

BIOMEDICINA MOLECULAR DEL SÍNDROME DE ANTIFOSFOLÍPIDOS. DISEÑO DE NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y DE TRATAMIENTO.

Isabel Baeza, Emma Leyva, Isabel Wong, Miguel Ibáñez y Carlos Wong

Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional
Carpio y Plan de Ayala, México, D. F. cp 11340, México. Tel/Fax 57296000, Ext. 62326, ibaeza@encb.ipn.mx

Palabras clave: Enfermedades autoinmunes, partículas lipídicas, lupus murino.

Introducción. El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) se caracteriza por el desarrollo de trombosis arterial y venosa, por trombocitopenia, pérdida fetal recurrente y por la presencia de anticuerpos antifosfolípidos. Puede ser primario cuando los pacientes presentan fundamentalmente las características indicadas, o es secundario cuando está asociado con otras enfermedades, como enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (LES), con enfermedades parecidas al lupus que son inducidas por algunos fármacos como la clorpromacina, la quinina y la procainamida, o con algunas enfermedades infecciosas, como el VIH, y neoplásicas [1].

El LES es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la presencia de anticuerpos anti-nucleares, anti-DNA y anti-histonas, por el depósito de complejos inmunes en diferentes tejidos, por inflamación y vasculitis. Los órganos más afectados son la piel, los riñones y el sistema nervioso. En la piel hay exantemas, especialmente en la cara en donde se desarrollan lesiones en forma de ala de mariposa. Cuando el LES se asocia al SAAF también se detectan anticuerpos antifosfolípidos, así como la patología indicada para el SAAF primario [1, 2].

Los anticuerpos antifosfolípidos descritos en el SAAF son muy heterogéneos y en general pertenecen a dos grupos: los anti-cardiolipina y los anticoagulantes. Los anti-cardiolipina reaccionan con diferentes fosfolípidos además de con la cardiolipina. Algunos anticuerpos anti-cardiolipina muestran reactividad con un complejo formado por fosfolípidos aniónicos y la proteína plasmática γ_2 -glicoproteína I (γ_2 -gpI), o incluso con la γ_2 -gpI sola, en lugar de con los fosfolípidos. Los anticuerpos anticoagulantes prolongan el tiempo de la coagulación al interferir con las reacciones dependientes de fosfolípidos de la cascada de la coagulación. Adicionalmente se han detectado anticuerpos diferentes a los anti-cardiolipina, como los que reconocen a la fosfatidiletanolamina asociada a proteínas y los anticoagulantes que reconocen a fosfatidilserina asociada con protrombina, proteína C, proteína S o con anexina V [3, 4, 5].

Nuestro grupo de investigación ha detectado un nuevo tipo de anticuerpo en los pacientes con LES asociado al SAAF, estos nuevos anticuerpos identifican lípidos en asociaciones moleculares diferentes a la de bicapa de la matriz membranal, que se conocen como "partículas lipídicas" [6].

Las partículas lipídicas son protuberancias formadas en membranas celulares y en membranas experimentales como los liposomas, por fosfolípidos que se encuentran en una asociación molecular diferente a la de la bicapa (Fig. 1).

Estos fosfolípidos son de forma molecular cónica como la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilglicerol, el fosfatidato, la fosfatidilserina, y la cardiolipina. Las partículas lipídicas son transitorias, es decir, no son permanentes, ya que los lípidos que las forman vuelven a reorganizarse en bicapas. Su formación es estimulada por fármacos como los que inducen enfermedades parecidas al lupus en humanos (procainamida y clorpromacina), por algunos antibióticos, cationes divalentes y péptidos no-polares [6-8].

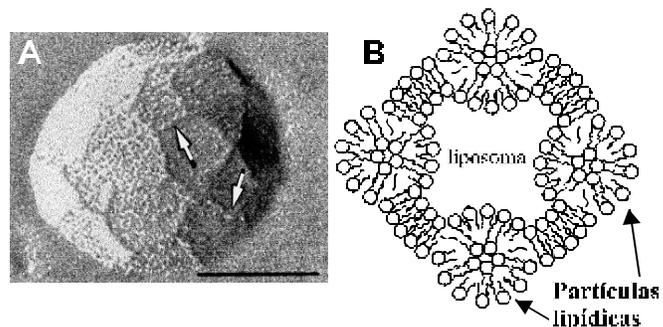


Fig. 1. Micrografía al microscopio electrónico de criofractura de partículas lipídicas y su representación esquemática. A. Se muestran las protuberancias de las partículas lipídicas (flechas) en la superficie de un liposoma, aisladas o asociadas en cordones. B. Esquema que muestra la estructura de una partícula lipídica formada por una micela invertida insertada en la bicapa de lípidos.

Las partículas lipídicas y los lípidos en bicapa son las dos asociaciones moleculares de los lípidos que se encuentran en las membranas celulares. La asociación de bicapa es la más abundante y permanente, en tanto que la de partícula lipídica se encuentra en menor proporción y es transitoria [6-9].

Los lípidos asociados en partículas lipídicas participan en la fusión entre membranas, en uniones entre células, en la activación de proteínas membranales, en señales de activación del metabolismo celular [6-10] y son inmunogénicas, ya que se han obtenido anticuerpos poli y monoclonales, como el H308, con especificidad por dichas estructuras [6, 9].

La detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en los pacientes con LES asociado al SAAF, sugiere que en dichos pacientes las partículas lipídicas se han hecho permanentes y por ello han inducido una respuesta inmune que lleva a formar anticuerpos que identifican a dichas partículas lipídicas. También sugiere que estos anticuerpos pueden participar en el desarrollo de esta enfermedad autoinmune.

Con base en lo anterior, el objetivo de esta línea de investigación es, determinar la participación de los lípidos asociados en partículas lipídicas como inductores de la formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas y determinar la participación de estos anticuerpos en el desarrollo del lupus humano, así como de un modelo experimental del lupus; asimismo, establecer métodos de diagnóstico basados en este nuevo tipo de anticuerpos y métodos de tratamiento basados tanto en bloquear a dichos anticuerpos, como en evitar que se formen en el paciente o en el modelo experimental. Lo que lleva en conjunto a un conocimiento de la biomedicina molecular de este tipo de enfermedades, que permite diseñar métodos de diagnóstico y de tratamiento que contribuyan a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Metodología. La estrategia experimental desarrollada se basa en:

1) La caracterización de los antígenos liposomales que llevan los lípidos asociados en partículas lipídicas por microscopía electrónica de criofractura [11], por resonancia magnética nuclear (NMR) de ^{31}P [11, 12] y por citofluorimetría. Estos antígenos liposomales se utilizarán en la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en el suero de pacientes y de los animales de experimentación, por metodologías diseñadas por nuestro grupo de investigación [6,9].

2) El desarrollo y la caracterización de un modelo experimental del lupus en ratones BALB/c y NIH, a través de la administración a los ratones de fármacos que inducen la formación de partículas lipídicas en membranas celulares y liposomales, o por la administración de las partículas lipídicas inducidas por estos fármacos en liposomas, o por la administración de anticuerpos monoclonales con especificidad a lípidos asociados en partículas lipídicas.

3) La detección de autoanticuerpos en el suero de pacientes y de los ratones con lupus por metodologías descritas en la literatura: específicamente de anticuerpos anti-cardiolipina [13], anti-nucleares [14] y anticoagulantes [15].

4) El desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico del lupus humano y del lupus murino basados en los antígenos liposomales que llevan los lípidos asociados en partículas para la detección de los anticuerpos anti-partículas lipídicas.

5) El desarrollo de nuevos métodos de tratamiento del lupus murino basados tanto en bloquear a los anticuerpos anti-partículas lipídicas que se producen en los ratones, como en evitar que se formen los anticuerpos anti-partículas lipídicas en el modelo murino. Con la finalidad de que estas metodologías se puedan aplicar al tratamiento del LES en el humano.

Resultados y discusión.

Detección de partículas lipídicas en los antígenos liposomales. La presencia de partículas lipídicas en los liposomas se demostró por 2 metodologías convencionales y por una desarrollada por nuestro grupo.

La microscopía electrónica de criofractura, que permite analizar la superficie de las membranas [11], ha mostrado las

protuberancias de estas estructuras lipídicas únicamente en liposomas que contienen un lípido de forma molecular cónica, como la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilglicerol, la fosfatidilserina, el fosfatidato y la cardiolipina, y que han sido tratados con un inductor de la formación de partículas lipídicas particularmente con los cationes cloropromacina, procainamida y calcio.

En la Fig. 1 se presentan las partículas lipídicas inducidas por calcio en un liposoma formado con fosfatidilcolina y fosfatidato, así como un esquema que indica el posible arreglo de las moléculas de los lípidos en estas asociaciones lipídicas.

La NMR de ^{31}P ha revelado espectros más angostos y desplazados a campos magnéticos más bajos después de la adición a los liposomas de los inductores de la formación de partículas (Fig. 2), debido al movimiento isotrópico de los lípidos cónicos en las partículas lipídicas como se ha descrito previamente [12].

Los espectros de liposomas que contienen los lípidos cónicos cardiolipina o fosfatidilserina y partículas lipídicas formadas en presencia de cloropromacina se presentan en la Fig. 2, resultados similares se obtuvieron por NMR con los inductores calcio y procainamida en estos liposomas.

Adicionalmente, demostramos que por citofluorimetría pueden detectarse claramente las partículas lipídicas en los liposomas, debido a que éstos presentan una granularidad o complejidad en sus bicapas mucho mayor que los liposomas antes de la adición de los inductores de partículas lipídicas.

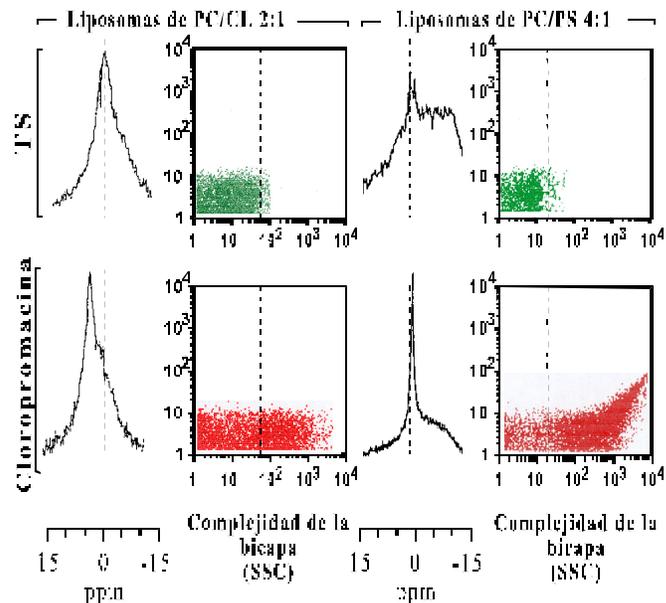


Fig. 2. Detección de partículas lipídicas inducidas por cloropromacina. Los espectros de NMR de ^{31}P se obtuvieron de liposomas formados de fosfatidilcolina (PC)/fosfatidato (PA) en proporción molar 2:1 y de PC/fosfatidilserina (PS) (4:1) incubados con regulador de Tris-salina (TS) solo o con cloropromacina 2 mM. La citofluorimetría se hizo con muestras de liposomas preparados para NMR. Las líneas discontinuas indican los valores de referencia en ppm para NMR y en dispersión del láser (SSC) para granularidad o complejidad liposomal.

La mayor granularidad es atribuida a la dispersión del rayo láser causada por las partículas lipídicas, con respecto a la dispersión del láser que registran los liposomas que tienen una superficie lisa de lípidos en bicapa (Fig. 2). Resultados similares se obtuvieron en citofluorometría con los inductores de partículas calcio y procainamida en estos liposomas, así como en liposomas que llevan fosfatidato.

Desarrollo de un modelo experimental del lupus en ratones BALB/c y NIH.

Para determinar la participación de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en el desarrollo de algunas enfermedades del SAAF, en particular del LES, y con base en la propiedad de la clorpromacina y de la procainamida de inducir la formación de partículas lipídicas, como se demostró en la Fig. 2, nuestro grupo propuso que en el lupus humano producido por la administración terapéutica de clorpromacina (un tranquilizante) o de procainamida (un antiarrítmico), las protuberancias lipídicas son estabilizadas en las membranas celulares de los pacientes por estos fármacos, lo que produce una exposición anormal de las mismas que conduce a una respuesta inmunológica con la producción de anticuerpos anti-partículas lipídicas.

Para probar esta hipótesis, los fármacos se administraron a ratones hembras de la cepa singénica BALB/c tanto solos como formando partículas lipídicas en liposomas. Los fármacos se administraron en los ratones a concentraciones semejantes a las que se usan en el tratamiento de pacientes con disfunciones psicóticas (3 mg/Kg de clorpromacina) o con arritmias cardíacas (10 mg/Kg de procainamida).

Se usaron grupos de 10 ratones hembras de dos meses de edad. La clorpromacina y la procainamida se inyectaron por vía intramuscular cada 24 h durante 4 meses, los liposomas solos o en presencia de los fármacos se administraron por vía intraesplénica, 2 veces una cada 2 semanas, posteriormente se administraron por vía intraperitoneal una vez cada semana durante 2 meses.

En el primer caso se espera que los fármacos indujeran y estabilizaran partículas lipídicas en las membranas de las células de los ratones; mientras que en el segundo, las partículas lipídicas ya fueron administradas en los liposomas. Como se esperaba, con los 2 procedimientos los ratones produjeron anticuerpos con reactividad a los lípidos asociados en partículas lipídicas [16].

Después de 4 semanas de la detección en el suero de los ratones BALB/c de los anticuerpos anti-partículas lipídicas, se produjeron en dichos ratones anticuerpos anti-cardiolipina y anti-nucleares, así como anticoagulantes (Cuadro 1).

Asimismo, estos ratones presentaron alopecia moderada, lesiones faciales simétricas, que fueron en forma similar a la de alas de mariposa, como las descritas en el lupus humano, cuando los ratones recibieron partículas lipídicas inducidas por procainamida (Fig. 3 A, B).

También presentaron alteraciones en la dermis y la epidermis, así como alteraciones renales y depósitos de complejos inmunes particularmente entre la dermis y la epidermis, en forma similar a la banda lúpica descrita en el humano, así como depósitos de complejos inmunes en la

pared de los capilares glomerulares y en el mesangio renal, también como sucede en el lupus humano [17, 18].

Es decir, en los ratones BALB/c en los que se administraron clorpromacina o procainamida o partículas lipídicas formadas por estos inductores se desarrolló una enfermedad autoinmune parecida al lupus humano.

Una enfermedad autoinmune con características muy similares a la desarrollada en los ratones BALB/c se produjo en ratones no-singénicos NIH por la administración de los fármacos solos o formando partículas lipídicas (Fig. 3 C, D).

La reproducción del lupus murino en ratones NIH es muy relevante, porque estos ratones son una cepa no-singénica que es más parecida a una población genéticamente abierta como la humana. Por lo que este modelo murino puede aplicarse más apropiadamente al estudio del lupus que afecta al humano.

Cuadro 1. Autoanticuerpos detectados en el lupus desarrollado en ratones BALB/c y NIH.

Tratamiento de cada grupo de ratones	Anticuerpos anti-partículas lipídicas (D)	Anticuerpos anti-cardiolipina (UA)	Anticuerpos anti-coagulantes (s)	Anticuerpos anti-nucleares IgG
FÁRMACOS:				
a) Clor	0.99 ? 0.01	2.00 ? 0.1	38 ? 2	+
b) Proc	0.99 ? 0.01	2.20 ? 0.1	39 ? 2	+
c) Control:TS	0.01? 0.001	0.09? 0.002	32 ? 2	-
LIPOSOMAS:				
d) PC/PS/Clor	0.99 ? 0.01	2.50 ? 0.1	42 ? 4	+
e) PC/PS/Proc	0.87 ? 0.03	3.50 ? 0.2	43 ? 2	+
f)Control:PC/PS	0.05 ? 0.002	0.90 ? 0.1	32 ? 2	-
ANTICUERPO MONOCLON.				
g) H308	0.79 ? 0.02	3.4 ? 0.4	43 ? 4	+
h) Control: Ts	0.1 ? 0.001	0.5 ? 0.2	32 ? 2	-

Cada grupo (a-h) es de 10 ratones. (D) Es la diferencia en escala logarítmica entre la reactividad de sueros inmunes y controles, valores de D ? 0.5 a p < 0.001 revelan anticuerpos anti-partículas. (AU) son unidades arbitrarias para anticuerpos anti-cardiolipina y son positivos con valores ? 1.9 para IgG. Valores de anticuerpos anticoagulantes mayores que 3 veces la ? del suero control (32 s) son positivos, s = segundos. TS = regulador. Ts = Anticuerpo monoclonal inespecífico. Clor = clorpromacina; Proc = procainamida; PC = fosfatidilcolina; PS = fosfatidilserina

La participación de anticuerpos anti-partículas lipídicas en el desarrollo de una enfermedad autoinmune fue confirmada por la administración intraperitoneal en ratones BALB/c y NIH del anticuerpo monoclonal H308 con reactividad a partículas lipídicas. Al administrar este anticuerpo a los ratones de ambas cepas se produjo también una enfermedad

autoinmune con características muy similares a las de la enfermedad desarrollada por la administración de los fármacos tanto solos como formando partículas lipídicas (Fig. 3 C, D).

La administración del anticuerpo monoclonal H308 fue más efectiva, ya que el lupus murino se desarrolló 2 meses después de la administración de este anticuerpo, a diferencia de los fármacos solos o formando partículas lipídicas en los liposomas que desarrollaron el lupus murino hasta 4 meses después de su administración en ambas cepas de ratones.

El lupus murino se desarrolló por los 3 procedimientos indicados más eficientemente en ratones hembras (60%) que en ratones machos (40%). También se encontró que los ratones BALB/c hembras que desarrollaron el lupus fueron menos fértiles que los ratones hembras control, además la administración del anticuerpo monoclonal H308 produjo pérdida fetal en ratones hembras preñadas. En cambio, la mayoría de los ratones NIH hembras presentaron abortos solamente hasta la segunda vez que se preñaron [16].

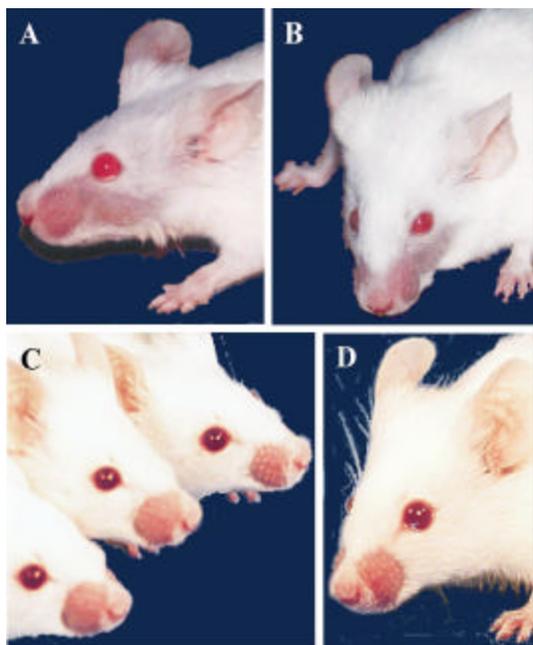


Fig. 3. Modelo murino parecido al lupus humano. Fotografías de: Ratones hembras BALB/c de 7 meses de edad que recibieron liposomas con partículas lipídicas inducidas por procainamida: A. se observan lesiones faciales en forma semejante a una ala de mariposa. B. las lesiones faciales son simétricas. C, D. Ratones hembras NIH de 7 meses de edad que recibieron el anticuerpo monoclonal H308 con reactividad a partículas lipídicas.

La demostración de que los anticuerpos anti-partículas lipídicas participan en el desarrollo en ratones de una enfermedad autoinmune parecida al lupus humano, fundamentalmente porque se producen estos anticuerpos en los ratones y porque estos anticuerpos aparecen primero que los anti-cardiolipina y los anti-nucleares, nos permite proponer que debido a que las partículas lipídicas se

encuentran en las membranas celulares, anticuerpos contra ellas pueden causar daño en dichas membranas y romperlas, con la consecuente liberación de antígenos intracelulares.

La exposición de estos antígenos como la fosfatidilserina que se encuentra en la cara interna de la membrana celular, la cardiolipina que forma parte de la membrana interna de las mitocondrias, el núcleo y el DNA, puede explicar la formación de anticuerpos contra dichos antígenos.

Esta propuesta ha sido totalmente confirmada en el modelo experimental del lupus murino porque después de la formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas se produjeron los anticuerpos anti-cardiolipina, anti-nucleares y anticoagulantes. Lo que constituye una de las aportaciones fundamentales de nuestra línea de investigación a la biomedicina molecular de este tipo de enfermedades autoinmunes

Con base en lo anterior, la formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas es un evento previo a la formación de los autoanticuerpos indicados, por lo que los anticuerpos anti-partículas pueden emplearse para la detección de esta enfermedad en etapas tempranas de la misma.

Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico del lupus basados en antígenos liposomales que llevan partículas lipídicas. Debido a que los lípidos en las asociaciones de bicapa y de partículas lipídicas son las formas naturales en que los lípidos se encuentran en las membranas celulares, la utilización de modelos membranales como los liposomas que llevan los fosfolípidos en estas asociaciones, constituyen antígenos más adecuados para la detección de estos anticuerpos en el suero de pacientes, que los antígenos que se usan en la práctica clínica para la detección de anticuerpos anti-lípidos, en donde en general no se toma en cuenta la forma en que los lípidos están en los organismos y usan lípidos unidos directamente a superficies sólidas como en el método de ELISA[13].

Al usar como antígenos liposomas con partículas lipídicas demostramos por primera vez este nuevo tipo de anticuerpos con especificidad a partículas lipídicas en el suero de pacientes con LES asociado a SAAF, como se indicó previamente en este trabajo.

Este nuevo tipo de anticuerpos que son los que participan en el desarrollo del lupus murino, se detectan por citofluorometría con antígenos liposomales que llevan partículas lipídicas y con un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas o de ratón, de acuerdo con el origen de los anticuerpos anti-partículas, que está unido a un fluorocromo como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig. 4).

Al ocurrir la reacción inmune entre los anticuerpos anti-partículas lipídicas y los antígenos liposomales, se fija el segundo anticuerpo anti-inmunoglobulinas de humano o de ratón que está unido a FITC, por lo que la reacción inmune produce liposomas fluorescentes.

La fluorescencia liposomal es detectada por citofluorometría y se registra en histogramas que incluyen el número de liposomas analizados (Fig. 5 a, e).

Como control negativo se usan liposomas en regulador de TS con o sin cloropromacina (Fig. 5c) y como control positivo la reacción con el anticuerpo monoclonal H308 específico para partículas lipídicas (Fig. 5 a).

La reacción de los anticuerpos anti-partículas lipídicas del suero de un ratón que desarrolló el lupus por administración de partículas lipídicas inducidas por cloropromacina se muestra en la Fig. 5 e. En donde se observa claramente un aumento de 100 veces en la fluorescencia después de la reacción del suero inmune con los liposomas, con respecto a la reacción del suero preinmune. El aumento en la fluorescencia revela la presencia de los anticuerpos anti-partículas.

A este método de citofluorimetría diseñado para detectar anticuerpos anti-partículas lipídicas con antígenos liposomales, le llamamos citofluorimetría-liposomal.

Al comparar los histogramas de una reacción inmune con su control por el método estadístico de Kolmogorov-Smirnof, que está integrado en el citofluorómetro, se obtiene el valor de D [19]. Este valor es la diferencia en la fluorescencia, en escala logarítmica, entre las 2 poblaciones liposomales analizadas y tiene valores entre 0.0 y 1.0 [19, 20]. Valores de $D > 0.5$ a $p < 0.001$ son positivos e indican, en este caso, la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas [6].

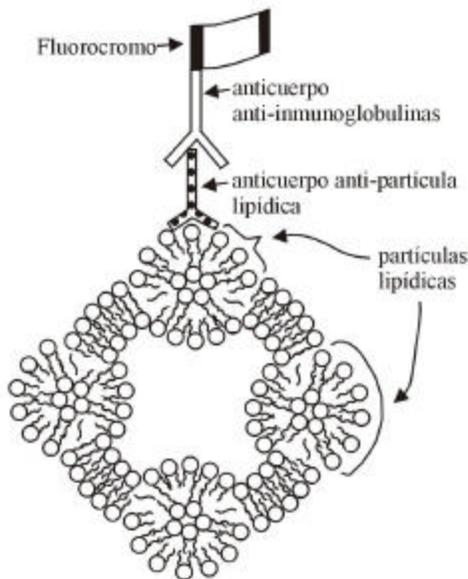


Fig. 4. Representación esquemática del sistema empleado para detectar anticuerpos anti-partículas lipídicas por citofluorimetría. Los anticuerpos anti-partículas lipídicas provienen del suero de los pacientes o de los ratones con lupus murino. El fluorocromo de mayor uso es el FITC.

Los sueros de los diferentes grupos de ratones con lupus murino indicados en el Cuadro 1, así como los sueros de 20 pacientes con LES asociado al SAAF dieron reacciones similares a la indicada con el suero del ratón en la Fig. 5 e. Lo que revela como ya se ha indicado la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas en dichos sueros.

Adicionalmente la citofluorimetría proporciona gráficas de puntos que correlacionan la fluorescencia, producto de la reacción inmune, con las partículas lipídicas, que son las estructuras lipídicas que reaccionan. Los perfiles obtenidos permiten caracterizar la reacción inmune (Fig. 5 b, f), con respecto al control (Fig. 5d)

Los anticuerpos anti-partículas lipídicas también se pueden detectar con los antígenos liposomales unidos a las placas de poliestireno que se usan para el método de ELISA.

Con esta metodología que llamamos ELISA-liposomal los lípidos formando los liposomas son los que se unen al soporte sólido, por lo que se conservan los lípidos asociados en bicapa y en partículas lipídicas de los antígenos liposomales.

En esta metodología, el segundo anticuerpo anti-inmunoglobulinas de humano o de ratón se encuentra unido a la enzima peroxidasa, por lo que la reacción inmune se pone de manifiesto por el desarrollo de color en los productos de la acción enzimática de la peroxidasa.

Actualmente se estudia la relación que puede haber entre la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas en el suero de pacientes con LES asociado a SAAF y el desarrollo de esta enfermedad. En este estudio se aprovechan los hallazgos descritos en el modelo murino del lupus.

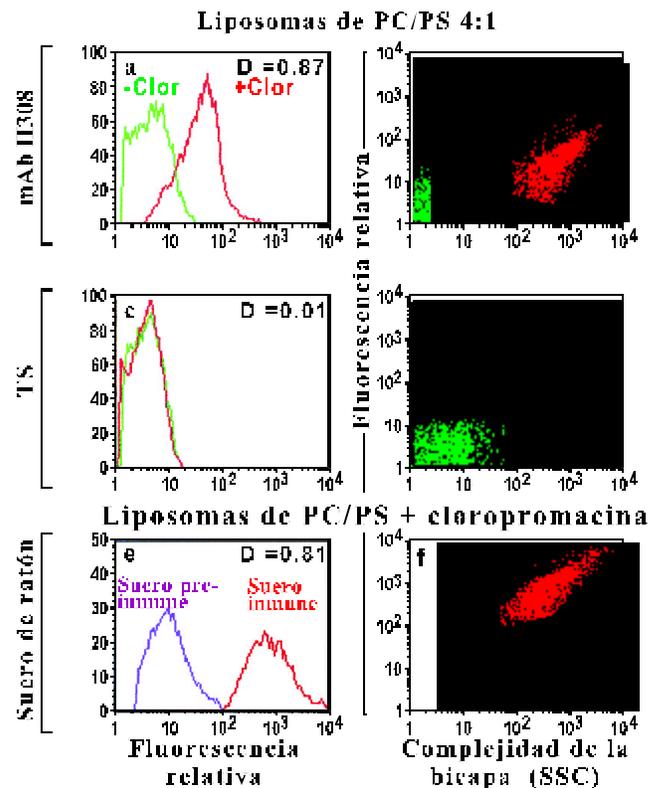


Fig. 5. Fluorocitometría de la reactividad de los anticuerpos anti-partículas lipídicas. Se emplean liposomas de fosfatidilcolina (PC)/fosfatidilserina (PS) como antígenos. Las partículas lipídicas se inducen con cloropromacina (Clor). El anticuerpo monoclonal (mAb) H308 es el control positivo y el regulador de Tris-salina (TS) es el control negativo.

Debido a que los anticuerpos anti-partículas lipídicas se producen en forma previa a los anti-cardiolipina y a los anti-nucleares, es posible detectar los anticuerpos anti-partículas con los métodos de ELISA-liposomal o de citofluorometría-liposomal en el suero de pacientes que se sospecha que inician con el LES o con enfermedades parecidas al lupus.

El diagnóstico temprano de estas enfermedades puede conducir a un mejor tratamiento de los pacientes, así como a mejorar su calidad de vida.

Desarrollo de nuevos métodos de tratamiento del lupus basados tanto en bloquear a los anticuerpos anti-partículas lipídicas, como en evitar que se formen estos anticuerpos.

Los métodos de tratamiento se están desarrollando en el modelo murino del lupus con la finalidad de aplicarlos en el tratamiento del LES en el humano.

El fundamento para bloquear los anticuerpos anti-partículas lipídicas es inactivar a estos anticuerpos y evitar que participen en el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, este procedimiento no impide que se continúen formando dichos anticuerpos.

Para bloquear en los anticuerpos anti-partículas los sitios que reconocen a los epítomos en las partículas lipídicas, se están llevando a cabo estudios de inhibición de la reacción inmune de los anticuerpos anti-partículas con haptenos. Los haptenos que se están usando son los diferentes compuestos químicos que integran a los lípidos, como serina, fosforilserina, glicerolfosforilserina, ácidos grasos etc.

Los haptenos que produzcan la mayor inhibición de los anticuerpos anti-partículas serán los que se administren en los ratones con lupus para tratar de bloquear a dichos anticuerpos y lograr una disminución en esta enfermedad.

Por otra parte, para evitar que se formen los anticuerpos anti-partículas lipídicas, la estrategia que hemos diseñado es usar compuestos que estabilicen la bicapa lipídica de las membranas celulares.

Los compuestos que hemos seleccionado son la espermidina y la cloroquina. La espermidina es una poliamina catiónica trivalente (Fig. 6), entre sus funciones biológicas se encuentra la de estabilizador membranar [21]. La cloroquina es un fármaco que se utiliza en el tratamiento del LES [22], es también una amina pero su carga es divalente y tiene además una región hidrofóbica en su estructura química (Fig. 6), por lo que puede intercalarse entre la matriz lipídica membranar.

La estrategia al estabilizar la matriz lipídica de la membrana celular, es disminuir la movilidad de los lípidos que se requiere para que estos lípidos se reorganicen y cambien del arreglo de bicapa al de partícula lipídica [6].

Esto se demostró claramente en liposomas por citofluorometría, porque la cloroquina y la espermidina evitaron la formación de partículas cuando se adicionaron a los liposomas simultáneamente con los inductores de partículas como la cloropromacina. Además revierten la formación de partículas lipídicas cuando se adicionan después del inductor de partículas.

La espermidina fue el compuesto más efectivo en impedir y en revertir la formación de partículas lipídicas, posiblemente

por sus tres cargas positivas que se unen sobre los lípidos de carga negativa que se encuentran en la superficie de los liposomas, lo que impide su reasociación para formar las partículas lipídicas en presencia de los inductores cloropromacina o procainamida.

Con base en estos hallazgos, es posible que uno de los efectos de la cloroquina en el tratamiento del LES sea el de estabilizar las membranas celulares e impedir o disminuir la formación de partículas lipídicas. Por lo que se diseñó un compuesto que es un análogo de la cloroquina, en el que se aumenta el número de cargas positivas para aumentar su eficiencia en estabilizar las membranas celulares.

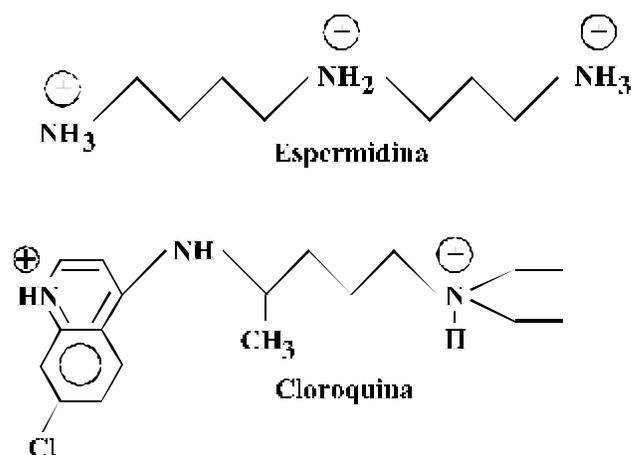


Fig. 6. Estructura química de los compuestos usados como estabilizadores de la membrana celular.

Este compuesto, que llamamos luprezan, es muy efectivo en suprimir y en revertir la formación de partículas lipídicas en liposomas, como se demuestra por los estudios de citofluorometría (Fig. 7).

En este estudio se analiza la presencia de partículas lipídicas en los liposomas por la dispersión del rayo láser. Los liposomas en regulador de Tris-salina presentan parámetros citofluorométricos característicos (Fig. 7 a, b). Después de la adición de cloropromacina se produce un aumento en la complejidad de las bicapas liposomales debido a la presencia de las partículas lipídicas que induce la cloropromacina (Figura 7 c, d). Esta complejidad es totalmente revertida por la adición de luprezan (Fig. 7 e, f). Adicionalmente, cuando se agregan simultáneamente la cloropromacina y el luprezan, las gráficas obtenidas son parecidas a las de la Fig. 7 a, b. Esto indica que el luprezan revierte y suprime, respectivamente, la formación de partículas lipídicas en los liposomas.

La complejidad liposomal también podría aumentar porque los liposomas se aglutinaran entre sí y formarían conglomerados. Sin embargo, esto no sucede porque el tamaño de los liposomas (Fig. 7 a) no se modifica por la adición de cloropromacina o de luprezan (Fig. 7 c, e).

El luprezan se ha probado en el tratamiento del lupus murino, por los procedimientos que normalmente se usan en farmacología para determinar en animales la actividad de

nuevos compuestos. Su efecto se comparó con el de la cloroquina en ratones con lupus.

Se formaron 3 grupos integrados cada uno de ellos por 10 ratones NIH que habían desarrollado lupus por la administración del anticuerpo monoclonal H308. Los compuestos se administraron por vía oral en el agua de bebida durante 8 semanas.

Al grupo A, se le administró cloroquina a una concentración similar a la que se emplea para el tratamiento del LES en humanos (5 mg/Kg de peso), el grupo B recibió luprezan a la misma concentración que la cloroquina y el grupo C, es el grupo control, que no recibió dichos compuestos.

Durante las 8 semanas de administración del luprezan y de la cloroquina a los ratones NIH de los grupos A y B, también se les continuó la administración intraperitoneal del anticuerpo monoclonal H308. Para que los cambios que se observaran se pudieran atribuir a los estabilizadores de membrana y no a la falta del anticuerpo monoclonal H308 que desarrolló la enfermedad en dichos ratones. El anticuerpo H308 también se continuó administrando a los ratones del grupo C.

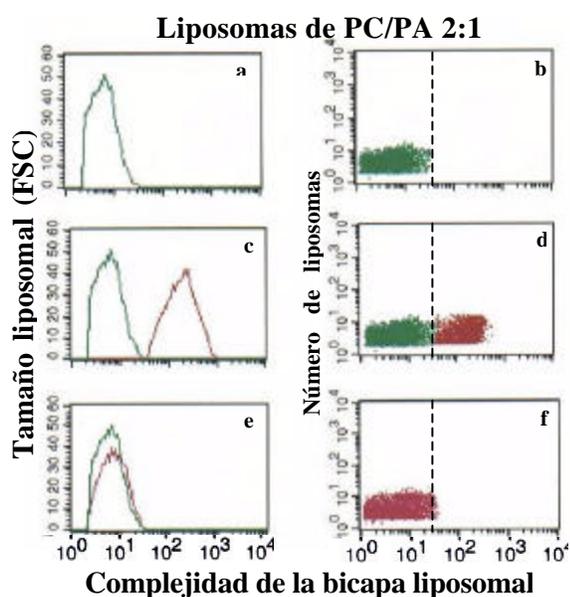


Fig. 7. Fluorocitometría de la acción del Luprezan en la formación de partículas lipídicas en liposomas. Se emplearon liposomas de fosfatidilcolina (PC)/fosfatidato (PA). a, b. Liposomas en regulador de Tris-salina. c, d. Liposomas incubados con cloropromacina 0.1 mM. e, f. Liposomas incubados con cloropromacina 0.1 mM y con luprezan 5 ?M. En las gráficas c-f también se incluyen los liposomas que solamente están en regulador. Las líneas discontinúas indican los valores de referencia en la dispersión del láser (SSC) para la complejidad liposomal.

Los compuestos luprezan y cloroquina también se administraron a 2 grupos de 10 ratones NIH que no presentaban el lupus murino.

Hubo un cambio muy notable en los ratones con lupus que recibieron los estabilizadores de la membrana celular. Después de 7 días de administrar el luprezan, se observó que

las lesiones en piel empezaron a disminuir de tamaño, se inició el crecimiento del pelo y de los bigotes y dichas lesiones desaparecieron completamente a las 3 semanas de administración de este compuesto (Fig. 8).

Con la cloroquina se observó una respuesta similar en los ratones NIH con lupus, pero esta respuesta se inició después de 3 semanas de administración del fármaco. Las lesiones faciales desaparecieron en este grupo de ratones a las 6 semanas de tratamiento (Fig. 8).

Adicionalmente se observó una disminución en los títulos de los anticuerpos anti-partículas lipídicas, anti-cardiolipina, anti-nucleares y anticoagulantes en los ratones de los grupos A y B, que recibieron la cloroquina o el luprezan.

Actualmente se llevan a cabo los estudios histopatológicos, así como la determinación de depósitos de complejos inmunes en estos ratones para determinar de forma integral el efecto de la cloroquina y del luprezan en el lupus murino. En el grupo C, los ratones conservaron las características del lupus ya descritas. Los grupos de ratones sanos NIH que recibieron cloroquina y luprezan no mostraron cambios aparentes.

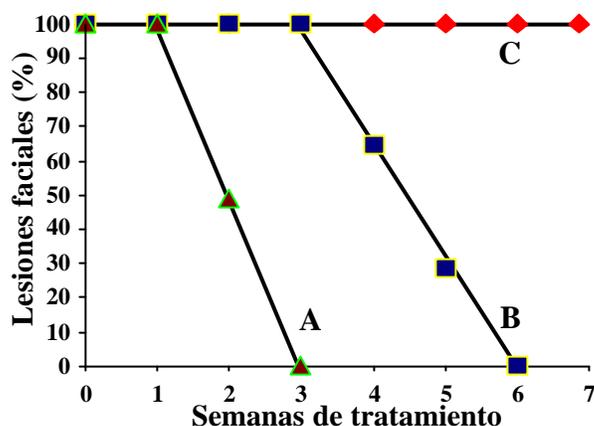


Fig. 8. Efecto del luprezan y de la cloroquina en las lesiones faciales de los ratones NIH que presentan lupus.

Estos resultados sugieren fuertemente el papel de los estabilizadores de la membrana celular en revertir el lupus murino, por lo que el luprezan podría utilizarse en el tratamiento del lupus en el humano, después de realizar todas las pruebas de toxicidad reglamentarias.

Conclusiones.

1. La cloropromacina y la procainamida inducen la formación de partículas lipídicas en liposomas que contienen un lípido cónico como fosfatidato, fosfatidilserina o cardiolipina.
2. La cloropromacina y la procainamida. o partículas lipídicas formadas por estos inductores desarrollaron en ratones singénicos BALB/c un modelo experimental parecido al lupus humano.
3. Los anticuerpos anti-partículas lipídicas participan en el desarrollo del lupus murino porque las partículas lipídicas son inmunogénicas,

4. El desarrollo del lupus murino por la administración del anticuerpo monoclonal H308 con reactividad por partículas lipídicas, confirma la participación de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en el desarrollo de esta enfermedad.
5. El desarrollo del lupus en ratones no-singénicos NIH, una población genéticamente abierta como la humana, es el modelo más adecuado para estudiar el lupus humano.
6. Los anticuerpos anti-partículas lipídicas se forman primero que los anti-cardiolipina, los anticoagulantes y los anti-nucleares en el lupus murino.
7. Los anticuerpos anti-partículas lipídicas se han detectado en pacientes con lupus eritematoso generalizado asociado al síndrome de antifosfolípidos.
8. La determinación de anticuerpos anti-partículas lipídicas puede utilizarse como un método de detección temprano del lupus.
9. Estabilizadores de la matriz lipídica membranal pueden usarse para el tratamiento del lupus murino.
10. El luprezan es más eficiente en el tratamiento del lupus murino que la cloroquina.

Agradecimientos. Este trabajo ha recibido apoyo presupuestal del Instituto Politécnico Nacional en los proyectos de investigación CGPI-IPN Claves 20020696 y 20030157.

Bibliografía.

1. Asherson, R. A., Cervera, R., Piette, J., Shoenfeld, Y. (1996). The antiphospholipid syndrome: History, definition, classification, and differential diagnosis. En: *The antiphospholipid syndrome*. Asherson, R. A., Cervera, R., Piette, J., Shoenfeld, Y. CRC Press, Boca Raton, New York, Londres. 3-12.
2. Hochberg, M. C. (1997). Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40: 1725-1726.
3. McNeil, H. P., Simpson, R., Chesterman, N. Krilis, A. (1990). Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: ?₂-Glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 4120-4124.
4. Sugi, T., McIntyre, A. (1995). Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. *Blood* 86: 3083-3089.
5. Arnout, J. (2001). Antiphospholipid syndrome: diagnostic aspects of lupus anticoagulants. *Thromb. Haemost.* 86: 83-91.
6. Aguilar, L., Ortega, G., Campos, B., Ibáñez, M., Wong, C., Farfán, N., Naciff, J., Kaetzel, M., Dedman, J., Baeza, I. (1999). Phospholipid membranes form specific nonbilayer molecular arrangements that are antigenic. *J. Biol. Chem.* 274: 25193-25196.
7. Cullis, P. R., Tilcock, C. P., Hope, M. J. (1991). Lipid polymorphism. En: *Membrane fusion*. Wilschut, J., Hoekstra, D. Marcel Dekker, New York. 35-64.
8. Hafez, M., Cullis, P. R. (2001). Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 139-148.
9. Baeza, I., Aguilar, L., Alvarado, F., Escobar, A., Mondragón, R., González, S., Ibáñez, M., Wong, C. (1995). Identification of phosphatidate nonlamellar phases on liposomes by flow cytometry. *Biochem. Cell Biol.* 73: 289-297.
10. van Dalen, A., Hegger, S., Killian, J. A., de Kruijff, B. (2002). Influence of lipids on membrane assembly and stability of the potassium channel KcsA. *FEBS Lett.* 525: 33-38.
11. Baeza, I., Wong, C., Mondragón, R., González, S., Ibáñez, M., Farfán, N., Argüello, C. (1994). Transbilayer diffusion of divalent cations mediated by phosphatidate particles. *J. Mol. Evol.* 39: 560-568.
12. Smaal, E. B., Nicolay, K., Mandersloot, J. G., de Gier, J., de Kruijff, B. (1987). ²H-NMR, ³¹P-NMR and DSC characterization of a novel lipid organization in calcium-dioleoylphosphatidate membranes. Implications for the mechanism of the phosphatidate calcium transmembrane shuttle, *Biochim. Biophys. Acta* 897: 453-466.
13. Loizou, S., McCrea, J. D., Rudge, A. C., Reynolds, R., Boyle, C., Harris, E. N. (1985) Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Standardization and quantitation of results. *Clin. Exp. Immunol.* 62: 738-745.
14. Molden, D. P., Nakamura, R. M., Tan, E. M. (1984). Standardization of immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): Use of reference-sera of defined antibody specificity. *J. Clin. Pathol.* 82: 57-62.
15. van den Besselaar, A., Meeuwisse-Braun, J., Jansen-Gruter, R., Bertina, R. M. (1987). Monitoring heparin therapy by activated partial thromboplastin time. Effect of pre-analytical conditions. *Thromb. Haemost.* 57: 226-231.
16. Baeza, I., Leyva, E., Campos, B., Lara, M., Ibáñez, M., Farfán, N., Orozco, H., Flores-Romo, L., Hernández-Pando, R., Wong, C. (2003). Antibodies to nonbilayer phospholipid arrangements induce a murine autoimmune disease resembling human lupus. *E. J. Immunol.* (enviado).
17. Jerdan, M. S., Hood, F., Moore, W., Callen, J. P. (1990). Histopathologic comparison of subsets of lupus erythematosus. *Arch. Dermatol.* 126: 52-60.
18. Farrugia, E., Torres, V., Gastineau, D., Michet, C., Holley, K. E. (1992). *Am. J. Kidney Dis.* 20: 463-471.
19. Lampariello, F. (2000). On the use of the Kolmogorov-Smirnov statistical test for immunofluorescence histogram comparison. *Cytometry* 39: 179-188.
20. Zazueta, C., Ramírez, J., García, N., Baeza, I. (2003). Cardiolipin regulates the activity of reconstituted mitochondrial calcium uniporter by modifying the structure of liposome bilayer. *J. Membrane Biol.* 191: 113-122.
21. Schuber, F., (1989). Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J.* 260: 1-10.
22. Muñoz-Valle, J. F., Vazquez-Del Mercado, M., Ruiz-Quezada, S., Oregon-Romero, E., Navarro-Hernández, R. E., Ramírez-Barragán, J., Martínez-Bonilla, G., Bernard-Medina, G., Bastidas-Ramírez, B. E., Ruiz-Madrigal, B., Panduro, A. (2003) Polymorphism of the beta(3)-adrenergic receptor and lipid profile in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus treated with chloroquine. *Rheumatol. Int.* 23: 99-103.