

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO PROTECTOR DE LA INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE Y EL
FACTOR DE TRANSFERENCIA LIBRES Y ENCAPSULADOS EN
LIPOSOMAS EN UN MODELO DE INFECCIÓN
EXPERIMENTAL EN RATONES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

POR

Q.B.P. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1995

TM

Z5320

FCB

1995

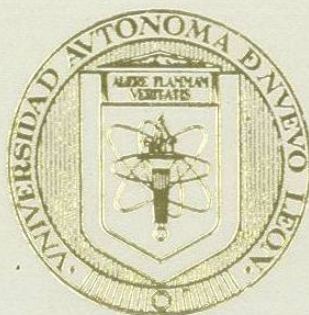
A4



1020091515

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO PROTECTOR DE LA INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE Y EL
FACTOR DE TRANSFERENCIA LIBRES Y ENCAPSULADOS EN
LIPOSOMAS EN UN MODELO DE INFECCION
EXPERIMENTAL EN RATONES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA

POR

Q.B.P. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1995

0093-86560

TM
Z5320
FCB
1995
A4

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFECTO PROTECTOR DE LA INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE Y EL
FACTOR DE TRANSFERENCIA LIBRES Y ENCAPSULADOS EN
LIPOSOMAS EN UN MODELO DE INFECCION
EXPERIMENTAL EN RATONES**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA**

POR

Q.B.P. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE

Dr. REYES TAMEZ GUERRA

SECRETARIO

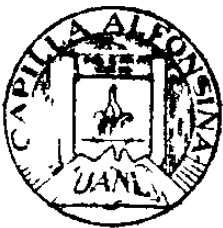
Dra. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

VOCAL

Dra. LAURA TREJO AVILA

MONTERREY, N.L.

MARZO DE 1995



FONDO TESIS

6707.

AREA DE TRABAJO

ESTE PROYECTO DE INVESTIGACION SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS, U.A.N.L., BAJO LA DIRECCION DEL DR. REYES TAMEZ GUERRA Y LA CO-DIRECCION DE LA DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA.

DEDICATORIA

A DIOS:

PORQUE ME HA PERMITIDO LLEGAR A ESTE MOMENTO CONTIGO SIEMPRE A MI LADO, PARA PODER CUMPLIR UNA MAS DE MIS METAS.

A MIS PADRES:

**Sr. SANTOS ALCOCER TRETO.
Sra. PAULINA GONZALEZ DE ALCOCER.
POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE LLEGAR A SER ALGUIEN EN LA VIDA, QUE ES LA HERENCIA MAS VALIOSA QUE PUEDO RECIBIR, GRACIAS POR SU PACIENCIA, APOYO, COMPRENSION Y AMOR QUE ME HAN BRINDADO ATRAVES DE GRANDES SACRIFICIOS Y SABIAS PALABRAS.**

A MI ESPOSA:

**Q.B.P. MARIA DE LOS ANGELES MARTINEZ DE ALCOCER.
POR TU AMOR, POR TU PACIENCIA, POR SER MI COMPAÑERA Y GUIA, POR CONVERTIRTE EN LA RAZON DE MI VIDA, POR PERMITIRME TU HOMBRO CUANDO MAS LO NECESITO, TODO ELLO HACE QUE ESTO SEA UN TRIUNFO LOGRADO POR LOS DOS.**

A MIS HERMANOS:

**RAFAEL, LUZ MARIA, VICENTE, SANTOS, NORA.
POR BRINDARME SU CARIÑO Y APOYO.**

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, POR COMPARTIR MUCHOS MOMENTOS AGRADABLES Y PORQUE EL TRABAJO DIARIO DE CADA UNO DE ELLOS, REPRESENTA PARA MI UN MOTIVO DE SUPERACION Y RESPETO.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Reyes Tamez Guerra y a la Dra. Cristina Rodriguez Padilla.

Por brindarme la oportunidad de tener su amistad, por su apoyo constante y decidido para lograr la terminación de esta investigación, por su guía y consejos, pilares importantes en mi formación académica, pero sobre todo por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de Inmunología y Virología.

A la Dra. Laura Trejo Avila.

Por su valiosa asesoría e interés mostrado a esta investigación y por sus consejos y apoyos inmerecidamente recibidos, así como por la oportunidad de tener su amistad.

A el Dr. Luis Galan Wong.

Por su apoyo, amistad y consejos dados durante todo momento que han sido muy valiosos y motivantes para lograr la superación en el campo académico.

A el Dr. Guillermo Elizondo Rojas.

Por su amistad, apoyo y consejos inmerecidamente recibidos para la realización de esta investigación.

A la División de Estudios de Posgrado:

Dra. Julia Verde Star, Por su apoyo otorgado durante la obtención de los créditos académicos y la realización de la presente investigación.

A el Centro Internacional de Biología Celular y Molecular A.C.

Por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría, así como el apoyo para la realización de la presente investigación.

A todas aquellas personas que de alguna manera u otra cooperaron para la realización de este trabajo.

INDICE

PORTADA	i
AREA DE TRABAJO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	
Mecanismos de Inmunidad a Microorganismos	2
Inmunidad Celular Contra Bacterias	2
Mecanismos de Inmunidad en Salmonelosis	3
Interleucina-2 en Infecciones Experimentales	6
Inmunomoduladores en Infecciones Experimentales	9
Generalidades de Liposomas	17
Liposomas en Enfermedades Infecciosas	19
MATERIAL Y METODOS	
Bacteria	22
Animales de Experimentacion	22
Obtencion de PME de <i>Salmonella enteritidis</i>	22
Obtencion de Inmunomoduladores	23
Cuantificacion de PME por el Metodo de Lowry	25
Cuantificacion de IL-2 por el Metodo Ac. Bicinconinico	25
Caracterizacion de IL-2 por SDS-PAGE	26
Cinetica de Crecimiento y Cuenta en Placa	27
Determinacion de LD 100%	28
Cinetica de Infeccion en Hgado y Bazo	29
Efecto de la Endotoxina en la Infeccion	29
Analisis de la Infeccion por Microscopia Electronica	29
Encapsulamiento de Inmunomoduladores en Liposomas	30
Separacion de Inmunomoduladores no Encapsulados	31
Caracterizacion de Liposomas por Microscopia Electronica	32
Determinacion del Efecto Protector de IL-2 libre y Liposomal	32
Determinacion del Efecto Protector del FTe libre y Liposomal	33
Analisis Histologico en Organos de Animales Protegidos con Inmunomoduladores Libres y en Liposomas	33
Alteraciones Histologicas Inducidas por IL-2 Libre y Liposomal	34
RESULTADOS	35

DISCUSIONES	53
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFIA	58

RESUMEN

Con el propósito de estudiar el efecto protector de la Interleucina-2 recombinante (IL-2) y el Factor de Transferencia específico (FTe) libres y atrapados en liposomas contra una dosis letal de *Salmonella enteritidis*, se desarrolló un modelo experimental de salmonelosis murina. Se encontró que son necesarias 2×10^7 bacterias/ml administradas por vía intraperitoneal para producir una infección letal entre las 16 hrs y 30 hrs. después del reto en ratones Balb/c. La cinética de infección en hígado y bazo demostró que existe un grado de infección mayor en el hígado que en el bazo, lo cual demuestra que la diseminación y multiplicación de la bacteria es la causa de la muerte. El choque séptico inducido por la presencia de endotoxina parece no tener influencia en la causa de la muerte letal. Las proteínas de membrana externa (PME) de la bacteria fueron semipurificadas y utilizadas como antígeno para la producción del FTe. Los inmunomoduladores fueron atrapados en liposomas producidos por la rehidratación de una película de fosfolípidos y extruidos a través de una membrana de 100 nm. Los liposomas producidos fueron caracterizados en forma y tamaño por microscopía electrónica de transmisión. Cuando se determinó el efecto protector de la IL-2 libre y atrapada en liposomas en la sobrevivencia a 7 días después del reto letal, se encontró que 25 µg de IL-2 (100,000 U) recombinante es capaz de producir un 60% de protección, mientras que la misma dosis de IL-2 atrapada en liposomas produce un 90%. La protección inducida con el FTe libre y atrapado en liposomas fue de un 40% y 80% respectivamente. La protección inducida con ambos inmunomoduladores libres y atrapados en liposomas correlacionó con una disminución del grado de infección tanto en el hígado como en el bazo, así como con la presencia de un infiltrado celular linfocítico en estos órganos. Los efectos sobre la protección y disminución de la infección en los tejidos producidos por ambos inmunomoduladores libres y en liposomas fueron más importantes los inducidos con IL-2 recombinante. Estos resultados demuestran que ambos inmunomoduladores confieren un estado de resistencia a la infección letal producida por *Salmonella enteritidis* y que los liposomas aumentan el papel protector de los mismos.

ANTECEDENTES

MECANISMOS DE INMUNIDAD A MICROORGANISMOS.

Existe una variedad de mecanismos de defensa específicos e inespecíficos que normalmente están involucrados en reconocer cualquier entidad extraña en el huésped. Dependiendo de la eficiencia de estos mecanismos la entrada de una bacteria al huésped puede generar una infección localizada o generalizada. La infección generalizada puede ocurrir por la diseminación directa de la bacteria a los tejidos circundantes o a través de los conductos linfáticos (diseminación linfática) de donde llega a la sangre por el conducto torácico. En otras ocasiones las bacterias llegan en forma directa a la sangre al pasar al interior de un vaso sanguíneo (diseminación sanguínea). Aquellas bacterias que tienen la capacidad de sobrevivir y multiplicarse intracelularmente no son, por lo general, eliminadas por la respuesta inmune humoral, en estas circunstancias los anticuerpos eliminan solamente una pequeña cantidad de la bacteria mientras que la fagocitosis por macrófagos y polimorfonucleares así como la inmunidad celular son los mecanismos más efectivos de defensa.(1,2).

INMUNIDAD CELULAR CONTRA BACTERIAS.

Para algunos patógenos intracelulares se ha descrito que los linfocitos T desempeñan un papel importante que radica principalmente en su capacidad de producir linfocinas que activen a los macrófagos, polimorfonucleares y células NK para incrementar su actividad microbicida. En algunos casos se ha demostrado que la transferencia adoptiva de células T específicas del patógeno confiere protección y un estado de inmunidad. Algunas de las linfocinas con capacidad para incrementar las funciones microbidas son las siguientes: Interferon- γ , α , y β ; la Interleucina-1, Interleucina-2 y los factores estimuladores de la colonia de macrófagos y de granulocitos-macrófagos (3). Recientemente se han hecho contribuciones importantes con el propósito de entender el papel de las células T en infecciones bacterianas, principalmente con aquellos patógenos que tienen la facilidad de replicarse en células fagocítico-mononucleares (4). Diversas poblaciones de células T, como la CD4+ y CD8+ pueden participar en el desarrollo de una respuesta protectora contra patógenos intracelulares. Los linfocitos T CD8+ presentan una actividad citotóxica específica para reconocer proteínas de los

patógenos en las membranas de las células huésped donde estos se replican. Por ejemplo, se ha observado que los macrófagos infectados con *Listeria monocytogenes* son lisados por linfocitos T CD8+ de una manera restringida por antígenos de histocompatibilidad clase I. De esta forma se ha determinado que no solamente las células CD4+ participan activamente en la infección por patógenos intracelulares, sino que también las células CD8+ pueden inducir un estado de resistencia o protección (5).

Recientemente se ha sugerido que dos poblaciones celulares pueden participar activamente en infecciones por patógenos intracelulares. Las células T gamma, delta (T γ δ) reconocen preferencialmente componentes de micobacterias, lo cual sugiere su participación en la inmunidad contra estos microorganismos. De igual forma con las células NK también se ha demostrado que muestran un papel bactericida importante (6,7).

MECANISMOS DE INMUNIDAD EN SALMONELOSIS.

Salmonella enteritidis es una bacteria gram negativa intracelular facultativa que puede producir infecciones letales cuando ocurre su diseminación en el huésped. La diseminación ocurre preferentemente a los órganos del sistema reticuloendotelial cuando la bacteria es inoculada por vía intravenosa o intraperitoneal siendo los macrófagos los sitios primarios de replicación intracelular. Los órganos más afectados en las infecciones experimentales inducidas como modelos de estudio de infecciones diseminadas son el hígado y el bazo (2).

Collins en 1969, encontró que el suero hiperinmune específico para *Salmonella enteritidis* administrado en animales era incapaz de proteger de una infección letal, observándose que solo se produce una inactivación inicial del inóculo para el reto pero no puede controlar la multiplicación posterior de la bacteria sobreviviente, con lo cual únicamente se extiende el tiempo de sobrevivencia sin producir una protección definitiva (8).

Hsu, H. S. y cols. en 1972, encontraron que las reacciones inflamatorias observadas en las lesiones cutáneas secundarias de cobayos inducidas por *Salmonella typhimurium* es claramente la manifestación de una respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos de la bacteria durante la infección (9).

Morris y cols. en 1976, observaron que los animales a los cuales se les eliminan los linfocitos B con ciclofosfamida son incapaces de controlar la multiplicación de *Salmonella typhimurium* viva utilizada como vacuna, estos animales eventualmente mueren después de la aplicación de la misma (10).

Mayo y cols. en 1977, encontraron que la expresión de una respuesta de hipersensibilidad retardada a proteínas de la bacteria puede ser demostrada in vivo mediante la prueba del factor inhibidor de la migración producido por los linfocitos de un animal inmunizado con *Salmonella typhimurium* (11).

Hochadel y cols. en 1977, demostraron que la transferencia de linfocitos T y B de ratones inmunizados con *Salmonella typhimurium* crea un estado de protección específico. La transferencia de linfocitos B produjo una mejor tasa de sobrevivencia de los animales infectados que la transferencia de los linfocitos T, lo cual correlacionó con una disminución de la población bacteriana del hígado, bazo y sangre (12).

Valtonen y cols. en 1978, encontraron que ratones sin células T y B generados por la administración de un suero antilinfocítico pueden inhibir el crecimiento de *Salmonella typhimurium* viva utilizada como vacuna siempre y cuando sean inyectados con antisuero específico (13).

Hsu y cols. en 1980, correlacionaron la respuesta de hipersensibilidad retardada y el estado de protección a una infección letal inducida por *Salmonella typhimurium*, encontraron que la inmunización con BCG crea un estado de hipersensibilidad retardada inducida por PPD junto con la bacteria. La sensibilidad a tuberculina prolongó el tiempo de supervivencia y produjo un 70% de protección mientras que el BCG solo incrementó la sobrevivencia hasta cerca de un 36% (14).

Saxen y Makela en 1982 y Saxen en 1984, encontraron que el suero inmune específico para *Salmonella typhimurium* fue capaz de inducir una protección pasiva, encontrándose que principalmente los anticuerpos de la clase IgM fueron los responsables de inducir esta protección (15,16).

Carlin y cols. en 1987, demostraron que los anticuerpos monoclonales de tipo IgG, IgM específicos para el polisacárido "O" de *Salmonella typhimurium* fueron capaces de inducir una protección al reto letal con la bacteria (17).

Smith y cols. 1989, analizaron el papel de las células asesinas naturales (NK) en la protección de ratones infectados con una dosis letal de *Salmonella typhimurium*. La infección aumento la capacidad de las células NK de matar a blancos transformados. Cuando las células NK fueron eliminadas in vivo por medio de la administración de un anticuerpo anti-asialo GM-1 produjo una ligera disminución del número de bacterias en el bazo (18).

Kagaya y cols. en 1989, estudiaron la capacidad del INF- γ en inducir la activación de macrófagos para matar eficientemente a *Salmonella typhimurium*, encontraron que el INF- γ activa eficientemente a los macrófagos para matar intracelularmente a *Salmonella typhimurium* (19).

Klotarski en 1989, Vordermeier en 1990 y Villarreal en 1992, han demostrado que durante la infección con *Salmonella* el huésped desarrolla una respuesta mediada por linfocitos T específica a antígenos de la bacteria con la producción de IL-2 e IL-4, dicha respuesta puede ser la responsable de inducir protección contra esta bacteria (20).

Gahring y cols. en 1990, observaron que algunas cepas de *Salmonella typhimurium* tienen la capacidad de invadir y replicarse en células no fagocíticas, pero no pueden sobrevivir en una línea celular de macrófagos J-774. Estas cepas que no tienen capacidad de sobrevivir en los macrófagos presentan una mutación relacionada con su capacidad de adherencia a células (21).

Nauciel en 1990, demostró que los linfocitos T CD4+ parecen jugar un papel de mayor importancia que los CD8+ en la protección de ratones infectados con *Salmonella typhimurium* (22).

Buchmeier y cols. en 1991, encontraron que los macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* son incapaces de matar intracelularmente a ésta bacteria debido a un mecanismo de inhibición de la fusión del fagosoma con lisosomas secundarios. Dicho mecanismo requiere de la bacteria viable; no es bloqueado por anticuerpos y no participa el lipopolisacárido (23).

Emoto en 1992 y Hara en el mismo año, observaron encontrado que durante la infección con *Salmonella* se lleva a cabo una preferencial inducción y activación de linfocitos T $\gamma\delta$ y que estos linfocitos pueden participar en la protección contra la infección (24).

Mixer y cols. en 1994, indican que tanto los linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ contribuyen a la resistencia a la infección producida por *Salmonella enteritidis*, por lo que ambas poblaciones celulares parecen participar en la protección contra esta infección (25).

INTERLEUCINA-2 EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

De una amplia variedad de inmunomoduladores que existen disponibles actualmente, la IL-2 ha sido uno de los más estudiados debido a su capacidad de inducir la activación de algunos sistemas citotóxicos del huésped y la liberación de una cascada de citoquinas importantes en la activación de linfocitos T, B, macrófagos y células NK. La utilización de la IL-2 en enfermedades infecciosas ha sido una área de particular interés, sobre todo contra patógenos intracelulares que se multiplican en los macrófagos, los estudios experimentales más importantes son mencionados a continuación:

Somesh y cols. en 1985, probaron el efecto de la IL-2 en la sobrevivencia de ratones a un reto letal con *Toxoplasma gondii* y encontraron que la administración de 5 dosis de IL-2 de 100 U disminuye en un 70% la mortalidad de los ratones infectados con una LD de *Toxoplasma gondii*, igualmente se disminuye el número de quistes en cerebro y se incrementa la actividad de las células NK, sin embargo no lograron revertir la supresión de la respuesta proliferativa de linfocitos a concanavalina A y lipopolisacárido en ratones con infección aguda (26).

Choromanski y cols. en 1985, examinaron los efectos de la administración de IL-2 en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* y encontraron disminuida parcialmente la respuesta a eritrocitos de carnero e incrementada la protección contra *T. cruzi* (27).

Deepe y cols. en 1986, estudiaron los defectos de la respuesta inmune celular en un modelo de histoplasmosis en ratón, encontrando que esto se debe principalmente a un déficit de IL-2. Además observaron que la IL-2 *in vitro* es capaz de aumentar

la respuesta proliferativa de los linfocitos y el número de microorganismos en los órganos infectados. Concluyéndose así que la IL-2 en este modelo de infección mostró efectos inmunomoduladores *in vitro* pero no *in vivo* (28).

Carl y cols. en 1986, demostraron que los linfocitos CD3+ y CD8+ activados por IL-2 son capaces de lisar en forma específica células infectadas con *Rickettsia typhi* y *Rickettsia prowasekii*. Debido a que estos linfocitos activados con IL-2 pueden ser obtenidos de sangre periférica, las células responsables de este efecto fueron llamadas células LAK (29).

Carl y cols. en 1986, encontraron que las células LAK que lisan específicamente a células infectadas con Rickettsias, pueden ser bloqueadas o inhibidas por un anticuerpo monoclonal OKT3 pero no pueden ser inhibidas por OKT4 y OKT8 (30).

Kong-Teck-Chong en 1987, encontró que la administración profiláctica de IL-2 en ratones aumenta la sobrevivencia y produce recuperación completa de una infección bacteriana aguda letal por bacterias gram negativas, los efectos fueron dependientes de la dosis y de la vía de administración de la IL-2 así como del reto con la dosis letal, observándose un mejor efecto protector cuando se aplicaban la IL-2 y el reto letal por la misma ruta y cuando se administraban por rutas diferentes fue menor o no se observó ningún efecto (31).

Iizawa y cols. en 1987, examinaron los efectos de la IL-2 en el curso de una infección crónica experimental por *Klebsiella pneumoniae* en el tracto respiratorio de ratones observando una disminución en la cantidad de bacterias en pulmón después de la administración de 2 o 20mg de IL-2. A dosis de 0.2mg por 14 días se suprime la proliferación de bacterias en el pulmón, los títulos de anticuerpos en suero no se afectaron con dicho tratamiento. la cantidad de linfocitos y monocitos en sangre periférica se incrementó por la administración de 20 mg de IL-2 por 14 días pero no en el tratamiento de 7 días (32).

Reddehase y cols. 1987, demostraron que la aplicación *in vivo* de 8 dosis de 10 U por dosis de IL-2 recombinante humana junto con 4×10^7 linfocitos sensibles incrementan la resistencia a una infección diseminada por citomegalovirus; dicho efecto no solo fue profiláctico, sino también terapéutico. La eliminación *in vivo* de células T CD4+ indicó que la IL-2 recombinante incrementa el efecto antiviral de esta población (33).

Weinberg y cols. 1987, estudiaron el efecto de la IL-2 recombinante en la recurrencia de infecciones genitales en cobayo por el virus Herpes simplex tipo 2. Una dosis de 5×10^6 U de IL-2 recombinante por vía subcutánea durante 4 semanas produjo una disminución significativa en la incidencia de nuevas lesiones genitales recurrentes, logrando así un estado de protección a la infección viral. Los mecanismos inmunológicos involucrados en dicha protección fueron la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus, un aumento en la producción de interferón- γ , un incremento en la actividad de células NK y de células LAK (34).

Jevan y cols. en 1988, estudiaron el efecto de la IL-2 recombinante en ratones infectados con *Mycobacterium lepraemurium* y *Mycobacterium bovis* encontrando que la IL-2 redujo significativamente el número de microorganismos en ganglios linfáticos e hígado de un 50-80 % en un ratón infectado con *M. lepraemurium*. Mientras que en los ratones infectados con *M. bovis* la reducción de la infección en bazo de estos animales fue de un 30-50 % (35).

Carl y cols. en 1988, encontraron que las células LAK que lisan blancos infectados con *Rickettsia typhi* y *Rickettsia prowazekii* son incapaces de reconocer y lisar células infectadas con *Rickettsia tsutsugamushi*, encontrando que las células infectadas por esta última no expresan los principales determinantes antigénicos inducidos por los otros dos tipos de rickettsias (36).

Cassandra y cols. en 1988, produjeron líneas de linfocitos T dependientes de IL-2 específicas para un antígeno de *Salmonella typhimurium* y demostraron que estas líneas celulares fueron capaces de transferir adoptivamente una protección específica contra un reto letal por la bacteria (37).

Kohl y cols. 1989, evaluaron el efecto protector de la IL-2 en ratones recién nacidos contra la infección letal del virus herpes simplex (HSV), encontrando que la administración de 10^6 U de IL-2 protegió a los ratones recién nacidos de la infección letal del HSV, las células de bazo de ratones recién nacidos tratados con IL-2 y células de bazo de ratones recién nacidos tratados *in vitro* con IL-2 transfirieron protección a ratones recién nacidos, se encontró que dichas células son macrófagos por su adherencia a la sílica y a anticuerpos anti-asialo GM-1. El tratamiento con IL-2 *in vitro* aumento la función de citotoxicidad dependiente de anticuerpos de los macrófagos de ratones recién nacidos y liberación de iones superóxido. El efecto mediado por la IL-2 es dependiente de la producción de

INF- γ *in vivo* dado que un anticuerpo monoclonal contra INF- γ inhibió el efecto de protección (38).

Iizawa y cols. 1990, probaron el efecto protector de la IL-2 contra la infección letal causada por *Klebsiella pneumoniae*, encontrando que la IL-2 inoculada subcutáneamente a una dosis de 20 mg por ratón por 7 días aumentó la sobrevivencia después del reto letal. Observaron que la inyección de anticuerpos anti-asialo GM-1 no influye en el efecto de la IL-2. Se encontró que en ratones a los que se les dio IL-2 aumentó el número de macrófagos peritoneales y la infiltración de leucocitos PMN en la cavidad peritoneal después del reto bacteriano. Además la transferencia de suero y células de exudado peritoneal consistiendo de un número aproximadamente igual de macrófagos y PMN obtenidos de ratón al que se le dio IL-2 aumentó la resistencia a *Klebsiella pneumoniae* (39).

INMUNOMODULADORES EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Un sinnúmero de citoquinas han demostrado tener la capacidad de inducir un estado de resistencia contra infecciones letales inducidas por patógenos intracelulares, en particular han tenido mayor efecto profiláctico o terapéutico aquellas que pueden inducir la activación de macrófagos.

PAPEL DE CITOQUINAS EN LA PROTECCION CONTRA PATOGENOS INTRACELULARES

IL-1 α	INF- γ	INF- β
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Plasmodium chabaudi</i>	
<i>Candida albicans</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	
<i>Brucella abortus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
<i>Staphylococcus pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	<i>Chlamidia tracomatis</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	

G-CSF	TNF α	GM-CSF
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p><i>Mycobacterium avium</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Candida albicans</i> <i>Torulopsis glabrata</i></p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>

Ozaki y cols. en 1987, estudiaron el efecto de la IL-1 α recombinante en ratones infectados con *Pseudomonas aeruginosa* o *Klebsiella pneumoniae*. En los infectados con *Pseudomonas aeruginosa* se demostró que la IL-1 α administrada intramuscularmente por 3 días antes del reto con la bacteria produjo una protección efectiva a la infección, este efecto fue dependiente de la dosis, encontrándose que con 10 mg por ratón se produjo el máximo de sobrevivencia (92.5 %), mientras que en la infección producida por *K. pneumoniae*, la IL-1 α administrada junto con la bacteria o un día después produjo también una protección a la infección. Igualmente dicho efecto fue dependiente de la dosis (40).

Matsumoto y cols. en 1987, evaluaron el efecto protector del G-CSF en ratones neutropénicos e inmunosuprimidos con ciclofosfamida, encontrando que es capaz de proteger del reto letal con *Pseudomonas aeruginosa*, esta resistencia fue dosis dependiente y debida a un incremento en los niveles de neutrófilos circulantes. De igual manera G-CSF fue capaz de proteger significativamente contra las infecciones sistémicas causadas por *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (41).

Baeman en 1987, estudio el efecto del INF- γ sobre la capacidad de los macrófagos para matar a las artroconidias de *Coccidioides immitis* encontrando que esta linfocina fue capaz de aumentar la actividad de los macrófagos para matar a estos microorganismos. Incluso de una manera similar cuando los macrófagos son incubados con los linfocitos sensibles a un antígeno de este microorganismo (42).

Wade y cols en 1987, encontraron que el INF- γ es capaz de revertir los efectos inhibitorios de la actividad bactericida generada por varios componentes de algunas micobacterias, que tienen la capacidad de inhibir la fusión de fagosomas y lisosomas. Este efecto promovido por el INF- γ no esta muy claro pero esta relacionado a la expresion de una proteina de 25 kd de *Mycobacterium tuberculosis* (43).

Czuprynski y cols. en 1987, reportaron que el tratamiento con IL-1 α recombinante incrementó significativamente la resistencia a la infección producida por *Listeria monocytogenes*. El nivel mas alto de protección se obtuvo con 100 U equivalentes a 0.17 mg de IL-1 α . La resistencia a la infección producida por esta monocina fue observada cuando se administró tanto por vía intraperitoneal como intravenosa, sin embargo una protección mas alta fue obtenida cuando la IL-1 α y la bacteria fueron administradas por vía parenteral. De igual manera se produjo una resistencia elevada por vía intravenosa cuando ambos se administraron por dicha vía (44).

Wu-Hsieh y cols. en 1987, demostraron que el INF- γ recombinante asi como las linfocinas obtenidas de linfocitos sensibles y de un hibridoma de células T estimulado con concavalina A activan a los macrófagos para inhibir el crecimiento intracelular de *Histoplasma capsulatum*. Tanto las linfocinas como el INF- γ fueron neutralizados en su capacidad para activar macrófagos por un anticuerpo anti-INF- γ demostrando que esta linfocina es la unica responsable de esta actividad (45).

Nakane y cols. en 1988, evaluaron el efecto del INF- γ sobre la infección producida por *Listeria monocytogenes* en ratones tratados por ciclosporina A, los cuales tienen inhibida su capacidad para producir INF- γ endógeno. La administración de esta linfocina inhibió el desarrollo de la infección producida por *Listeria monocytogenes* y restauró la capacidad para producir INF- γ en circulación en respuesta a un antígeno específico de la bacteria (46).

Zhong y cols. en 1988, encontraron que el INF- γ recombinante produce una disminución del numero de *Chlamydia trachomatis* en el pulmón, bazo e hígado así como una disminución de la reacción inflamatoria producida en estos órganos por este microorganismo (47).

Fujiki y cols. en 1988, demostraron que el INF- β recombinante tiene efectos protectores y terapéuticos al aumentar la sobrevivencia y disminuir el número de microorganismos en ratones infectados con *Listeria monocytogenes*, además el INF- β produjo un aumento en la liberación de los metabolitos reactivos del oxígeno después de su administración, lo cual estuvo relacionado directamente con el efecto protector inducido (48).

Bermudez y cols. en 1988, estudiaron el efecto de la amikacina, roxitromicina y azitromicina solas o en combinación con el TNF- α para inhibir o matar el complejo *Mycobacterium avium*. Los tres antibióticos mostraron una capacidad que va de 18 - 22 % para matar a las micobacterias mientras que las combinaciones de los antibióticos con el TNF- α mostraron un aumento en esta capacidad, 73 % con TNF- α y roxitromicina, 62 % en la combinación de TNF- α y azitromicina y un 56 % con TNF- α y amikacina. Las combinaciones de amikacina, roxitromicina y TNF- α produjeron hasta el 91 % de la muerte intracelular de la bacteria (49).

Minami y cols. en 1988, demostraron que la IL-1 α fue capaz de aumentar la resistencia a la infección sistémica producida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans*. La dosis efectiva de IL-1 α varió de 0.1 a 10 mg por ratón dependiendo del agente infeccioso, la ruta de administración y la dosis de reto del microorganismo, de igual manera se observó que la IL-1 α es capaz de inducir un estado de resistencia a la infección producida por *Pseudomonas aeruginosa* en un animal con leucopenia inducida con ciclofosfamida (50).

Hershman y cols. en 1988, estudiaron el efecto del INF- γ en el tratamiento de las infecciones que simulan las condiciones clínicas que ocurren después de un trauma abdominal. El INF- γ produjo un aumento muy significativo en la sobrevivencia de los animales infectados experimentalmente con *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* inmediatamente después del trauma producido por una laparotomía (51).

Chen y cols. en 1989, evaluaron el uso del INF- γ recombinante en una infección producida por *Listeria monocytogenes* en animales neonatos, encontrando que una sola dosis de INF- γ puede proteger del reto letal con este microorganismo, la protección mostrada fue dosis dependiente (52).

Mcintyre y cols. en 1989, evaluaron el papel de la IL-1 α recombinante en su capacidad para aumentar la resistencia anti-bacteriana inespecífica en una infección producida posteriormente de la supresión de la médula ósea encontrando que esta monocina produce un aumento en el número de neutrófilos en sangre periférica y un aumento en la resistencia a la infección producida por *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Así se demostró que la IL-1 α tiene la capacidad de recuperar la supresión de la médula ósea inducida por ciclofosfamida, así como de aumentar la resistencia antimicrobiana (53).

Tanaka y cols. en 1989, evaluaron el efecto profiláctico del GM-CSF en ratones tratados con ciclofosfamida e infectados con *Pseudomonas aeruginosa*, la administración de este inmunomodulador produjo un aumento en la proporción de sobrevivientes de los animales infectados lo cual correlacionó con un aumento en la cuenta de leucocitos en sangre periférica y una inhibición del crecimiento bacteriano en varios órganos llegando a niveles no detectables. Este efecto profiláctico puede deberse a una rápida recuperación de la médula ósea y por consecuencia un aumento parcial de la función de los macrófagos producidos por el GM-CSF (54).

Kagaya y cols. en 1989, estudiaron la capacidad del INF- γ recombinante en la activación de la capacidad bactericida de los macrófagos contra *Salmonella typhimurium*, en relación a la fusión fagosoma-lisosoma y a la producción de H₂O₂. Los macrófagos peritoneales de ratones Balb/c fueron incubados con INF- γ a 10 U/ml por 12 y 48 hrs y se encontró que en ambos casos aumentan la actividad bactericida contra *Salmonella typhimurium* aunque la producción de H₂O₂ permaneció sin alterar cuando se incubaron 12 hrs y aumento cuando se incubaron 48 hrs. Además encontraron que a las 2 hrs de la infección, con macrófagos activados por 12 hrs se observó una disminución de la población bacteriana. A las siguientes 6 hrs de la infección, sin embargo, el número de bacterias viables en macrófagos activados permanecen sin cambio. Por otro lado observaron en macrófagos incubados con 10 a 10³ U de IFN- γ por 12 y 48 hrs aumentan la fusión fagosoma conteniendo *Salmonella typhimurium* con lisosomas (55).

Ferrante en 1989, estudio la capacidad del TNF- α para aumentar la muerte de *Torulopsis glabrata* y *Candida albicans* mediada por neutrófilos, encontrándose que esta monocina aumenta significativamente la actividad fungicida de los neutrófilos en una manera dosis dependiente, aunque fueron necesarias dosis mucho más bajas para matar a *Torulopsis glabrata* que las requeridas para matar a

Candida albicans. El aumento máximo de la capacidad fungicida fue obtenido con 20 y 100 U de TNF α para matar a dichos microorganismos, de igual manera se encontró que el aumento de la capacidad fungicida correlacionó con un incremento en la producción de superóxido y de la desgranulación de enzimas y otras proteínas presentes en gránulos azurófilos (56).

Desiderio y cols. en 1989, encontraron que el TNF- α recombinante al administrarse intravenosamente produjo un aumento en la resistencia a un reto letal con *Listeria monocytogenes*. Dicha protección se perdió completamente cuando se trató simultáneamente con un anticuerpo policlonal contra TNF- α pero no se inhibió con el tratamiento de una inmunoglobulina G de otra especificidad (57).

Kurtz y cols. en 1989, realizaron un estudio para probar el efecto combinado y separado de la IL-1 α e IFN- γ en la resistencia a la infección por *Listeria monocytogenes*. Estudiaron los efectos coordinados en la administración de las citoquinas y la máxima protección fue observada cuando IL-1 e IFN- γ fueron administrados al momento del reto con la bacteria. Cuando se comparó el efecto protector separado y combinado de IL-1 α e IFN- γ hasta el final de la infección primaria de *Listeria monocytogenes*, observaron un efecto aditivo de las 2 citoquinas solamente 3 días después del reto, aunque el resultado no implica una acción sinérgica entre las 2 citoquinas. Comparaciones histopatológicas de hígado y bazo entre ratones infectados tratados con citoquinas y un control de ratones infectados con *Listeria monocytogenes*, muestran que el tratamiento con las citoquinas redujo la severidad del daño tisular en ratones infectados tratados con citoquinas (58).

Nakumura y cols. en 1989, evaluaron el efecto de la IL-1 α recombinante en conjunto con la terapia antimicrobiana utilizada en las infecciones sistémicas inducidas por: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Candida albicans* y su utilidad en una infección sistémica producida por *Pseudomonas aeruginosa* con leucopenia asociada, inducida por la administración de ciclofosfamida. Se obtuvieron efectos sinérgicos de la IL-1 α con leftazidime, moxalactam, gentamicina, enoxacina, anfotericina B, miconazol y una preparación de inmunoglobulina al inducir un máximo de protección en estas infecciones (59).

Nakane y cols. en 1990, realizaron un estudio para ver el efecto protector del TNF- α en un modelo de salmonelosis murina. Encontraron un aumento en la capacidad bactericida de polimorfonucleares y macrófagos de cavidad peritoneal con la administración intraperitoneal de 5×10^6 U de TNF- α en ratones 6 a 12 hrs antes del reto con *Salmonella typhimurium*. El tratamiento produjo un ligero incremento en el número de neutrófilos en la cavidad peritoneal, pero no produjo un aumento de macrófagos. El grado de sobrevivencia de ratones infectados con *Salmonella typhimurium* fue mayor cuando se administró por vía intraperitoneal el TNF- α antes de la infección. La coadministración de pequeñas dosis de TNF- α 5×10^3 U e INF- γ (10^3 U) 6 hrs antes del reto también aumentaron efectivamente la actividad bactericida y la protección. El efecto cooperativo de TNF- α e IFN- γ sólo fue visto cuando estas citoquinas recombinantes fueron inyectadas juntas antes del reto. La inyección de suero anti-TNF- α anuló el efecto del TNF- α y el efecto cooperativo del TNF- α e INF- γ (60).

Flesch y cols. en 1990, evaluaron la capacidad de la IL-6 recombinante para activar algunas funciones de los macrófagos derivados de médula ósea para detener el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* y *Micobacterium bovis*. Los macrófagos estimulados con IL-6 y posteriormente infectados por estos microorganismos no inhibieron el crecimiento de estas micobacterias. La inhibición de crecimiento mediada por IL-6 sólo se demostró cuando los macrófagos se trataron inmediatamente después de la infección (61).

Williams y cols. en 1990, estudiaron el papel del TNF- α recombinante en ratones atímicos nu/nu y heterocigotos con neumonitis producida por *Chlamydia trachomatis*. Un anticuerpo monoclonal contra TNF- α fue capaz de neutralizar la actividad en el pulmón y acelerar significativamente la mortalidad de animales infectados. La administración de lipopolisacárido y de TNF- α protegió significativamente de la mortalidad inducida en ratones infectados (62).

Hiroshi y cols. en 1990, estudiaron la eficacia terapéutica del G-CSF sólo y en combinación con un antibiótico en una infección intramuscular inducida por *Pseudomonas aeruginosa* en ratones. El crecimiento bacteriano en el músculo infectado fue suprimido por el tratamiento con G-CSF. El G-CSF puede estimular grandemente los mecanismos de defensa después de la sensibilización con el reto bacterial. Un grupo de ratones tratados con G-CSF mostró más agrupamientos de polimorfonucleares maduros en el músculo del muslo infectado 6 hrs después del reto bacterial. También observaron que en ratones tratados con G-CSF el número

de polimorfonucleares disminuye en la sangre y esto reduce el efecto terapéutico de el antibiótico ceftazidime en ratones (63).

Suzuki y cols. en 1990, evaluaron el efecto del INF- γ recombinante en encefalitis crónica producida por *Toxoplasma gondii* en un modelo murino y encontraron que la administración intravenosa de 6 dosis (5×10^5 U c/u) de INF- γ produjo una disminución marcada en el número y en los focos de células inflamatorias presentes en áreas del parénquima cerebral y en áreas perivasculares un día después de la última inyección correlacionándose con una disminución en el número de taquizoitos presentes en el cerebro. Dicho efecto fue temporal debido a que 2 semanas después aparece nuevamente una inflamación severa en el cerebro (64).

Meding y cols. en 1990, analizaron el efecto del INF- γ durante la infección experimental con *Plasmodium chabaudi chabaudi* en ratones. Encontrando que la administración exógena de INF- γ produjo una ligera disminución así como un retardo parcial de la parasitemia. La neutralización *in vivo* de INF- γ por medio de la administración de una mezcla de anticuerpos monoclonales produjo una infección más pronunciada, mientras que la eliminación *in vivo* de las células T CD4+ productoras de INF- γ no produjo una modificación importante en la infección, sugiriendo que otros factores además de esta molécula pueden estar involucrados en la eliminación de los parásitos (65).

Kulberg y cols. en 1990, realizaron un estudio para evaluar el papel de los granulocitos en la protección inducida por IL-1 α contra una infección sistémica producida por *Candida albicans*. Cuando los ratones fueron inmunosuprimidos por medio de un pretratamiento con ciclofosfamida, acetato de hidrocortisona, o una radiación subletal de cuerpo completo, la administración en estos animales de 80 ng de IL-1 α redujo significativamente el crecimiento de *Candida albicans* en los riñones y en el bazo. Este efecto protector de la IL-1 α fue mantenido cuando se administró 24 hrs antes de la infección, así como al momento de la misma o 6 hrs después en los ratones tratados con ciclofosfamida. El efecto de la IL-1 α fue dependiente de la presencia o reclutamiento de granulocitos dado que se demostró que la IL-1 α inhibe el crecimiento de *Candida albicans* en riñones y bazo de animales con una granulocitopenia severa (66).

Denis, en 1991, encontró que la estimulación *in vitro* con TNF- α y el GM-CSF en monocapas de macrófagos infectados con *Mycobacterium lepraemurium* producen una restricción del crecimiento intracelular de esta micobacteria, dicho efecto fue

dependiente de la dosis para ambas citoquinas. 10^3 U de ambas citoquinas producen una reducción del crecimiento del 40 al 50 % con respecto al control (67).

Denis, en 1991, probó el efecto del INF- β recombinante en la resistencia de los ratones a la infección con *Mycobacterium avium*. Al inocular ratones con 10^3 U de INF- β después de haber sido infectados con *Mycobacterium avium* encontraron una resistencia mayor a la infección, y se determinó que fue debido a una reducción en el crecimiento bacteriano en el hígado y bazo de animales infectados. Esto fue comprobado por el hecho de que los macrófagos peritoneales tratados con INF- β 10^3 U *in vitro* fueron más bacteriostáticos para *M. avium* que los macrófagos no tratados (68).

Zhan y cols. en 1991, estudiaron el efecto de la IL-1 α en la profilaxis y tratamiento de la brucelosis experimental, y observaron que IL-1 α administrada a ratones 4 hrs antes de la infección con *Brucella abortus* redujo el crecimiento de la bacteria en hígado y bazo. Sin embargo, la misma dosis (10^4 U) o 10 veces más alta no fue capaz de reducir el número de bacterias cuando se administró a ratones infectados crónicamente. La inyección de IL-1 α en ratones normales indujo 2 hrs después un incremento en la actividad estimuladora de la colonia en suero. Los niveles de factor estimulador de la colonia bajaron pero permanecieron más altos que el normal por 12 hrs. Como resultado del tratamiento con IL-1 α , el número de células formadoras de colonia, especialmente en el bazo se incrementó en ratones normales e infectados aguda y crónicamente (69).

McCabe y cols. en 1991, realizaron un estudio para ver el efecto del INF- γ en la infección aguda y crónica causada por *Trypanosoma cruzi* en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida. Encontraron que en los ratones tratados con ciclosporina a los que se les inoculó *T. cruzi* después de que se les había administrado INF- γ , se disminuye la parasitemia y se previene la muerte en la mayoría de los ratones. Se encontraron pocos cultivos positivos para *T. cruzi* en bazo y corazón en ratones tratados con ciclosporina e INF- γ . El INF- γ activó a macrófagos a pesar del tratamiento con ciclosporina (70).

GENERALIDADES DE LIPOSOMAS

Hace tres décadas que el estudio de las propiedades físicas de los componentes membranales condujo al descubrimiento de ciertas estructuras vesiculares cerradas espontáneamente en dispersiones acuosas de lipidos, dichas estructuras fueron denominadas "Liposomas" por su descubridor, Alec D. Bangham en 1961. Por mucho tiempo los liposomas fueron utilizados como modelos de membranas biológicas para realizar investigaciones básicas en bioquímica de membranas y mecanismos de transporte, sin embargo, desde hace ya varios años los liposomas se han venido utilizando como un medio potencial para introducir deliberadamente materiales en el compartimiento intracelular con lo cual se a llamado rapidamente la atencion a los biólogos celulares, moleculares, farmacólogos e inmunólogos y en general a todos los investigadores en biomedicina. (71). De acuerdo a la definición mas utilizada, los liposomas son vesículas artificiales microscópicas formadas de uno o mas fosfolípidos, de tres clases diferentes, las vesículas multilamelares grandes (VMG), las vesículas unilamelares pequeñas (VUP) y las vesículas unilamelares grandes (VUG), diferenciadas exclusivamente por su tamaño y cantidad de lamelas internas.

TIPOS Y METODOS DE PRODUCCION DE LIPOSOMAS

TIPO DE LIPOSOMA	METODO
VESICULAS MULTILAMELARES GRANDES	AGITACION MECANICA CONGELACION -ENFRIAMIENTO EVAPORIZACION DE SOLVENTES Y SONICACION
VESICULAS UNILAMELARES PEQUEÑAS	SONICACION PRENSA FRANCESA INYECCION ETANOLICA DE FOSFOLIPIDOS EN AGUA ELIMINACION DE DETERGENTES POR FILTRACION EN GEL
VESICULAS UNILAMELARES GRANDES	DISPERSION DE LIPIDOS ACIDOS INFUSION EN ETER FUSION POR CALCIO VAPORIZACION DE SOLVENTES EVAPORACION EN FASE REVERSA FILTRACION EN MEMBRANA LIOFILIZACION -REHIDRATAACION

Los liposomas proporcionan un sistema acarreador de moléculas con propiedades que los distinguen de los demás sistemas para transportar o dirigir drogas, dichas características los convierten en los vehículos ideales(72).

CARACTERISTICAS DE LOS LIPOSOMAS COMO ACARREADORES DE DROGAS

CARACTERISTICAS GENERALES

RELATIVA FACILIDAD DE PREPARACION
SON FACILMENTE METABOLIZABLES
NO SON TOXICOS Y ANTIGENICOS
LA FORMA, EL TAMAÑO Y LA CARGA PUEDEN SER PREDEFINIDOS
LAS MOLECULAS SON ATRAPADAS SIN UNION QUIMICA
MOLECULAS LIPOSOLUBLES E HIDROSOLUBLES PUEDEN SER INCORPORADAS
LAS MOLECULAS SON PROTEGIDAS DE LA DEGRADACION O INACTIVACION
SON UN SISTEMA CONTROLADO DE LIBERACION DEPENDIENTE DEL TIEMPO
INGREMENTAN LA INCORPORACION DE MOLECULAS AL CITOPLASMA
RETARDAN LA METABOLIZACION DE MOLECULAS
PROLONGAN LA VIDA MEDIA DE LAS MOLECULAS EN CIRCULACION
PUEDEN CONTROLAR LA DISTRIBUCION DE MOLECULAS EN EL ORGANISMO
LAS MOLECULAS PUEDEN SER ENVIADAS A BLANCOS ESPECIFICOS EN EL ORGANISMO

Los liposomas pueden interactuar con las células de varias maneras, por adsorción inespecífica o mediada por ligandos específicos tales como los anticuerpos, hormonas y lectinas. También puede llevarse a cabo un intercambio de lípidos entre el liposoma y la membrana plasmática o pueden ser endocitados o fusionados. Cuando los liposomas son administrados *in vivo* ellos se remueven de la circulación principalmente por las células fagocíticas y transportados a los órganos del sistema retículo endotelial y una pequeña cantidad puede distribuirse a otros órganos, este patrón de distribución puede manipularse modificando algunas características de los propios liposomas como son tipo de fosfolípido, presencia de ligandos específicos, tamaño, carga y cantidad de liposomas administrados. En general, los liposomas pueden ser utilizados de dos maneras diferentes: 1) Para introducir agentes en las células que actúen contra residentes no deseables, los cuales pueden ser microorganismos o sustancias químicas. 2) Para introducir agentes, los cuales activen la muerte de la célula u otras propiedades de la misma. En ambos casos, se han obtenido aportaciones considerables con la utilización de los liposomas con el objeto de mejorar la eficiencia de los agentes antimicrobianos, quimioterapia antitumoral e inmunomoduladores, su uso como tal, en estas áreas de la terapéutica médica, representa una de las aplicaciones más fascinantes desde su descubrimiento.(73, 74, 75, 76, 77).

APLICACION DE LIPOSOMAS COMO ACARREADORES DE MACROMOLECULAS EN BIOMEDICINA

ACARREADORES DE:	AREA ESPECIALIZADA
AGENTES ANTIMICROBIANOS	TERAPIA ANTIMICROBIANA
DROGAS CITOTOXICAS	QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL
INMUNOMODULADORES	TERAPIA BIOLOGICA INMUNOTERAPIA
ANTIGENOS	VACUNAS
AGENTES DE CONTRASTE Y DE IMAGEN	IMAGEN DIAGNOSTICA
GENES, DNA ANTISENIDO Y RIBOZIMAS	TERAPIA GENICA
AGENTES COSMETICOS	TERAPIA BIOCOSMETICA

LIPOSOMAS EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La capacidad de los liposomas de funcionar como acarreadores de drogas, ha sido rápidamente utilizada para mejorar la efectividad terapéutica de algunas drogas utilizadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Este tipo de drogas encapsuladas en liposomas han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades producidas por hongos, bacterias y parásitos en modelos experimentales en animales.

La utilidad de los liposomas en este campo fue demostrada hace algunos años por el tratamiento de leishmaniasis en ratones con drogas antimoniales encapsuladas en liposomas. Alving y cols., así como, New y cols. en 1978, encontraron independientemente que estas drogas encapsuladas en liposomas reducen significativamente su toxicidad e incrementan de 700-1800 veces su efectividad de curar la infección en comparación con la droga libre (78).

Desde entonces, un sinnúmero de agentes antimicrobianos han sido encapsulados en liposomas, pero los resultados más importantes han sido obtenidos con el encapsulamiento de antibióticos aminoglucósidos para el tratamiento de patógenos intracelulares o facultativos, buscando mejorar la eficiencia antimicrobiana del antibiótico incrementando la cantidad del mismo en las células o en los tejidos donde se multiplica el patógeno.

**ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS UTILIZADOS CONTRA
PATOGENOS INTRACELULARES**

PATOGENO	ANTIBIOTICO LIPOSOMAL
<i>Mycobacterium avium</i>	RIFAMPICINA
<i>Candida albicans</i>	ANFOTERICINA-B
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ANFOTERICINA-B
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ESTREPTOMICINA
<i>Brucella canis</i> <i>Brucella abortus</i>	ESTREPTOMICINA
<i>Salmonella enteritidis</i>	ESTREPTOMICINA
<i>Salmonella typhimurium</i>	CEPHALOTINA
<i>Listeria monocytogenes</i>	AMPICILINA
<i>Mycobacterium avium</i>	AMIKACINA
<i>Staphylococcus aureus</i>	PIPERACILINA
<i>Escherichia coli</i>	CLORAMFENICOL
<i>Mycobacterium avium-intracelulare</i>	CIPROFLOXACINA
<i>Mycobacterium avium</i>	GENTAMICINA

De estos estudios observamos que uno de los sistemas comunmente utilizados para evaluar la efectividad relativa del antibiótico libre contra el antibiótico en liposomas es evaluando la multiplicación o eliminación del patógeno en macrófagos infectados *in vitro*, todos los estudios indican que el antibiótico liposomal elimina la bacteria intracelular de los macrófagos mas eficientemente que el antibiótico libre. En otros estudios, donde se ha evaluado la efectividad *in vivo* de antibióticos encapsulados en liposomas, se ha encontrado la misma diferencia observada *in vitro* de la forma liposomal del antimicrobiano. En ratones infectados experimentalmente con patógenos intracelulares los antimicrobianos

encapsulados en liposomas mejoran el tiempo de sobrevivencia de los animales en relación a la droga libre, también se han obtenido reducciones importantes en el número de bacterias presentes en los órganos infectados.

Los tres antimicrobianos con los cuales se han obtenido mayores éxitos en su evaluación preliminar en modelos experimentales, actualmente están en fase clínica, tales son los casos del muramíl tripéptido lipofílico, la anfotericina-B y la gentamicina. En los próximos años, la utilización de liposomas en enfermedades infecciosas podrá ser una de las áreas que tengan un mayor número de drogas en evaluación o quizás estén disponibles en el mercado para el tratamiento de estas enfermedades.

**DROGAS EN LIPOSOMAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
EN ENSAYOS CLINICOS**

PRODUCTO	ENFERMEDAD	COMPAÑIA	PAIS	ESTADO CLINICO
MTP-LIPOSOMAS	INFECCIONES VIRALES	CIBA-GEIGY	U.S.	FASE II
ANFOTERICINA-B LIPOSOMAL	INFECCIONES SISTEMICAS HONGOS	M.D. ANDERSON HOSPITAL	U.S.	FASE I
ANFOTERICINA-B LIPOSOMAL	INFECCIONES SISTEMICAS HONGOS	SQUIBB LIPOSOME COMPANY	U.S.	FASE I
GENTAMICINA LIPOSOMAL	INFECCIONES GRAM- NEGATIVAS	THE LIPOSOME COMPANY	U.S. / EUROPA	FASE II Y III

MATERIAL Y METODOS

BACTERIA.

La bacteria *Salmonella enteritidis* se obtuvo del cepario del Laboratorio de Bacteriología General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. La bacteria se mantuvo en agar soya tripticasa con 0.1 % desoxicolato de sodio en refrigeración a 4^o C. Se realizaron resiembras periódicas cada mes para su mantenimiento. La patogenicidad de la bacteria fue asegurada por pasajes continuos en el bazo de ratones.

ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Para la realización de este estudio se usaron ratones de la cepa Balb/c de 4-8 semanas de edad, con un peso aproximado de 20 g., los cuales fueron obtenidos de la Unidad de Investigaciones Biomedicas de Occidente, del IMSS, Guadalajara, Jalisco. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones de agua y alimentos controlados.

OBTENCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Salmonella enteritidis*.

La extracción de proteínas de membrana externa se realizó por medio del siguiente metodo:

- 1.- Se realizó un cultivo de *Salmonella enteritidis* de 16-18 hrs en caldo soya tripticasa en agitación a 150 rpm y 37^oC, tiempo durante el cual el cultivo alcanza una densidad optima de 0.8-1.0 unidades.
- 2.- El cultivo se centrifugó a 6000 rpm/15 min a 4^oC para obtener una pastilla de bacterias.
- 3.- La pastilla se resuspendió en 20 ml de HEPES 10mM, pH 7.4 y se centrifugó a 6000 rpm/15 min (este paso se repitió 2 veces descartando el sobrenadante).
- 4.- Se resuspendió la pastilla nuevamente en 10 ml de HEPES 10 mM, pH 7.4 para someter las bacteria a sonicación en un Homogenizador ultrasonico (Cole-Parmer) durante 10 ciclos de 1 min a intervalos de 30 seg, o hasta que la densidad óptica alcanzó la mitad de la original.

- 5.- Se centrifugó a 5000 rpm/20 min colectando exclusivamente el sobrenadante (este paso fue repetido 2 veces).
- 6.- Los sobrenadantes colectados se centrifugaron a 45000 rpm/45 min a 5°C en una Ultracentrifuga Beckman L5-50E con un rotor 50 Ti.
- 7.- Se resuspendió la pastilla en HEPES 10mM, pH 7.4 y se centrifugó a 45000 rpm/45 min (este paso se repitió 2 veces).
- 8.- La pastilla se resuspendió nuevamente en HEPES 10 mM, Triton X-100 2% para luego centrifugar a 45000 min rpm/45 min.
- 9.- La pastilla se reconstituyó con 10 ml de TRIS 50 mM, EDTA 5mM, Triton X-100 2%, pH 7.8 y se incubó durante 15 min.
- 10.- Se realizó una ultima centrifugación a 45000 rpm/45 min.
- 11.- La pastilla se resuspendió en 1 ml de HEPES 10mM, pH 7.4 y se guardó en refrigeración hasta el momento de utilizarla.

OBTENCION DE INMUNOMODULADORES.

INTERLEUCINA-2:

La interleucina-2 (IL-2) humana recombinante altamente purificada se obtuvo de Cetus Corporation (Emeryville, C.A.) conteniendo una actividad específica de 3.9×10^6 U/mg. Esta proteína proviene del gene de IL-2 humana clonado de la línea celular Jurkat expresado en *Escherichia coli*. La interleucina-2 fue reconstituida con agua bidestilada estéril a una concentración de 1×10^6 U/ml. Una unidad de IL-2 es expresada como el recíproco de la dilución que induce el 50% de la proliferación máxima en la línea celular HT-2, y es equivalente a 2.3 unidades del Programa de Modificadores de la Respuesta Biologica del Instituto Nacional del Cancer, USA. La cantidad de endotoxina fue menor de $0.03 \text{ ng}/10^6 \text{ U}$ determinado por la prueba de Limulus. Esta cantidad de endotoxina presente en el producto recombinante es tan pequeña que no induce un efecto significativo.

FACTOR DE TRANSFERENCIA ESPECIFICO (FTe):

La producción de FTe para las proteínas de membrana externa de *Salmonella enteritidis* (PME) se realizó con una modificación del método descrito por S.Lawrence (79).

- 1.- Se utilizó un bazo de bovino, el cual se lavó previamente con PBS conteniendo 0.1% de penicilina y estreptomina.
- 2.- El bazo se cortó en pequeños pedazos (3 cm), los cuales se maceraron para la liberación de los linfocitos.
- 3.- Las células se colectaron en frascos de polipropileno de 250 ml, de los cuales se tomó una muestra para realizar una cuenta de linfocitos en cámara de newbauer.
- 4.- Los linfocitos se ajustaron a una densidad celular con el propósito de determinar el número de unidades de FTe obtenidas del total de células recuperadas (1 U FT=1×10⁹ linfocitos).
- 5.- La suspensión de linfocitos se estimuló con las proteínas de membrana externa (PME) a una concentración de 1 mg/ml por un período de 6-8 hrs a 37°C.
- 6.- Las células se centrifugaron a 2000 rpm/15 min, utilizando una centrífuga refrigerada Bekman modelo J2-21 con un rotor JA-14.
- 7.- El paquete celular obtenido se sometió a un proceso de congelación y descongelación por un período de 10-12 ciclos utilizando una mezcla de alcohol-acetona (1:1 vol/vol) en CO₂ líquido y un baño maría a 37°C.
- 8.- El extracto obtenido se sometió a diálisis por un período de 24 hrs a 4°C contra agua destilada estéril.
- 9.- La fracción dializable se colocó en viales estériles de 50 ml con el volumen apropiado para obtener una unidad por vial y posteriormente se liofilizaron usando un equipo Virtis Co.Inc.
- 10.- Los viales se almacenaron a -20°C hasta su utilización.
- 11.- De igual manera se produjo un dializado control en el cual se utilizó la misma cantidad de PME de *Salmonella enteritidis* con el propósito de excluir que algún efecto estimulante presente en el FTe sea debido a restos o a pequeños péptidos de las proteínas.

CUANTIFICACION DE LAS PME DE *Salmonella enteritidis* POR METODO DE LOWRY.

- 1.- Se colocó en un tubo 0.5 ml de la muestra de PME de *Salmonella enteritidis* y se agregó 0.5 ml de NaOH 1N, mezclándose rápidamente.
- 2.- Los tubos se colocaron en baño de agua hirviendo durante 5 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
- 3.- Se agregaron 2.5 ml del reactivo que contiene Na₂CO₃ 5% y CuSO₄ 5H₂O al 5% en una solución de tartrato de sodio y potasio al 1% dejándolo reposar por 1 min.
- 4.- Se agregaron 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N.
- 5.- De la misma manera se trató un blanco conteniendo 0.5 ml de agua bidestilada en lugar de la muestra y una serie de proteínas estandar de 50-200 µg/ml de albúmina serica bovina.
- 6.- Se incubó por un período de 30 min, para que se desarrollara completamente el color .
- 7.- Posteriormente se determinó la densidad óptica a 750 nm en un espectrofotómetro UV/Visible Beckman modelo 25.
- 8.- La confiabilidad y reproducibilidad de la prueba se verificó utilizando un análisis de regresión lineal simple relacionando la densidad óptica y la concentración en µg/ml de cada uno de los estandares.

CUANTIFICACION DE LA IL-2 RECOMBINANTE POR EL METODO DE ACIDO BICINCONINICO.

- 1.- Se agregó 0.1 ml de la proteína estandar (50-1000 µg/ml de albúmina serica bovina) para el blanco se añadió 0.1 ml de agua bidestilada y 0.1 ml de la muestra (IL-2 recombinante).
- 2.- Se añadieron 2 ml del reactivo de trabajo (50 partes reactivo A con una parte del reactivo B, reactivo A: Na₂CO₃.H₂O 2%, NaHCO₃ 0.95%, BCA-Na₂ 1%, Na₂-tartrato 0.16% y NaOH 0.4%, el reactivo B: CuSO₄) y se mezcló en un vortex.
- 3.- Se incubaron los tubos a 37°C/30 min.
- 4.- Se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
- 5.- Se obtuvo la absorbancia a 562 nm en un Espectrofotómetro Beckman modelo 25 usando como referencia agua bidestilada.
- 6.- A la absorbancia de todas las muestras del estandar y al problema se le resto la absorbancia del blanco.

7.- La confiabilidad y reproducibilidad de la prueba se verificó utilizando un análisis de regresión lineal simple relacionando la densidad óptica y la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los estándares.

CARACTERIZACION DE LA IL-2 RECOMBINANTE Y LAS PME DE *Salmonella enteritidis* POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS.

- 1.- La preparación de las muestras se realizó mezclando 50 μl las proteínas con 50 μl de amortiguador de muestra conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 6.8, 15% de glicerol, 50% SDS, 0.02% azul de bromofenol y β -mercaptoetanol. Las muestras se sometieron a ebullición por un período de 3-5 min.
- 2.- Se prepararon 30 ml del gel separador al 10% mezclando 12.6 ml de agua bidestilada, 7.5 ml de amortiguador Tris pH 8.8 y 9.9 ml de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%), 300 μl de persulfato de amonio y 22.5 μl de TEMED; se mezclaron rápidamente y se añadieron a las placas de vidrio montadas apropiadamente con separadores para generar un gel delgado.
- 3.- Después de polimerizado el gel separador se prepararon 10 ml de un gel concentrador al 5% mezclando 5.82 ml de agua bidestilada, 2.5 ml de amortiguador Tris pH 6.8, 1.66 ml de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%), 100 μl de persulfato de amonio y 10.0 μl de TEMED, se adicionaron sobre el gel separador e inmediatamente se colocó el peine con dientes de teflón para que al polimerizar el gel se definan los carriles de las muestras.
- 4.- El gel polimerizado en las placas de vidrio se colocó en el tanque de la cámara Protean II modelo 3000X de Bio-Rad; dicha cámara fue llenada con amortiguador de corrimiento que contiene glicina, Tris y SDS. Posteriormente las muestras fueron colocadas en los carriles correspondientes utilizando una microjeringa Hamilton, de igual manera fueron colocadas un grupo de proteínas como marcadores de peso molecular obtenidas del kit MH-SDS-200 (Sigma Chemical Co.). Anhidrasa carbonica 29 kd, albumina bovina 66 kd, fosforilasa B 97.4 kd, β -galactosidasa 116 kd y miosina 205 kd.
- 5.- La cámara Protean II fue conectada a una fuente de poder y el gel fue corrido bajo condiciones de voltaje constante (100 volts) durante 5-6 hrs.
- 6.- Al terminar el corrimiento electroforético el gel fue separado desensamblando las placas de vidrio y fue teñido en una solución de azul de Coomassie al 0.25% en metanol-acido acético por un periodo de 30 min con agitación suave.
- 7.- El gel posteriormente fue colocado en una solución desteñidora que contiene

CUENTA EN PLACA POR MEDIO DEL METODO DE DIFUSION:

- 1.- Se prepararon placas de agar soya tripticasa con 0.1% de desoxicolato de sodio como inhibidor de gram(+).
- 2.- Se prepararon tubos de ensaye de 13x100 con tapón metálico conteniendo 2 ml de agar soya tripticasa solidificado, al momento de realizar el conteo, los tubos se colocaron en un baño de agua a 50°C.
- 3.- Al tiempo cero de la cinética se tomo 1 ml de la muestra y se realizaron diluciones en solución salina estéril.
- 4.- De la dilución 10^{-2} se tomo 0.1 ml y se vació en un tubo de agar licuado.
- 5.- Se agitó fuertemente el tubo en un vortex y se vació en la placa de agar de manera que quedara bien distribuido el agar, se incubó a 37°C por 24 hrs y se contaron el número de colonias (éste procedimiento se realizó por duplicado).
- 6.- Se realizó cuenta en placa cada 2 hrs durante el crecimiento del cultivo hasta que alcanzó la fase estacionaria, variando solamente las diluciones realizadas.
- 7.- Se tabularon los resultados de las lecturas y las cuentas en placa.
- 8.- Se graficaron los resultados y se obtuvo el tiempo de duplicación y velocidad de crecimiento.
- 9.- La bacteria en fase log se utilizó para la determinación de la LD100.

DETERMINACION DE LA LD100:

- 1.- Se realizaron diluciones $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ de la bacteria en fase log de crecimiento (0.6-1.0 unidades de densidad óptica) en solución salina estéril conteniendo peptona al 5%.
- 2.- Apartir de las diluciones se realizó un conteo en placa en agar soya tripticasa de la misma manera como se mencionó en la cinetica de crecimiento.
- 3.- De cada una de las diluciones se inocularon 0.5 ml por vía intraperitoneal a grupos de 10 ratones usando jeringas de 1 ml.
- 4.- Posteriormente se monitoreó la sobrevivencia en cada uno de los grupos inoculados con la dilución respectiva, registrando la sobrevivencia hasta un período de 7 días después del reto.
- 5.- La dosis letal 100% se determinó como el número mínimo de bacterias necesarias para matar al total de la población de ratones por grupo.

CINETICA DE INFECCION DE *Salmonella enteritidis* EN HIGADO Y BAZO:

- 1.- Se inocularon 0.5 ml de la LD100 de *Salmonella enteritidis* por vía intraperitoneal a un grupo de 20 ratones.
- 2.- Cada 4 hrs después del reto letal se sacrificaron 3 ratones.
- 3.- El hígado y el bazo se obtuvieron bajo condiciones asépticas, los cuales se homogenizaron en 50 ml de solución salina estéril en tubos cónicos de polipropileno.
- 4.- Apartir del homogenizado se realizaron varias diluciones desde 10^{-1} - 10^{-6} , de cada dilución se tomaron 0.1 ml para determinar el número de bacterias en agar XLD por el metodo de difusión.
- 5.- Se registro el número de bacterias a las 24 hrs.
- 6.- Los resultados fueron expresados como Log10 de UFC de *Salmonella enteritidis* por órgano de la media \pm error estándar de la media.

EFEECTO DE ENDOTOXINA EN LA INFECCION PRODUCIDA POR *Salmonella enteritidis*.

- 1.- La cantidad de bacteria que corresponde a un LD100 (2.4×10^7 bacterias) fue colocado a $100^{\circ}\text{C}/15$ min en un baño de agua.
- 2.- Se tomaron 0.1 ml para realizar cuenta en placa directa en agar XLD.
- 3.- Se inoculo un grupo de 10 ratones por via intraperitoneal con la bacteria muerta por calor.
- 4.- A la vez se inoculó otro grupo con 0.5 ml de solución salina estéril con peptona al 5%.
- 5.- Se observó la sobrevivencia de los animales hasta 7 dias después del reto con la bacteria muerta.

ANALISIS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LA INFECCION PRODUCIDA POR *Salmonella enteritidis* EN HIGADO Y BAZO.

- 1.- Se inocularon 0.5 ml de la LD100 por vía intraperitoneal a un grupo de 10 ratones.
- 2.- Los animales infectados se sacrificaron a las 4, 8, 16, 20, 24 hrs después del reto letal.
- 3.- El hígado y el bazo obtenidos se cortaron en pedazos pequeños de 1 mm^3

- aproximadamente y se colocaron en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 con 2.5% de glutaraldehído para su fijación por 4 hrs a 4°C.
- 4.- Las piezas de tejido se post-fijaron en tetróxido de osmio 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M con sacarosa al 3% durante 1:30 hrs.
 - 5.- Las piezas se sometieron a un proceso de deshidratación iniciando con etanol 70%, 80%, 90%, 95% por 5 min en cada uno y etanol absoluto 3 veces por 5 min.
 - 6.- Se realizó una pre-inclusión colocando las muestras en óxido de propileno 2 veces por 15 min y después en una mezcla de óxido de prolipropileno-resina en una relación 3:1, 2:1, 1:1 por 30 min en cada uno.
 - 7.- Después la mezcla se incluye en resina Medcast en moldes para producir bloques duros al polimerizar por 48 hrs a 70°C en una estufa.
 - 8.- Los bloques son cortados en un ultramicrotomo manual utilizando cuchillas de vidrio, los cortes semifinos obtenidos son teñidos con azul de toluidina 1% y observados al microscopio óptico.
 - 9.- Los cortes finos son colocados en rejillas de cobre los cuales son teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo en presencia de vapores de NaOH.
 - 10.- Los cortes teñidos son observados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss.
 - 11.- Las placas fotográficas se revelan utilizando dektol 1:1 con agua destilada en agitación constante a 20°C por 5-7 min.
 - 12.- Los negativos se copian en papel Kodabromide RC II F2 utilizando un quipo proyector y se revelan nuevamente en Dektol por 1 min a 20°C.

ENCAPSULAMIENTO DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE Y FTe EN LIPOSOMAS.

- 1.- Se colocaron en un matraz estéril de 25 ml, 150 ul de fosfatidilcolina y .0023 g de ácido fosfatídico, se disolvieron en 1-2 ml de cloroformo y se mezclaron en un vortex por 30 min.
- 2.- La mezcla se sometió a un flujo de nitrógeno para evaporar el cloroformo y formar una película de fosfolípidos durante 15-30 min.
- 3.- La película fue hidratada con 1 ml de agua destilada estéril conteniendo 1×10^6 U (250 µg/ml) de IL-2 recombinante y en otros experimentos 1-2 U FTe.
- 4.- La suspensión fue agitada vigorosamente en un vortex durante 20-30 min, hasta que se disolvió completamente la película de fosfolípidos.

- 5.- La suspensión de vesículas fue sujeta a 5 ciclos de congelación en un baño de hielo seco-etanol y descongelación en un baño de agua a 40°C.
- 6.- Las vesículas multilamelares resultantes se aplicaron a un equipo de extrusión (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) usando membranas de policarbonato (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA.) con un poro de 100 nm de diámetro.
- 7.- Las vesículas fueron colocadas a la cámara central arriba de las membranas y luego se aplicó una presión de 100-500 lb/in² de nitrógeno con un cilindro de gas equipado con un regulador de alta presión.
- 8.- Los liposomas unilamelares se reinjectaron al equipo de extrusión por 10 veces para uniformizar el tamaño.
- 9.- Los liposomas obtenidos se colocaron en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a 4°C hasta su utilización por un período no mayor de 7 días después de su fabricación.

SEPARACION DE LA INTERLEUCINA-2 Y DEL FTe LIBRES Y ATRAPADOS EN LIPOSOMAS UNILAMELARES.

- 1.- Se realizó la hidratación de Sephadex G-50 en amortiguador de fosfatos salino 0.1 M pH 7.4 durante 16-18 hrs.
- 2.- Se preparó una jeringa estéril de 5 ml colocándole en el fondo una malla metálica de soporte para el Sephadex (minicolumna).
- 3.- La minicolumna se llenó 3/4 partes con Sephadex G-50 y se colocó en un tubo cónico estéril de 15 ml.
- 4.- Se agregaron 2 ml de las preparaciones de liposomas producidos durante el encapsulamiento de IL-2 y FTe.
- 5.- La minicolumna se centrifugó a 1200 rpm/3 min, el eluido obtenido se denominó E-1 (esta fracción contiene los liposomas con IL-2 o el FTe atrapados).
- 6.- La IL-2 o el FTe no atrapados retenidos en la columna fueron eluidos agregando 2 ml de amortiguador de fosfatos salino y repitiendo la centrifugación, esta fracción fue denominada E-2.
- 7.- Las fracciones E-1 y E-2 se guardaron a 4°C hasta su utilización, para la cuantificación de la IL-2 por el método del ácido bicinónico como se describió anteriormente y la cuantificación del FTe atrapado en liposomas se realizó por el método de orcinol como se describió antes.

CARACTERIZACION DE LAS PREPARACIONES LIPOSOMAS CON IL-2 Y FTe ATRAPADOS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

- 1.- Un alicuota de liposomas con IL-2 o FTe atrapados fueron colocados sobre una rejilla de cobre de 200 mallas con un soporte de parlodion recubierta con carbon.
- 2.- Las rejillas se dejaron secar durante 5-10 min a temperatura ambiente.
- 3.- Se coloco una solucion de acetato de uranilo saturada o al 2% sobre la rejilla y se dejo tenir durante 1-3 min.
- 4.- La rejilla fue observada y fotografiada en un Microscopio Electronico de Transmision Carl Zeiss EM 95-2 del Departamento de Microscopia Electronica de la F.C.B. de la U.A.N.L.

DETERMINACION DEL EFECTO PROTECTOR DE LA INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE LIBRE Y ATRAPADA EN LIPOSOMAS.

- 1.- Se evaluo el efecto protector de las siguientes preparaciones de IL-2 en ratones infectados con *Salmonella enteritidis*:
 - a.- IL-2 libre 10 μg /raton.
 - b.- IL-2 libre 25 μg /raton.
 - c.- IL-2 libre 50 μg /raton.
 - d.- IL-2 libre 100 μg /raton.
 - e.- Albumina serica bovina 50 μg /raton.
 - f.- IL-2 atrapada en liposomas a la dosis de optimo efecto protector/raton.
 - h.- Liposomas vacios ajustados a la misma concentracion de fosfolipidos/raton.
- 2.- Las dosis mencionadas fueron inyectadas a grupos de 10 ratones por via intraperitoneal 2 hrs antes del reto letal con la bacteria inoculada por la misma via. En algunos experimentos la IL-2 fue inyectada a diferentes tiempos 2, 4, 6, 12 hrs antes dela injeccion de la bacteria.
- 3.- La sobrevivencia fue monitoreada en cada grupo de ratones hasta un periodo de 7 dias despues del reto letal.
- 4.- Los resultados fueron expresados como % de sobrevivencia a 7 dias despues del reto letal para cada una de las dosis administradas.

DETERMINACION DEL EFECTO PROTECTOR DEL FTe LIBRE Y ATRAPADO EN LIPOSOMAS.

- 1.- Se evaluo el efecto protector de las siguientes preparaciones de FTe en ratones infectados con *Salmonella enteritidis*, de acuerdo al siguiente protocolo:
 - a.- FTe libre 1 unidad/raton.
 - b.- FTe libre 2 unidad/raton.
 - c.- Control-PME 1 unidad/raton.
 - d.- FTe atrapado en liposomas 1 unidad/raton.
 - e.- Liposomas vacios a una concentracion igual de fosfolipidos/raton.
- 2.- Las dosis mencionadas fueron inyectadas a grupos de 10 ratones por via intraperitoneal 2 hrs antes del reto letal con la bacteria. En algunos experimentos el FTe fue inyectado a diferentes tiempos 2, 4, 6 hrs antes del reto letal.
- 3.- La sobrevivencia fue monitoreada en cada uno de los grupos de ratones hasta un periodo de 7 dias despues del reto letal.
- 4.- Los resultados fueron expresados como % de sobrevivencia a 7 dias despues del reto letal para cada una de las dosis administradas.

ANALISIS HISTOLOGICO EN ORGANOS INFECTADOS DE RATONES PROTEGIDOS CON IL-2 Y FTe LIBRES Y ATRAPADOS EN LIPOSOMAS.

- 1.- Los ratones protegidos con IL-2 y FTe libres y en liposomas de la infeccion letal producida *Salmonella enteritidis* fueron sacrificados a los 7-9 dias despues del reto letal.
- 2.- El higado y bazo fueron obtenidos en condiciones asepticas y colocados en formol 10% para su fijacion durante 12 hrs a 4 °C.
- 3.- Las piezas se deshidrataron en alcohol a concentraciones crecientes que van desde 70%,80%,90% y absoluto durante 1:30 hrs en cada uno, posteriormente se colocaron en xilol I y II por 1:30 y 2 hrs respectivamente.
- 4.- Enseguida las piezas fueron pre-incluidas en parafina I y II durante 1:30 hrs en cada una, posteriormente las piezas se colocaron en parafina III para su inclusion definitiva dejandose solidificar durante 2 hrs a temperatura ambiente.
- 5.- Los bloques con las piezas incluidas fueron cortadas en un microtomo y los cortes obtenidos se colocaron en porta objetos recubiertos con albumina de meyer.
- 6.- Los cortes fueron tenidos con Hematoxilina y Eosina.

7.- Los cortes tenidos se montaron en resina y posteriormente fueron observados y fotografiados en un microscopio binocular Carl Zeiss adaptandole una camara Nikon de 25 mm.

ANALISIS DE LAS ALTERACIONES HISTOLOGICAS PRODUCIDAS EN TEJIDOS POR LA ADMINISTRACION IL-2 RECOMBINANTE LIBRE Y ATRAPADA EN LIPOSOMAS.

- 1.- La IL-2 libre y atrapada en liposomas fue inyectada en ratones normales por via intraperitoneal a la dosis que ejercio el optimo efecto protector contra la infeccion letal producida por *Salmonella enteritidis*.
- 2.- Los ratones fueron sacrificados a las 24 hrs despues de la administracion de la IL-2.
- 3.- El higado, bazo, rinon, corazon y pulmón fueron obtenidos bajo condiciones asepticas.
- 4.- Los tejidos fueron fijados en formol 10% durante 12 hrs.
- 5.- Los tejidos fueron deshidratados e incluidos en parafina como se describio anteriormente.
- 6.- Los cortes obtenidos fueron procesados por Hematoxilina y Eosina.
- 7.- los cortes tenidos fueron observados para detectar alguna alteracion histologica relacionada con algun efecto toxico inducido por la administracion de IL-2 en forma libre y atrapada en liposomas.

RESULTADOS

Los inmunomoduladores usados en este estudio se obtuvieron de la siguiente manera; como fuente de Interleucina-2 recombinante se utilizó una preparación comercial de Cetus Corp. que contiene una proteína de 15 kd , altamente homogénea, y con una actividad biológica de inducir la activación y proliferación de linfocitos T, mientras que el Factor de Transferencia específico se produjo en nuestro laboratorio bajo los métodos que se han establecido desde hace algunos años para la producción de este biológico con fines de terapia en humanos. Con la finalidad de producir un FT específico para el patógeno utilizado en el modelo experimental, se decidió utilizar las proteínas de membrana externa de *Salmonella enteritidis* para la estimulación de los linfocitos, dada la importancia de estas proteínas como inmunógenos de este patógeno. De tres experimentos realizados para la obtención de PME se produjo la suficiente proteína para la producción de un número de unidades suficientes de FT para este estudio. Se obtuvo un promedio de 200 µg/ml de las PME, las cuales fueron caracterizadas por SDS-PAGE, el perfil de proteínas obtenido esta formado por 13 especies distintas (Fig No.1 y2).

Fig. No. 1 PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE LAS PME DE *Salmonella enteritidis*

EXPERIMENTO	VOLUMEN OBTENIDO	[PROTEINA]	COEFICIENTE DE CORRELACION
1	10 ml	0.224	0.98
2	10 ml	0.232	0.97
3	10 ml	0.240	0.98

Se realizaron dos experimentos de producción de FTe, denominados lote 1 y lote 2 con 35 y 24 unidades respectivamente, tres unidades de cada lote fueron usadas para cuantificar la cantidad de FT presente en cada unidad por medio del método de orcinol, por otro lado la IL-2 recombinante fue reconstituida y separada en alícuotas de 1×10^6 U/ml conteniendo 250 µg/ml de proteína (Fig. No.3).

Fig. No.3 SDS-PAGE de las PME de *Salmonella enteritidis*.

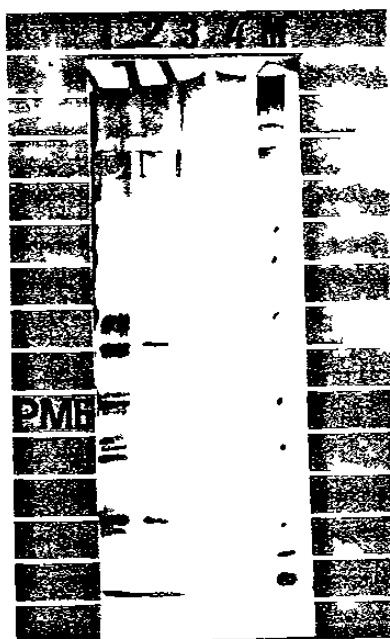
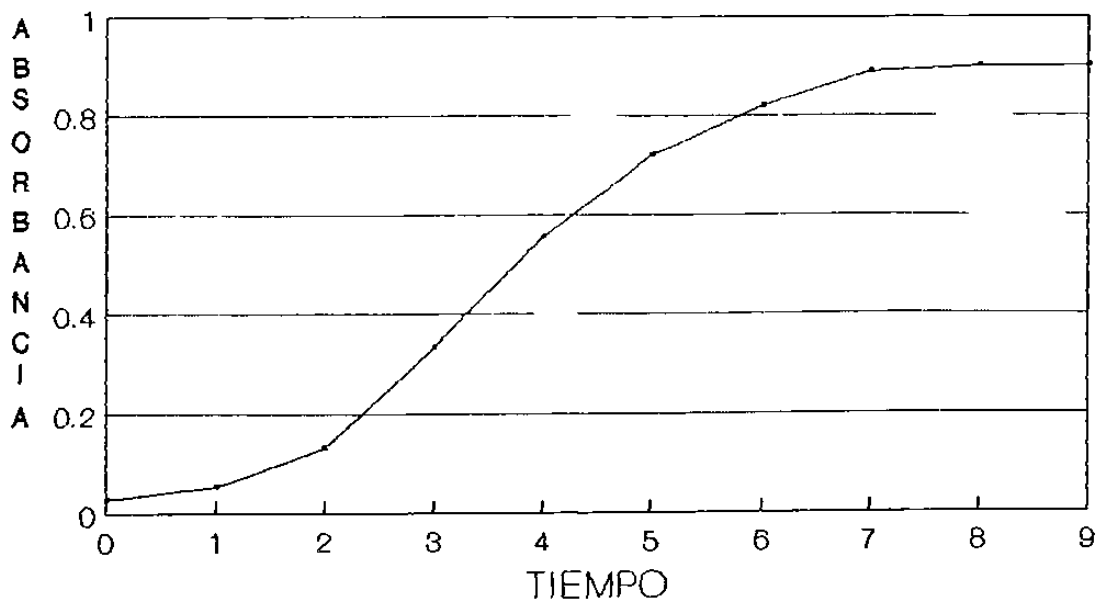


Fig. No.4 Dosis y Unidades Experimentales del FTe y la IL-2 Recombinante.

INMUNOMODULADOR	UNIDADES EXPERIMENTALES	CONCENTRACION
FTe	LOTE 1 35 U LOTE 2 24 U	1 U = 25 mg/ml 1 U = 49.5 mg/ml *
FT Control	30 U	No Detectable **
IL-2 Recombinante	16 viales 1x10 ⁶ U/ml	1x10 ⁶ U = 250 µg/ml ***

Fig. No. 3 Curva de crecimiento de *Salmonella enteritidis*.



Los datos mostrados representan la curva típica de 10 experimentos realizados.

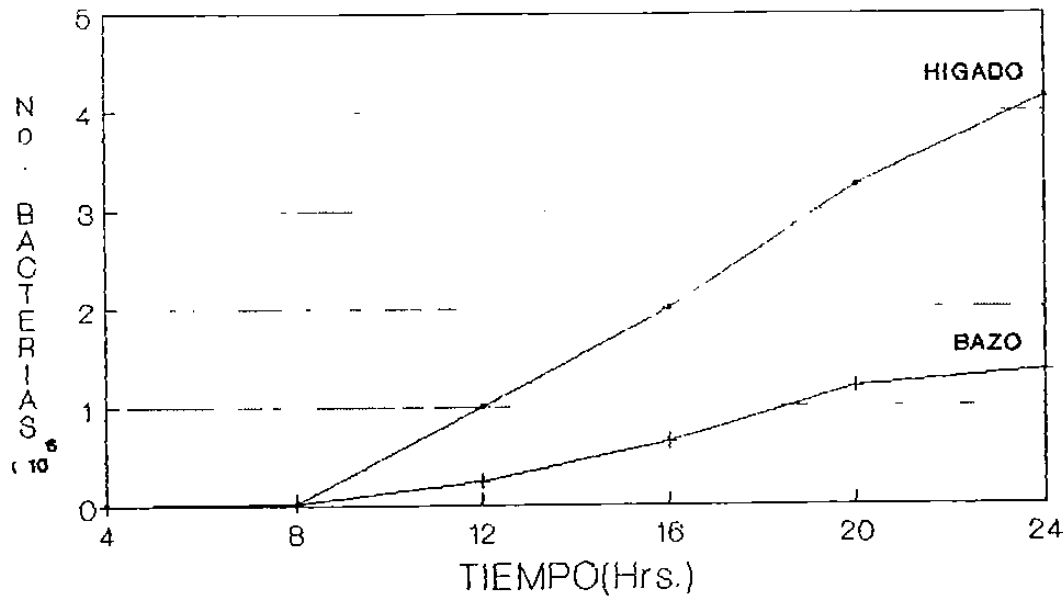
La bacteria en fase logarítmica se diluyó e inoculó intraperitonealmente a grupos de 10 ratones, la sobrevivencia se monitoreó cada 24 hrs, encontrándose que una dosis de 2.6×10^7 UFC/ ml fue la menor cantidad de bacterias que produjo un 100% de mortalidad (Tabla No. 4).

Tabla No.4 Determinación de la Dosis Letal 100% de *Salmonella enteritidis*.

DILUCION DEL STOCK	No. Bacterias / ml	% MORTALIDAD 24 hrs despues del
Directa	4.4×10^9	100%
10^{-1}	2.36×10^8	100%
10^{-2}	2.6×10^7	100%
10^{-3}	2.1×10^6	50%
10^{-4}	2.1×10^5	20%
10^{-5}	2.57×10^4	0%

En otra serie de experimentos se monitoreó la cinética de infección de la bacteria en el hígado y bazo después de el reto letal, encontrándose que la replicación en el hígado fue mayor que en el bazo, a las 24 hrs se detectaron 2.07×10^7 UFC/ml en el hígado, mientras que en bazo fue de 6.85×10^6 UFC/ml (Figura No.4).

Figura No.4 Cinética de Infección en Hígado y Bazo de ratones Balb/c inoculados con LD100 de *Salmonella enteritidis*.



Los datos son presentados como Log10 de la media del número de bacterias de tres repeticiones realizadas en cada tiempo en dos experimentos diferentes.

Estos experimentos indican que la bacteria se distribuye preferentemente a hígado y bazo y que se multiplica en estos órganos, la multiplicación de la bacteria en estos sitios puede ser la principal causa de la muerte letal inducida en estos ratones. Sin embargo la presencia de lipopolisacárido en la bacteria puede tener alguna influencia en la infección letal, para estudiar el papel del lipopolisacárido en este modelo de infección, se realizaron varios experimentos inoculando grupos de ratones con la cantidad de bacteria correspondiente a la LD100 tratada a $100^{\circ}\text{C}/15$ min, bajo estas condiciones, el lipopolisacárido podrá ejercer un efecto sobre la sobrevivencia de los ratones, se encontró que el LPS no ejerce tal efecto, dado que

los ratones no mostraron síntomas de la infección y a los 7 días después del reto con la bacteria muerta no se encontró infección en el hígado y bazo. Con el objeto de conocer algunos eventos sobre la localización y multiplicación de la bacteria en los sitios primarios de infección, se realizaron otros experimentos para estudiar por microscopía electrónica de transmisión la infección de la bacteria en el hígado y en el bazo. Se encontró que durante la etapa temprana de la infección (4-8 hrs) hay un infiltrado de células inflamatorias con un predominio de células polimorfonucleares, en el hígado los polimorfonucleares fueron localizados en los sinusoides hepáticos, mientras que en el bazo no se logró diferenciar bien dado la naturaleza linfoide del órgano, aunque produce una esplenomegalia muy marcada (Figura No.5).



Figura No.5 Micrografía electrónica Infección temprana con *Salmonella enteritidis* en hígado de ratón Balb/c. Infiltración de polimorfonucleares en el sinusoides hepático.

En el hígado la bacteria fue localizada en dos compartimientos, libre en los sinusoides hepáticos e intracelularmente fagocitada por polimorfonucleares, las células de kupffer que están localizadas en los sinusoides hepáticos aparentemente no fagocitaron a la bacteria (Figura 6A y 6B).

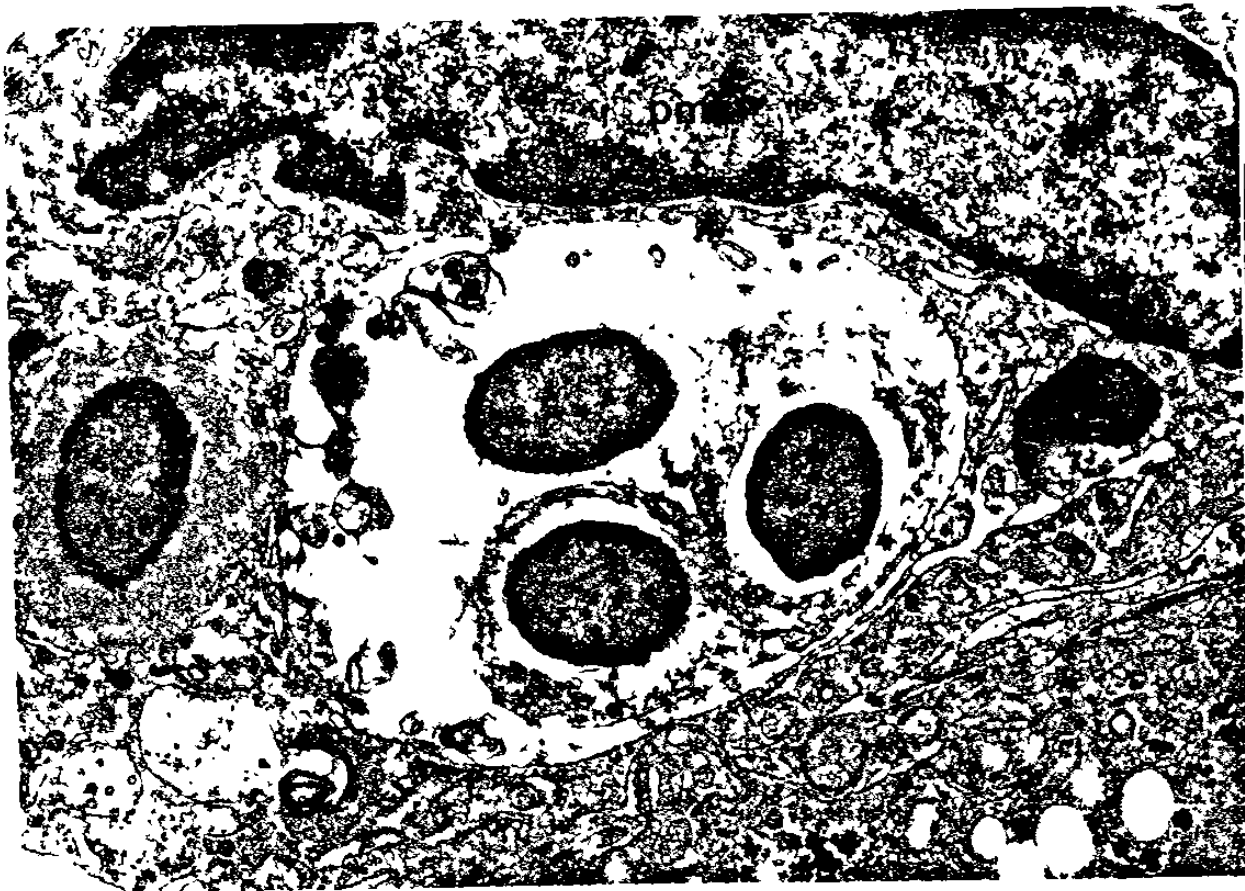


Figura No.6 Micrografía electrónica de la infección temprana inducida con *Salmonella enteritidis* en el hígado de ratón Balb/c. Presencia de la bacteria dentro de vacuolas de células fagocíticas localizadas en los sinusoides hepáticos.

Otra evidencia adicional de que la multiplicación de la bacteria es la causa principal de la muerte inducida por la infección letal se obtuvo cuando se encontró que la bacteria se multiplica en células fagocíticas (Figura No.7A y 7B).



Figura No.7 Micrografía electrónica de la infección temprana inducida con *Salmonella enteritidis* en el hígado. Multiplicación de la bacteria en células fagocíticas.

Durante la etapa tardía de la infección, cuando los ratones manifiestan los signos agudos de la infección, entre las 16 y 24 hrs se observan en el hígado evidencias claras de la destrucción tisular del órgano. Se encontraron áreas de depósito de material fibroso cercanos a la bacteria, tales depósitos de material fibrilar es interpretado como indicador de un proceso inflamatorio agudo. También fue muy frecuente observar zonas de extensa vacuolación y grupos de bacterias en el parénquima hepático rodeadas de grandes áreas de necrosis, todos estos eventos son consecuencia de la infección letal producidos por la multiplicación de la bacteria en estos órganos(Figura No.8A y 8B).

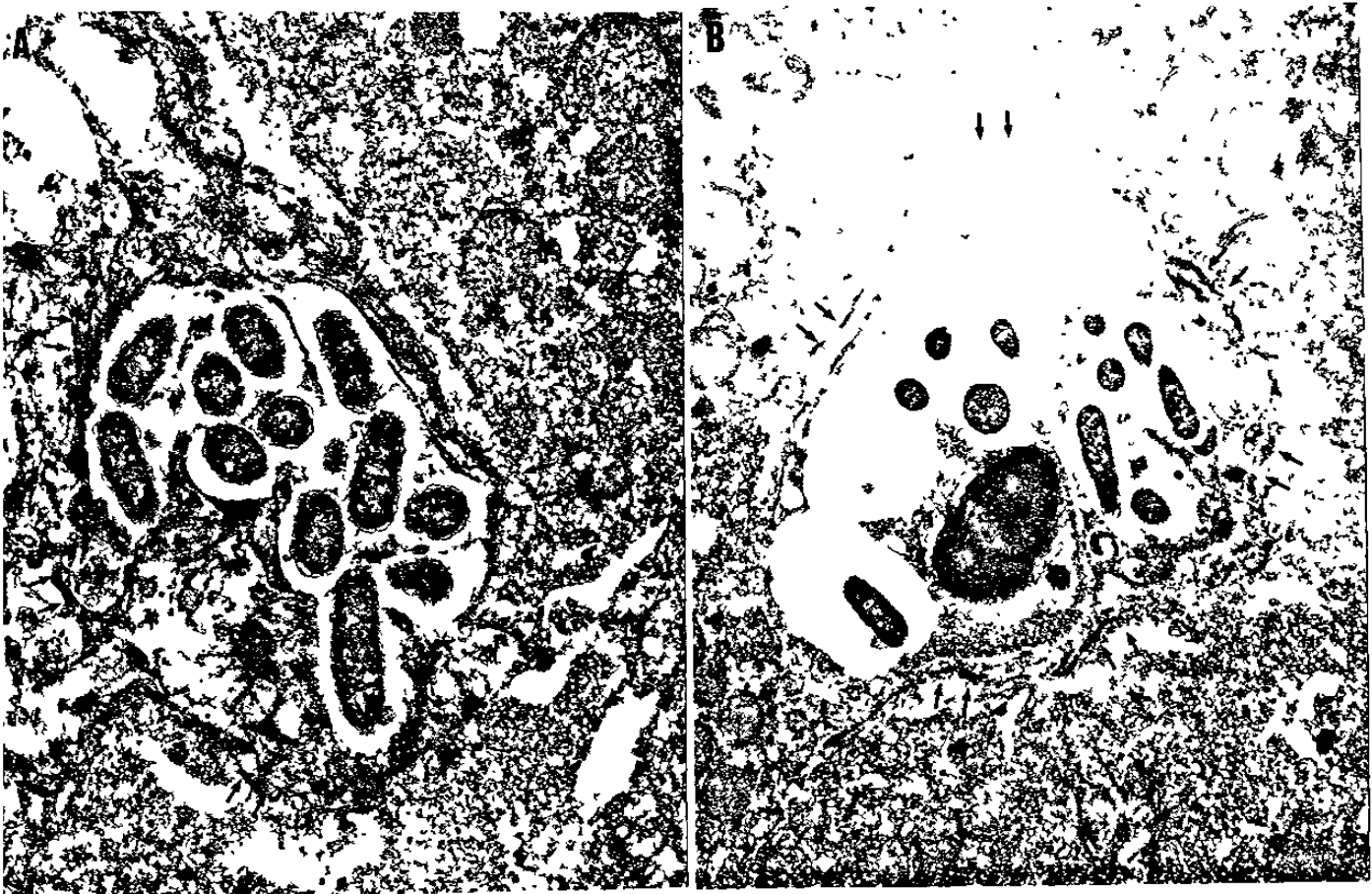


Figura No.8 Micrografía electrónica de la infección tardía inducida por *Salmonella enteritidis* en el hígado de ratones Balb/c. Multiplicación de la bacteria en el parenquima hepático y necrosis extensa de tejido.

CARACTERIZACION DE INMUNOMODULADORES EN LIPOSOMAS.

Después de la producción de liposomas utilizando el proceso de extrusión, la capacidad de encapsulamiento del FTe y la IL-2 recombinante fue evaluada determinando la concentración de cada uno de los inmunomoduladores por diferentes métodos, el FTe fue cuantificado por el método de orcinol como se había mencionado para caracterizar los lotes de FTe producidos, mientras que la cuantificación de IL-2 recombinante fue determinada midiendo la cantidad de proteína atrapada por el método del ácido bicinconínico. Las determinaciones se realizaron en las fracciones E1 y E2 de la separación en la minicolumna de los inmunomoduladores atrapados en liposomas. Se encontró que en la fracción E1 eluyen los liposomas y en la fracción E2 eluye el material no atrapado. Cuando se realizó una determinación directa del FTe y la IL-2 se encontró que los fosfolípidos interfieren en los métodos de orcinol y bicinconínico formando precipitados o incrementando el desarrollo de color en la reacción. Por tales motivos fue necesario realizar otros experimentos colocando los liposomas de la fracción E1 en un sistema bifásico de cloroformo-agua para lograr la separación de los fosfolípidos del inmunomodulador, ya que en este sistema los fosfolípidos se distribuyen en la fase orgánica y el FTe o IL-2 en la fase acuosa. Cuando se realizó lo anterior se encontró que se atrapó 24.1 mg/ml de FTe durante el proceso de fabricación de liposomas, mientras que para IL-2 es atrapada la mayoría de la proteína en liposomas aproximadamente los 250 µg/ml (Tabla No.4).

Tabla No.4 Determinación de la concentración del FTe y la IL-2 recombinante en liposomas unilamelares.

INMUNOMODULADOR	CONCENTRACION LIBRE	CONCENTRACION EN LIPOSOMAS	EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO
FTe	1 U = 49.6 mg/ml	24 mg/ml	50 %
IL-2 Recombinante	1×10^6 U = 250 µg/ml	250 µg/ml	≥ 98 %

Los datos presentados corresponden a la media de tres determinaciones en dos experimentos diferentes. La concentración fue determinada en un análisis de regresión lineal de los datos con un coeficiente correlación de 0.95 para la prueba de Orcinol y de 0.98 para la prueba del Ac. Bicinconínico.

Para complementar la caracterización de los liposomas producidos se estudió por microscopía electrónica de transmisión la forma, el tamaño y homogeneidad de las vesículas obtenidas utilizando tinciones negativas con acetato de uranilo, tanto de la preparaciones del atrapamiento del FTe, IL-2 recombinante y los liposomas control conteniendo solamente solución amortiguadora. Se encontró que ninguno de los dos inmunomoduladores bajo estudio afectan la formación de liposomas, dado que las micrografías obtenidas certificaron la naturaleza vesicular, homogeneidad y estructura oligolamelar de los liposomas que encapsularon tanto FTe como IL-2 recombinante (Figura 9A,9B y 9C).

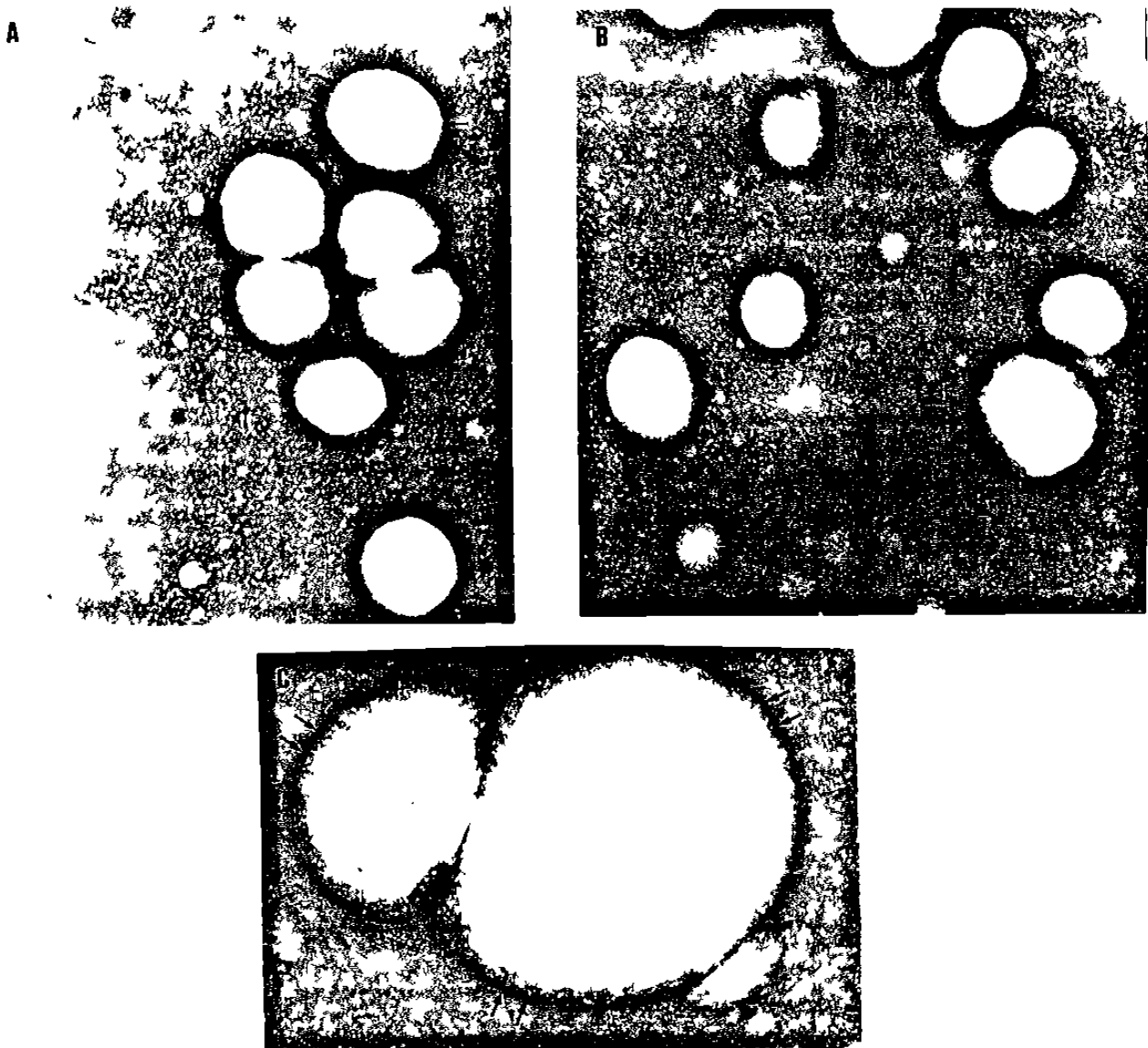
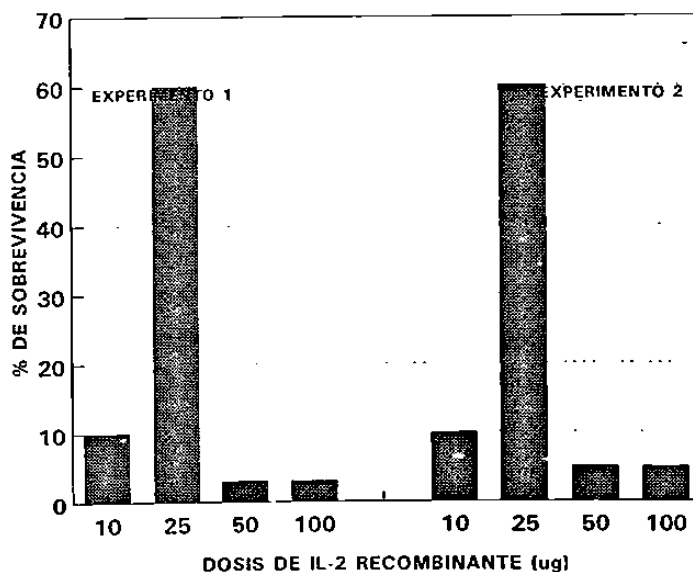


Figura No.9 Micrografías electrónicas de los liposomas que encapsularon FTe,IL-2 recombinante y control. La tinción negativa demuestra la homogeneidad y naturaleza vesicular de los liposomas.

EFFECTO DE LOS INMUNOMODULADORES (FTe,IL-2) LIBRES Y EN LIPOSOMAS EN LA INFECCION LETAL INDUCIDA POR *Salmonella enteritidis*.

Con el propósito de determinar la dosis optima del FTe y la IL-2 recombinante libres de producir un efecto protector o de resistencia a la infección letal inducida por *Salmonella enteritidis* se realizaron varios experimentos independientes para cada inmunomodulador inoculando grupos de ratones con diferentes dosis. La IL-2 recombinante fue aplicada a dosis que fueron de 10,25,50,100µg/raton por vía i.p. dos hrs antes del reto letal, de igual manera fue inoculado un grupo control con solución salina estéril que habia sido utilizada como vehículo de dilución de la IL-2. Después del reto letal se monitoreo la sobrevivencia a los siete dias encontrándose que con la administración de 25µg/ratón de IL-2 recombinante libre fue capaz de inducir un 60% de sobrevivencia, mientras que fue muy interesante observar que con dosis mayores de 50 y 100 ug/raton no produjeron efecto alguno, por el contrario con la administración de estas dosis se presentó un estado de hipersensibilidad a la infección letal, dado que los animales mostraron los síntomas agudos de la infección más rápidamente y el 100% murieron antes de las 24 hrs teniendo un comportamiento diferente al control que recibió solamente la dosis letal de la bacteria (Figura No.10).

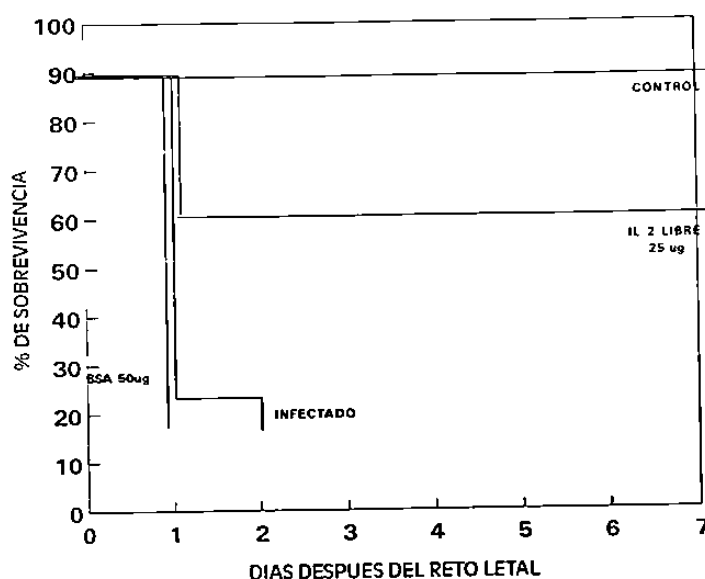
Figura No.10 Efecto de diferentes dosis de IL-2 recombinante en la sobrevivencia de ratones Balb/c infectados letalmente.



Los datos mostrados de los dos experimentos independientes fueron obtenidos administrando cada dosis en grupos de 10 ratones 2 hrs antes del reto letal. El porcentaje de sobrevivencia a los 7 dias despues del reto letal es presentado.

Con el propósito de confirmar que el efecto protector obtenido con la IL-2 se debe exclusivamente a la actividad biológica del inmunomodulador se realizó un tercer experimento administrando 50 μ g/ratón de albúmina serica bovina y se determinó la sobrevivencia a 7 días después del reto letal, encontrándose que la administración de una mayor cantidad de una proteína irrelevante, sin actividad biológica no mostró efecto alguno sobre la sobrevivencia de ratones infectados con la dosis letal (Figura No.11).

Figura No.11 Efecto protector de la IL-2 recombinante libre contra la infección letal.



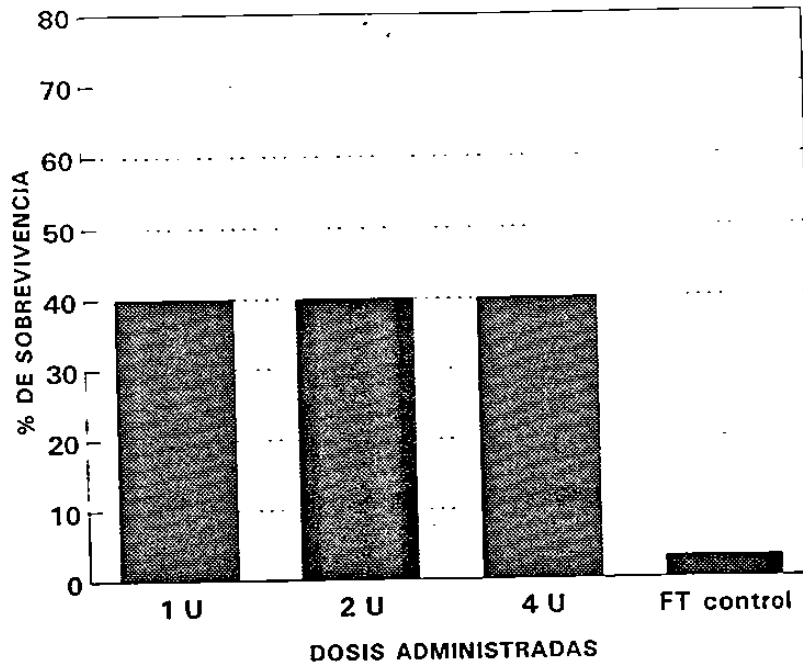
Los datos presentados corresponden a la sobrevivencia obtenida de dos experimentos independientes a los 7 días después de administrar el reto letal.

Cuando se realizaron los mismos experimentos con FTe, se encontró que la administración de 1 U de FTe libre por vía i.p. 2 hrs antes del reto letal produjo un 40% de sobrevivencia a 7 días, mientras que la administración de 2 o 4 U no modificaron el efecto producido con una única dosis, por su parte el FT control no mostró efecto alguno sobre la sobrevivencia (Figura No.12).

Para conocer si el efecto protector es mantenido en el tiempo se realizaron otros experimentos en los cuales se administró 1 U de FTe a las 2, 4 y 6 hrs antes del reto letal, encontrándose que en los tiempos estudiados fue mantenido el mismo efecto observado a las 2 hrs. Estos experimentos demuestran que ambos inmunomoduladores son capaces de inducir un estado de protección contra la

infección letal inducida por *Salmonella enteritidis* y que comparativamente la IL-2 recombinante ejerció un efecto mas importante contra la infección letal, al menos en las dosis y tiempos examinados.

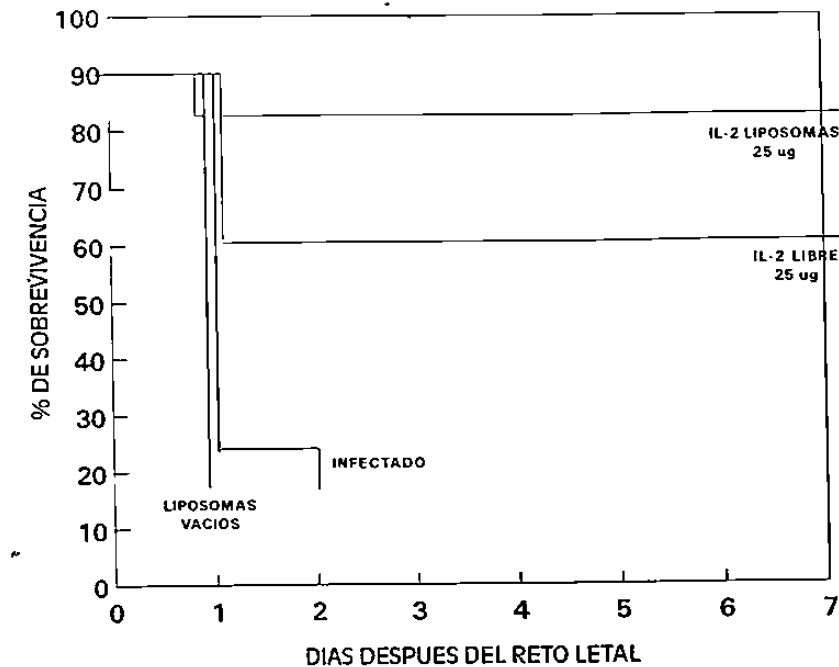
Figura No.12 Efecto de diferentes dosis de FTe en la sobrevivencia de ratones Balb/c infectados letalmente.



Los datos mostrados representan la sobrevivencia obtenida a los 7 dias después del reto letal, en cada uno de los grupos a los que se les administró la dosis establecida 2 hrs - antes de la infección letal.

Cuando las dosis de ambos inmunomoduladores que indujeron un estado de protección significativo contra la infección letal fueron administradas en liposomas, se encontró que en el caso de la IL-2 recombinante el efecto protector fue aumentado del 60% al 90%, mientras que los liposomas solos o vacíos no mostraron algun efecto significativo (Figura No.13).

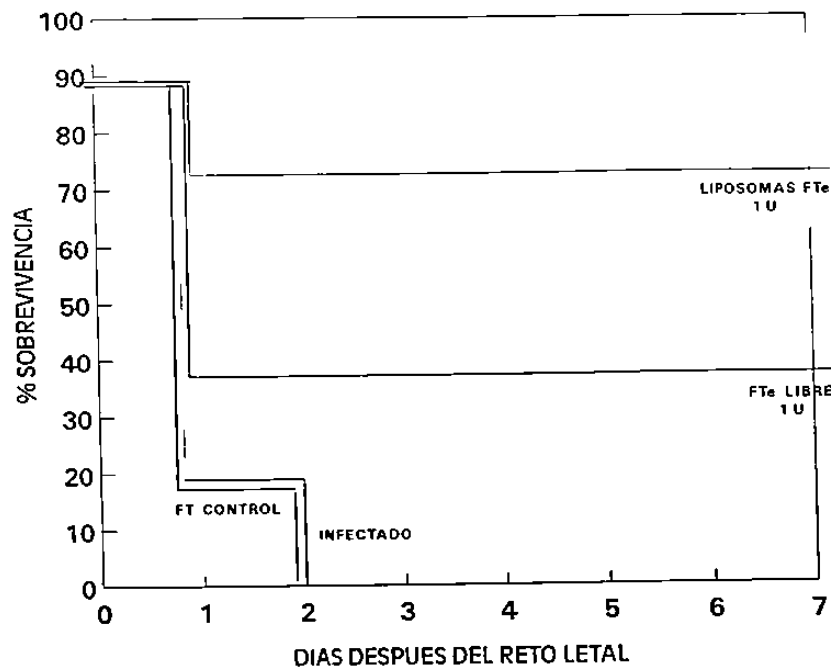
Figura No.13 Efecto de la IL-2 recombinante atrapada en liposomas contra la infeccion letal inducida por *Salmonella enteritidis*.



Los datos mostrados representan la supervivencia obtenida en dos experimentos independientes a los 7 días después del reto letal.

El FTe atrapado en liposomas mostró un comportamiento similar en la infección experimental, es decir, incremento el efecto de protección del 40% a el 80% de supervivencia cuando fue administrado 2 hrs antes del reto letal con la bacteria por vía intraperitoneal, mientras que los liposomas vacíos administrados a la misma concentración de fosfolípidos no producen ningún efecto.(Figura No.14).

Figura No.14 Efecto del FTe encapsulado en liposomas contra la infección letal inducida por *Salmonella enteritidis*.



Los datos mostrados representan la supervivencia obtenida en dos experimentos independientes obtenidos a los 7 días después del reto letal.

Los experimentos anteriores demuestran que los liposomas pueden mejorar significativamente el efecto protector de ambos inmunomoduladores contra la infección letal inducida experimentalmente con *Salmonella enteritidis*.

Con el propósito de determinar si el efecto protector inducido por la administración de ambos inmunomoduladores libres y en liposomas se correlaciona con una disminución del grado de infección en hígado y bazo, se realizaron otros experimentos en los que después de la aplicación de los inmunomoduladores y el reto letal se determinó la infección en hígado y bazo a las 24 hrs. Se encontró que la administración de IL-2 recombinante libre produce una reducción significativa del número de bacterias en los dos órganos primarios de la infección, en el hígado hubo una disminución de 1.9×10^7 bacterias del control a 1.0×10^6 bacterias, mientras que en el bazo la disminución fue de 6.0×10^6 bacterias del control a 8.9×10^5 bacterias. Con la administración de IL-2 atrapada en liposomas se obtuvo una reducción mayor de la infección, en el hígado la infección fue de 1.0×10^4 bacterias

y en el bazo de 9.3×10^3 bacterias. Un comportamiento similar en la reducción de la infección fue obtenido con la administración de FTe encapsulado en liposomas, con la aplicación de FTe libre antes de la infección letal se obtuvieron en el hígado 3.0×10^6 bacterias y en el bazo 2.5×10^6 bacterias. Con la administración de FTe encapsulado en liposomas se obtuvo una reducción de la carga bacteriana mas significativa, en el hígado el grado de infección fue equivalente a 2.0×10^5 bacterias, mientras que en el bazo fue de 1.0×10^5 bacterias (Figura No.15).

Figura No.15 Correlación entre la protección y disminución de la infección producida por IL-2 recombinante y FTe libres y atrapados en liposomas.

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	Log ₁₀ Bacteria / Organo 24 Hrs Despues de la Infeccion		% SOBREVIVENCIA EN EL DIA 7	p
		HIGADO	BAZO		
Control	Sol. Salina	7.29	6.78	0	
1	IL-2 Libre 25 mg	6.02	5.94	60	<0.03 *
2	IL-2 LIPOSOMAS	4.0	3.96	90	<0.001**
3	LIPOSOMAS vacios	7.31	6.84	0	no significanti e
4	FTe Libre 1 U	6.47	6.39	40	>0.03*
5	FTe LIPOSOMAS 1 U	5.3	5.0	80	0.001**

El grado de infección fue determinado 24 hrs después del reto letal, en este tiempo el hígado y bazo fueron homogenizados y se determinó la cantidad de bacteria . Cada dato representa el Log₁₀ de UFC de la media ± desviación estandar de la media de 3 experimentos realizados. * P<0.03, comparado con el grupo control. ** P<0.001, comparado con el grupo control.

Los experimentos anteriores demuestran que los dos inmunomoduladores bajo estudio son capaces de inducir un estado de protección contra la infección letal y esta protección correlaciona con una disminución de la multiplicación de la bacteria en los sitios primarios de la infección, se determinó también que los liposomas aumentaron estos efectos en ambos inmunomoduladores. Dichos efectos fueron superiores con la administración de la IL-2 recombinante, tanto libre como administrada en liposomas.

Finalmente, se realizaron otros estudios a nivel de los tejidos primarios de la infección en los ratones que fueron tratados con ambos inmunomoduladores, tanto libres como encapsulados en liposomas. Estos estudios se dirigieron hacia la búsqueda de evidencias que demostraran que la protección de los ratones por la administración de los inmunomoduladores sea debida a la disminución o prevención del daño producido en el hígado y bazo como consecuencia del desarrollo de una respuesta inmune celular "in situ" que inhiba la multiplicación de la bacteria en los tejidos. Los análisis histológicos del hígado y bazo de los animales protegidos con ambos inmunomoduladores a los 7-9 días después del reto letal demostraron que tanto la IL-2 y el FTe libres y encapsulados en liposomas inducen una infiltración celular, formado principalmente por linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares, en el hígado la infiltración celular fue localizada en zonas perivasculares y en el parénquima hepático donde presumiblemente existían focos de multiplicación de la bacteria, la presencia de estas células fue observada en áreas de destrucción de hepatocitos infectados (Figura No.16).

De acuerdo a las observaciones hechas en los tejidos no se lograron establecer diferencias histológicas entre los efectos inducidos por ambos inmunomoduladores. Otros estudios han indicado que la administración de IL-2 recombinante a ciertas dosis puede inducir algunos efectos tóxicos en algunos tejidos, así que finalmente nos preguntamos cuáles serían los efectos inducidos por la administración de 25 ug de IL-2 libre y encapsulada en liposomas?. El análisis de los efectos fue enfocado a la búsqueda de alteraciones histológicas como indicadores de toxicidad, en el hígado, bazo, riñón y corazón no se encontraron evidencias de alteraciones histológicas, mientras que en el pulmón, la administración de IL-2 libre produjo a la 24 hrs destrucción y engrosamiento de la línea endotelial vascular de venas pulmonares, así como, una infiltración perivascular linfocítica muy abundante, estos signos fueron considerados como parte del síndrome de "rompimiento vascular" que han sido reportados como el principal efecto tóxico de la IL-2 recombinante en el pulmón (Figura No.17).

La administración de la IL-2 recombinante atrapada en liposomas no produjo estos efectos en el pulmón, presumiblemente los liposomas modifican la farmacocinética de distribución de la IL-2 en tejidos (Figura No.18).

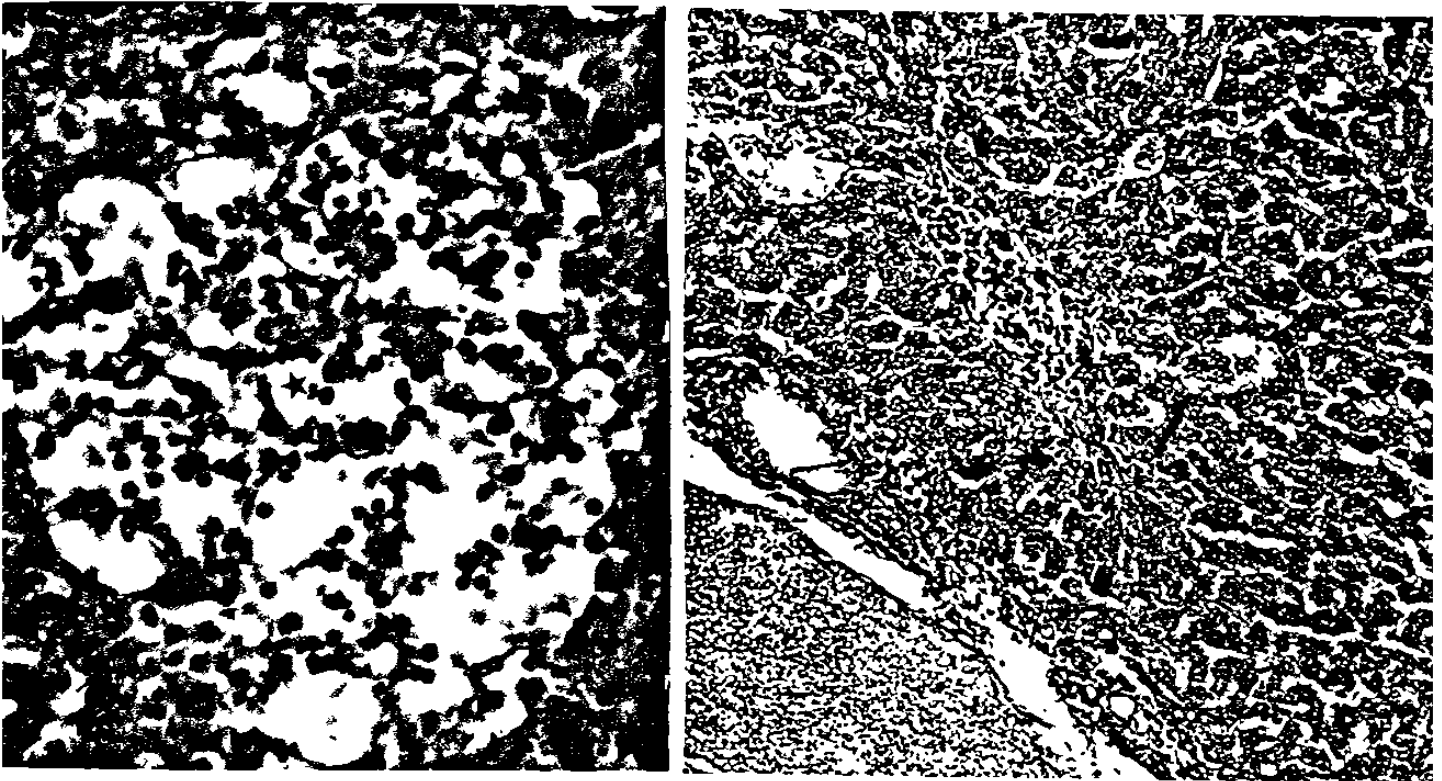


Figura No.17 Fotomicrografía de un corte histológico de hígado teñido con hematoxilina y eosina. (A) Hígado de ratones protegidos a los 7 días después del reto letal con IL-2 libre. (B) Hígado de ratones protegidos a los 7 días después del reto letal con IL-2 atrapada en liposomas. Las flechas indican la presencia de linfocitos, macrófagos y PMN infiltrados en la zona perivascular y lisis de hepatocitos infectados.

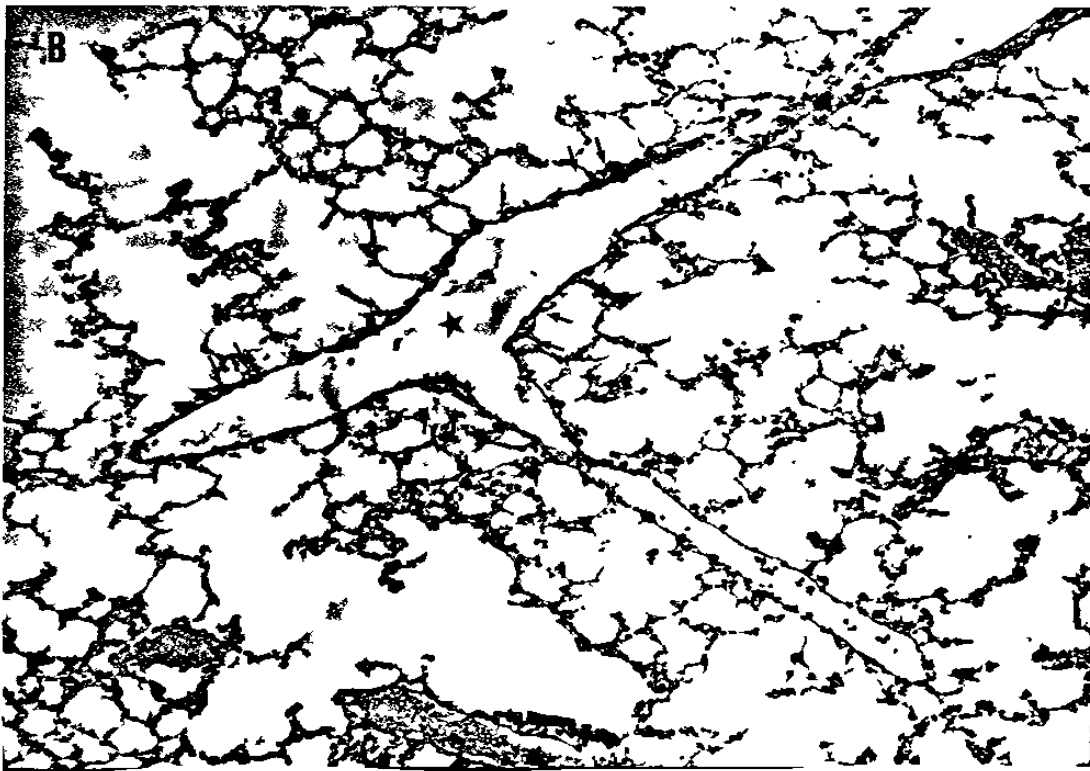


Figura No.18 Fotomicrografía de un corte histológico de pulmón teñido con hematoxilina y eosina. (A) pulmón de un ratón normal tratado con 25µg de IL-2 libre. (B) Pulmón de un ratón normal tratado con 25 µg de IL-2 atrapada en liposomas. Las flechas indican la infiltración perivascular de linfocitos y la destrucción del endotelio vascular.

DISCUSION

Como se mencionó anteriormente, la terapia biológica a base de inmunomoduladores es una alternativa extensamente estudiada a nivel experimental y en protocolos clínicos para el tratamiento del cancer y enfermedades infecciosa. La interleucina-2 recombinante y el factor de transferencia han demostrado tener una capacidad de modular algunos mecanismos de la respuesta inmune, sin embargo, pocos han sido los estudios que se han realizado para determinar el papel profilactico y terapeutico en infecciones experimentales y de igual forma pocos han sido los esfuerzos que se han realizado para optimizar la efectividad de estos inmunomoduladores. En el presente trabajo se ha tratado de estudiar el papel profiláctico de la IL-2 recombinante y del factor de transferencia específico en una infección letal diseminada y hemos considerado el uso de liposomas como un acarreador biodegradable específico, cuya distribución *in vivo* es a órganos del sistema reticuloendotelial, con el propósito de aumentar el efecto de ambos inmunomoduladores en los sitios primarios de multiplicación bacteriana en este modelo de infección experimental.

Para tales propósitos se desarrolló una infección experimental letal diseminada a hígado y bazo usando una cepa de *Salmonella enteritidis*. El modelo experimental se estableció por la administración de una dosis letal de la bacteria inyectada por vía intraperitoneal a ratones singenicos Balb/c, bajo estas condiciones la muerte de los animales se presentó entre las 16-30 hrs después del reto letal, la endotoxina o el LPS de la bacteria no tiene influencia sobre la sobrevivencia debido a que la misma cantidad de bacteria en la dosis letal muerta por calor no mostró efecto sobre la muerte de los ratones. Al estudiar el comportamiento de la infección en el hígado y bazo se encontró que la multiplicación de la bacteria en estos órganos puede ser la principal causa de muerte de los animales , esto fue comprobado por microscopía electrónica de transmisión de los órganos infectados, permitiendo ademas de observar la multiplicación de la bacteria en los tejidos, obtener evidencias del proceso inflamatorio agudo y areas extensas de necrosis producidas como consecuencia de la infección letal. Estos resultados establecieron que en esta infección experimental la muerte de los animales no se debe a efectos del síndrome de choque séptico inducido por endotoxina y por consecuencia puede resultar un modelo de interés para estudiar los efectos de algunos inmunomoduladores que estimulen algunos mecanismos microbicidas.

Los primeros experimentos con los dos inmunomoduladores fueron realizados con el propósito de determinar la concentración óptima que modifique la sobrevivencia de los animales después de la administración del reto letal.

El FTe libre fue administrado a varias dosis, que van de 1,2 y 4 unidades por vía i.p. 2 hrs antes del reto letal, una unidad de FTe fue capaz de inducir una sobrevivencia del 40% y fue muy interesante observar que una mayor cantidad de dosis no aumentaron o disminuyeron las sobrevivencia, estos resultados hasta este momento no tienen una explicación clara, sin embargo el efecto biológico de una unidad de FTe es muy evidente, dado que el FT control no indujo efecto alguno sobre la sobrevivencia de los animales. El tiempo de administración del inmunomodulador no fue un parámetro muy estudiado, solamente se realizaron experimentos realizando la administración del FTe 2,4 y 6 hrs antes del reto letal, los resultados obtenidos indicaron que hasta el tiempo mas largo se mantiene el mismo efecto de protección al reto letal.

Las dosis administradas de la IL-2 recombinante libre tambien arrojaron resultados muy interesantes, las dosis aplicadas fueron 10,25,50 y 100 ug por ratón, con 25 μ g se obtuvo la mayor sobrevivencia, mientras que con dosis mayores el efecto fue inverso al observarse un aceleramiento de la infección que produjo una muerte mas rapida de los animales con respecto al grupo control. Este estado de hipersensibilidad a la infección producido con dosis de 50 y 100 ug de IL-2 recombinante refleja el efecto deletéreo que puede tener en el hùesped una concentración elevada de esta citoquina y la necesidad de eficientizar el manejo de la misma.

El efecto protector de la IL-2 recombinante es debido exclusivamente a la actividad biológica, dado que la administración de una cantidad mayor de una proteína con una actividad irrelevante no mostró efecto alguno sobre la protección a los ratones. Los dos inmunomoduladores son capaces de inducir un estado de resistencia o protección a la infección letal, la interleucina-2 mostró tener un efecto protector mas potente, mientras que el factor de transferencia tiene un efecto no muy significativo.

Cuando los inmunomoduladores fueron administrados en liposomas a la misma concentración que habían demostrado producir el óptimo de protección, se observó que los liposomas mejoraron en forma muy importante el efecto protector contra la infección letal, los liposomas vacíos no tienen ningún efecto en la sobrevivencia, ésto se mostró cuando se administraron cantidades iguales de fosfolípidos en liposomas vacíos sin ejercer un efecto en la protección de los animales.

El efecto en la protección fue mayor cuando el FTe fue atrapado en liposomas al inducir un aumento del 40% al 80%, mientras que el aumento obtenido con la IL-2

atrapada en liposomas fue del 60% al 90%. Las diferencias obtenidas con ambos inmunomoduladores atrapados en liposomas posiblemente reflejan los diferentes mecanismos por los cuales inducen un estado de protección a la infección letal.

Ambos inmunomoduladores fueron capaces de inhibir la multiplicación de la bacteria en los sitios primarios de la infección, de igual forma que el efecto protector, la inhibición de la multiplicación de la bacteria también fue aumentado por la administración de estos agentes en liposomas, un mayor efecto sobre la disminución de la infección en el hígado y bazo fue obtenido con la administración de IL-2 encapsulada en liposomas.

El hígado y bazo de los animales protegidos con ambos inmunomoduladores tanto libres, como atrapados en liposomas presentaron infiltración de linfocitos, macrófagos y PMN, lo cual es indicativo del desarrollo de una respuesta inmune localizada y posiblemente la causa principal de la protección inducida por estos inmunomoduladores.

Aunque no es claro el mecanismo por medio del cual los liposomas mejoran el efecto protector de la IL-2 recombinante y del FTe en este modelo experimental, una posible explicación podría radicar en la capacidad de los liposomas de acarrear y concentrar moléculas a órganos del sistema retículo endotelial, así en este trabajo la IL-2 recombinante y el FTe podrían ejercer un efecto estimulante "in situ", como la activación de linfocitos, macrófagos y otras células localizadas en los órganos infectados, aunque la estimulación de células fagocíticas en cavidad peritoneal pudiera estar contribuyendo, dado que es la misma ruta de administración de los inmunomoduladores y de la bacteria.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir lo siguiente:

1.- Se desarrolló un modelo experimental de una infección letal producida por *Salmonella enteritidis*, dicha infección se caracteriza por una diseminación y multiplicación de la bacteria al hígado y bazo, produciendo la muerte de los ratones durante las primeras 30 hrs. Este modelo es altamente reproducible bajo las condiciones determinadas en este estudio y puede ser utilizado para evaluar el efecto protector contra la infección letal de cualquier sustancia que pueda modificar algunas funciones del sistema inmune.

2.- Se estableció un procedimiento para la producción de liposomas unilamelares basado en el proceso de extrusión, el cual es altamente reproducible en cuanto a la forma y tamaño de las vesículas generadas, dicho proceso puede ser utilizado para la encapsulación de moléculas biológicamente activas.

3.- Los dos inmunomoduladores evaluados en este estudio, tanto el FTe, como la IL-2 recombinante mostraron una capacidad de inducir un estado de protección a la infección letal, así como, disminuir el grado de infección en los principales órganos afectados.

4.- Una dosis de FTe libre fue capaz de inducir 40 % de protección, mientras que la misma cantidad encapsulada en liposomas unilamelares incremento a un 80 % la protección.

5.- La IL-2 recombinante libre a una dosis de 25 µg produjo un 60 % de protección, mientras que la misma dosis atrapada en liposomas unilamelares incremento a un 90 % la protección.

6.- La protección inducida por ambos inmunomoduladores libres y encapsulados en liposomas, correlacionó con una significativa disminución de los daños producidos en los tejidos infectados, así como, con la presencia de una infiltración celular linfoide en estos órganos.

7.- La IL-2 recombinante libre y encapsulada en liposomas unilamelares presentó efectos superiores en la protección y disminución de los daños producidos.

8.- Los liposomas unilamelares produjeron una disminución de los daños tisulares en el pulmón inducidos a las 24 hrs por la IL-2 libre.

9.- La capacidad protectora contra la infección letal de ambos inmunomoduladores fue potenciada cuando ellos fueron encapsulados en liposomas unilamelares.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fields,P.I.,R.V.Swanson,D.G.Haidaris and F.Heffron.(1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:5189.
- 2.- Buchmeier,N. and F.Heffron.(1989) Intracellular survival of wild-type of *Salmonella typhimurium* and macrophage sensitive mutants in diverse populations of macrophage. *Infect. Immun.*57:1.
- 3.- Nauciel,C.(1990) Role of CD4+ T-cell and T-independent mechanism in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J. Immunol.*145:1265-1269.
- 4.- Kagaya,K.,K.Watanabe and Y.Fukazawa.(1989) Capacity of recombinant gamma-interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect. Immun.*57:609-615.
- 5.- Matsumura,H.,K.Onuzuka,Y.Terada,Y.Nakano and M.Nakano.(1990) Effect of murine recombinant interferon- γ in the protection of mice against *Salmonella*. *Int. J. Immunopharmacol.*12:49-56.
- 6.- Muotiala,A., and P.H.Makela.(1990) The role of INF- γ in the murine *Salmonella typhimurium* infection. *Microb. Pathog.*8:135-141.
- 7.- Nakano,Y.,K.Onuzuka,y.Terada,H.Shinomiya and M.Nakano.(1990) protective effect of recombinant tumor necrosis factor- α in murine *Salmonellosis*. *J. Immunol.*144:1935-1941.
- 8.- Tite,J.P.,G.Dougan and S.N.Chatfield.(1991) The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J. Immunol.*147:3161-3164.
- 9.- Nauciel,C. and F.Espinasse-Maes.(1992) Role of gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.*60:450-454.
- 10- Vogels,M.T.E. and J.W.M.Van der Meer.(1992) Use of immune modulators in nonspecific therapy of bacterial infections. *Infect. Immun.*36:1-5.

- 11.- Smith,K.A.(1988) Interleukin-2: inception,impact and implications. *Science* 240:1169-1176.
- 12.- Kaplan,G.,Z.A.Cohn and K.A.Smith.(1992) Rational immunotherapy with interleukin-2. *Biotechnology* 10:157-162.
- 13.- Wahl,S.M.,N.McCartney-Francis,D.A.Hunt,P.D.Smith,L.M.Wahl and I.M.Katona.(1988) Monocyte interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 augmentation of microbicidal activity. *J. Immunol.*139:1342-
- 14.- Davis,C.E.,M.Belosevic,M.S.Meltzer and C.A.Nancy.(1988) Regulation of activated macrophage antimicrobial activities: cooperation of lymphokines for induction of resistance to infection. *J. Immunol.*141:627-
- 15.- Belosevic,M.,C.E.Davis,M.S.Meltzer and C.A.Nancy.(1988) Regulation of activated macrophage anticicrobial activities: identification of lymphokines that cooperate with interferon gamma for induction of macrophage resistance to infection. *J. Immunol.*141:890-
- 16.- Belosevic,M.,D.S.Finbloom,M.S.Meltzer and C.A.Nancy.(1990) IL-2: A cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. *J. Immunol.*145:831-839.
- 17.- Chong,K.T.(1987) Prophylactic administration of interleukin-2 protects from lethal challenge with gram-negative bacteria. *Infect. Immun.*55:668-673.
- 18.- Weyand,C.M.,J.Goronzy,M.J.Dallman and C.G.Fathman.(1986) Administration of recombinant interleukin-2 in vivo induces a polyclonal IgM response. *J.Exp. Med.*163:1607-1612.
- 19.- Weyand,C.M.,J.Goronzy,G.G.Fathman and P.O.Hawley.(1987) Administration of recombinant interleukin-2 protects against septic death. *J. Clin. Invest.*79:1756-1763.
- 20.- Goronzy,J.,C.Weyand,J.Quan,C.G.Fathman and P.O.Hanley.(1989) Enhanced cell-mediated protection against fatal *Escherichia coli* septicemia induced by treatment with recombinant IL-2. *J. Immunol.*142:1134-1138.

- 21.- Haak-Frendscho,M.,K.M.Young and C.J.Czuprynski.(1989) Treatment of mice with human recombinant interleukin-2 augments resistance to the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*57:3014-3021.
- 22.- Haak-Frendscho,M. and C.J.Czuprynski.(1992) Use of recombinant interleukin-2 to enhance adoptive transfer of resistance to *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.*60:1406-1414.
- 23.-Adibzadeh,M.,H.G.Weder,A.Rehbein,U.Schwulera,J.Obermeier and G.Pawelec.(1992) Activity of liposomal interleukin-2 in vitro. *Mol.Ther.*4:24-28.
- 24.-Anderson,P.M.,E.Katsanis,S.F.Sencer,D.Hasz,A.C.Ochoa and B.Bostrom.(1992) depot characteristics and biodistribution of interleukin-2 liposomes: Importance of route. *J. Immunotherapy.*12:19-31.
- 25.- Sencer,S.,M.Rich,E.K.Katsanis,A.C.Ochoa and P.M.Anderson.(1991) Antitumor vaccine adjuvant affects of IL-2 liposomes in mice immunized against MCA-102 sarcoma. *Eur. Cytokine Network* 2:311-318.
- 26.- Anderson,P.M.,D.Hasz,L.Dickrell and S.Sencer.(1992) Interleukin-2 in liposomes: increased intravenous potency and less pulmonary toxicity in rats. *Drug Develop. Res.*27:15-31.
- 27.-Anderson,P.M.,E.Katsanis,A.S.Leonard,D.Schow,C.M.Loeffler,M. B.Goldstein and A.C.Ochoa.(1990) Increased local antitumor effects of interleukin-2 in mice with MCA-106 sarcoma pulmonary metastases. *Cancer Res.*27:1853-1856.
- 28.-Loeffler,C.M.,J.L.Platt,P.M.Anderson,E.Katsanis,J.B.Ochoa,W. J.Urba,D.L.Longo,A.S.Leonard and A.C.Ochoa.(1991) Antitumor effects of interleukin-2 liposomes and anti-CD3-stimulated T-cell against murine MCA-38 hepatic.
- 29.- Swenson,C.E.,M.C.Popescu and R.S.Ginsberg.(1988) Preparation and use of liposomes in the treatment of microbial infections. *Crit.Rev.Microbiol.*15(Suppl):S1-S31.

- 30.- Dillner,J., Dillner,L., Rob,J., Willems,J., Jones,I., Lancaster,W., Smith,R. and Lerner,R. A synthetic peptide defines serologic IgA response to a human papillomavirus-encoded nuclear antigen expressed in virus-carrying cervical neoplasia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 (1989):3838.
- 31.- Dillner,J., Dillner,L., Utter,G., Eklund,C., Rotoloa,A., Costa,S. and DiLuca,D. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. Int. J. Cancer. 45 (1990):529.
- 32.- Dillner,J. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: The E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. Int. J. Cancer. 46 (1990):703.
- 33.- Jenison,S.A., Firzlaff,J.M., Langenberg,A. and Galloway,D.A. Identification of immunoreactivity antigens of human papillomavirus type 6b using Escherichia coli-expressed fusion proteins. J. Virol. 62 (1988):2115.
- 34.- Jenison,S.A., Yu,X.P., Valentine,J.M. and Galloway,D.A. Human antibodies react with an epitope of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame which is distinct from the type-common epitope. J. Virol. 63 (1989):809.
- 35.- Jochmus-Kudielka,I., Schneider,A., Braun,R., Kimmig,R., Koldousky,U., Schneweis,K.E., Seedorf,K. and Gissmann,L. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. J. Natl. Cancer. Inst. 81 (1989):1698.
- 36.- Youn Son,M., Park,J.S., Namkoong,S.E., Kim,S.J., Lee,H.X., Chee,Y.H., Yoon,H.S. Immunologic assays of sera to HPV-related proteins in women with cervical neoplasia. 12Th. International Papillomavirus Conference, 1993, Baltimore,USA.
- 37.- Baay, M.F.D., Duk,J.M., Burger,M.P.M., de Bruijn,H.W.A., Stolz,E. and Herbrink,P. Follow up of antibody responses to HPV E6 in women treated for cervical carcinoma. 12Th. International Papillomavirus Conference, 1993, Baltimore,USA.
- 38.- Morris,H.B.B., Gatter,K.C., Sykes,G., Casemore,V. and Mason,D.Y. Langerhan's cells in human cervical epithelium: effects of warts virus infection and intraepithelial neoplasia. Br. J. Obstet. Gynecol. 90 (1983):412.
- 39.- Morris,H.B.B., Gatter,K.C., Stein,H., Mason,D.Y. Langerhan's cells in human cervical epithelium: An immunohistochemical study. Br. J. Obstet. Gynecol. 90 (1983):400.
- 40.- Vayrynen,M., Syrjanen,K., Mantyjarvi,R. Langerhan's cells in human papillomavirus (HPV) lesions of the uterine-cervix identified by the monoclonal antibody OKT6. Int. J. Gynecol. Obstet. 22 (1984):22.

- 41.- Van Nagell,J.R., Donaldson,E.S., Wood,E.G., Parker,J.C.P. The significance of vascular invasion and lymphocitic infiltration in invasion cervical cancer. *Cancer*. 41 (1978):228.
- 42.- Syrjanen,K.J. Immunocompetent cells in uterine cervical lesions of human papillomavirus origin. *Gynecol. Obstet. Invest.*16 (1983):327.
- 43.- Chardonnet,Y., Viac,J., Staquet,M.J. and Thivolet,J. Cell-mediated immunity to human papillomavirus. *Clin. Dermatol.* 3 (1985):156.
- 44.- Bell,M.C., Crowley-Nowick,P.A., Edwards,R.P., El- Asfour,S.A., Connor,W., Miller,D. and Partridge, E.E. Cellular immune infiltrates are altered in cervical dysplasia. 12Th. International Papillomavirus Conference,1993, Baltimore,USA.
- 45.- Cauda,R., Tyring,S.K., Grossi,C.E., Tilden,A.B., Hatch,K.D., Sams,W.M., Baron,S. and Witheley,R.J. Patients with condyloma accuminatum exhibit decreased interleukin-2 and interferon-gamma production and depressed natural killer activity. *J. Clin. Immunol.* 7 (1987):304.
- 46.- Nakano,T., Oka,K., Morita,S., Tsunemoto,H. Pronostic significance of langerhan's cell infiltration in radiation therapy for scuamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 113 (1989):507.
- 47.- Nakano,T., Oka,K., Morita,S. and Arai,T. Roles of langerhan's cells and T-Lymphocytes infiltrating cancer tissues in patiens treated by radiation therapy of cervical cancer. *Cancer*. 70 (1992):2839.
- 48.- Cubie,H.A. and Norval,M. Humoral and cellular immunity to papillomavirus in patients cervical dysplasia. *J. Med. Virol.* 24 (1988):85.
- 49.- Spradbrow,P.B. Immune response to Papillomavirus infection. In *Papillomavirus and Human Disease*. (Ed.) K.Syrjanen, L.Gissmann and L.G.Koss,1987, Sringer-Verlang,Berlin.
- 50.- Gissmann,L. and Jochmus-Kudielka,I. Immune response to papillomavirus infection. *Curr. Probl. Dermatol.* 18 (1989):162.
- 51.- Malejczyk,J., Majewski,S., Jablonska,S., Rogozinski,T.T. and Orth,G. Abrogated NK-cell lysis of human papillomavirus (HPV)-16-bearing keratinocytes in patients with pre-cancerous and cancerous HPV-induced anogenital lesions. *Int. J. Cancer.*43 (1989):209.
- 52.- Castello,G., Esposito,G.,Stellato,G., Dalla-Mora,L., Abate,G., Germano,A. Immunological abnormalities in patients with cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 25 (1986):61.
- 53.- Halpert,R., Fruchter,R.G., Sedlis,A., Butt,K., Boyse,J.G. and Sillman,F.H. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstetrics and Gynecol.* 68 (1986):251.

- 54.- Johnson,J.C., Burnett,A.F., Willet,G.D., Yuong,M.A. and Doniger,J. High frequency of latent and clinical human papillomavirus cervical infection in immunocompromised human immunodeficiency virus-infected women. *Obstetrics and Gynecol.* 79 (1992):321.
- 55.- Schafer,A., Friedman,W., Mielke,M., Schwarlander,B. and Koch,M.A. The increased frequency of cervical dysplasia- neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus is related to the degree of immunosuppression. *Am. J. Obstetrics. and Gynecol.* 164 (1991):593.
- 56.- Strang,G., Hickling,J.K., McIndoe,G.A.J., Howland,K., Wilkinson,D., Ikeda,H. and Rothbard,J.B. Human T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 and E6 synthetic peptides identification of T cell determinants, HLA-DR restriction and virus type specificity. *J. Gen. Virol.* 71 (1990):423.
- 57.- Tindle,R.W., Fernando,G.J.P., Sterling,J.C. and Frazer,I.H. A "public" T-helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (1991):5887.
- 58.- Comerford,S.A., McCance,D.J., Dougan,G. and Tite,J.P. Identification of T-and B-cell epitopes of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 65 (1991):4681.
- 59.- Chen,L., Thomas,E.K., Hu,S.L., Hellström,I. and Hellström,K.E. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (1991):110.
- 60.- Chen,L., Mizuno,M.T., Singall,M.C., Hu,S.L., Galloway,D.A., Hellström,I. and Hellström,K.E. Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a syngenic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J. of Immunol.* 148 (1992):2617.
- 61.- Gao,L., Chain,B., Sinclair,C., Zhu,X., Sadovnikova,E., Stauss,H., Crawford,L. and Beverly,P.B.L. Murine cytotoxic T cell responses to HPV 16 E6. 12Th. International Papillomavirus Conference, 1993, Baltimore, USA.
- 62.- Sadovnikova,E., Zhu,X., Poirer,G., Collins,S., Beverly,P. and Stauss,H.J. Identification of CTL epitopes in E7 protein of human papillomavirus type 16. 12Th. International Papillomavirus Conference, 1993, Baltimore, USA.
- 63.- Tarpey,I., Davies,H., Stacey,S., Hickling,J., Birley,H., Renton,A. and McIndoe,A. Human cytotoxic lymphocytes to HPV 16/11 E7. 12Th. International Papillomavirus Conference
- 64.- Meneguzzi,G., Cerni,C., Kieny,M.P. and Lathes,R. Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia virus expressing E6 and E7. *Virology.* 181 (1991):62.

- 75.- Gaus,H., Lipford,G.D., Wagner,H. and Heeg,K. Quantitative analysis of lymphokine mRNA expression by a nonradioactive method using PCR and anion exchange chromatography. *J. of Immunology* 158 (1993):229.
- 76.- Gilliland,G., Perrin,S., Blanchard,K. and Bunn,F. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation of competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 (1990):2725.
- 77.- Rappolee,D.A., Wang,A., Mark,D. and Werb,Z. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J. Cell. Biochem.* 39 (1989):318.
- 78.- Witsell,A.L. and Schook,L.B. Clonal analysis of gene expression by PCR. *Biotechniques* 9 (1990):318.
- 79.- Matsuzi,Y., Yamamoto,T. and Hara,K. detection of inflammatory cytokine messenger mRNA-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology* 76 (1992):42.
- 80.- Bao,S., Goldstone,S. and Husband,A.J. Localization of INF- γ and IL-6 mRNA in murine intestine. *Immunology* 80 (1993):666.

