ es un activador por excelencia de los macrófagos ya que controla su capacidad tumoricida *in vivo*, como presentadores de antígenos, la

degradación del triptofano extracelular, la fagocitosis y la producción de diversas citocinas, como IL-1 o IL-6. Las poblaciones de macrófagos activados por IFN- γ fagocitan menos parásitos intracelulares, por lo que se hacen resistentes a la infección. (Zambrano,1993)

Las citocinas que actúan preferencialmente en etapas específicas de la diferenciación hematopoyética se han clasificado en 3 grupos:

- a) Las que actúan sobre células muy primitivas como SCF (Factor de células totipotenciales, del inglés: stem cell factor), IL-6, G-CSF, IL-11, IL-12 y LIF (Factor inhibidor de leucemias, del inglés: leukemia inhibitory factor).
- b) Las que actúan sobre células progenitoras multipotentes: SCF, IL-3, GM-CSF e IL-4.
- c) Las que actúan sobre células progenitoras ya comprometidas: G-CSF, IL-5, M-CSF y Epo.

Existen más citocinas y factores de crecimiento que participan en el proceso hematopoyético; sin embargo, dependen de la presencia de otros factores y actúan sinérgicamente (Kaushansky, 1997).

Debido a los efectos reguladores que las citocinas ejercen en el desarrollo y maduración de células hematopoyéticas, así como por su intervención en diversos procesos biológicos relacionados; han despertado un gran interés en la investigación en el área clínica.

B. MACRÓFAGOS

1.- Características de los macrófagos

El macrófago, al igual que las otras células sanguíneas de la línea mieloide, tiene su origen en la célula tallo totipotencial que se encuentra en la médula ósea (Lowry y Quesenbery, 1992; Kaushansky, 1997). La célula tallo origina la unidad formadora de colonias mixtas, que a su vez da origen al progenitor bipotencial de macrófagos y granulocitos, conocido como unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos, esta unidad formadora de colonias da origen a la primera célula con características exclusivas de la línea macrofágica: el monoblasto (Lotem, et al., 1991). El monoblasto es una célula grande con un núcleo con cromatina dispersa, muy semejante al mieloblasto que es el precursor de los granulocitos.

Posteriormente el monoblasto se convierte en promonocito que tiene un núcleo irregular profundamente dentado y con filamentos esparcidos en el citoplasma; en esta etapa ya es capaz de fagocitar. El promonocito se convertirá en un monocito, la célula madura de mayor tamaño de todos los tipos sanguíneos, abandona la médula y entra en el torrente sanguíneo.

El proceso de la monocitopoyesis se lleva a cabo en aproximadamente 6 días. El monocito puede permanecer con vida durante algunos meses en el torrente sanguíneo y verse influenciado por diversas citocinas para acudir a la

defensa del organismo, alcanzando su madurez total, convirtiéndose en macrófago (Klein, 1990) o ingresar en algún tejido donde se cree que puede vivir incluso por años, convirtiéndose en un macrófago residente. Una vez establecido en un órgano o tejido en particular, adquiere características y propiedades específicas determinadas por el microambiente circundante (Foster y Landy, 1981; Dean y Jessup, 1986). Los macrófagos residentes toman un nombre especial de acuerdo al tejido del que forman parte, así tenemos células de Kuffer en el hígado, histiocitos en el tejido conectivo, células de "polvo" en los pulmones, etc. Estas células reciben nombres diferentes debido a que, a pesar de su origen y propiedades comunes, no tienen una morfología idéntica. Su metamorfosis a partir del estado monocítico al de macrófago, se ve influenciada por el tejido en el cual se lleva a cabo esta transformación, lo que da como resultado esta variación morfológica. Estas células terminales mononucleares son grandes, de 50 μm de diámetro y tienen un núcleo ovoide o con forma de bloque. Su citoplasma está lleno de gránulos lisosomales y vacuolas (Barret, 1991) (Figura T3).

Es importante resaltar que las poblaciones de macrófagos residentes en los tejidos y los inducidos a llegar a cualquier parte del organismo son muy diferentes morfológica y fisiológicamente (Dexter y Spooncer, 1987; Rasmussen, 1983; Johnson et al., 1983), debido a que los inducidos son afectados por una gran variedad de señales.

Los macrófagos se encuentran en todos los tejidos blandos del cuerpo, aunque el bazo y el hígado son los que tienen una población más abundante. Se caracterizan por una movilidad ameboide que hace posible que se desplacen a través de las superficies del cuerpo (Barret, 1991).

Uno de los cambios más notables que sufren los macrófagos, tanto *in vivo* como *in vitro*, es la activación, que es un cambio de un estado de reposo a otro en el cual adquieren la capacidad de destruir microorganismos o células malignas. Esta activación esta acompañada de cambios biológicos y morfológicos entre los que se incluyen la expresión de diversos receptores de membrana. Los receptores de membrana llevan a cabo funciones de reconocimiento requeridas para controlar las respuestas a cambios en el microambiente celular.

Figura T3. Micrografía electrónica de un macrófago residente de la cavidad peritoneal.



Los macrófagos son células grandes, de aproximadamente 50 μm de diámetro, poseen un núcleo ovoide o amañonado y gran cantidad de vacuolas y gránulos (22750X)

2.- *Funciones de los macrófagos*

Debido a su amplia distribución, los macrófagos tienen la facultad de monitorear el estado fisiológico del organismo y responder a diferentes tipos de señales, fisicoquímicas, humorales y celulares; tanto en condiciones normales como de estrés.

Cuando se altera el estado homeostático interno, el macrófago se activa y libera una gran variedad de enzimas, hormonas, proteínas y modificadores biológicos, para restablecer el equilibrio interno.

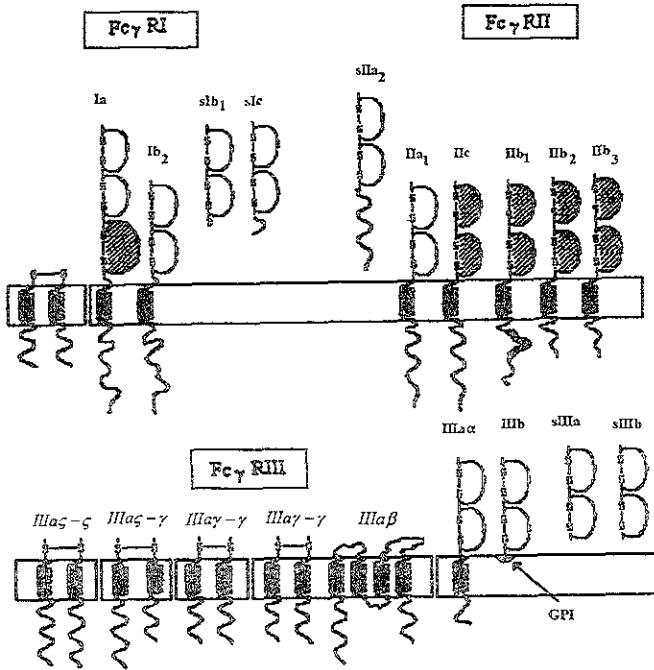
Los macrófagos forman parte de los mecanismos de defensa del organismo, ya sea por la activación de diversos procesos inmunológicos o por tener importantes funciones en numerosos procesos biológicos (Van Rooijen y Sanders, 1994), es decir, los macrófagos pueden potenciar o inhibir algún proceso o tener un papel crucial en él. Los macrófagos juegan un papel muy importante en la defensa del organismo contra cuerpos extraños debido a su capacidad de fagocitar partículas y microorganismos. Además, cuentan con diversos receptores de superficie capaces de unir, por ejemplo, complejos de antígeno con anticuerpo para posteriormente permitir la fagocitosis del antígeno, así como para desencadenar numerosas respuestas inmunológicas (Gosselin, et al., 1992). Son células capaces de procesar en su interior diversos antígenos y enlazarlos a moléculas MHC para su presentación a los linfocitos citotóxicos (Alving y Wassef, 1994).

3.- Receptores de superficie en los macrófagos

Los receptores de los macrófagos para la porción Fc de las inmunoglobulinas son de suma importancia para la realización de sus funciones; además se les considera como los principales marcadores de la madurez de estas células. En los últimos años han sido estudiados y caracterizados tanto en ratón como en humano, en el caso de los receptores para las inmunoglobulinas tipo G (Fc γ Rs) lo primero que se caracterizó fueron sus diferencias para enlazar IgG agregada o monomérica, así como la capacidad de algunos de ellos para resistir tratamientos con tripsina (Mellman y Unkeless, 1980; Unkeless y Einsen, 1975; Heusser, et al., 1977; Lane, et al., 1980). Al pasar los años se fueron descubriendo las características particulares de estos receptores, su peso molecular, afinidad a diferentes temperaturas y fuerzas iónicas, distribución, organización génica y sus diversos moduladores (Denhams, et al., 1987; Guyre, et al., 1981; Takeda, et al., 1983; Calcagno, et al., 1982; Fragoso, et al., 1985).

Los Fc γ Rs son ejemplos de moléculas con dominios conservados y combinados con secuencias divergentes para incrementar sus funciones. Comparten características comunes, todos tienen una secuencia líder en 2 exones, las diferencias se dan en los genes para los dominios intracelulares y transmembranales (Ravetch y Kinet, 1991; Ravetch y Anderson, 1990; Rhodes, et al., 1983). Los dominios extracelulares de los Fc γ Rs presentan homología con los dominios Cg2 de las inmunoglobulinas, aunque su plegamiento puede no ser como el de una típica IgG (Ravetch y Anderson, 1990; Kinet, 1989; Hibbs, et al., 1988) (Figura T4).

Figura T4. Representación esquemática de la familia de los Fc γ R.



Los receptores pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. En los 3 grupos de receptores se presentan algunas formas que no están asociadas a la membrana (Van der Winkel and Capel, 1993)

Aunque existen variantes, los Fc γ Rs pueden ser divididos en 3 tipos principales (Ravetch y Kinet, 1991):

- 1) El Fc γ RI de humano y de ratón que se caracteriza por su alta afinidad por la IgG monomérica.

- 2) El Fc γ RII humano y el Fc γ RIIb de ratón caracterizados por su amplia distribución.
- 3) El Fc γ RIII transmembranal de humano y Fc γ RIIIa de ratón, caracterizados por ser los más numerosos.

Los Fc γ RI presentan alta afinidad por monómeros de IgG. La molécula humana pesa 70 kDa y la de ratón 67 kDa (Lane, et al., 1980; Van de Winkel y Anderson, 1991). El Fc γ RI humano está muy glicosilado, si se le retiran los azúcares su peso se reduce a unos 55 kDa. Se encuentra presente en macrófagos, monocitos y neutrófilos tratados con IFN γ (Van de Winkel y Anderson, 1991). El Taller Internacional de Antígenos de Diferenciación, lo designó como CD64 (Ravetch y Kinet, 1991; Ravetch y Anderson, 1990). Existen varios anticuerpos capaces de reconocer a este receptor; sin embargo, para el receptor similar en los ratones no existe ninguno, aunque se sabe que ambos receptores presentan una homología entre 65 y 75% en sus regiones transmembranales, los anticuerpos existentes no presentan reacción cruzada (Ravetch y Kinet, 1991; Ravetch y Anderson, 1990; Van de Winkel y Anderson, 1991).

El receptor tipo I participa en la liberación del anión superóxido, en la fagocitosis, en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y en la secreción de IL-6 y TNF α (Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés: Tumor necrosis factor alpha) (Van de Winkel y Anderson, 1991; Van de Winkel y Capel, 1993).

La expresión del Fc γ RI se ve incrementada por IFN γ y lipoproteínas de baja densidad (LDLs). La IL-6 incrementa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en la que participan los Fc γ RI sin aumentar el número de receptores presentes, mientras que la IL-4 los disminuye. Los glucocorticoides inhiben el aumento de los receptores mediado por IFN γ en PMN (granulocitos polimorfonucleares) (Van de Winkel y Anderson, 1991; Grattage et al., 1992; Perussia, et al., 1983; Perussia, et al., 1987; DeVelde, et al., 1990; Parren, et al., 1992). También la IL-1 β , la IL-2, el TNF γ y el TNF β (Factores de necrosis tumoral gama y beta, respectivamente) son inductores de su aparición especialmente si se combinan con PMA (forbol miristato acetato, del inglés: phorbol myristate acetate) (Grattage, et al., 1992).

Los Fc γ RII son los de más amplia distribución. Se les encuentra en casi todas las células sanguíneas, sólo las NK no los poseen. Su número varía en los diferentes tipos celulares. Es una glicoproteína de 40 Kd tanto en ratón como en humano (Ravetch y Kinet, 1991; Ravetch y Anderson, 1990). Su utilidad radica en su capacidad de enlazar complejos inmunes, se le ha denominado antígeno de diferenciación CDW32. Existen varios anticuerpos contra este receptor en humano y se ha reportado sólo uno contra este tipo de receptor en ratón (Mellman y Unkeless, 1980). Se sabe que los medios condicionados por linfocitos en presencia de PMA incrementan los Fc γ RII (Liesveld, et al., 1988). Para algunos autores el Fc γ RII no varía por el tratamiento con IFN γ , GM-CSF, G-CSF y glucocorticoides (Huizinga, et al., 1990), mientras que para otros, IFN α , IFN γ y GM-CSF lo incrementan, al igual que IL-1 β , IL-2, TNF α y β , al combinarse con PMA (Grattage, et al., 1992) El efecto se inhibe por

dexametasona. Por otra parte se ha informado que IL-4 reduce su expresión (DeVelde, et al., 1990).

Entre las funciones que controla el Fc γ RII se encuentra la fagocitosis y participa en la liberación de superóxido, de enzimas lisosomales y de TNF γ .

Los genes para Fc γ RIII de humano y de ratón son reconocidos como homólogos por su distribución, organización, secuencia y función. Son sialoglicoproteínas de 50-80 kDa y después de diversos tratamientos en diferentes células se convierten en proteínas entre 21 y 33 kDa. Este receptor se designa como antígeno de diferenciación CD16 (Ravetch y Kinet, 1991; Van de Winkel y Capel, 1993; Erbe, et al., 1990). Este receptor sólo enlaza polímeros con afinidad media y al parecer sus carbohidratos son muy importantes ya que sin ellos no existe enlace (Ravetch y Kinet, 1991; Ravetch y Anderson, 1990).

El Fc γ RIIIb es inducido por el IFN γ y el TGF β (Factor de crecimiento tumoral beta, del inglés: tumor growth factor beta), es inhibido por glucocorticoides y el TNF α , así como por la IL-4 (Ravetch y Kinet, 1991; Ravetch y Anderson, 1990; Van de Winkel y Anderson, 1991; DeVelde, et al., 1990; Van de Winkel y Capel, 1993; Erbe, et al., 1990). Se ha postulado que este receptor sólo sea una trampa para complejos inmunes que no activan neutrófilos, aunque en unión con el receptor de tipo II puede participar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la fagocitosis (Huitzinga, et al., 1990).

En general los 3 tipos de receptores participan de forma diferencial en algunas enfermedades; por ejemplo, el FcRII soluble se correlaciona con mayor riesgo a contraer infecciones en pacientes neutropénicos y se ha asociado a enfermedades renales en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Por su parte, el receptor de tipo III está relacionado con la liberación de superóxidos que contribuyen al daño celular como secuela postinflamatoria. (Flores, 1997).

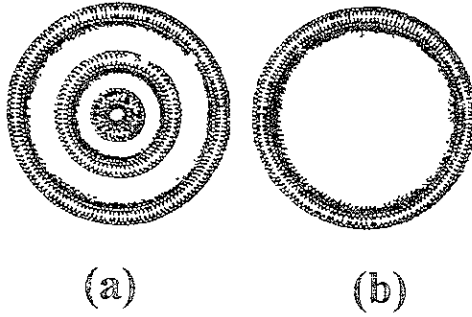
C. LIPOSOMAS

1.- Características generales de los liposomas

Los liposomas son vesículas microscópicas formadas por una o varias bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos, las cuales delimitan uno o varios compartimentos acuosos en el interior, su tamaño varía de 0.02 hasta 10 μm de diámetro (Bangham et al., 1965).

Los liposomas se clasifican, dependiendo del número de bicapas lipídicas que contienen, en vesículas unilamelares (ULV, del inglés: unilamellar vesicles) y vesículas multilamelares (MLV, del inglés: multilamellar vesicles) de aproximadamente 1 a 10 μm de diámetro. A su vez, las ULV se dividen en vesículas unilamelares pequeñas (SUV, del inglés: small unilamellar vesicles) de 25 a 50 nm y vesículas unilamelares grandes (LUV, del inglés: large unilamellar vesicles) entre 160 y 900 nm (Szoka y Papahadjopoulos, 1980) (Figura T5).

Figura T5. Representación esquemática de liposomas multilamelares (a) y unilamelares (b).



Debido a sus características, los liposomas se han utilizado como modelos experimentales en el estudio de algunas propiedades de la membrana celular; como la permeabilidad, la fluidez y la organización molecular de los lípidos y de las proteínas membranales (Bangham, 1968; Margolis, 1984). Además, la interacción liposoma-célula es un modelo para estudiar procesos fisiológicos, como la fusión y la adhesión celular (Papahadjopoulos y Kimelberg, 1973; Papahadjopoulos et al., 1990; Leckband et al., 1993).

Otro aspecto importante de mencionar, es que debido a la semejanza del arreglo lipídico entre el liposoma y la matriz membranal, así como a la manera espontánea en que se forman los liposomas en un medio acuoso, estas vesículas se han empleado como un modelo experimental de estructuras precelulares en los estudios sobre el origen de la vida, ya que al formarse aíslan microambientes de los alrededores y al mismo tiempo, constituyen una barrera con una permeabilidad altamente específica (Baeza et al., 1987; 1990; 1992).

Finalmente, la capacidad de los liposomas para atrapar moléculas biológicamente activas en su interior acuoso o en su bicapa lipídica, ha permitido que estas vesículas puedan utilizarse como vehículos para transportar fármacos, enzimas o ácidos nucleicos a células en diferentes sistemas biológicos (Poste, 1980; Itani et al., 1987; Mannino y Gould, 1988; Friedmann, 1989; Szelei y Duda, 1989; Keown et al., 1990; Janoff, 1992).

Cuando los liposomas se usan como transportadores de sustancias a la célula, es muy importante alcanzar un encapsulamiento óptimo, una adecuada protección a las sustancias que llevan y una selectividad contra las células a las que van dirigidos, por esta razón; se ha estudiado mucho acerca de la composición y tipo de lípidos que los forman.

Generalmente se usan LUV de 0.2 a 0.5 μm de diámetro, porque son muy estables e interaccionan mejor con las células, formadas con lípidos anfipáticos que normalmente conforman las membranas celulares; además, al aplicar los liposomas en animales, se pueden dirigir hacia un tipo específico de células, uniéndose en su superficie anticuerpos, proteínas virales, glucolípidos o lectinas (Straubinger y Papahadjopoulos, 1983; Kaneda et al., 1987; Liu et al., 1992; Trubetskoy et al., 1992). También, se pueden formar con una composición lipídica semejante a la de las membranas de las células a las que se van a dirigir (Burkhanov et al., 1985; Santiago, 1996).

Después de la interacción del liposoma con la célula, puede ocurrir la fusión de su bicapa lipídica con la membrana celular, o bien, las vesículas pueden penetrar a la célula por endocitosis; en cualquiera de estos 2 procesos, los liposomas vacían su contenido en el citoplasma celular (Poste, 1980).

2.- Lípidos que forman liposomas

De los diversos grupos de lípidos presentes en las estructuras biológicas, solo los lípidos que constituyen la matriz de las membranas celulares pueden formar parte de los liposomas, estos son: los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol.

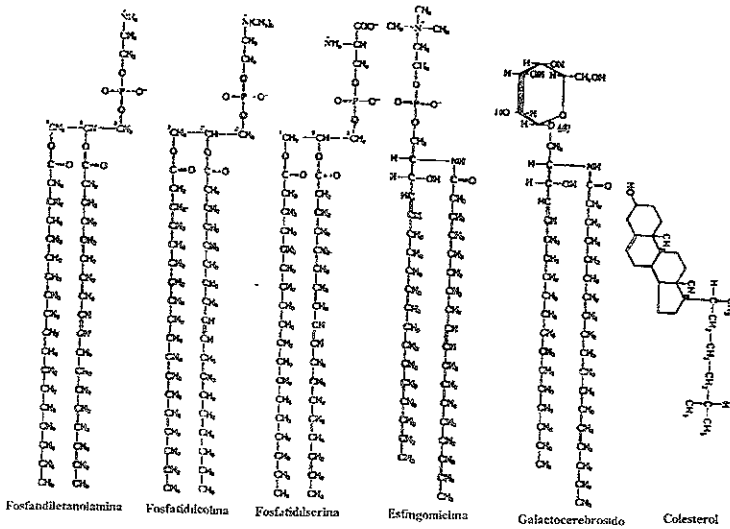
Un aspecto fundamental en la organización y en la función de la matriz lipídica membranal, es el carácter anfipático de sus lípidos. Una molécula anfipática es aquella que contiene una región hidrofóbica y una región hidrofílica (Gitler, 1969). Las regiones hidrofóbicas son insolubles en agua y las hidrofílicas son solubles en ella.

Los fosfolípidos y glicolípidos presentan una región polar en un extremo de su molécula, constituida por el grupo fosfato y/o una base nitrogenada, o por carbohidratos; y una región no-polar en el otro extremo, constituida por las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos y de esfingosina. La relación de tamaño de la región polar con respecto a la no-polar es de aproximadamente 1/3:2/3 respectivamente (Figura T6), lo cual les permite a estos lípidos asociarse entre si y formar agregados moleculares específicos; la bicapa lipídica es un ejemplo de estos agregados (Ibañez, 1993).

La región hidrofílica del colesterol es su grupo hidroxilo y la parte hidrofóbica la constituye el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. En esta molécula, las regiones polar y no-polar también están orientadas hacia uno y otro extremo, pero la diferencia fundamental con respecto a los otros lípidos

anfipáticos, es que su región polar es muy pequeña, por lo cual, el colesterol, por sí sólo, no forma bicapas lipídicas (Cuilis y Hope, 1985).

Figura T6. Lípidos anfipáticos. Todos ellos forman parte de la membrana celular.



3.- Autoensamble de los lípidos anfipáticos.

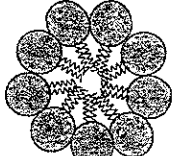
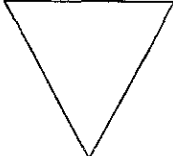
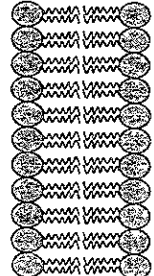
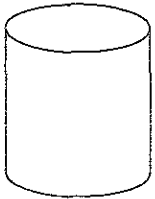
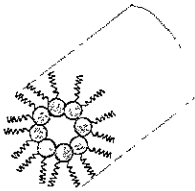
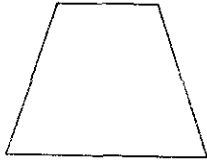
La presencia de un extremo polar y uno no-polar en los lípidos anfipáticos, determina que estas moléculas se autoensamblen espontáneamente en un medio acuoso, en asociaciones moleculares específicas, o fases lipídicas, en donde se satisface su doble carácter de hidrofobia e hidrofilia. La parte polar del lípido interacciona con las moléculas de agua y la parte no-polar se aleja de ellas, ya que la interacción de grupos no-polares con el agua provocaría un

aumento en la estabilidad de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, lo cual causaría una disminución en la entropía del sistema, que termodinámicamente no es favorable. Esta situación desfavorable se contrarresta con el alejamiento de grupos no-polares de la fase acuosa, que se conoce como efecto hidrofóbico y que permite que las moléculas de agua puedan alcanzar el máximo de desorden posible (Tanford, 1973). Al presentarse el efecto hidrofóbico, los lípidos en un medio acuoso, se autoensamblan y forman las asociaciones moleculares de bicapa, de fase hexagonal II (H_{II}) o de micela (Figura T7). En estas asociaciones moleculares, las regiones no-polares de los lípidos se atraen entre sí por fuerzas de van der Waals, en tanto que en las regiones polares, al quedar expuestas al medio acuoso, se manifiestan las interacciones hidrofílicas al máximo (Ibañez, 1993).

Por lo tanto, el autoensamble de lípidos en asociaciones moleculares específicas no requiere de energía, es termodinámicamente espontáneo y estable; su fuerza motriz es el alejamiento de los grupos no-polares del medio acuoso, con lo que se conserva el mayor número de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, el máximo de desorden y el mínimo de energía en el sistema, (Tanford, 1973).

La bicapa lipídica es la asociación molecular que adoptan los lípidos anfipáticos que tienen una forma molecular cilíndrica, como la fosfatidilcolina (Figura T7), en los cuales el diámetro de la región polar es muy parecido al de las cadenas hidrocarbonadas. Como los extremos de la bicapa lipídica quedarían expuestos a un ambiente acuoso, la bicapa se cierra y forma una vesícula llamada liposoma. Esta asociación molecular es la estructura básica de todas las membranas biológicas (Singer y Nicolson, 1972).

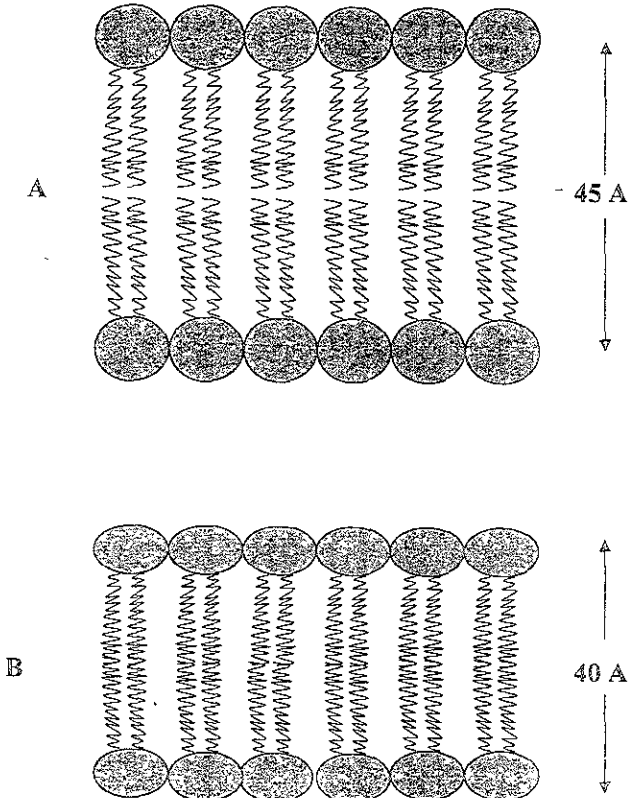
Figura T7. Polimorfismo lipídico.

TIPO DE LÍPIDO	FASE ESTRUCTURAL	FORMA MOLECULAR
Lisofosfolípidos Detergentes	 MICELA	 CONO INVERTIDO
Fosfatidilcolina Esfingomielinea Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Fosfatidilglicerol Acido Fosfatídico Cardiolipina	 BICAPA	 CILINDRICA
Fosfatidiletanol amina (insaturada) Cardiolipina-Ca ²⁺ Acido fosfatídico Ca ²⁺ (pH 6) Acido fosfatídico (pH 3)	 HEXAGONAL II	 CONO

Diferentes configuraciones espaciales que adoptan los lípidos anfipáticos de acuerdo a su composición molecular (Ibañez, 1993)

Las bicapas lipídicas pueden encontrarse en estado sólido (gel) o fluido (líquido cristalino), dependiendo de su composición de lípidos y de la temperatura. Cada lípido tiene una temperatura de transición (T_c), en la cual ocurre el cambio de estado (Figura T8) (Ibañez, 1993).

Figura T8. Diferentes estados de la bicapa lipídica.



En estado de gel (A), las cadenas hidrocarbonadas se encuentran rígidas en la bicapa ocupando mayor espacio; en el estado líquido cristalino (B), las cadenas están desordenadas, por lo que el espesor disminuye (Ibañez, 1993).

Los liposomas con lípidos que tienen una T_c inferior a la temperatura ambiente, son sólidos y los que tienen una T_c superior son fluidos. La T_c es una función de las interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, por lo tanto depende de la longitud y la insaturación de estas cadenas. La T_c aumenta de 14 a 23°C cuando la longitud de la cadena se incrementa en 2 grupos metilenos; en tanto que la presencia de dobles ligaduras, de ramificaciones o de anillos de ciclo propano, producen una disminución hasta de 80°C en la T_c , como en los ácidos grasos de 18°C, porque interrumpen el ordenamiento regular de las cadenas hidrocarbonadas, lo cual disminuye las interacciones mencionadas (Pagano y Weinstein, 1978).

El colesterol no forma liposomas por sí mismo, pero se integra a las bicapas lipídicas. Su presencia en liposomas que presentan una T_c cercana a la temperatura ambiente, provoca una disminución en la fluidez de la bicapa y en la permeabilidad a solutos hidrofílicos, por lo que confiere una gran estabilidad al liposoma (Szoka y Papahadjopoulos, 1980).

En las asociaciones moleculares de micela, la porción polar de los lípidos se encuentra en la periferia y la no-polar está hacia el centro de la estructura; debido a que los lípidos que dan esta fase tienen una forma molecular de cono invertido, en donde la porción más ancha corresponde a la región polar y la más estrecha a las cadenas hidrocarbonadas (Figura T7) (Ibañez, 1993).

En la fase hexagonal (H_{II}), las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se encuentran hacia afuera de un cilindro y las cabezas polares se encuentran hacia dentro en contacto con el medio acuoso (Figura T7); los lípidos que dan esta fase son los que tienen una forma molecular cónica, en donde la base del cono corresponde a las cadenas hidrocarbonadas y el vértice a la región polar, como la fosfatidiletanolamina poliinsaturada, la cardiolipina y al ácido fosfatídico a pH 3 y en presencia de cationes divalentes (Ibañez, 1993). Cuando se modifican estas condiciones, la forma del lípido cambia a cilíndrica, con lo cual su asociación molecular cambia a la de bicapa. La propiedad de los lípidos de adoptar diferentes asociaciones moleculares en un medio acuoso, como una función de su forma molecular, se le conoce con el nombre de polimorfismo lipídico (Cullis y Hope, 1985).

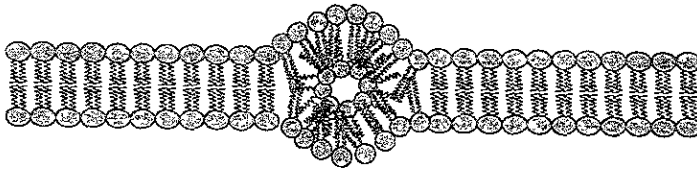
Los lípidos que dan la fase H_{II} , constituyen del 35 al 40% de los lípidos de las membranas celulares (de Kruijff, 1987), y algunos estudios de resonancia magnética nuclear, sugieren que los lípidos cónicos en las membranas celulares se encuentran en un arreglo semejante al H_{II} , llamado micela invertida (Cullis and Hope, 1985) (Figura T9). Estudios posteriores han sugerido que estas micelas invertidas aumentan entre mayor sea la actividad biológica de las membranas, y se les ha relacionado con las siguientes funciones:

- a) En la formación de puntos de contacto entre membranas, como en los procesos de fusión membranal.
- b) En la yuxtaposición de membranas en los cloroplastos y las mitocondrias, organelos muy ricos en lípidos cónicos.

- c) En el transporte de cationes divalentes y de moléculas como lípidos, algunos péptidos y proteínas a través de la matriz lipídica membranal (de Kruijff, 1987).

Las micelas invertidas, también llamadas partículas lipídicas se han demostrado por microscopía electrónica de criofactura, en la bicapa lipídica de liposomas con diferente composición de lípidos, entre los cuales se encuentran los de dipalmitoilfosfatidilcolina y ácido fosfatídico (2:1) (Verkleij, 1984). Además, se ha demostrado que estas partículas transportan iones, como el manganeso y calcio, a través de la estructura lipídica de los liposomas (Baeza et. al., 1990; 1994).

Figura T9. Representación esquemática de una micela invertida.



Es una micela formada por lípidos cónicos en el interior de una bicapa lipídica.

4.-Formación de liposomas

Los liposomas se pueden formar de lípidos naturales y/o sintéticos. Su principal constituyente es la fosfatidilcolina, pero se pueden utilizar otros lípidos o mezclas de ellos, que pueden conferir carga positiva o negativa al liposoma. La inclusión de cargas aumenta notablemente el volumen acuoso

atrapado adentro de los liposomas, debido a la repulsión electrostática entre las bicapas adyacentes, la carga también afecta la interacción de los liposomas con las células (Pagano y Weinstein, 1978). Caso especial, son los liposomas estéricamente estabilizados, que son aquellos a los que se les ha añadido moléculas de polietilenglicol al fosfolípido con la finalidad de que los liposomas tengan una mayor circulación en el torrente sanguíneo sin ser fagocitados (Lasic, 1996).

Generalmente los liposomas multilamelares se forman por agitación mecánica de una película muy fina de lípidos a la que se adiciona la solución acuosa con las moléculas que se van a encapsular (Banham et al., 1965); éstas moléculas quedan atrapadas en los espacios acuosos, si son polares, o se insertan en la bicapa lipídica si son hidrofóbicas.

Las SUV se forman al someter a ultravibración una preparación de MLV (Lasic, 1988), con lo cual se produce una población homogénea de liposomas pequeños (25-50 nm). El material que se desea encapsular se adiciona a la suspensión de MLV y como la sonicación rompe los liposomas grandes, el material externo puede ser atrapado al formarse los nuevos liposomas.

Las LUV se emplean principalmente para encapsular macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, los métodos mas usados para formarlos son: quelación del Ca^{2+} con EDTA de una suspensión acuosa de lípidos (Papahadjopoulos et. al., 1975), inyección de lípidos disueltos en éter a una solución acuosa caliente (Deamer y Banham, 1976) y por evaporación en fase

inversa (Szoka y Papahadjopoulos, 1978). Con este último método se forman liposomas de 0.1 a 1 μm de diámetro y son uni y oligolamelares.

D. IMPORTANCIA DEL USO DE LOS LIPOSOMAS

La importancia del uso de liposomas como acarreadores de diversas sustancias, radica en que se ha demostrado que su utilización modifica fuertemente la farmacocinética de los productos activos, ya que la sustancia libre requiere de mayores concentraciones para ejercer sus funciones, pues es rápidamente excretada por los riñones y además puede tener efectos tóxicos, diferentes o no tener ninguno (Poyner, et al., 1995; Duserre, et al., 1995; Kamei, et al., 1995; Camilleri, et al., 1995).

Ha sido notable la utilización de liposomas para encapsular medicamentos antitumorales; por ejemplo, en adenocarcinomas se han administrado liposomas con muramil tripéptido e ifosfamida, de tal forma que son accesibles a los macrófagos aledaños al tumor, lográndose la regresión de éste (Kleinerman, et al., 1995a). Por otro lado, al enviar el muramil tripéptido en liposomas y tomar muestras para su posterior observación con microscopio electrónico, se aprecia la aparición de una discreta subpoblación de macrófagos distinta morfológica y funcionalmente a la población inicial, que pudiera estar involucrada con los efectos tumoricidas (Hoedemakers, et al., 1995). Más aún, se ha demostrado que existe correlación entre la regresión de tumores y la administración de medicamentos en liposomas (Xie, et al., 1995). En otras investigaciones se utilizó un fármaco anti-VIH encapsulado en liposomas y fue

dirigido a monocitos-macrófagos humanos (Betageri, et al., 1993). Adicionalmente, se ha avanzado en el estudio acerca del efecto en los macrófagos de los medicamentos encapsulados en liposomas, y se ha encontrado que puede estar involucrada la inducción a la secreción de citocinas clave para la regresión de tumores o para la defensa contra enfermedades, como la IL-1, el TNF y la IL-6 (Asano, et al., 1995; Kleinerman, 1995b; Phillips, et al., 1995; Eue, et al., 1995; Pittet, et al., 1995).

En la actualidad se han utilizado liposomas para nuevas estrategias de combate contra diversas enfermedades, principalmente cáncer (Kopenhagen, et al., 1998). En una de ellas se han utilizado estas partículas para transportar genes que codifican para diferentes citocinas, con la finalidad de que sean expresados por las células tumorales. Con esta estrategia, se han logrado efectos contra células de cáncer cervical y de colon (Tomoda, et al., 1998; Shimizu, et al., 1998). Otra estrategia es la utilización de oligodesoxiribonucleótidos asociados a liposomas positivos con la finalidad de modificar la expresión genética en células hematopoyéticas humanas, lo que abre la posibilidad de utilizarlos en protocolos clínicos (Kronenwett et al., 1998).

Los liposomas son útiles en la práctica clínica, en el rastreo linfático por centelleo en el que se utilizan micropartículas marcadas o coloides que se distribuyen en la corriente linfática; en la actualidad se ha propuesto una nueva estrategia alternativa, enviando liposomas con marcaje dirigidos a los macrófagos de esas zonas (Pittet, et al., 1995).

Otra forma de utilización de liposomas es para la fabricación de vacunas mediante la encapsulación del antígeno para generar respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CTLs, del inglés: cytotoxic T lymphocyte). De hecho, existe información acerca de la estimulación de CTLs por antígenos liposomales, lo que apoya la idea de la utilización de liposomas como vacunas sintéticas contra antígenos intra o extracelulares (Alving y Waseff, 1994; Kersten y Crommelin, 1995; Rao, et al., 1995; Barnes y Michell, 1995; Lezama-Dávila y Gallagher, 1995; Bergers, et al., 1994; Alving,1993; Ho, et al., 1994; Nair, et al., 1993). Existen estudios acerca del procesamiento de los antígenos liposomales por los macrófagos y varios autores proponen que el antígeno es procesado por los macrófagos a través de un proceso citoplásmico que resulta en la liberación de los epitopes del antígeno al aparato de Golgi y al retículo endoplásmico. Los epitopes antigénicos liposomales podrían asociarse a las moléculas MHC clase I y transportarse en vesículas hacia la superficie de las células para la presentación e inducción de CTLs (Alving y Waseff, 1994; Rao, et al., 1995; Barnes y Mitchell, 1995; Alving,1993).

Es importante resaltar que los liposomas también han sido útiles en el estudio de las características de diversos receptores en macrófagos. Los receptores "scavenger" involucrados en la captación de lípidos tales como el colesterol, han sido estudiados con la ayuda de liposomas, se sabe que estos receptores se unen a lipoproteínas de baja densidad LDLs (LDLs, del inglés: low density lipoproteins), que son las principales acarreadoras del colesterol sanguíneo. Las LDLs se presentan ya sea en forma acetilada u oxidada (AcLDL y OxLDL). Utilizando liposomas se ha encontrado que la asociación de fosfolípidos cargados negativamente con LDLs, incrementa la ingestión y

deposición de ésteres de colesterol por los macrófagos (Greenspan, et al., 1995). Otros autores han encontrado que el grupo lateral es crítico para el transporte de esteroides de los lisosomas al citoplasma, sus datos sugieren que la acumulación de fitoesteroides endocitados en fagolisosomas no es una consecuencia de la inhabilidad de la célula para esterificar esteroides en el retículo endoplásmico, sino que los macrófagos pueden discriminar entre esteroides que difieren sólo en un grupo etilo o metilo (Sato, et al., 1995); además, se han encontrado evidencias de que estos receptores juegan un papel significativo en el reconocimiento de células dañadas o apoptóticas (Sambrano y Steinberg, 1995). Se ha demostrado que la modificación de LDL en el plasma humano confiere propiedades aterogénicas a esta proteína; esta modificación es una reacción en cascada que incluye desialización, pérdida de lípidos, reducción en el tamaño de la partícula, incremento en la carga electronegativa y peroxidación de lípidos (Tertov et al., 1998). Utilizando liposomas, se ha determinado que los receptores "scavenger" clase B SR-B1 y CD36 son receptores para fosfolípidos aniónicos (Rigotti, et al., 1995).

Más ejemplos de estudios de receptores con ayuda de liposomas son el reconocimiento y eliminación de liposomas conteniendo fosfatidilserina, en los que se ha encontrado que este es un proceso mediado determinantemente por opsoninas del suero (Liu, et al., 1995). En otros estudios se ha descrito la contribución de los receptores de manosa activando el proceso de fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG a través de Fc γ Rs; además, encontraron que las lectinas pueden participar en la transducción de la señal en la activación de macrófagos por liposomas (Murai, et al., 1995). En cuanto a la activación de receptores se ha encontrado que el de IL-1 es modulado por lipopolisacáridos de

paredes bacterianas (LPS) encapsulados en liposomas (Marquette, et al., 1994; Dieter, et al., 1995)

Paradójicamente, los artículos que describen diferentes usos y formulaciones con liposomas han disminuído, ya que en la actualidad se registran cientos de patentes al año con formulaciones y usos específicos de estas partículas (Soto, 2000).

E: UTILIZACION DE LIPOSOMAS COMO VEHICULOS PARA CITOCINAS.

1.- Encapsulamiento de citocinas en liposomas

Actualmente se han encapsulado diversas citocinas en liposomas y se ha observado que pueden ejercer sus funciones tanto en células en cultivo como *in vivo*.

Uno de los primeros informes de una citocina encapsulada en liposomas data de 1985 en el cual un factor denominado MAF (Factor activador de macrófagos, del inglés: Macrophage Activating Factor) producido por linfocitos, termoestable y especie específico, al ser encapsulado en liposomas podía romper la barrera de la especificidad (Kleinerman y Fidler, 1985). Esta citocina ejerce sus funciones estimulando un receptor interno después de haber traspasado la membrana de la célula no específica.

Se han utilizado IL-1, TNF e IFN γ encapsuladas en liposomas para causar efectos tumoricidas en células de cáncer de mama (Saito, et al., 1995, Coradini, et al., 1998). Además se ha utilizado TNF α encapsulado para combatir sarcomas (van der Veen, et al., 1998) así como IL-2 para tratamiento de metastasis en hígado (Okuno, et al., 1998).

2.- Unión preferencial de los liposomas a sus células blanco

La capacidad fagocítica de los macrófagos y su participación en la degradación de los lípidos hacen que estas células sean la vía principal de captación de los liposomas. Precisamente, por esta razón se han fabricado liposomas modificados o no convencionales (Lasic, 1996) para permitir que circulen o permanezcan por más tiempo en el sitio de inyección y de esta manera sean capaces de liberar su carga para que ésta ejerza su función.

En la década de los 80s, los macrófagos comenzaron a ser muy estudiados *in vivo*, con la finalidad de determinar su participación precisa en diferentes procesos biológicos; por lo anterior se intentó suprimir ciertas poblaciones de macrófagos para facilitar esta determinación. Se eliminaron poblaciones usando asbestos o sílice (Kagan y Hartmann, 1984), carragina (Shek, et al., 1982) u otros tratamientos (Pinto, et al., 1989); sin embargo, existían inconvenientes debido a que la supresión era incompleta o había efectos colaterales causados por el material. En 1984, se introdujo una estrategia basada en la liberación intracelular de una sustancia letal para los macrófagos, llamada clodronato (diclorometilen-bifosfonato), encapsulada en liposomas, lo

que ha permitido diversos estudios sin ninguna interferencia (Van Rooijen y Sanders, 1994). En adelante encapsular en liposomas diversas sustancias, para su posterior ingestión y procesamiento por los macrófagos, ha sido una poderosa y útil herramienta en diversos estudios y aplicaciones en ciencia básica y medicina.

Se ha trabajado mucho para encontrar el mejor método de eliminación de subpoblaciones específicas de macrófagos, los resultados indican que es muy importante la composición química, la carga eléctrica y la vía de administración de los liposomas con clodronato para conseguir la supresión deseada (VanRooijen y Sanders, 1994). Es de suma importancia resaltar que si el tóxico no es encapsulado en liposomas, no tiene ningún efecto en la población de macrófagos (Camilleri, et al., 1995; Fraser, et al., 1995; Aramaki, et al., 1995). El utilizar liposomas envenenados para estudiar la función de algunas subpoblaciones de macrófagos ha sido de mucha utilidad; se ha descrito que la eliminación de los macrófagos del hígado de ratones, permite en ellos que células hematopoyéticas humanas vivan hasta por 12 días (Fraser, et al., 1995). Se han encontrado evidencias de no participación de los macrófagos periféricos o sus secreciones en la activación sistémica de células T causada por superantígenos bacterianos *in vivo*. Adicionalmente, se ha descrito la participación de los macrófagos en la encefalomiелitis debido a que éstos representan alrededor del 50% de las células mononucleares que rodean a lesiones perivasculares del sistema nervioso central de ratas que sufren esta enfermedad (Huitinga, et al., 1995). En otros estudios se encontró que al eliminar los macrófagos alveolares de ratas y ratones con liposomas, se amplifica fuertemente la respuesta inmune a antígenos inhalados, en particular

de respuestas de anticuerpos secundarios dependientes de células T de memoria, por lo que se concluye que el papel de los macrófagos residentes alveolares es la modulación de respuestas inmunológicas ante la diversidad de antígenos que entran por esta vía (Strickland, et al., 1993). Resulta muy interesante ver los estudios comparativos con varias subpoblaciones de macrófagos eliminadas con liposomas alternativamente; por ejemplo, se ha estudiado la eficacia de los macrófagos de bazo y de las células dendríticas para la inducción exitosa de la respuesta de linfocitos citotóxicos restringidos de clase I, la cual depende de la apropiada presentación del antígeno por las APCs (células presentadoras de antígenos; del inglés: antigen presenting cells), los autores estudiaron la distribución de liposomas y su antígeno y encontraron que las células dendríticas son más eficientes, pero si los macrófagos del bazo son eliminados antes del proceso, las células dendríticas se vuelven ineficientes (Nair, et al., 1995).

Algunos investigadores han modificado liposomas añadiéndoles azúcares para dirigirlos a poblaciones especiales de macrófagos; además, se postula que asociar azúcares con diversas proteínas, puede facilitar la unión de éstas con su receptor (Kichler y Shuber, 1995; Wadhwa y Rice, 1995; Yachi, et al., 1995).

3.- Liberación de las citocinas en las células blanco

La liberación de las citocinas en sus células blanco es un punto que no ha sido muy estudiado. Como ya se mencionó, los macrófagos son la vía

principal de captación de los liposomas, por lo que se están utilizando liposomas estabilizados para hacer llegar medicamentos, citocinas o diversas moléculas a una población celular específica, precisamente librando la fagocitosis por los macrofagos de estas vesículas. Independientemente de la célula blanco a la cual van dirigidos, al parecer los liposomas pueden seguir 3 caminos para interactuar con ellas: fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido en el citoplasma, entrar en la célula vía endocitosis o fagocitosis; y romperse en un área cercana a la célula blanco, liberando su contenido permitiendo que entre en contacto con las células (Poste, 1980; Zhou y Huang, 1994).

En estudios recientes se ha demostrado que una glicoproteína sérica se une a los liposomas formados con fosfatidilcolina y sirve como una intermediaria para la interacción de estas partículas con los macrófagos; además, se describe que la modificación química de residuos de lisina y cisteína anulan el efecto de esta proteína sérica (Balasubramanian y Schroit, 1998)

En estudios realizados sobre de la liberación de fármacos, se encontró que la permeabilidad de la membrana es determinante para el paso de éstos, no así su difusión. Por lo anterior, se ha propuesto que la membrana puede participar en el control de este proceso (Imanidís et al., 1998).

Por último, es importante mencionar que se ha encontrado que la composición química de la membrana de los liposomas tiene una importante participación en la tasa de transición de arreglos en los péptidos transportados (Salom et al., 1998).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL: Evaluar la diferenciación celular de macrófagos residentes de cavidad peritoneal *in vitro* e *in vivo*, mediante la expresión de Fc γ Rs y la secreción de óxido nítrico, inducidos con IL-1 β e INF- γ encapsulados en liposomas y determinar el tipo de Fc γ Rs expresados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Inducir la aparición de receptores Fc γ Rs en macrófagos peritoneales de ratón *in vitro* mediante la administración de IL-1 β e INF- γ encapsulados en liposomas.
2. Evaluar la producción de óxido nítrico inducido por IL-1 β , e INF- γ encapsuladas en liposomas.
3. Utilizar liposomas con o sin citocinas *in vivo*, para evaluar la diferenciación funcional y morfológica de los macrófagos residentes de cavidad peritoneal a diferentes tiempos.
4. Evaluar la aparición de Fc γ RI y Fc γ RII inducidos a diferentes tiempos

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con células hematopoyéticas, especialmente macrófagos, nuestro grupo de trabajo ha hecho importantes avances en el entendimiento de la diferenciación celular normal, evaluada a través de la aparición de los diferentes receptores inmunológicos para la porción Fc de las inmunoglobulinas (Fc γ Rs). Se ha determinado que además del IFN γ ; la IL-1 β y la IL-6 son inductoras de la aparición de Fc γ Rs en macrófagos normales y leucémicos de ratón (Santiago et al, 1996). Además, se ha encontrado expresión diferencial de Fc γ Rs en diversos estados de diferenciación y, en presencia de IL-1 β , en macrófagos normales y en líneas leucémicas (Santiago et al, 1993, Corona de Valdés et al, 1996). Por lo anterior, podemos afirmar que hemos encontrado diferencias importantes en la expresión de Fc γ Rs en diferentes estados de diferenciación y con la presencia de diferentes citocinas; sin embargo, nada se ha hecho aún acerca de este proceso *in vivo*.

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

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

Por lo anterior, un adelanto en el entendimiento de la diferenciación celular de los macrófagos, es el estudio *in vivo* de la influencia de diversas citocinas en este proceso. Este avance puede lograrse elaborando liposomas conteniendo el material necesario para la investigación y administrándolos por la vía adecuada a ratones, para posteriormente proceder a la extracción y evaluación del grado de diferenciación de los macrófagos. En el presente trabajo se utilizaron IL-1 β e IFN γ encapsulados en liposomas para evaluar la expresión de Fc γ Rs y la producción de óxido nítrico (parámetros de diferenciación) en macrófagos peritoneales residentes de ratón. Así mismo, se complementó la información funcional con la observación de cambios morfológicos apreciados en microscopía electrónica.

Tradicionalmente, los Fc γ Rs se detectan evaluando, por rosetado (Santiago, et al, 1993) o por técnicas espectrofotométricas (Mendoza et al, 1996); la unión a éstos de eritrocitos opsonizados con IgG. Sin embargo, existen

3 tipos diferentes de ellos y existen anticuerpos monoclonales para un sólo tipo de Fc γ Rs de ratón y ninguno en forma comercial. En nuestro laboratorio se ha trabajado en la obtención de dichos anticuerpos para precisar qué tipo de Fc γ Rs aparecen en macrófagos normales o leucémicos y con la presencia de diversas citocinas (Flores et al, 1996). Adicionalmente, en la actualidad, se conocen secuencias específicas para cada tipo de receptor, lo que posibilita su análisis mediante la técnica de RT-PCR.

Por lo anterior se utilizaron citocinas solas o combinadas encapsuladas en liposomas para inducir la aparición de Fc γ Rs en macrófagos peritoneales y evaluar la expresión del tipo de Fc γ R inducido. Esta evaluación cobra importancia debido a que día con día se están asociando nuevas funciones a cada uno de los tipos de Fc γ Rs, especialmente para los de tipo I y II se están estableciendo patrones de comportamiento e influencia de cada uno de ellos en las diferentes formas de diferenciación que llevarán a la madurez y función completa de las subpoblaciones de macrófagos, lo que nos coloca en la posibilidad de intervenir en la vía de diferenciación deseada para su manipulación, en el caso de que sea necesario realizarla, mediante citocinas encapsuladas de forma segura.

Por último, definitivamente el uso de liposomas es ilimitado, es posible la aplicación de esta biotecnología en otros sistemas y tipos celulares, lo que facilitaría el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, utilizando diversos protocolos; por ejemplo, ADN para terapia genética, principios activos en bajas concentraciones y citocinas en forma específica y segura.

HIPÓTESIS

Las citocinas son péptidos o glicoproteínas sintetizadas o secretadas por distintas células del cuerpo. Son compuestos potentes en extremo, que estimulan funciones específicas en las células blanco con concentraciones mínimas. Debido a los efectos de estas citocinas en el desarrollo y maduración de células hematopoyéticas, así como de su intervención en diversos procesos biológicos relacionados con éstas, se ha despertado un gran interés para su aplicación clínica.

Nuestro grupo ha demostrado que las citocinas IL-1 β y el IFN γ inducen la expresión de Fc γ Rs tanto en macrófagos normales de la cavidad peritoneal, como en macrófagos provenientes de líneas celulares leucémicas. Sin embargo, el efecto inductor de estas dos moléculas sólo ha sido evaluado *in vitro*, por lo que teniendo en consideración que los liposomas se utilizan para encapsular segura y adecuadamente diversas sustancias, si encapsulamos en liposomas la IL-1 β y el IFN γ y se las proporcionamos *in vivo* a subpoblaciones de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, podremos evaluar su efecto en la diferenciación de estas células, principalmente en la expresión de Fc γ Rs y la activación celular, para conocer si el efecto observado *in vitro* puede ser generalizado a poblaciones de macrófagos no manipulados fuera del organismo y tener la posibilidad de conocer como estas citocinas encapsuladas participan en los procesos normales de activación-diferenciación de los macrófagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico.- Se utilizaron ratones hembras o machos de las cepas CD-1, CBA, NIH o la F1 de la cruce de BALB/c X BLACK/c57 de 6-8 semanas de edad.

Citocinas.- Se utilizaron rh IL-1 β y rm IFN γ (IMMUNEX,USA).

Soluciones.- Ver ANEXO 1.

Cultivo celular.- Todos los cultivos se efectuaron en incubadoras a una temperatura de 37°C, con humedad saturante y 10% de CO₂. Se utilizaron los medios de cultivo RPMI 1640 (Microlab, México) e IMDM (GIBCO Labs, USA), suplementados con suero fetal de bovino al 10% (GIBCO Labs, USA) inactivado previamente a 56°C (medio suplementado). Para el cultivo se utilizaron cajas Petri de 10 mm de diámetro o placas de 24 pozos (Nuncclon, Dinamarca).

Formación de liposomas.- Los liposomas neutros y negativos fueron preparados mediante el método de Szoka (Szoka y Papahadjopoulos, 1978). Se usaron 10 μ moles de lípidos (Fosfatidilcolina (PC): Fosfatidiletanolamina (PE): Colesterol (CH), 4:2:4 y PC:Fosfatidilserina (PS):CH 6:3:1, respectivamente) disueltos en 1 ml de cloroformo, los cuales se colocaron en un matraz cónico de 2 bocas de 50 ml de capacidad. El disolvente se evaporó a presión reducida y se

añadieron 1.2 ml de éter dietílico y 333 μ l de medio de cultivo con o sin citocinas. Se agitó con vortex durante 45 segundos a la máxima velocidad y se procedió a evaporar el solvente por 45 segundos más en agitación. La suspensión lechosa de liposomas se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo sin suero. Para eliminar la citocina no encapsulada, se procedió a lavar la suspensión por ultracentrifugación a 220,000 g y la pastilla de liposomas se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo. Por último, la suspensión se filtró en membranas Millipore (Millipore, USA) con poros de 0.22 μ m de diámetro para obtener la preparación estéril.

Los liposomas catiónicos o positivos se prepararon por sonicación, disolviendo 10 μ moles de lípidos (Espemidin-colesterol (EspCH): PC, 5:5) con 1 ml de cloroformo, se evaporó el solvente con aire estéril, se adicionaron 333 μ l de medio de cultivo con o sin citocinas y se procedió a sonicar por 3 ciclos de 5 segundos por 30 segundos de reposo; por último, se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo sin suero. Para eliminar la citocina no encapsulada, se procedió a lavar la suspensión por ultracentrifugación, manteniendo en todo momento a la suspensión estéril debido a que estos liposomas no pueden ser filtrados, pues por sus características se adhieren a las membranas Millipore.

Obtención y cultivo de poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal.- Se sacrificaron ratones por dislocación cervical y se obtuvieron células de cavidad peritoneal mediante lavado con IMDM, se lavaron por centrifugación y se sembraron 5×10^5 en placas de microcultivo o 4×10^6 en cajas Petri. Después de una hora, se retiró el sobrenadante y se procedió a lavar los pozos o las cajas con medio de cultivo. Las células

adheridas (población enriquecida) se cultivaron en presencia de medio suplementado durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se lavaron los pozos o las cajas con medio (cultivo estabilizado) y se procedió a estimular, en ausencia de suero, a las poblaciones enriquecidas y estabilizadas, con o sin citocinas libres o encapsuladas en liposomas. Después de la estimulación, los pozos o cajas fueron lavados con medio de cultivo, se procedió a colocarles medio suplementado y a incubar las placas durante 2 días más. Transcurrido este tiempo, las células fueron evaluadas con la técnica de detección de la aparición de Fc γ Rs y el medio de cultivo usado para determinar la presencia de nitritos (productos indicadores de la secreción de óxido nítrico).

Cuando fue requerido, para evaluar los cambios morfológicos, se procedió a fijar y preparar las células para microscopía electrónica

Cinética dosis-respuesta a liposomas vacíos en la cavidad peritoneal.- Se inyectaron 300 μ l de medio IMDM o de liposomas neutros vacíos en la cavidad peritoneal de los ratones a ensayar. Transcurridas 2, 16, 24 y 48 horas, grupos de 5 animales se sacrificaron respectivamente y se procedió a obtener las células mediante un lavado de cavidad peritoneal con IMDM. Posteriormente se procedió a enriquecer la población de macrófagos, como se describió anteriormente, y a evaluar su diferenciación funcional (aparición de Fc γ Rs y secreción de óxido nítrico) y morfológica.

Efecto *in vivo* de la estimulación con citocinas encapsuladas en liposomas.- Se inyectaron 600 μ l de liposomas en la cavidad peritoneal de los ratones. Después de 2 horas de estimulación, los animales se sacrificaron y se

procedió a obtener las células mediante un lavado de cavidad peritoneal con IMDM. Se procedió a sembrarlas tanto en placas de cultivo como en cajas Petri para obtener cultivos enriquecidos de macrófagos. Después del lavado, las placas continuaron 2 días en cultivo con medio suplementado, para después ser evaluadas en su producción de óxido nítrico y la aparición de Fc γ Rs. Por otra parte, las células de las cajas fueron lisadas para la obtención de ARN.

Determinación de la aparición de Fc γ Rs mediante la técnica espectrofotométrica con ortofenilendiamina (OPD).- Las células se cubrieron con 100 μ l de eritrocitos de carnero al 2% recubiertos con IgG de conejo, se incubaron durante una hora a 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó 3 veces cada pozo con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría. Finalmente, se colocaron 200 μ l de la solución de OPD. Después de 7 minutos se procedió a evaluar la reacción colorida en un espectrofotómetro para microplacas (Elx-800, BIO-TEK Instruments, INC., USA) a 490 nm.

Determinación de ARN de los diferentes receptores por reacción en policadena con retrotranscriptasa (RT-PCR).- Se obtuvieron entre 5 y 10 X 10⁶ células adherentes de la cavidad peritoneal de ratones y se lisaron en la caja con 1 ml de TRIZOL (Gibco BRL, USA); posteriormente con ayuda de un gendarme y una pipeta se colocaron en tubos eppendorf, se adicionaron 25 μ l de acetato de sodio 2M y 1 ml de fenol saturado a 60°C, homogeneizando al agregar cada reactivo. Se incubó el contenido de cada tubo con 100 ml de mezcla Sevag durante 10 minutos a 4°C, se centrifugó a 14000 rpm durante 5

minutos a 4°C y se obtuvo la fase acuosa. Se adicionaron 12.5 µl de cloruro de sodio 5M y 31.25 µl de isopropanol frío, se permitió la precipitación durante toda la noche a -70°C. El ARN se obtuvo por centrifugación y la pastilla se resuspendió en agua dietilpirocarbonatada para proceder a la cuantificación mediante absorbencia en el espectrofotómetro a 260 nm. Para la retrotranscripción se utilizó 1 µg de ARN en presencia de cloruro de magnesio, dNTPs, oligo dT, inhibidor de ARNasas, retrotranscriptasa y DTT, durante 1 hora a 42°C. Los productos de la reacción fueron utilizados para la reacción en polícadena en presencia de los oligonucleótidos adecuados durante 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1.5 minutos a 55°C y 3 minutos a 72°C; y por último 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

Los oligonucleótidos usados fueron:

- FcyRI sentido.- CTGCAGGAGTGCCATCACGGTGAAAGA.
- FcyRI antisentido.- GGATGTGAAACCAGACAGGAGCTGATGA.

- FcyRII sentido.- GGATGTGAAACCAGACAGGAGCTGATGA.
- FcyRII antisentido.- GCAGCTTCTTCCAGATCAGGAGGA.

Preparación de muestras para microscopía electrónica.- Las células a observar se fijaron en su caja durante una hora en glutaraldehído al 1.5% en solución amortiguadora de cacodilato pH 7.4. Las células fueron desprendidas de las cajas con ayuda de un gendarme de plástico y se colocaron en tubos eppendorf, se lavaron y se colocaron en OsO₄ al 1% en solución de Milloning durante 12 horas a temperatura ambiente. Se les retiró el postfijador y se procedió a la deshidratación con etanol en concentración creciente de 70% al

100% para terminar con propilenoóxido:epon 1:1 y su preinclusión en epon 100% en el tubo cerrado. Después de 24 horas se permitió la evaporación del solvente durante al menos un día. Se procedió a rellenar con epon y se colocaron en estufa a 60°C durante 48 horas para permitir la polimerización. Se realizaron los cortes, se colocaron en rejillas, se contrastaron con citrato de plomo y se procedió a la observación en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM10, Germany).

Evaluación de la producción de óxido nítrico.- La determinación de la concentración de nitritos (productos estables finales del óxido nítrico) en los sobrenadantes de los cultivos, se realizó por la reacción de Griess adaptada a microplacas. Se añadieron 40 µl de reactivo de Griess a 150 µl del sobrenadante del cultivo de macrófagos. Después de esperar 5 min. a temperatura ambiente, se procedió a medir la absorbencia a 540 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Eix-800, BIO-TEK Instruments, INC., USA).

Obtención de oro coloidal.- La formación de oro coloidal se basa en la reducción controlada de una solución de ácido tetracloroáurico. Para obtener partículas de aproximadamente 5 nm de diámetro, se utilizó una modificación del método de Millphordt (Millphordt , 1982) utilizando citrato de sodio y ácido tánico como agentes reductores.

El material se lavó perfectamente con agua nanopura, se hirvieron durante 6 minutos 100 ml de una solución de ácido tetracloroáurico al 1%, se mezclaron 2ml de citrato de sodio al 1% con 0.45 ml de ácido tánico al 1%, se añadió esta mezcla rápidamente a la solución de ácido tetracloroáurico y se agitó por 15 minutos. La solución de oro coloidal se enfrió y guardó en

condiciones estériles. El tamaño y forma de las partículas fue verificado por microscopía electrónica, obteniéndose un diámetro de 5 nm.

Diseño Estadístico

Cada experimento se realizó al menos 2 veces por cuadruplicado. Se realizó un análisis exploratorio de datos para comparar los diferentes tratamientos y los diferentes días en que fueron realizados. El análisis exploratorio se realizó con ayuda del paquete estadístico STATA y la comparación de las medias por día y tratamiento mediante una prueba de Bonferroni en el mismo paquete. Las gráficas mostradas pertenecen al experimento de un mismo día.

RESULTADOS

INDUCCIÓN *in vitro* A LA DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATÓN, POR LIPOSOMAS DE DIFERENTES COMPOSICIONES LIPÍDICAS.

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

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

Los macrófagos se estimularon con 50 U/ml de IFN γ durante 2, 4, 8 y 12 horas, en ausencia de suero fetal de bovino. Transcurrido este tiempo, los cultivos fueron lavados, se les adicionó medio de cultivo suplementado y se incubaron a 37°C con 10% de CO₂. Al término de 48 horas, se procedió a evaluar la presencia de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y la producción de óxido nítrico. Los resultados obtenidos mostraron que en ambos casos, 2 horas de estímulo es tiempo suficiente para que la inducción a la diferenciación se lleve a cabo (Figuras R1A y R1B); cabe aclarar que la literatura señala que el óxido nítrico comienza a secretarse después de 6 horas del estímulo y continúa alrededor de 18 horas más (Donell,1994); y que para que los receptores aparezcan es necesario esperar 2 días más (Flores,1991), ya sea en ausencia o en presencia de la citocina.

FIGURA R1A
DURACIÓN DEL ESTIMULO CON IFN- γ PARA LA
APARICIÓN DE Fc γ Rs

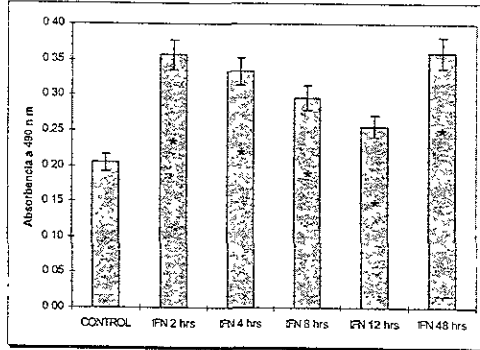
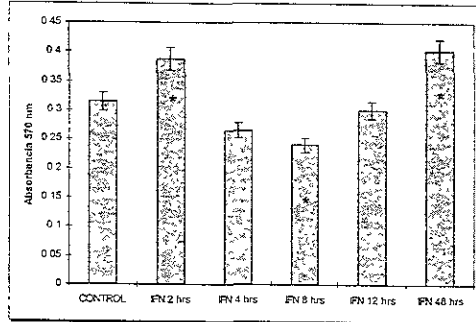


FIGURA R1B
DURACIÓN DEL ESTIMULO CON IFN- γ PARA LA
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO



Poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD-1, fueron estimuladas con IFN γ (50 μ g/ml) durante 2, 4, 8 y 12 horas. Después de la incubación, los cultivos se lavaron y se incubaron en presencia de medio suplementado, por 2 días más. Finalmente, se evaluó la aparición de Fc γ Rs (Fig R1A) y la secreción de óxido nítrico (Fig R1B).

Control, células cultivadas 48 horas en presencia de medio suplementado

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

* significativamente diferente al control negativo

ESTE TEST NO DEBE
 REALIZARSE EN LA
 ESCUELA DE LA
 UNIVERSIDAD

Liposomas neutros o negativos como vehículos para transportar IFN γ para estimular in vitro a macrófagos peritoneales de ratones CD-1.

Con el objeto de determinar la concentración necesaria y el tipo de liposoma adecuado para acarrear IFN γ , se obtuvieron cultivos enriquecidos de macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratones CD-1 y se estimularon durante 2 horas con IFN γ libre o encapsulado en liposomas neutros o negativos. Transcurridos 2 días, se evaluó la aparición de Fc γ Rs y la secreción de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos indican que los liposomas neutros conteniendo IFN γ en concentración ya sea análoga a la libre (50 U/ml), o 10 veces menor, inducen la aparición de Fc γ Rs (Figura R2A) pero no la producción de óxido nítrico (Figura R2B). Es importante mencionar que utilizando una dosis menor de IFN γ encapsulado en liposomas fue posible obtener una mejor respuesta comparada con la citocina libre (Figura R2A), por lo que esta concentración se usó en los ensayos posteriores.

FIGURA R2A
APARICIÓN DE $Fc\gamma$ Rs ESTIMULADOS
CON LIPOSOMAS NEUTROS QUE CONTIENEN $IFN\gamma$

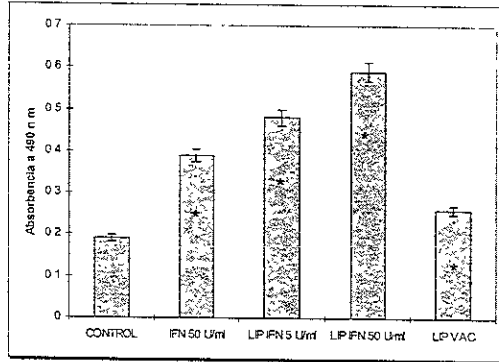
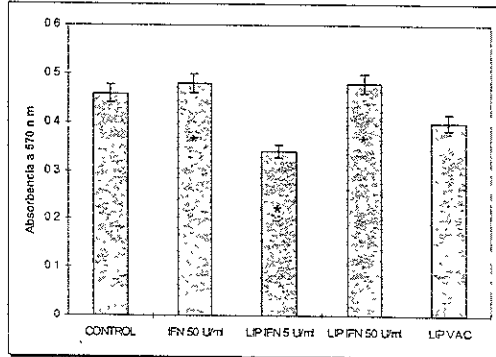


FIGURA R2B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO INDUCIDA POR
LIPOSOMAS NEUTROS QUE CONTIENEN $IFN\gamma$.



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD-1 para evaluar la expresión de $Fc\gamma$ Rs (Fig. R2A) y la secreción de óxido nítrico (Fig. R2B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a $IFN\gamma$ (50 U/ml) (control positivo) y a liposomas neutros vacíos (LIP VAC) o con $IFN\gamma$ (5 y 50 U/ml, respectivamente) por un período de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* significativamente diferentes al control negativo.

Por último, el IFN γ encapsulado en liposomas negativos indujo una respuesta ligeramente superior, aunque sin diferencia significativa con respecto al control, en la inducción a la aparición de Fc γ Rs (Figura R3A) y en el caso de la liberación de óxido nítrico se obtuvo una respuesta similar a la anterior usando los liposomas negativos vacíos (Figura R3B).

FIGURA R3A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS POR LIPOSOMAS NEGATIVOS
CONTENIENDO IFN γ .

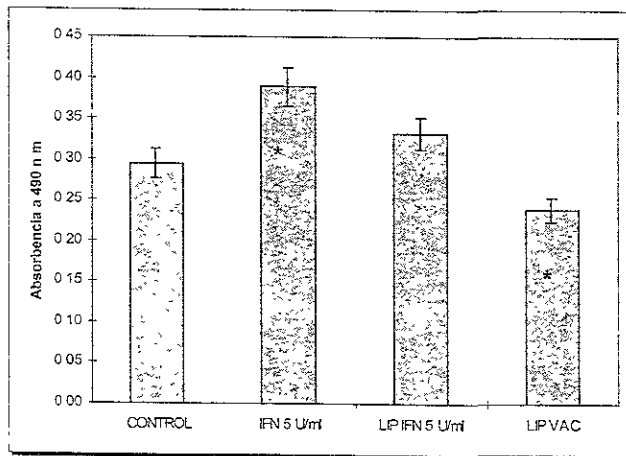
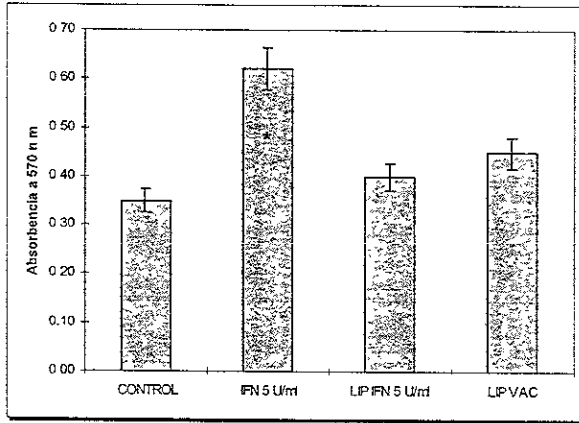


FIGURA R3B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO IFN γ .



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD-1 para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig R3A) y la secreción de óxido nítrico (Fig R3 B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a IFN γ (5 U/ml) (control positivo) y a liposomas negativos vacíos (LIP VAC) o 5 U/ml de IFN γ (LIP IFN 5 U/ml) por un período de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* significativamente diferentes al control negativo.

Liposomas neutros o negativos como vehículos para transportar IL-1 β para estimular, in vitro, a macrófagos peritoneales de ratones CD-1.

Análogamente a los experimentos realizados con IFN γ , se obtuvieron cultivos enriquecidos de macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratones CD-1 y se estimularon durante 2 horas con IL-1 β libre o encapsulada en liposomas neutros o negativos. Transcurridos 2 días se evaluó la aparición de Fc γ Rs y la secreción de óxido nítrico.

En el caso de los liposomas neutros fue necesario reducir 10 veces la dosis a encapsular de la citocina, debido a que la dosis usual (10 ng/ml), produce un efecto adverso impidiendo la formación de estos acarreadores. Los resultados muestran que usando liposomas neutros para inducir la aparición de los $Fc\gamma Rs$, la presencia de los liposomas vacíos es suficiente para obtener respuesta (Figura R4A); sin embargo, en presencia de $IL-1\beta$ en ningún caso se detecta la presencia de óxido nítrico en el medio de cultivo (Figura R4B). Al utilizar liposomas negativos que contienen $IL-1\beta$ encapsulada, los resultados indican que con un décimo de la concentración de $IL-1\beta$ que se usa normalmente, se obtiene un efecto inductor de la aparición de $Fc\gamma Rs$, superior en aproximadamente 20% a la del control positivo (citocina libre) (Figura R5A); mientras que aunque aparentemente existe un 30% de aumento en la producción de óxido nítrico en presencia de liposomas negativos vacíos, esta producción parece no ser significativa si la comparamos con los valores promedio obtenidos en los controles de este tipo de evaluación, que en todos los casos son de 200 a 300% superiores (Figura R5B).

FIGURA R4A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS POR LIPOSOMAS NEUTROS
QUE CONTIENEN IL-1 β .

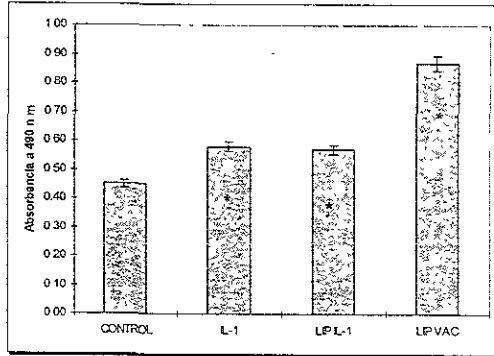
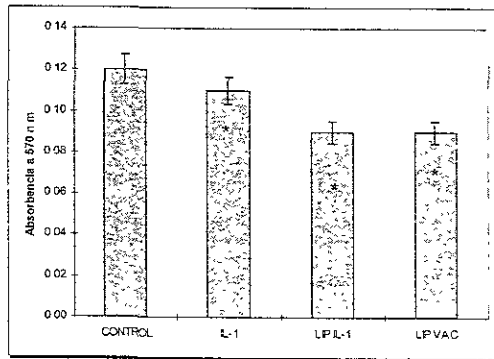


FIGURA R4B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS NEUTROS QUE CONTIENEN IL-1 β .



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD-1 para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig. R4A) y la secreción de óxido nítrico (Fig. R4B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 10 ng/ml de IL-1 β (IL-1) (control positivo) y a liposomas neutros vacíos (LIP VAC) o con 1 ng/ml de IL-1 β (LIP IL-1), por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* significativamente diferentes al control negativo

FIGURA R5A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS POR LIPOSOMAS NEGATIVOS
CONTENIENDO IL-1 β .

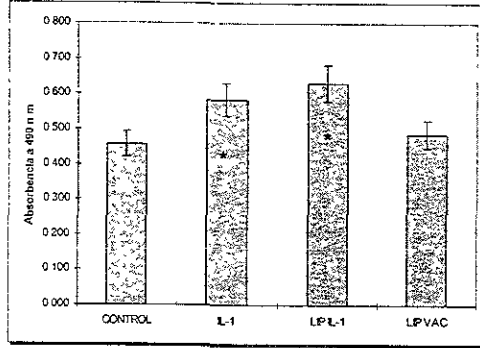
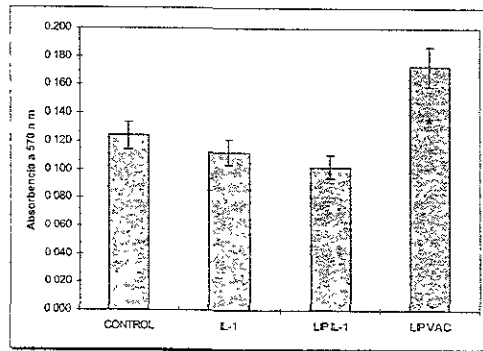


FIGURA R5B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO IL-1 β .



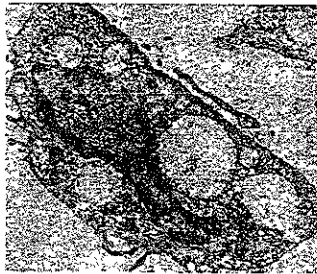
Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD-1 para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig. R5A) y la secreción de óxido nítrico (Fig. R5B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 1 ng/ml de IL-1 β (IL-1) (control positivo) y a liposomas negativos vacíos (LIP VAC) o con 1 ng/ml de IL-1 β (LIP IL-1), por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* significativamente diferentes al control negativo

Comparación morfológica de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones CD-1 estimulados *in vitro* con liposomas

Con la finalidad de evaluar una posible diferenciación morfológica, se procedió a procesar muestras de macrófagos residentes estimulados con citocina libre o encapsulada en liposomas, para microscopía electrónica. Las observaciones indican que la presencia de estos acarreadores no provoca cambios morfológicos en estas células (Figura RA).

**FIGURA RA
LOS MACRÓFAGOS NO CAMBIAN SU MORFOLOGÍA AL SER
ESTIMULADOS CON LIPOSOMAS.**



(a)



(b)

Se estimularon poblaciones enriquecidas de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones CD-1 con 50 U/ml de IFN γ libre o encapsulado en liposomas durante 2 horas. Las células fueron lavadas y cultivadas por 2 días más. Se fijaron y procesaron para ser observadas con microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM10. Es importante señalar que los liposomas vacíos no pueden distinguirse de las vacuolas de estas células. (a) Macrófago estimulado con IFN γ libre (6,500X), (b) Macrófagos estimulado con liposomas conteniendo IFN γ (12,500X).

INDUCCIÓN *in vivo* A LA DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES CD-1.

Efecto de la inyección de liposomas vacíos en la cavidad peritoneal de ratones CD-1.

Una vez determinadas las condiciones necesarias para la estimulación *in vitro*, se procedió a realizar los primeros experimentos *in vivo*. Con la finalidad de saber si los liposomas pudieran causar un efecto irritante, se inyectaron en la cavidad peritoneal 2 grupos de 20 ratones machos CD-1, ya sea con 300 μ l de liposomas neutros vacíos, o su correspondiente control sólo con 300 μ l de medio IMDM. Se sacrificaron 5 ratones de cada grupo a las 2, 16, 24 y 28 horas. Se procedió a obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos residentes para evaluar la aparición de Fc γ Rs y la secreción de óxido nítrico. Además, se determinó el número promedio de células obtenido de cada grupo de ratones. Los resultados indican que no existe cambio en el número de células obtenidas en ningún grupo (Cuadro 1) y que para la aparición de Fc γ Rs se encuentran cambios con respecto al control de tiempo 0, a las 2 y 16 horas en ambos grupos. A las 2 horas se pudo detectar un aumento de 400% y 600% en ausencia y en presencia de liposomas respectivamente con respecto al control del tiempo cero, y a las 16 horas un aumento de aproximadamente 300% en ambos casos; por lo que solamente a las 2 horas este aumento es mayor que el de su propio control (Figura R6A). Por otra parte, en la evaluación de la liberación de óxido nítrico, se observa en general una disminución de 25 a 75% en comparación con el control de tiempo 0; sin embargo, en los tiempos de 2 y de 16 horas existen

diferencias de aproximadamente 60% con respecto a sus propios controles (inyección sin liposomas) e incluso en el tiempo 16 horas la liberación de óxido nítrico supera en un 10% a la de las células del tiempo 0 (sin estimulación alguna) (Figura R6B).

CUADRO 1
NÚMERO DE CÉLULAS OBTENIDAS POR GRUPO

TIEMPO (HORAS)	NÚMERO DE CÉLULAS X 10 ⁶
Sin inocular (tiempo 0)	6.6 +/-0
2 (medio de cultivo)	5.5 +/-1.5
2 (liposomas)	6 +/-1
16 (medio de cultivo)	6 +/-1
16 (liposomas)	6 +/-1
24 (medio de cultivo)	6.6 +/-0
24 (liposomas)	6.6 +/-0
48 (medio de cultivo)	6.3 +/-1.4
48 (liposomas)	6.25 +/-1.35

Se inyectaron grupos de ratones CD-1 con medio de cultivo o con liposomas vacíos y se sacrificaron en los tiempos mencionados. Se obtuvieron las células peritoneales de cada ratón, se contaron y se promediaron por grupo.

FIGURA R6A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS POR LIPOSOMAS
VACÍOS APLICADOS *in vivo*

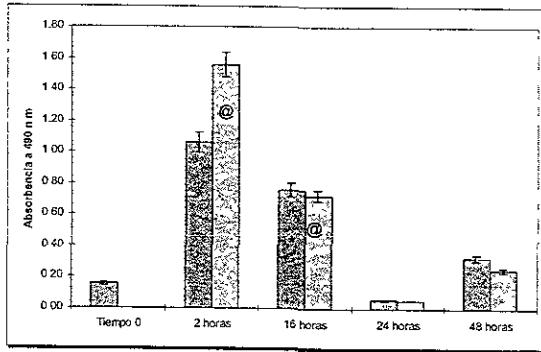
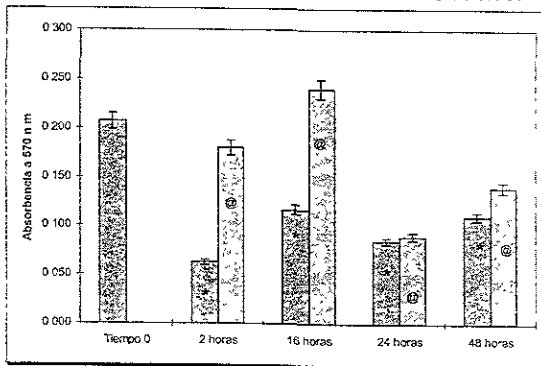


FIGURA R6B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS VACÍOS APLICADOS *in vivo*.



Se inyectaron grupos de ratones CD-1 con medio de cultivo o con liposomas vacíos y se sacrificaron en los tiempos mencionados. Se obtuvieron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal y se evaluó la expresión de Fc γ Rs (Fig R6A) y la secreción de óxido nítrico (Fig R6B).

* Significativamente diferentes al control negativo

@ Significativamente diferente a su propio control

Uso de liposomas negativos encapsulando IFN γ e IL-1 β para la estimulación de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal in vivo.

Con el objeto de evaluar el efecto de las citocinas encapsuladas en liposomas sobre los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal *in vivo*, se inyectaron en la cavidad peritoneal de cada ratón 600 μ l de medio IMDM con citocinas libres o encapsuladas en liposomas negativos, a grupos de 5 ratones para cada condición. Después de 2 horas de estimulación, los animales fueron sacrificados para obtener las células peritoneales y proceder a obtener cultivos enriquecidos de macrófagos residentes. Después de 2 días, las células se examinaron para evaluar la aparición de receptores Fc γ Rs y la secreción de óxido nítrico.

Los resultados indicaron que en estas condiciones la IL-1 β , ya sea libre o encapsulada en liposomas, no ejerce efecto alguno en la aparición de Fc γ Rs y que el IFN γ encapsulado es el único que favorece la aparición de estos receptores aumentando su expresión más del 100% con respecto al control. Es importante mencionar que estos liposomas negativos vacíos también producen un incremento de aproximadamente 25% en la expresión de los Fc γ Rs (Figura R7A). Por otro lado, en lo que se refiere a la secreción de óxido nítrico no se obtuvo estimulación en ningún caso; sin embargo, hubo un decremento de aproximadamente 50% con la presencia de IL-1 β libre o encapsulada (Figura R7B)

FIGURA R7A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS POR LIPOSOMAS
NEGATIVOS CON IL-1 β E IFN γ APLICADOS *in vivo*

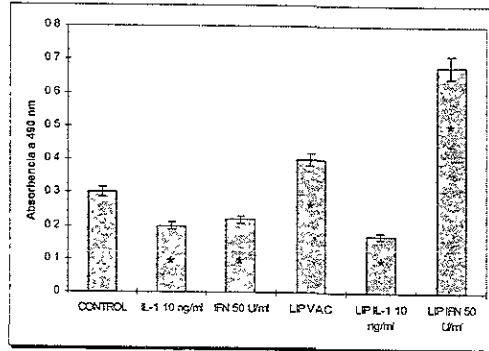
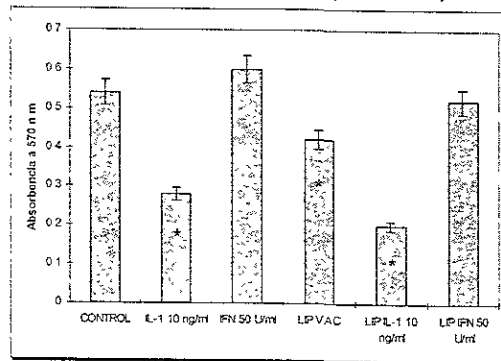


FIGURA R7B
DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO
DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN *in vivo* DE LIPOSOMAS
NEGATIVOS CON IL-1 β E IFN- γ



Se inyectaron grupos de ratones CD-1 con IL-1 (10 ng/ml), IFN- γ (50 U/ml), con liposomas negativos vacíos (LIP VAC) y con IL-1 (10ng/ml) (LIP IL1) o IFN- γ (50 u/ML) (lip ifn), además medio de cultivo como control (CONTROL) Se procedió a sacrificarlos y obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal que fueron cultivadas en medio suplementado por 2 días. Finalmente se procedió a la evaluación de la aparición de Fc γ Rs (Fig 7A) y la secreción de óxido nítrico (Fig 7B)

* Significativamente diferentes al control.

Al utilizar liposomas neutros encapsulando $\text{IFN}\gamma$, se obtuvo un aumento mayor al 100% en la inducción a la aparición de $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ utilizando liposomas conteniendo 50 U/ml (Figura R8A) y no hubo respuesta en la secreción de óxido nítrico (Figura R8B). Cabe señalar que en presencia de liposomas vacíos se observó un decremento de aproximadamente 30% en la secreción de óxido nítrico (Figura R8B).

FIGURA R8A
APARICIÓN DE $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ INDUCIDOS POR LA APLICACIÓN DE
LIPOSOMAS NEUTROS CON $\text{IFN}\gamma$ *in vivo*.

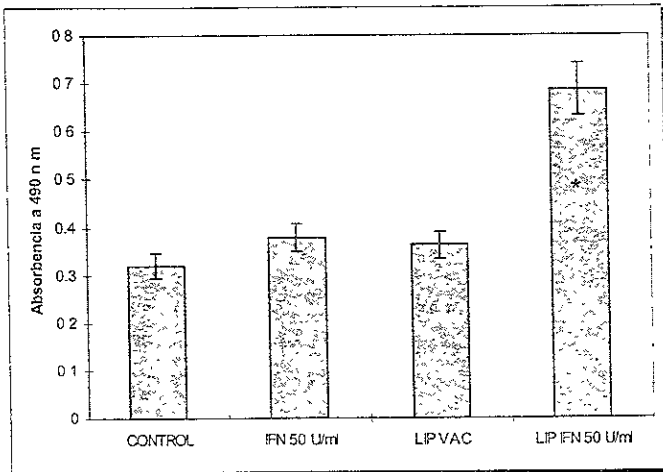
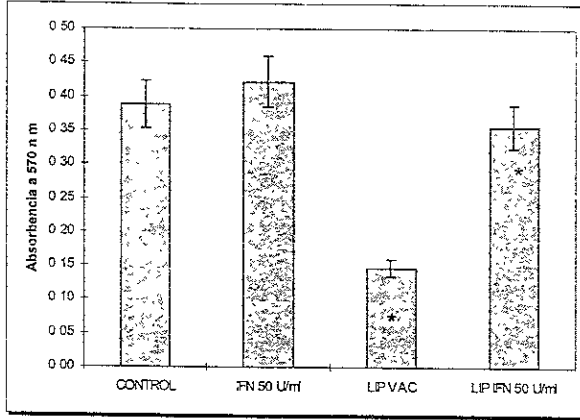


FIGURA R8B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS NEUTROS CON IFN γ *in vivo*.



Se inyectaron grupos de ratones CD-1 con IFN- γ (50 U/ml), liposomas negativos neutros vacíos (LIP VAC) y con IFN- γ (50 U/ml), así como medio de cultivo como control (CONTROL) por un período de 2 horas. Se procedió a sacrificarlos y obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal que fueron cultivadas en medio suplementado por 2 días. Transcurrido este tiempo se procedió a su evaluación para la expresión de Fc γ Rs (Fig R8A) y la secreción de óxido nítrico (Fig R8B).

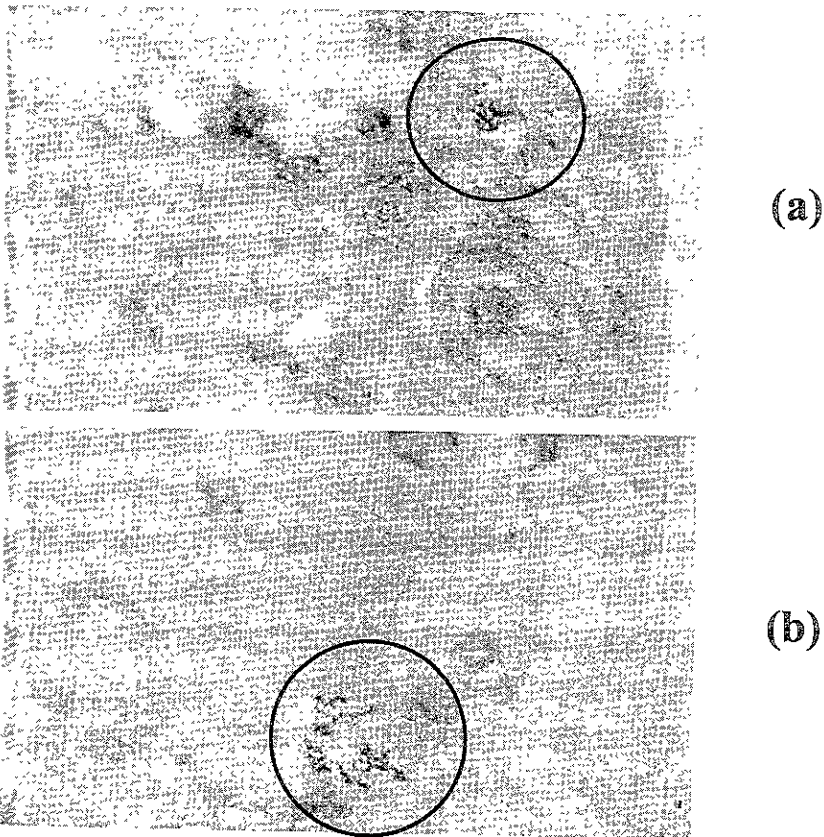
* Significativamente diferentes al control

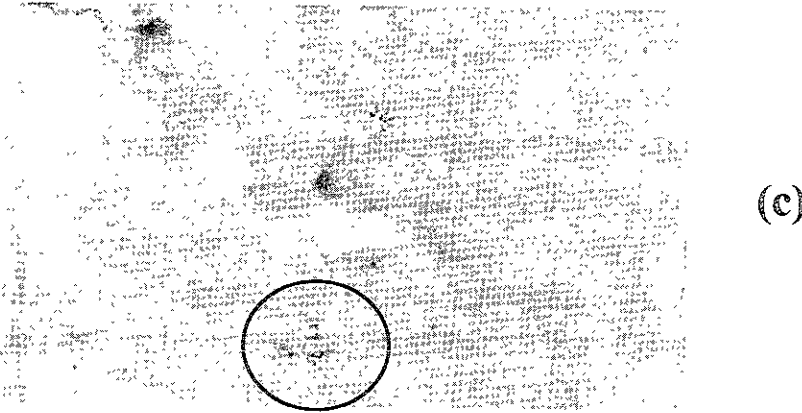
ESTUDIOS DE INTERNALIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS CON LOS MACRÓFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES CD-1.

Con el objeto de seguir el camino de los liposomas y proponer su modo de acción, se prepararon liposomas de diferentes cargas eléctricas conteniendo partículas de oro coloidal, para poder analizar las partículas mediante el uso del microscopio electrónico. La observación cuidadosa de las preparaciones, indica que los liposomas pueden adherirse a la membrana plasmática y liberar su contenido en el interior de las células, además pueden ser internalizados

mediante vacuolas fagocíticas para posteriormente liberar su contenido dentro de las células. Asimismo, fue posible observar que al acercarse a los macrófagos los liposomas pueden abrirse; sin embargo, las partículas de oro pueden observarse adheridas entre sí a manera de un collar (Figura RB).

FIGURA RB
INTERACCIÓN DE LOS LIPOSOMAS CON LOS MACRÓFAGOS





Se estimularon poblaciones enriquecidas de macrófagos peritoneales de ratón con liposomas *conteniendo partículas de oro coloidal de aproximadamente 5nm de diámetro durante 2 horas.* Se procedió a fijar las células y procesarlas para su observación en un microscopio electrónico Zeiss EM10. Los liposomas pueden entrar completos a las células (a) (25,000X), fundirse a la membrana (b) (31,500X) o liberar su contenido dentro de ellas (c) (31,500X)

EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN A LA DIFERENCIACIÓN MEDIANTE EL USO DE CITOCINAS ENCAPSULADAS EN LIPOSOMAS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATONES SINGÉNICOS.

Efecto de la estimulación con liposomas neutros encapsulando $IFN\gamma$ e $IL-1\beta$ a macrófagos peritoneales de ratones singénicos.

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

Al utilizar liposomas neutros encapsulando $IFN\gamma$ para la inducción a la aparición de $Fc\gamma Rs$, únicamente los liposomas conteniendo 50 U/ml fueron capaces de causar una ligera respuesta positiva de aproximadamente 15% más con respecto al control. Por su parte, el $IFN\gamma$ libre indujo un aumento mayor (casi de 100%) de la aparición de $Fc\gamma Rs$ en presencia de 5U/ml (Fig. R9A). En el caso de la secreción de óxido nítrico solo se pudo observar un aumento de 10% en presencia liposomas encapsulando cualquiera de las 2 concentraciones de $IFN\gamma$ (Figura R9B).

FIGURA R9A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON
LIPOSOMAS NEUTROS CONTENIENDO IFN γ

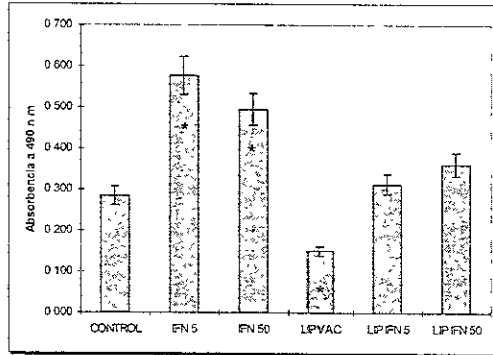
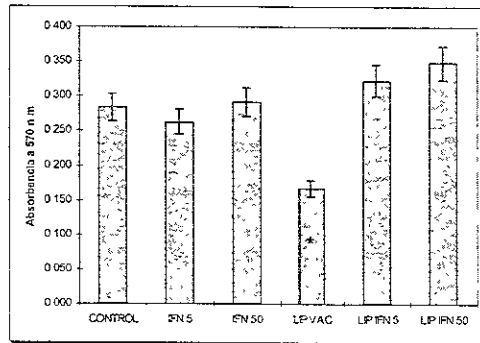


FIGURA R9B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS NEUTROS CONTENIENDO IFN γ .



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig R9A) y la secreción de óxido nítrico (Fig R9B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 5 y 50 U/ml de IFN- γ (IFN 5 Y 50) (controles positivos) y a liposomas neutros vacíos (LIP VAC) o con 5 y 50 U/ml de IFN- γ (LIP IFN 5 Y 50) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo

Por otro lado, al utilizar IL-1 β para estimular la diferenciación en las células peritoneales, no fue posible encapsularla en liposomas neutros en concentración de 10 ng/ml, ya que su presencia no permite la formación del cuerpo lipídico. Al utilizar liposomas conteniendo 1 ng/ml de esta citocina para inducir tanto la aparición de Fc γ Rs como la secreción de óxido nítrico se obtuvo una respuesta mínima similar a la de la citocina libre a la misma concentración (Figuras R10A y R10B).

FIGURA R10A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON
LIPOSOMAS NEUTROS CONTENIENDO IL-1 β

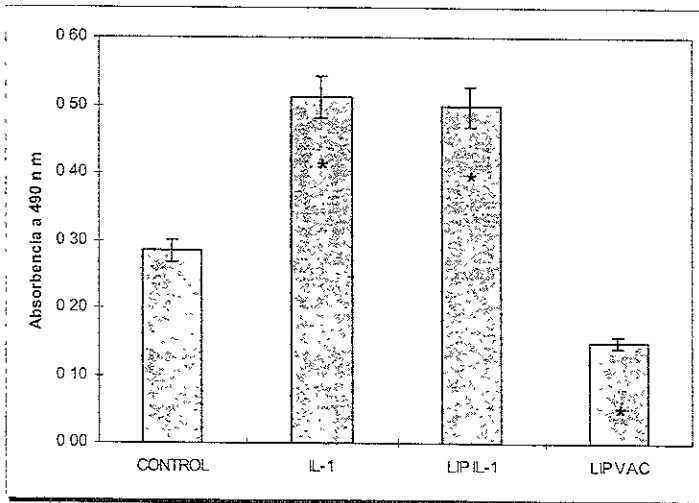
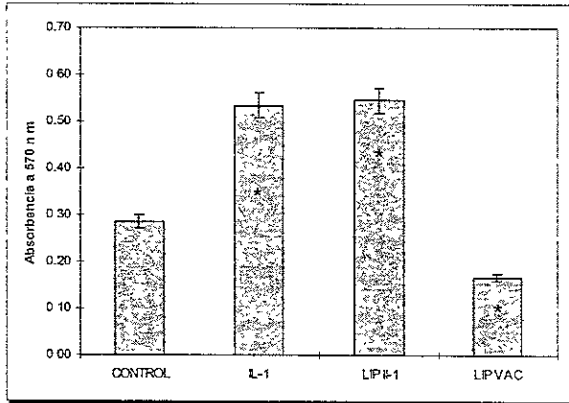


FIGURA R10B
 SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
 LIPOSOMAS NEUTROS CONTENIENDO IL-1 β



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones FI (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de $Fe \gamma Rs$ (Fig. R10A) y la secreción de óxido nítrico (Fig. R10B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 1 ng/ml de IL-1 β (IL-1) (control positivo) y a liposomas neutros vacíos (LIP VAC) o con 1 ng/ml de IL-1 β (LIP IL-1) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo

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

Al utilizar 5 o 50 U/ml de $IFN\gamma$ libre o encapsulado en liposomas negativos para inducir la diferenciación de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos, los resultados indicaron que tanto la citocina libre (ambas concentraciones) como los liposomas con 5 U/ml produjeron una

respuesta positiva similar (un aumento en la expresión de alrededor de 60% en comparación al control) en la inducción a la aparición de $Fc\gamma Rs$; por su parte, los liposomas con 50 U/ml producen un aumento en la expresión de receptores superior al 100% con respecto al control. Es importante señalar que los liposomas negativos vacíos producen un aumento en la expresión de $Fc\gamma Rs$ de aproximadamente 30% (Figura R11A). En cuanto a la liberación de óxido nítrico, ésta fue un 30% mayor con respecto a su control cuando se utilizaron liposomas con 5 U/ml de $IFN\gamma$ (Figura R11B).

FIGURA R11A
APARICIÓN DE $Fc\gamma Rs$ INDUCIDOS CON
LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO $IFN\gamma$

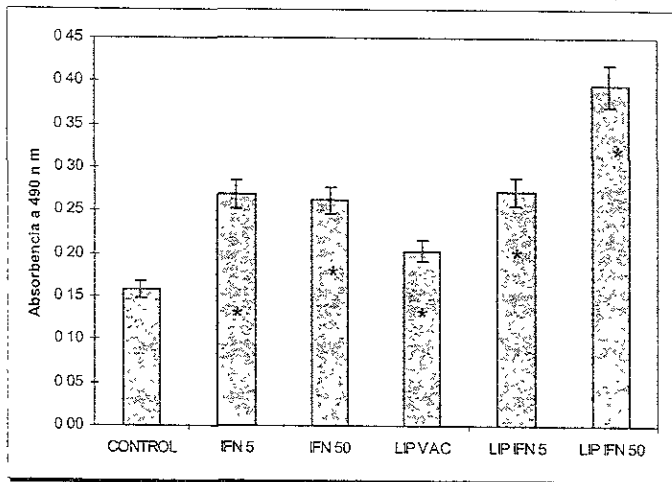
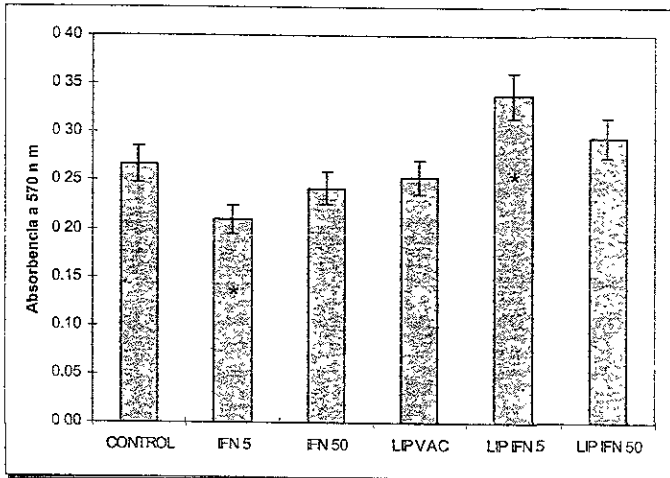


FIGURA R11B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO IFN γ .



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig. R11A) y la secreción de óxido nítrico (Fig. R11B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 5 y 50 U/ml de IFN- γ (IFN 5 y 50) (controles positivos) y a liposomas neutros vacíos (LIP VAC) o con 5 y 50 U/ml de IFN- γ (LIP IFN 5 y 50) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo

Por otro lado, al utilizar en ensayos similares IL-1 β libre o asociada a liposomas negativos, los resultados mostraron que para la inducción a la aparición de Fc γ Rs ambas concentraciones de citocina libre tienen un efecto positivo similar (aproximadamente un 70% de aumento con respecto al control); además, que los liposomas vacíos y con 10 ng/ml inducen un ligero

incremento (aproximadamente 35%) y que los liposomas negativos con 1 ng/ml de IL-1 β producen un fuerte efecto inductor (aproximadamente 150% más) comparado con su propio control (liposomas vacíos) y el del experimento (sin tratamiento alguno) (Figura R12A). En el caso de la liberación de óxido nítrico, los resultados mostraron que la administración de liposomas con 1 ng/ml de IL-1 β produjo una reducción de la liberación de aproximadamente 40%, mientras que el uso de liposomas con 10 ng/ml aumentó la secreción en más del 50% (Figura R12B).

FIGURA R12A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON
LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO IL-1 β

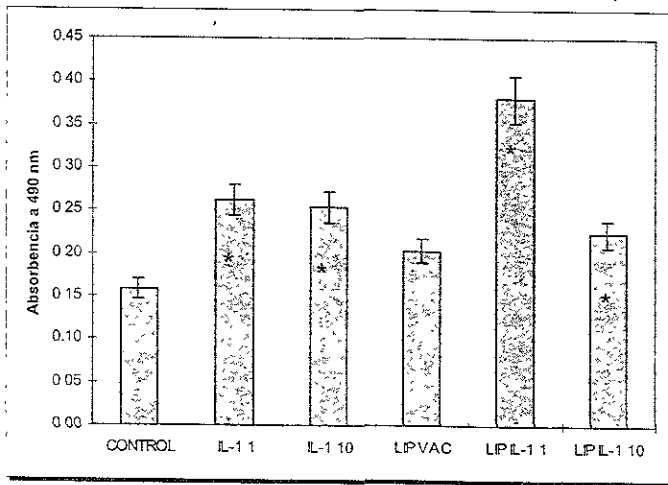
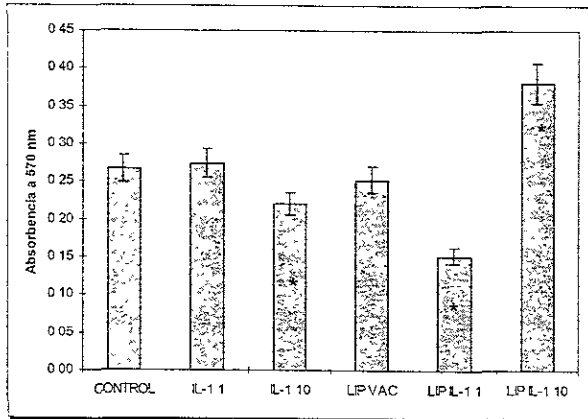


FIGURA R12B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS NEGATIVOS CONTENIENDO IL-1 β



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de $Fc\gamma$ Rs (Fig. R12A) y la secreción de óxido nítrico (Fig. R12B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 1 y 10 ng/ml de IL-1 β (IL-1 1 y 10) (controles positivos) y a liposomas negativos vacíos (LIP VAC) o con 1 y 10 ng/ml de IL-1 β (LIP IL-1 1 Y 10) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo

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

Al utilizar liposomas positivos para acarrear $IFN\gamma$, los experimentos indicaron que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos tanto para la inducción de $Fc\gamma$ Rs como para la secreción de óxido nítrico, con respecto al efecto causado por la citocina libre (Figuras R13A y R13B).

Los resultados obtenidos para la inducción con IL-1 β indicaron que sólo la citocina libre produjo un incremento de aproximadamente 50% en la aparición de Fc γ Rs (Figura R14A) y que para la secreción de óxido nítrico únicamente se obtiene un 15% más en presencia de 10 ng/ml de IL-1 β ya sea libre o encapsulada (Figura R14B).

FIGURA R13A
APARICIÓN DE Fc γ Rs INDUCIDOS CON
LIPOSOMAS POSITIVOS CONTENIENDO IFN γ

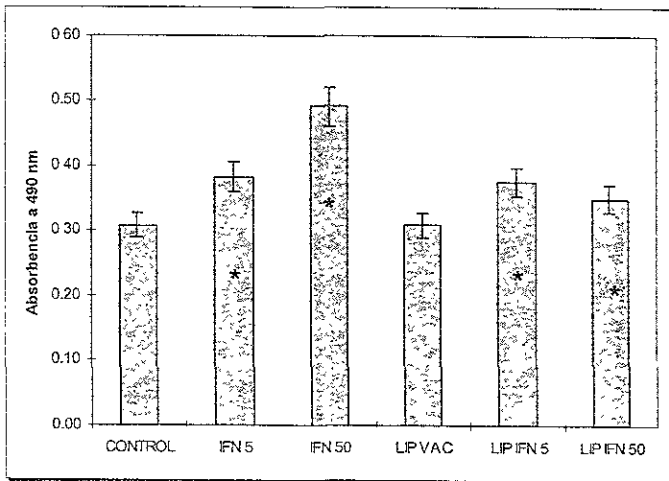
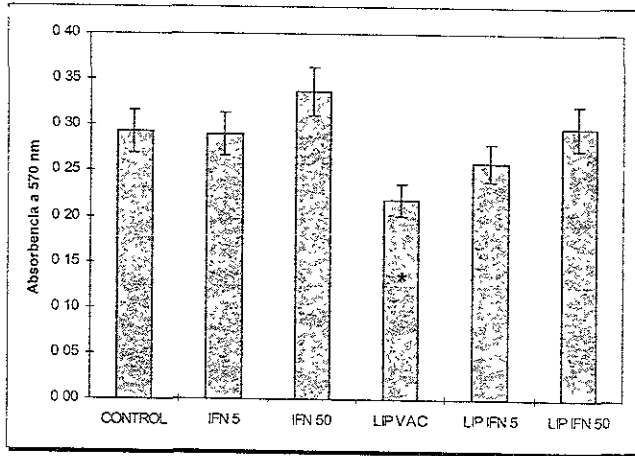


FIGURA R13B
SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
LIPOSOMAS POSITIVOS CONTENIENDO IFN γ .



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig R13A) y la secreción de óxido nítrico (Fig R13B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 5 y 50 U/ml de IFN- γ (IFN 5 Y 50) (controles positivos) y a liposomas positivos vacíos (LIP VAC) o con 5 y 50 U/ml de IFN- γ (LIP IFN 5 Y 50) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo

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

Con el objeto de evaluar el efecto *in vivo* del IFN γ encapsulado en liposomas sobre los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos, a grupos de 5 ratones se les inyectaron en la cavidad peritoneal 600 μ l de medio IMDM con citocina libre o encapsulada en liposomas negativos.

Después de 2 horas de estimulación, los animales fueron sacrificados para obtener las células peritoneales y proceder a obtener cultivos enriquecidos de macrófagos residentes. Dos días después, las células fueron evaluadas para la aparición de $Fc\gamma Rs$ y la secreción de óxido nítrico. Los resultados indicaron que en estas condiciones, al igual que para ratones de cepa abierta, el $IFN\gamma$ encapsulado favoreció fuertemente la aparición de estos receptores, induciendo un aumento en la expresión superior al 120%. Es importante mencionar que los liposomas vacíos también producen un incremento en la expresión de $Fc\gamma Rs$ de aproximadamente 65% (Figura R14A). Por otro lado, en lo que se refiere a la secreción de óxido nítrico no se obtuvo respuesta positiva en ningún caso (Figura R14B).

FIGURA R14A
APARICIÓN DE $Fc\gamma Rs$ INDUCIDOS CON
LIPOSOMAS POSITIVOS CONTENIENDO $IL-1\beta$

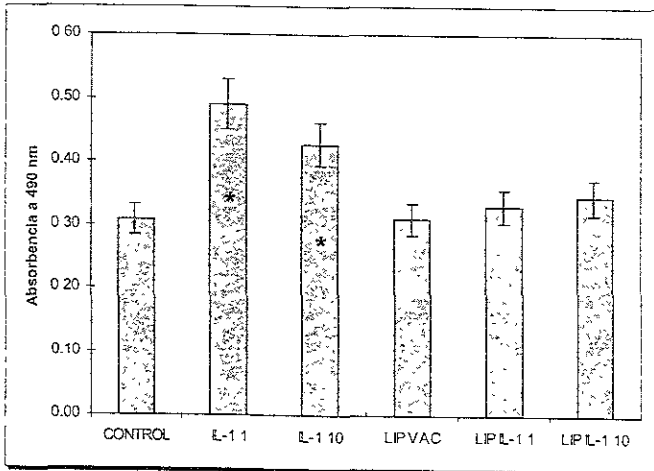
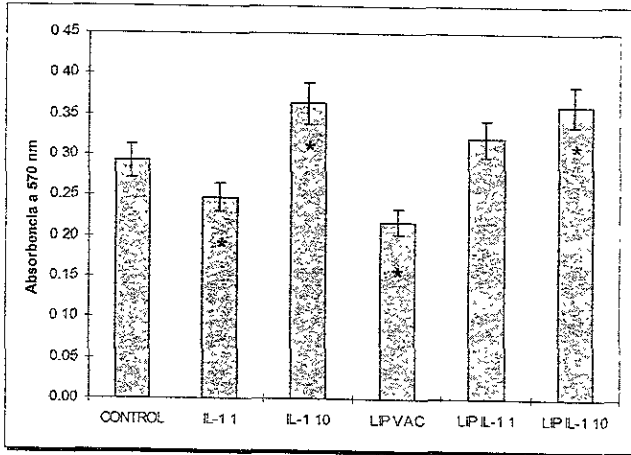


FIGURA R14B
 SECRECIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ESTIMULADA POR
 LIPOSOMAS POSITIVOS CONTENIENDO IL-1 β



Se cultivaron poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones F1 (Black C57 X BALB C), para evaluar la expresión de Fc γ Rs (Fig R14A) y la secreción de óxido nítrico (Fig R14B). Las células fueron expuestas a medio de cultivo (CONTROL), a 1 y 10 ng/ml de IL-1 β (IL-1 1 y 10) (controles positivos) y a liposomas positivos vacíos (LIP VAC) o con 1 y 10 ng/ml de IL-1 β (LIP IL-1 1 y 10) por un periodo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 2 días más en presencia de medio suplementado.

* Significativamente diferentes al control negativo

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

Para determinar el tipo de Fc γ Rs inducidos *in vivo*, se obtuvo ARN de 8×10^6 células de cultivos enriquecidos obtenidos después de 2 horas de

estimulación con o sin liposomas. Se procedió a analizar el ARN mediante la técnica de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los 2 tipos principales de Fc γ Rs de ratón, Fc γ RI y Fc γ RII. Este estudio se realizó con una alícuota de las células obtenidas para el experimento anterior, de esta forma, ambos experimentos se complementan ya que por un lado se está detectando el ARN mensajero producido como respuesta al estímulo y por el otro (experimento anterior), al sembrar las células y esperar 2 días más se detectó la expresión de los Fc γ Rs (Figuras R15A y R15B).

FIGURA R15A

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

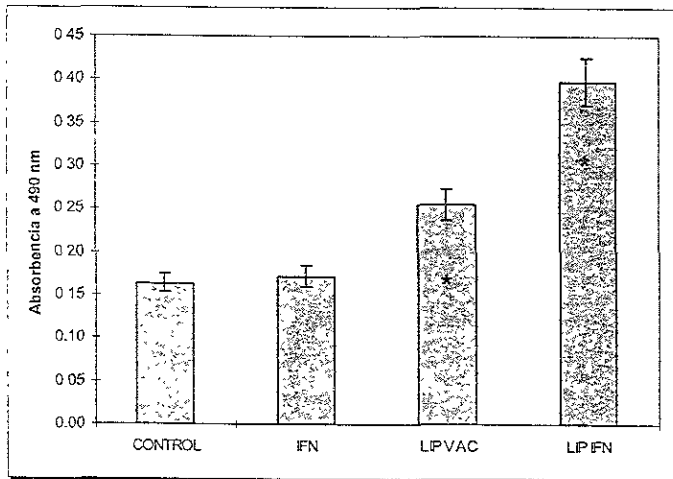
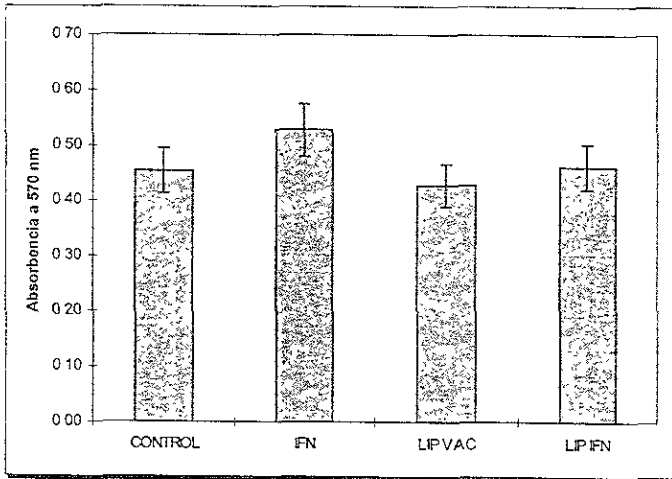


FIGURA R15B
DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO
DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN *in vivo* DE LIPOSOMAS
NEGATIVOS CON IFN γ .

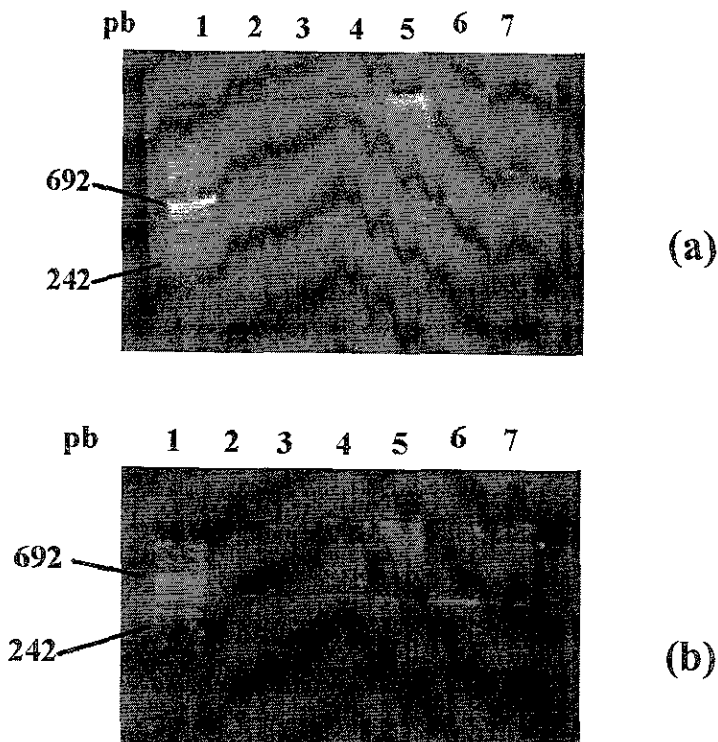


Se inyectaron grupos de ratones F1 (Black C57 X BALB C) con 600 μ l IFN- γ (50 U/ml), liposomas negativos vacíos (LIP VAC) y con IFN γ (50 U/ml) (LIP IFN); además medio de cultivo como control (CONTROL). Después de 2 horas se procedió a sacrificarlos y obtener poblaciones enriquecidas de macrófagos de la cavidad peritoneal que fueron cultivadas en medio suplementado por 2 días. Finalmente se procedió a la evaluación de la aparición de Fc γ Rs (Fig. R15A) y la secreción de óxido nítrico (Fig. R15B).

* Significativamente diferentes al control negativo

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

FIGURA RC
DETERMINACIÓN DE LA APARICIÓN DE Fc γ Rs DESPUÉS DEL
ESTÍMULO CON LIPOSOMAS, MEDIANTE LA
TÉCNICA DE RT-PCR



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

DISCUSIÓN

En investigaciones previas realizadas por nuestro grupo de trabajo (Flores, 1997; Mendoza, 1993), se ha demostrado que citocinas como IL-6, IL1 β e INF γ son fuertes activadoras de los macrófagos *in vitro*, induciendo la aparición de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas; no obstante; poco se sabe acerca del efecto causado por estas moléculas *in vivo*, debido a que al ser administradas en concentraciones óptimas por diversas vías pueden inactivarse rápidamente y producir efectos adversos variados de leves a graves (Duserre et al., 1995) En el presente trabajo se estableció como objetivo el encontrar las condiciones adecuadas para estimular con citocinas a los macrófagos peritoneales *in vivo* mediante el uso de liposomas que son conocidos como acarreadores, concentradores y protectores (Van Roojen y Sanders, 1994).

Es conocido que la presencia de suero en el medio de cultivo aglutina a los liposomas, lo que no les permite una adecuada interacción con sus células blanco. Por lo anterior y debido a que los primeros resultados indican que 2 horas de estimulación con las citocinas son suficientes para producir un efecto inductor de la aparición de Fc γ Rs y de la liberación de óxido nítrico y a que no es necesaria la permanencia de éstas durante todo el tiempo de cultivo; los ensayos de estimulación se llevaron a cabo en ausencia de suero solamente por de 2 horas; en consecuencia, es necesario tomar en cuenta que el hecho de que

la respuesta *in vitro* se vea disminuída tanto para la aparición de Fc γ Rs como para la liberación de óxido nítrico después de este tiempo, puede deberse a los efectos de la ausencia del suero en el cultivo.

Es importante mencionar que nuestros experimentos *in vitro* fueron evaluados 2 días después, ya que resultados previos indican que una vez presentado el estímulo, el tiempo necesario para la expresión del Fc γ R en la membrana del macrófago es de 48 horas (Flores, 1991) y que existen informes de que la secreción de óxido nítrico puede detectarse entre 6 y 24 horas después de la exposición a diferentes estímulos, quedando sus productos estables finales en el medio de cultivo hasta su evaluación (Doneil, 1994).

En el presente trabajo se obtuvo una excelente respuesta en los ensayos de inducción de células peritoneales de ratones CD1 *in vitro* con liposomas neutros acarreando IFN γ , tanto para la aparición de Fc γ Rs como para la liberación de óxido nítrico; por otro lado, la administración de la citocina en liposomas negativos *in vitro*, produjo un ligero efecto positivo únicamente en la expresión de Fc γ Rs. En este sentido, es importante mencionar que el IFN- γ presenta segmentos específicos que se caracterizan por la presencia de residuos repetitivos de arginina y lisina, los cuales son esenciales para que esta citocina sea funcional (Zambrano, 1993); confiriéndole carga positiva a la molécula, consecuentemente el IFN- γ se inactiva en pH ácido (Bach, 1984). Además, se ha postulado que cada tipo celular, para interactuar con los liposomas, requiere de una combinación de lípidos y una carga eléctrica específicas, en el caso de los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón existen evidencias de su afinidad por los liposomas con carga negativa (VanRooijen,

1994). Considerando que el IFN γ es una citocina con carga neta positiva, podría suceder que las cargas negativas de los lípidos interaccionaran con ella ayudando a su mejor encapsulación; sin embargo, esta interacción podría tener un efecto adicional en la configuración de la citocina impidiéndole ejercer su acción. En otro orden de ideas, los resultados indican que los liposomas pueden liberar a la citocina fusionándose a la membrana del macrófago, en este caso el IFN γ al ser liberado podría ser activo nuevamente, explicando así el ligero efecto inductor mostrado por esta citocina encapsulada en liposomas negativos.

Por otro lado, la IL-1 β es una citocina neutra; aunque estudios de mutagénesis sitio-específica indican que su polaridad es muy importante, debido a que la presencia de la arginina 127 es fundamental para su actividad biológica, una simple sustitución produce una reducción de ésta hasta 100 veces, sin perder su capacidad de enlace al receptor. Asimismo, estudios de cristalografía de rayos X indican que la presencia del ácido glutámico 212 es crítica para los efectos biológicos de esta citocina, debido a que la destrucción selectiva de los residuos de ácido glutámico produce una fuerte pérdida de su actividad biológica. Además, su mecanismo de acción puede ser tanto por medio de receptores, como por la unión inespecífica de la citocina a la membrana del macrófago (Dinarello,1991). Estos resultados con macrófagos de la cavidad peritoneal en ratones CD-1 *in vitro*, muestran que únicamente la administración de la citocina en liposomas negativos produce una fuerte respuesta en la aparición de Fc γ Rs y una moderada respuesta en la secreción de óxido nítrico, lo que puede implicar que la composición lipídica de éstos los hace más atractivos para este tipo celular; lo que es congruente con el hecho de que incluso los liposomas negativos vacíos presenten una ligera acción

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

Los macrófagos activados no sólo funcionan como fagocitos, sino que también secretan específicamente una amplia diversidad de sustancias biológicamente activas en los tejidos circundantes, ejemplos de ellos son algunas interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12), IFN- α y β , TGF- β y óxido nítrico (Zambrano, 1993). Todas estas sustancias participan en procesos de regulación positiva o negativa de ellos mismos y de otros tipos celulares.

El óxido nítrico es considerado como un mediador importante en la defensa del organismo contra agentes extraños, su actividad inmunológica puede ser controlada o inhibida por varias moléculas, entre ellas IL-10 y TGF β que son secretadas por macrófagos (Donell, 1994). En nuestros resultados *in vitro* utilizando liposomas negativos con ambas citocinas, se puede observar que la liberación de óxido nítrico se ve disminuída en una proporción similar al aumento en la aparición de Fc γ Rs, lo que parece indicar que este aumento de la aparición de receptores, en estas condiciones específicas pudiera favorecer la secreción y función de alguna de estas citocinas inhibitoras de la liberación de óxido nítrico.

Por otra parte, el hecho de que los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal estimulados con liposomas vacíos *in vitro* no cambien su morfología, es un indicio de que estas partículas no son irritantes. Además, experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo, indican que al inyectar un agente extraño como el caseinato de sodio a la cavidad peritoneal de ratón; la respuesta del organismo es el envío de diferentes poblaciones celulares a su defensa. En el caso de los ratones CD-1, 16 horas después de la inyección se encuentra un pico máximo de granulocitos, después de este tiempo disminuye la población para dar paso a la llegada de macrófagos inducidos para la defensa, con un número máximo de estas células a los 4 días (Ríos,1984). En el presente trabajo, después de la inyección de liposomas vacíos a la cavidad peritoneal no se encontró diferencia en el número ni en el tipo de células presentes, indicando que no ejercen un efecto irritante *in vivo*. Cabe mencionar, que en estas condiciones, existe una ligera respuesta en la aparición de $Fc\gamma Rs$ en los macrófagos después de 2 horas del estímulo, la cual no puede deberse a éste debido a que, como ya se mencionó, son necesarias 48 horas para la expresión de la proteína en las membranas de este tipo celular; además, se observa un aumento en la secreción de óxido nítrico que sigue un comportamiento muy parecido al de los controles negativos, por lo que no puede ser efecto de la presencia de liposomas y en ambos casos después de las 16 horas comienza a descender.

Al utilizar *in vivo* liposomas neutros y negativos encapsulando IL-1 β ó INF γ para estimular a la aparición de $Fc\gamma Rs$ en los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, se encontró que sólo el INF γ encapsulado produce un efecto inductor, mientras que las citocinas libres no producen efecto alguno y la IL-1 β

encapsulada tampoco. Lo anterior puede deberse a que la concentración utilizada en forma libre de las citocinas es escasa para ejercer algún efecto y en el caso de la IL-1 β encapsulada, tal vez no sea funcional por falta de concentración o por algún efecto negativo en la interacción célula-liposoma. En el caso de los liposomas negativos vacíos al interaccionar con las células en estudio, se observa una ligera respuesta positiva, lo cual es congruente con lo informado en la literatura acerca de la preferencia de los macrófagos residentes por este tipo de liposomas.

En general, en cuanto a la secreción de óxido nítrico no se encontraron diferencias en presencia de ningún tipo de liposomas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Como ya se mencionó, sólomente el IFN γ encapsulado en liposomas mostró un efecto activador *in vivo*; sin embargo, sucede algo particular en este efecto, ya que se presenta una mayor inducción de la aparición de Fc γ Rs con liposomas negativos en comparación a la inducida por los liposomas neutros; los cuales habían sido los más efectivos *in vitro*. Lo anterior es muy importante pues es un indicio más de que las condiciones *in vivo* pueden proporcionar resultados totalmente diferentes, debido probablemente a que en la regulación del funcionamiento de un organismo completo intervienen diversos tipos celulares y reguladores metabólicos.

En otro orden de ideas, es importante mencionar que el camino que siguen los liposomas para liberar su contenido en los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal parece ser aleatorio, permitiendo la internalización ya sea

por fusión con la membrana, por liberación en regiones cercanas o por fagocitosis,

Al utilizar ratones singénicos como donadores de macrófagos peritoneales, los resultados de estimulación *in vitro* cambian con respecto al uso de liposomas para encapsular el IFN γ . Para los macrófagos de estos animales, los liposomas negativos resultan ser muy buenos acarreadores de ambas citocinas produciendo un efecto inductor superior al de las citocinas sueltas; mientras que los liposomas neutros y positivos encapsulando ya sea IFN γ o IL-1 β inducen una respuesta similar al de las citocinas libres. Es interesante mencionar, que al utilizar ratones singénicos *in vitro*, es mas notorio el efecto inverso en el que el aumento de Fc γ Rs se asocia a la disminución de la secreción de óxido nítrico en los macrófagos peritoneales, como respuesta a la presencia de las citocinas encapsuladas en liposomas negativos.

En lo que se refiere a los resultados de estimulación *in vivo* utilizando ratones singénicos, se obtuvo una respuesta muy similar a la obtenida con ratones de cepa abierta (CD-1).

Adicionalmente, al obtener ARN mensajero de las células de ratones singénicos estimuladas con liposomas *in vivo* y analizarlas por RT-PCR para determinar una posible expresión diferencial de los 2 tipos principales de Fc γ Rs, se encontró que en todos los casos se expresan ambos tipos de receptores. Cabe aclarar que aunque el Fc γ R de tipo III no es muy abundante en estas células, si posee efectos importantes por lo que sería recomendable realizar su determinación posteriormente. Es importante mencionar que la

técnica es cualitativa y que controlando muy estrictamente las condiciones experimentales pudiera hacerse semicuantitativa, lo cual nos llevaría a notar que aún cuando aparezcan los 2 tipos de receptores, el aumento visto en los estudios de detección colorimétrica, puede deberse a un tipo particular de ellos.

Teniendo en consideración los resultados aquí presentados, se puede afirmar que los liposomas negativos son muy buenos acarreadores de ambas citocinas tanto *in vivo* como *in vitro* y que la respuesta de un organismo completo es diferente a la que se presenta *in vitro*. Además, se muestra una vez más que los liposomas son excelentes acarreadores y protectores de los principios activos a encapsular y se presentan evidencias de interacciones particulares entre éstos y los lípidos que constituyen las partículas acarreadoras. Estas interacciones son de suma importancia para la aplicación de esta biotecnología en diversos modelos de estudio. Particularmente, este aspecto es congruente con los cientos de patentes de formulaciones lipídicas registradas cada año, las cuales van en aumento cada mes.

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

Por lo anterior, si bien es importante analizar las propiedades de las sustancias que se van a encapsular, debido a la complejidad del sistema, es más

importante ensayar y encontrar las condiciones ideales para cada organismo, citocina, tipo celular y condiciones fisiológicas presentes. En este sentido, el trabajo *in vitro* fue de gran utilidad para encontrar las condiciones óptimas para el trabajo *in vivo*.

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

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

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los macrófagos pueden ser estimulados *in vitro* para inducir la aparición de Fc γ Rs y la liberación de óxido nítrico por un estímulo de 2 horas con IFN γ .

Los liposomas neutros son excelentes vehículos para que el IFN γ ejerza sus funciones *in vitro* sobre células peritoneales de ratones CD-1.

Los liposomas negativos son excelentes acarreadores de IL-1 β y producen un incremento de Fc γ Rs en macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones CD-1.

Los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones CD-1 estimulados *in vitro* con liposomas no cambian su morfología.

Los liposomas vacíos inyectados en la cavidad peritoneal estimulan la liberación de óxido nítrico. En contraste, no producen un aumento en el número celular ni un efecto inductor de la aparición de Fc γ Rs.

Los liposomas negativos encapsulando IFN γ tienen un excelente efecto positivo en la inducción a la aparición de Fc γ Rs en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal *in vivo*.

Los liposomas pueden seguir varios caminos para su internalización en los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.

Los liposomas neutros encapsulando $\text{IFN}\gamma$ e $\text{IL-1}\beta$ inducen una respuesta similar a la de las citocinas libres, al estimular macrófagos peritoneales de ratones singénicos.

Los liposomas negativos son excelentes acarreadores de ambas citocinas para la estimulación de la diferenciación de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos.

La inducción a la diferenciación de macrófagos peritoneales de ratones singénicos por citocinas encapsuladas en liposomas positivos es similar a la causada por las citocinas libres.

Los liposomas negativos encapsulando $\text{IFN}\gamma$ tienen un excelente efecto positivo en la inducción a la aparición de $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones singénicos *in vivo*.

Al estimular *in vivo* con liposomas vacíos la cavidad peritoneal de ratones singénicos, aparecen los $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ y $\text{Fc}\gamma\text{RII}$.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal BB y Gutterman JU. (1992). Human cytokines: Handbook for basic and clinical research. Boston: Blakwell Scientific Publication; p-441.

Aguila HL, Akashi K, Domen J, Gandy KL, Lagasse E, Mebius RE, Morrison SJ, Shizuru J, Strober S, Uchida N, Douglas DE y Weissman IL. (1997). From stem cells to lymphocytes: biology and transplantation. *Immunol Rev* 157: 13-40.

Alving CR. (1993). Immunologic presentation of liposomal antigens. *J Liposome Res* 3:493-504.

Alving CR y Wassef NM. (1994). Novel vaccines and adjuvants: Mechanisms of action. Cytotoxic T lymphocytes induced by liposomal antigens: Mechanism of immunological presentation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: suppl s91-s94.

Allen TD y Dexter TM. (1990). Marrow Biology and Stem Cells. En: Colony Stimulating Factors, Immunology series 49. Dexter TM, Garland JM y Testa NG, eds. New York: Marcel Dekker, Inc, p-475.

Alleva DG, Kaser SB, Monroy MA, Fenton MJ y Beller DI. (1997). IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition.. *J Immunol* 159:2941-2951.

Aramaki Y, Akiyama K, Hara T y Tsuchiya S. (1995). Recognition of charged liposomes by rat peritoneal and splenic macrophages: Effects of fibronectin on the uptake of charged liposomes. *Eur J Pharmaceutical Sci* 3: 63-70.

Asano T, McIntyre BW, Bednarczyk JL, Wygant JN y Kleinerman ES. (1995) Liposomal muramyl tripeptide upregulates adhesion molecules on the surface of human monocytes. *Oncology Res* 7: 253-257.

Bach JF.(1984) *Inmunología*, Ed. Limusa, México. pp 408-409.

Baeza I, Wong C, Mondragón R, González S, Ibañez M, Farfán N y Argüello C. (1994) Transbilayer diffusion of divalent cations into liposomes mediated by lipidic particles of phosphatidate. *J Mol Evol* 39: 560-568.

Baeza I, Ibañez M, Lazcano A, Santiago C, Argüello C, Wong C y Oró J. (1987). Liposomes with polyribonucleotides as model of precellular systems. *Origins of Life* 17: 321-331.

Baeza I, Ibañez M, Santiago J, Wong C y Oró J. (1990). Diffusion of Mn^{2+} ions into liposomes mediated by phosphatidate and monitored by the activation of an encapsulated enzymatic system. *J Mol Evol* 31:453-461.

Baeza I, Ibañez M, Wong C, Chávez P, Gariglio P y Oró J. (1992). Possible prebiotic significance of polyamines in the condensation, protection, encapsulation, and biological properties of DNA. *Origins of Life* 21: 225-242.

Balasubramanian K y Schroit AJ. (1998). Characterization of phosphatidylserine-dependent beta2-glycoprotein I macrophage interactions. Implications for apoptotic cell clearance by phagocytes. *J Biol Chem* 273:29272-7.

Bangham, A. (1968). Membrane models with phospholipids. *Progr Biophys Mol Biol* 18: 29-95.

Bangham A, Standish. M y Watking J. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13: 238-252.

Barnes KA y Mitchell RN. (1995). Detection of functional class II-associated antigen: Role of a low density endosomal compartment in antigen processing. *J Exp Med* 181: 1715-1727.

Barret James T. (1991) *Inmunología Medica*, Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, Mexico D.F pp 19-29.

Bazan JF. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11: 350-354.

Becker RP y DeBruyn PH. (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation, a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 145: 183-205.

Bergers JJ, Den-Otter W, Dullens HFJ, De-Groot JW, Steerenberg PA, Filius PMG. y Crommelin DJA. (1994). Effect of immunomodulators on specific tumor immunity induced by liposome-encapsulated tumor-associated antigens. *Int J Cancer* 56: 721-726.

Betageri GV, Black CDV, Szebeni J, Wahl LM y Weinstein JN. (1993). Fc-receptor-mediated targeting of antibody-bearing liposomes containing dideoxycytidine triphosphate to human monocyte-macrophages. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 48-53.

Bradley TR y Metcalf D (1966). The growth of mouse bone-marrow cells *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44: 287-299.

Brown G, Jones NA, Bunce CM, Lord JM, Owen PJ y Patton WN. (1991). Haemopoiesis: A lottery or genomic determinis?. *Brit J Hematol* 79: 527-529

Burkhanov S, Dormeneva E, Kosykh V, Berdichevskii V, Torchilin V, Saatov T y Repin V. (1985). Interaction between liposomes with different lipid composition and hepatocytes *in vivo*. *Bull Exp Biol Med (Engl. Tr.)* 99: 726-728.

Calcagno M, Pérez JR, Waldo MG, Cabrera G y B Weiss-Steider. (1982). Evidence of existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood.* 59:756-760.

Camilleri JP, Williams AS, Amos N, Douglas-Jones AG, Love WG y Williams BD. (1995). Methods for assessing splenic macrophage depletion by liposome encapsulated clodronate. *Inflam Res* 44: 152-157.

Carnot P y Deflandre C. (1906). Sur l'activité hemopoiétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *CR Acad Sci Paris* 143: 432.

Coradini D, Pellizzaro C, Biffi A, Lombardi L, Pirronello E, Riva L y DiFronzo G. (1998) Effect of liposome-encapsulated alpha-or beta-interferon on breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 18(1A): 177-182.

Corona de Valdés T, Santiago E y Weiss-Steider B.(1996). Fc γ R induced by IL-1 but not by IFN are blocked by anti-Igs. IV Latin American Congress of Immunology and XI Mexican Congress of Immunology. Zacatecas, México.

- Croxford JL, Triantaphyllopoulos K, Podhajcer OL, Feldmann M, Baker D y Chernajovsky Y. (1998). Cytokine gene therapy in experimental allergic encephalomyelitis by injection of plasmid DNA-cationic liposome complex into the central nervous system. *J Immunol* 160: 5181-5187.
- Cullis P y Hope M. (1985). Physical properties and functional roles of lipids in membranes. En: *Biochemistry of Lipids and Membranes*. En: Vance, D. y Vance, J. (Eds) Benjamin/Cummings Publ. Co. Menlo Park, USA.
- Curry JL y Trentin JJ (1967). Hematopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation. *Develop Biol* 15: 395-413.
- Chamberlain JK, Leblond PF y Weed RI (1975). Reduction of adventitial cell cover: an early direct effect of erythropoiesis on bone marrow ultrastructure. *Blood Cells* 1: 665.
- Dazan LE, Wu L, Bullington D y Shabced A. (1996). Viral IL-10 gene therapy inhibits TNF-alpha and IL-1 beta, not IL-6, in the newborn endotoxemic mouse. *J Pediatr Surg* 31: 411-414.
- Deamer D. y Banham A. (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochem Biophys Acta* 443: 629-634.
- Dean RT y Jessup W. (1986). Mononuclear phagocytes: Physiology and pathology. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p- 345.
- Denhamss S, Barfoot R y E Jackson. (1987). A receptor for monomeric IgG2b on rat macrophages. *Immunology* 62:769-774.
- DeKruiff B. (1987). Polymorphic regulation of membrane lipid composition. *Nature* 329: 587-588.
- DeVelde AA, Huijbens RJF, deVries JE. y CG Figdor. (1990). IL-4 decreases FcγR membrane expression and FcγR mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J Immunol.* 144:3046-3051.
- Dexter TM. (1989). Haemopoietic growth factors. *Brit Med Bull* 45: 337-349.

- Dexter TM y Spooncer E. (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Ann Rev Cell Biol* 3: 423-441.
- Dieter P, Ambs P, Fitzke E, Hidaka H, Hoffman R y Schwende H. (1995). Comparative studies of cytotoxicity and the release of TNF-alpha, nitric oxide, and eicosanoids of liver macrophages treated with lipopolysaccharide and liposome-encapsulated MTP-PE. *J Immunol* 155:2595-2604.
- Dinarelo CA. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-1652.
- Donnell C y Liew E. (1994) Immunological Aspects of Nitric Oxide, *The Biochemist* 16: 19-22.
- Dorshkind K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 8: 111.
- Dorshkind K. (1991). Hematopoietic system. *Encyclopedia Hum Biol* 4: 165.
- Duserre N, Lessard C, Paquette N, Perron S, Poulin L, Tremblay M, Beauchamp D, Desormeaux A y Bergeron MG. (1995). Encapsulation of foscarnet in liposomes modifies drug intracellular accumulation, *in vitro* anti-HIV activity, tissue distribution and pharmacokinetics. *AIDS* 9: 833-884.
- Erbe DV, Collins JE, Shen L, Graziano RF y Fanger MW. (1990). The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Mol Immunol*: 27: 57.
- Ericson SG, Benoit EN, Mills LE y Fanger MW. (1994). The effect of recombinant human interleukin-3 and recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor on Fc γ receptor expression and antibody-dependent cellular cytotoxicity of hematopoietic progenitor cells during *in vitro* myeloid maturation. *Exp Hematol* 22: 283-289.
- Eue I, Zeisig R y Arndt D. (1995). Alkylphosphocholine-induce production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U-937 cells. *J Cancer Res and Clin Oncology* 121: 350-356.

Flores F. (1991) Inducción a la expresión de receptores Fc en macrófagos y granulocitos de ratón por interleucina-1 recombinante humana. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Autónoma de México. Tesis para obtener el título de Biólogo. México.

Flores F, Hernandez J, Ortiz V, Paniagua J, Santiago E, Mendoza J, Isibassi A. y Weiss-Steider B. (1996). Epitope prediction for mouse Fc receptor type I and type II and generation of specific antibodies. IV Latin American Congress of Immunology and XI Mexican Congress of Immunology. Zacatecas, México.

Flores F. (1997) Expresión diferencial del ARNm para Fc γ RI y Fc γ RII inducida por factores de crecimiento hematopoyético en las líneas de macrófagos IC21 y de monocito-macrófagos P388 de ratón. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias Biomédicas (Inmunología). México.

Foster O y Landy M. (1981). Heterogeneity of mononuclear phagocytes. London, Academic Press, p-279.

Fragoso A, Arciga MA, Calcagno M y Weiss-Steider B. (1985). Determination of the inducers of Fc (FcRI) and C3 (C3RI) receptors on myeloid cells in several media from human and mouse origin, and the identification of the macrophage as the cell that produces these factors. *Exp. Hematol.* 13:163-168.

Fraser CC, Chen BP, Webb S, Vanrooijen N y Kraal G. (1995). Circulation of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient mice after CI(2)MDP-liposome-mediated macrophage depletion. *Blood* 86: 183-192.

Friedmann T. (1989). Progress toward human gene therapy. *Science* 244: 1275-1281.

Gitler C. (1969). Propiedades de las superficies biológicas. En: *Ensayos bioquímicos*. Soberón G. (Ed.) Prensa Médica Mexicana. México.

Golde DW y Gasson JC (1988). Hormones that stimulate the growth of blood cells. *Sci Am* 259: 62-71.

Gosselin EJ, Wardwell K, Gosselin DK, Alter N, Fisher J y PM Guyre. (1992). Enhanced antigen presentation using human Fcγ Receptor (Monocyte-macrophage) specific immunogens. *J. Immunol* 149:3477-3481.

Grattage LP, McKenzie IF y PM Hoggarth. (1992). Effects of PMA, cytokines and dexametasone on the expression of cell surface Fc receptors and mRNA in U937 cells. *Immunol. Cell. Biol.* 70: 97-105.

Greenspan P, Ryu BH, Mao FW y Gutman RL. (1995). Association of negatively-charged phospholipids with low-density lipoprotein (LDL) increase its uptake and the deposition of cholesteryl esters by macrophages. *Biochemica and Biophysica Acta- Lipids and Lipids Metabolism* 1257: 257-264.

Guyre PM, Crabtree GR, Bodwell JE y A Munk. (1981). MLC-conditionated media stimulate an increase in Fc receptors on human macrophages. *J. Immunol.* 126:666-668.

Heusser CH, Anderson CL y HW. Grey. (1977). Receptors for IgG: subclass specificity of receptors on different mouse cells types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line. *J. Exp. Med.* 145: 1316-1327.

Heyworth CM, Vallance SJ, Whetton AD y Dexter TM. (1990). The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors. *J Cell Sci; Suppl* 13: 57-74.

Hibbs ML, Classen BJ, Walker ID, Mckenzie ID y PM Hoggart. (1988). The structure of the murine Fc receptor for IgG. *J. Immunol.* 140: 344-350.

Ho RJY, Burke RL y Merigan TC. (1994). Disposition of antigen-presenting liposomes *in vivo*: Effect on presentation of herpes simplex virus antigen rgD. *Vaccine* 12: 235-242.

Hoedemakers RMJ, Atmosoerodjobriggs JE, Morselt HWM, Daermen T, Scherphof GL y Hardonk MJ. (1995). Histochemical and electron microscopic characterization of hepatic macrophage subfractions isolated from normal and liposomal muramyl dipeptide treated rats. *Liver* 15: 113-120.

- Huitinga I, Ruuls S.R, Jung S, Vanrooijen N, Hartung HP y Dijkstra CD. (1995). Macrophages in T cell-line mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Clin and Exp Immunol* 100: 344-351.
- Huizinga TWJ, Ross D y Von dem Borne AEGK. (1990). Neutrophil Fc- Receptors: A two way bridge in the immune system. *Blood* 75:1211-1214.
- Ibañez M. (1993). Transferencia de genes por medio de liposomas. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México, D.F.
- Imanidis G, Helbing-Strausak S, Imboden R y Leuenberger H. (1998). Vehicle-dependent in situ modification of membrane-controlled drug release. *J Controlled Release* 51:23-34.
- Itani T, Ariga H, Yamaguchi N, Tadakuma T y Yasuda T. 1987. A simple and efficient method for transfection of DNA into mammalian cells grown in suspension. *Gene* 56: 267-276.
- Jandl JH. (1991). Blood cell formation. En: *Blood: Pathophysiology*, Jandl JH, (Ed), Blackwell Scientific Publications, Inc; Massachusetts, USA. pp 1-23.
- Janoff A. (1992). Lipids, liposomes and rational drugs design. *Lab. Inves.* 66: 655-658.
- Jelkmann W. (1992). Erythropoitin: Structure, control of production and function. *Physiol Rev* 72: 449-489.
- Johnson WJ, Marino PA Schreiber RD y Adams RD. (1983). Sequential activation of murine mononuclear phagocytes for tumor cytotoxicity: Differential expression markers by macrophages in the several stages of development. *J. Immunol.* 131: 1038-1043.
- Kagan E y Hartmann DP. (1984) Elimination of macrophages with silica and asbestos. *Methods Enzimol.* 108: 325-335.
- Kamei S y Kopecek J. (1995). Prolonged blood circulation in rats of nanospheres surface-modified with semitelechelic poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]. *Pharmaceutical Res* 12: 663-668

- Kaneda Y, Uchida T, Kim J, Ishiura M y Okada Y. (1987). The improved efficient method for introducing macromolecules into cells using HVJ (Sendai virus) liposomes with gangliosides. *Exp. Cell. Res.* 173: 56-69.
- Kaushansky K. (1997). Thrombopoietin: Understanding and manipulating platelet production. *Ann Rev Med* 48: 1-11.
- Keown W, Campbell C y Kucherlapati R. (1990). Methods for introducing DNA into mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185: 527-537.
- Kersten GFA y Crommelin DJA. (1995). Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations. *Biochem and Biophys Acta- Rev Biomembranes* 1241: 117-138.
- Kichler A y Schuber F. (1995). Versatile synthesis of bi- and tri-antennary ligands: Interaction with the Gal/GalNAc receptor on human hepatoma cells. *Glycoconjugate* 12: 275-281.
- Kinet JP. (1989). Antibody cell interactions: Fc-Receptors. *Cell* 57: 351-354.
- Klein J. (1990). *Immunology*. Blackwell Sci. Co. Cambridge Mass. USA. p.8-28, 102-160.
- Kleinerman E y Fidler D. (1985) Human lymphokines activate tumoricidal properties in human but not rodent macrophages: Elimination of species specificity by encapsulation in liposomes. En: *Macrophage Biology*. Alan R Liss, Inc. New York, USA. p81-96.
- Kleinerman ES. (1995b). Biologic therapy for osteosarcoma using liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *Hematol-Oncol Clin of North Am* 9: 927-938.
- Kleinerman ES, Meyers PA, Raymond AK, Gano JB, Jia SF y Jaffe N. (1995a). Combination therapy with ifosfamide and liposome-encapsulated muramyl-tripeptide: Tolerability, toxicity, and immune stimulation. *J Immunotherapy* 17: 181-193.

- Koppenhagen FJ, Kupcu Z, Wallner G, Crommelin DJ, Wagner E, Storm G y Kircheis R. (1998). Sustained cytokine delivery for anticancer vaccination: liposomes as alternative for gene-transfected tumor cells. *Clin Cancer Res* 4: 1881-1886.
- Kronenwett R, Steidl U, Kirsch M, Sczakiel G y Haas R. (1998). Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. *Blood* 91: 852-862.
- Kurnit DM, Matthyse S, Papayannopoulou T y Stamatoyannopoulos G. (1985). Stochastic branching model for hemopoietic progenitor cell differentiation. *J Cell Physiol* 123:55-63.
- Lane BC, Mitchell KJ, Titchel MS y SM Cooper. (1980). Structural evidence for distinct IgG subclass-specific Fc receptors on mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 152:1147-1161.
- Lasic D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.* 256: 1-11.
- Lasic D. (1996). Liposomes. *Science & Medicine* 6:34-43.
- Leckband D, Helm C y Israelachvili J. (1993). Role of calcium in the adhesion and fision of bilayers. *Biochem* 32: 1127-1140.
- Lezama-Dávila CM y Gallagher G. (1995). CD4+, CD8+ and CD4-,CD8- T cells subsets can confer protection against *Leishmania mexicana* infection. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 90: 51-58.
- Liesveld JL, Abboud CN, Looney RJ, Ryan DH y JK Brennan. (1988). Expression of IgG Fc receptors in myeloid leukemic cells lines. *J. Immunol.* 140:1527-1533.
- Lipton J y Sachs L. (1981). Characterization of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic cells produced by the Krebs ascites tumor. *Biochem Biophys Acta* 673: 552-569.
- Liu DX, Liu F y Song YK.(1995). Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. *Biochem Biophys Acta-Biomem* 1235: 140-146.

- Liu D, Mori A y Huang L. 1992. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1 containing liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 1104: 95-101.
- Lotem J, Shabo Y y L Sachs. (1991). The network of haematopoietic regulatory proteins in myeloid cell differentiation. *Cell Growth and Diff* 2: 421-427.
- Lowry PA y PJ Quesenberry. (1992). Overview of haematopoiesis. En: *Haematopoietic Growth Factors*. Symann M., Quesenberry P.J. y G. Morstyn (eds.). Gardiner Cadwell Communications. UK p. 9-15.
- Mannino R. y Gould-Fogerite S. 1988. Liposome mediated gene transfer. *BioTech* 6: 682-690.
- Margolis L. 1984. Cell interaction with model membranes probing, modification and simulation of cell surface functions. *Biochem. Biophys. Acta* 779: 161-187.
- Marquette C, VanDam AM, Vanrooijen N, Berkenbosh F y Haour F. (1994). Peripheral macrophage depletion prevents down regulation of central Interleukin-1 receptors in mice after endotoxin administration. *Psychoneuroendocrinology* 19: 189-196.
- Mellman JJ. y JC Unkeless. (1980). Purification of a functional mouse Fc receptors through the use of a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 152: 1048-1069.
- Mendoza JF. (1993). Evidencia de que G-CSF es un factor de crecimiento de fibroblastos que induce la maduración de los granulocitos y que los macrófagos producen moléculas de 45 KD con estas actividades. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias UNAM.
- Mendoza J, Hernández J, Marure R y Weiss-Steider B.(1996) Inducción de la expresión de receptores Fc en la línea de monocitos murinos ICI-21 por $INF\gamma$ e $IL-6$, y su falta de efecto en la línea F388D.1. . IV Latin American Congress of Immunology and XI Mexican Congress of Immunology. Zacatecas, México.
- Metcalf D. (1992). Hemopoietic regulators. *TIBS* 17: 286-289.
- Millphordt H. (1982). *Experientia* 38:1127-1128.

- Morahan PS, Rozner MA y EJ Jesse. (1982). Effect of elicitation of peritoneal macrophage subpopulations: size distributions, ectoenzyme phenotypes and antitumor activity. *Int. J. Cancer* 30:787-789.
- Morstyn G y Burgess AW. (1988). Hemopoietic growth factors: A review. *Can Res* 48: 5624-5637.
- Mukouyama Y, Hara T, Xu M, Tamura K, Donovan P, Kim H, Kogo H, Tsuji K, Nakahata T y Miyajima A. (1998). In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 8: 105-114.
- Murai M, Aramaki Y y Tsuchiya S. (1995). Contribution of mannose receptor to signal transduction in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis of mouse peritoneal macrophages induced by liposomes. *J Leuko Biol* 57: 687-691.
- Nair S, Buiting AMJ, Rouse RJD, Vanrooijen N, Huang L y Rouse BT. (1995). Role of macrophages and dendritic cells in primary cytotoxic T lymphocyte responses. *Internat Immunol* 7: 679-688.
- Nair S, Sam-Babu J, Dunham RG, Kanda P, Burke RL y Rouse BT. (1993). Induction of primary antiviral cytotoxic and proliferative responses with antigens administered via dendritic cells. *J Viro* 67: 4062-4069.
- Nakahata T, Gross AJ y Ogawa M. (1982). A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of primitive hemopoietic stem cells in culture. *J Cell Physiol* 113:445-448.
- Nicoletti F, Mancuso G, Cusumano V, DiMarco R, Zaccone P, Bendtzen K y Teti G. (1997). Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. *Eur J Immunol* 27: 1580-1583.
- Novak JP y Stewart CC. (1991). Stochastic versus deterministic in haemopoiesis: What is what? *Brit J Hematol* 78: 149-154.
- Ogawa M. (1998). Stochastic model revisited. *Int J Hematol* 69: 2-5.
- Okuno K, Nakamura K, Tanaka A, Yachi K y Yasutomi M. (1998). Hepatic immunopotential by galactose-entrapped liposomal IL-2 compound in the treatment of liver metastases. *Surg Today* 28: 64-69.

- Oppenheim JJ. (1981). Lymphokines. En: Oppenheim JJ, Rosenstreich DL y Potter M, eds. Cellular functions in immunity and inflammation. London: Edward Arnold, 259-282.
- Pagano R y Weinstein J. 1978. Interactions of liposomes with mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7: 435-468.
- Papahadjopoulos D y Kimmelberg H. 1973. Phospholipids vesicles (liposomes) as models of biological membranes. *Progr. Surf. Sci.* 4: 141-232.
- Papahadjopoulos D, Nir S y Düzgünes N. 1990. Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22: 157-179.
- Papahadjopoulos, D, Vail, W, Jacobson, K y Poste, G. 1975. Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochem. Biophys. Acta* 394: 483-491.
- Parren PHI, Warmerdam PAM, Boeije LCM, Arts J, Westerdaal NAC, Vlug A, Capel PAJ, Aarden LA y JGJ van de Winkel (1992). On the interaction of IgG subclasses with the low affinity FcγRIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils and platelets. *J. Clin. Invest.* 90: 1537-1546.
- Paul WE. (1991). Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77: 1859-1870.
- Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V y G Trinchieri. (1983). Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG on human monocytic and myeloid cells. *J. Exp. Med.* 158:1092-1113.
- Perussia B, Kobayashi M, Rossi ME, Anegeon, I y G Trinchieri (1987). Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: Role of Fc receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J. Immunol.* 138: 765-774.
- Phillips NC y Gagne L. (1995). Modulation of murine macrophage nitric oxide synthesis by liposomal phospholipids: Correlation with liposome immune adjuvant activity. *J Drug Target* 3: 137-147.

Pinto AJ, Steward D, Volkman A, Jendrsiak G, Vanrooijen N y Morahan PS. (1989). Selective depletion of macrophages using toxins encapsulated in liposomes: Effect of antimicrobial resistance. En: G Lopez-Berestein y I. Fidler (Eds). *Liposomes in the Therapy of infectious Diseases and Cancer*. Alan R. Liss, New York, USA. pp 441-451.

Pittet JC, Pepin M, Normier G, Binz H y Lepape A (1995). Lymphoscintigraphy via the targeting of macrophages with ^{99m}Tc -J001X poly-galactoside in a model of pyogranulomas developed in sheep lymph nodes. *Nuclear Med Biol* 22: 355-365.

Pluznik DH y Sachs L. (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66: 319-324.

Poste G. 1980. The interaction of lipid vesicles (liposomes) with cultured cells and their use as carriers for drugs and macromolecules. En: *Liposomes in biological systems*. Gregoriadis, G. y Allison, A. (Eds.), Wiley, New York, USA.

Poyner EA, Alpar HO, Almeida AJ, Gamble MD y Brown MRW. (1995). A comparative study on the pulmonary delivery of tobramycin encapsulated into liposomes and PLA microspheres following intravenous and endotracheal delivery. *J Control Rel* 35: 41-48.

Rao M, Wassef NM, Alving CR y Krzych U. (1995). Intracellular processing of liposome-encapsulated antigens by macrophages depends upon the antigen. *Infect and Immun* 63:2396-2402.

Rasmussen JM. (1983). Fractionation of untreated and inflammatory murine peritoneal macrophages on discontinuous Percoll density gradients. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C* 91: 299.

Ravetch JV y CL Anderson. (1990). Fc γ R family: Proteins, transcripts and genes. En: *Fc receptors and the action of antibodies*. Metger H. (Ed.). Am Soc Microbiol, USA. p 211-235.

Ravetch JV y JP Kinet (1991). Fc Receptors. *Ann Rev Immunol*. 9: 457-492.

Rhodes J, Jones DH y NM Bleehen.. (1983). Increased expression of human monocytic HLA DR antigens and Fc receptors in response to human interferon in vivo. *Clin Exp Immunol* 53:739-743.

- Rigotti A, Acton SL y Krieger M. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD-36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 270: 16221-16224.
- Ríos R. (1984) Aislamiento y Caracterización de subpoblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratón. Escuela Nacional de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Licenciatura. México D.F.
- Roitt MI (1991). *Inmunología*, 2ª ed., Ed. Salvat Editores S.A., México. pp 5.1-5.4
- Sachs L. (1987). The molecular control of blood cell development. *Science* 238:1374-1379.
- Sachs L. (1992). The molecular control of hematopoiesis: From clonal development in culture to therapy in the clinic. *Int J Cell Cloning* 10: 196-204.
- Saito M, Fan D y Lachman LB. (1995). Antitumor effects of liposomal IL-1 alpha and TNF alpha against the pulmonary metastases of the B16F10 murine melanoma in syngeneic mice. *Clinical & Exp Metas* 13: 249-259.
- Salom D, Perez-Paya E, Pascal J y Abad C. (1998). Environment- and sequence-dependent modulation of the double-stranded to single-stranded conformational transition of gramicidin A in membranes. *Biochem* 37:14279-91.
- Sambrano GR y Steinberg D. (1995). Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: Role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci.USA* 92: 1396-1400.
- Santiago E, Mendoza JF, Corona T, López R, Mora L, Flores F y Weiss-Steider B (1993). Induction of Fc receptors on murine macrophages and leukemic cells by interleukin-1. *Europ Citokine Network* 4: 223-228.
- Santiago, R. (1996). Transfección de células en cultivo con liposomas que contienen lípidos cónicos y lípidos catiónicos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de Maestría. México.

Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, DiMatteo FM, Sidoni A, Migliorati G y Morelli A. (1996). Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterol* 111: 736-744.

Sato Y, Nishikawa K, Aikawa K, Mimura K, Murakamimurofushi K, Arai H y Inoue K. (1995). Side-chain structure is critical for the transport of sterols from lysosomes to cytoplasm. *Biochem Biophys Acta- Lipids and Lipid Metabolism* 1257: 38-46.

Scragg A. (1996) *Biotecnología para Ingenieros, Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Limusa Noriega Editores, México. pp 75-99, 400.

Shek PN, Lopez NG y Heath TD. (1982). The role of macrophages in promoting the antibody response mediated by liposome-associated protein antigens. *Immunol lett* 5: 305-309.

Shimizu M, Akiyama S, Ito K, Kasai Y, Takagi H, Kito M., Ohishi N. y Yagi K. (1998). Effect on colon cancer cells of human interferon-beta gene entrapped in cationic multilamellar liposomes. *Biochem Mol Biol Int* 44: 1235-1243.

Singer S y Nicolson G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science* 175: 720-731.

Soto I, Cáceres J, Mendoza J y Weiss B (Eds.). (1999). *Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmune: Mecanismos celulares y moleculares*. Ed. Plaza y Valdez. México, D.F.

Soto R. (2000). *Análisis epistemológico de la factibilidad de un modelo biotecnológico*. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestría (Gestión Tecnológica). México.

Spangrude GJ. (1991). Hematopoietic stem-cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 3: 171-178.

Stites DP. (1993) *Inmunología Básica y Clínica*. 7a. Ed. El manual moderno. México. pp 23-27, 101-111.

- Straubinger, R y Papahadjopoulos D. (1982). Liposome-mediated DNA transfer. En: *Techniques in somatic cell genetics*. Jerry W. Shay (Ed.). Plenum Press. USA.
- Strickland DH, Thepen T, Kees UR, Kraal G y Holt PG. (1993). Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. *Immunol* 80: 266-272.
- Szelei, J y Duda E. (1989). Entrapment of high-molecular-mass DNA molecules in liposomes for the genetic transformation of animal cells. *Biochem. J.* 259: 549-553.
- Szoka, F y Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4194-4198.
- Szoka, F y Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann Rev Biophys Bioeng* 9: 467-508.
- Takai, T y Ohmori, H. (1992). Enhancement of DNA transfection efficiency by heat treatment of cultured mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1129: 161-165.
- Takeda K, Minowada J y A Bloch. (1983). Differential ability of mitogen-stimulated human leukocyte-conditioned media to induce Fc receptors on human leukemic cells. *Cell. Immunol.* 79: 288-297.
- Tanford, C. (1973). *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes*. John Wiley and Sons. New York, London, Sydney and Toronto.
- Tertov VV, Kaplun VV, Sobenin IA y Orekhov AN. (1998). Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. *Atherosclerosis* 138:183-95.
- Till JE, McCulloch EA y Siminovitch L. (1964). A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen-colony forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 51: 29.
- Tomoda K, Ohishi N, Kikkawa F, Mizutani S, Tomoda Y y Yagi K. (1998). Cationic multilamellar liposome-mediated human interferon-beta gene transfer into cervical cancer cell. *Anticancer Res* 18(3A): 1367-1371.

- Trepicchio WL, Bozza M, Pedneault G y Dornier AJ. (1996). Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol* 157: 3627-3634.
- Trubetskoy V, Torchilin V, Kennel S y Huang L. (1992). Cationic liposomes enhance targeted delivery and expression of exogenous DNA mediated by N-terminal modified poly (L-lysine)-antibody conjugate in mouse lung endothelial cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1131: 311-313.
- Unkeless JC y HN Eisen. (1975). Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 142: 1520-1533.
- Van de Winkel JGJ. y CL Anderson. (1991). Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J. Leuk. Biol.* 49: 511-524.
- Van de Winkel JGJ. y PJA. Capel. (1993). Human IgG Fc receptor heterogeneity: Molecular Aspects and Clinical implications. *Immunol. Today.* 14:215-221.
- Van der Veen AH, Eggermont AM, Seynhaeve AL, van Tiel y ten Hagen T.L. (1998). Biodistribution and tumor localization of stealth liposomal tumor necrosis factor-alpha in soft tissue sarcoma bearing rats. *Int J Cancer* 77: 901-906.
- Van Rooijen N. y Sanders A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Meth* 174: 83-93.
- Van Snick J. (1990). Interleukin-6: An overview. *Ann Rev Immunol* 8: 253-278.
- Van Zant G. y Goldwasser E. (1979). Competition between erythropoietin and colony-stimulating factor for target cells in mouse marrow. *Blood* 53:946-965.
- Verkleij, A. (1984). Lipidic intramembranous particles. *Biochem Biophys Acta* 779: 43-63.
- Wadhwa M.S. y Rice K.G. (1995). Receptor mediated glycotargeting. *J Drug Target* 3:111-127.

- Weinstein R, Riordan MA, Wene K, Kreezko S, Zhou M y Dainiak N. (1989). Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. *Blood* 73: 111-116.
- Weiss L. (1981). Haemopoiesis in mammalian bone marrow. En: *Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation*, Ciba Foundation Symposium 84, Porter R and Whelan J (Eds.). Pitman Medical, London, UK. p-67.
- Westen H y Bainton DF. (1979). Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocyte precursors. *J Exp Med* 50: 919-937.
- Wight TN, Kinsella MG, Keating A y Singer JW. (1986). Proteoglycans in human long-term bone marrow cultures: Biochemical and ultrastructural analysis. *Blood* 67: 1333-1343.
- Xie K.P, Huang S.Y, Dong Z.Y, Gutman M y Fidler I.J. (1995). Direct correlation between expression of endogenous inducible nitric oxide synthase and regression of M5076 reticulum cell sarcoma hepatic metastases in mice treated with liposomes containing lipopeptide CGP 31362. *Cancer Res* 55: 3123-3131.
- Yachi K, Kikuchi H, Yamauchi H, Hirota S y Tomikawa M. (1995). Distribution of liposomes containing manno-6-phosphate esters of fatty acid in rats. *J Microencap* 12: 377-388.
- Yoder M, Hiatt K, Dutt P, Mukherjee P, Bodine D y Orlic D. (1997). Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* 7: 335-344.
- Zambrano S.A.(1993). *Inmunología*. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, México.
- Zhou X y Huang L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochem and Biophys Acta* 1189: 195-203.
- Zuckerman KS y Wicha MS. (1983). Extracellular matrix production by adherent cells of long-term murine bone marrow cell cultures. *Blood* 61: 540-547.

ANEXO 1

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS). A 800 ml de agua agregar 8 g de cloruro de sodio, 2.16 g de fosfato de sodio monobásico y 0.2 g de fosfato de potasio. Ajustar pH a 7.2 y aforar a un litro. Esterilizar en autoclave a 20 lb por 20 minutos.

Solución de Aisever. Agregar a 900 ml de agua destilada 20.5 g de dextrosa, 8 g de citrato de sodio dihidratado, 0.55 g de ácido cítrico monohidratado y 4.2 g de cloruro de sodio. Ajustar pH a 6.1 y aforar a 1 litro. Se esteriliza en autoclave a 20 lb por 20 minutos.

Eritrocitos de camero al 2%. Los eritrocitos de camero se obtuvieron por punción en la yugular de un camero (Facultad de Medicina, UNAM). La sangre obtenida se resuspendió en un volumen similar de solución de Aisever, en la que se puede mantener a 4°C hasta por 20 días.

Inicialmente se determinó la concentración óptima de anticuerpo para opsonizar a los eritrocitos mediante titulación. En una microplaca de 96 pozos (Dynatech, USA) se hicieron diluciones seriadas (desde 1:10 hasta 1:3000) en amortiguador de fosfatos (PBS), a partir de una solución de 10 mg/ml de IgG de conejo contra eritrocitos de camero (Sigma Chemical, USA), a 50 µl de cada una de las diluciones se agregaron 50 µl de eritrocitos de camero al 2% en PBS, se resuspendió e incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Mediante un análisis visual se eligió como concentración óptima de anticuerpo el título

subaglutinante de los eritrocitos de carnero. La opsonización de los eritrocitos de carnero se consiguió incubándolos al 2% con la concentración óptima de anticuerpo (generalmente entre 1:600 y 1:1000) a 37°C durante 30 minutos con agitación constante. Finalmente se lavaron tres veces por centrifugación con PBS y se resuspendieron al 2%.

Solución de hidrocloreto de ortofenilendiamina (OPD). Se disolvieron 0.5 mg/ml en PBS y justo antes de usarse se añadió 0.009% de H₂O₂

Reactivo de Griess.-Es una solución de sulfanilamida al 1%, dihidrocloreto de naftiletildiamina en H₃PO₄ al 2.5% y ácido clorhídrico 2N en proporción 2:1:1).

Mezcla Sevag. Mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico 24:1.

Solución amortiguadora de cacodilato pH 7.4. Cacodilato de sodio 0.1 M.

Solución fijadora de Osmio-Milloning. Solución A: 0.226 g de fosfato monobásico de sodio en 10 ml. Solución B: 0.252 g de NaOH en 10 ml. Solución C: 0.054 g de glucosa en 1 ml. Solución D: 8.3 ml de solución A más 1.7 ml de solución B. Se mezclan 9 ml de solución D y 1 ml de solución C y se disuelve 1% de OsO₄.