

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL MODELO EN
RATÓN DE LUPUS HUMANO**

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA
OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA:
CARLOS WONG BAEZA

Directores de tesis:
DRA. MARÍA ISABEL BAEZA RAMÍREZ
DR. CARLOS WONG RAMÍREZ

COLABORACIÓN
DR. HORACIO ASTUDILLO DE LA VEGA



MÉXICO D.F. Abril 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 16:00 horas del día 12 del mes de Abril del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB-IPN para examinar la tesis titulada:

Análisis molecular del modelo en ratón de lupus humano

Presentada por el alumno:

Wong

Apellido paterno

Baeza

Apellido materno

Carlos

Nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	3	3	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. María Isabel Baeza Ramírez

Dr. Carlos Wong Ramírez

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández

Dr. Horacio Astudillo de la Vega

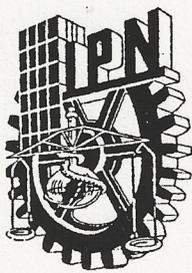
Dra. Rosa María Ribas Jaimes

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Manuel Jesús Piñón López

Secretaría de Educación Pública
Instituto Politécnico Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 12 del mes de Abril del año 2012, el que suscribe Carlos Wong Baeza alumno del Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología Molecular con número de registro A090333, adscrito al Laboratorio de Biomembranas, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. María Isabel Baeza Ramírez y del Dr. Carlos Wong Ramírez y cede los derechos del trabajo intitulado Análisis molecular del modelo en ratón de lupus humano, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección isabelbaeza@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,

Nombre y firma del alumno
Carlos Wong Baeza

Nombre y firma del Director de tesis
Dra. María Isabel Baeza Ramírez

Nombre y firma del Director de tesis
Dr. Carlos Wong Ramírez

BIOMEDICINA MOLECULAR DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Carlos Wong-Baeza, Luís España-Mejía, Alonso Tescucano, Verónica Alcántara, Miguel Ibáñez, Carlos Wong e Isabel Baeza.

Laboratorio de Biomembranas. Departamento de Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 5729 6000, Ext. 62326.

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a clinically heterogeneous disease, autoimmune in origin, and characterized by the presence of autoantibodies as those against double-stranded DNA, nuclei, histones, lymphocytes, ribonucleoproteins, and Ro and La cytoplasmic proteins. Immune-complex deposition on target organs produces inflammation and vasculitis; the most affected organs are skin, kidneys and the nervous system, and glomerulonephritis is the most frequent cause of mortality in the patients. SLE aethiology is very complex and poorly understood. Experimental animal models have been used in trying to understand the molecular basis of this complex disease. We have studied the participation of phospholipids associated in a non-bilayer arrangement, known as lipidic particles, and antibodies against lipidic particles, in the development of SLE. We hypothesized that antibodies against lipidic particles might contribute to the development of autoimmune disorders, perhaps through immunogenic damage of cells with lipidic particles exposed on their membranes. To test this hypothesis, we injected both syngenic and non-syngenic mice with liposomes bearing lipidic particles induced by chlorpromazine or procainamide, we also treated mice directly with these lipidic particles inductors alone. Mice developed an autoimmune disease resembling human lupus, with the production of anti-lipidic particles antibodies three to four weeks earlier than anti-cardiolipin, anticoagulant, anti-histone and anti-nuclear antibodies. Sick mice presented some areas of facial alopecia, their most affected organs were skin and kidneys. These findings, together with the presence of anti-lipidic particles antibodies in the sera of patients with SLE, led us to propose the participation of lipidic particles and anti-lipidic particles antibodies in the development of human lupus. Our model might contribute to a better understanding of the molecular biomedicine of SLE, and also to an earlier diagnosis and treatment of this disease, through the detection of anti-lipidic particles antibodies in the sera of patients.

Key words: Anticuerpos anti-partículas lipídicas, enfermedades autoinmunes, lupus eritematoso sistémico, lupus en ratones, partículas lipídicas.

Dirigir la correspondencia a: Dra. María Isabel Baeza Ramírez
Laboratorio de Biomembranas.

Tel. 5729 6000, Ext. 62326. E-mail: isabelbaeza@yahoo.com ibaeza@encb.ipn.mx



Membrane fusion inducers, chloroquine and spermidine increase lipoplex-mediated gene transfection

Carlos Wong-Baeza^a, Israel Bustos^a, Manuel Serna^a, Alonso Tescucano^a, Verónica Alcántara-Farfán^a, Miguel Ibáñez^a, Cecilia Montañez^b, Carlos Wong^a, Isabel Baeza^{a,*}

^aBiochemistry Department, National Polytechnic Institute (IPN), Mexico City 11340, Mexico

^bDepartment of Genetics and Molecular Biology, Centre for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), IPN, Mexico City 07360, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2010

Available online 8 May 2010

Keywords:

Gene transfection

Lipoplexes

Lipofectamine

Chlorpromazine

Procainamide

Chloroquine

Spermidine

ABSTRACT

Gene transfection into mammalian cells can be achieved with viral and non-viral vectors. Non-viral vectors, such as cationic lipids that form lipoplexes with DNA, are safer and more stable than viral vectors, but their transfection efficiencies are lower. Here we describe that the simultaneous treatment with a membrane fusion inducer (chlorpromazine or procainamide) plus the lysosomotropic agent chloroquine increases lipoplex-mediated gene transfection in human (HEK293 and C-33 A) and rat (PC12) cell lines (up to 9.2-fold), as well as *in situ* in BALB/c mice spleens and livers (up to 6-fold); and that the polyamine spermidine increases lipoplex-mediated gene transfection and expression in cell cultures. The use of these four drugs provides a novel, safe and relatively inexpensive way to considerably increase lipoplex-mediated gene transfection efficiency.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Gene transfection into mammalian cells, both in tissue cultures and *in vivo*, is a critical technique for studying gene functions and developing gene therapies for inherited diseases [1]. Gene transfection can be achieved with viral and non-viral vectors; viral vectors deliver high transfection efficiencies, but they induce immune responses and issues related to their safety need to be addressed before their clinical potential is reached [1,2]. Non-viral vectors have several advantages in terms of safety, stability, ease of preparation and ability to carry large amounts of genetic material, but they do not match the transfection efficiency of viral vectors [2–4]. Current studies aim to develop safe vectors that deliver high transfection efficiency and high expression of the transfected genes [1,5].

The most commonly used non-viral vectors are cationic polymers and cationic lipids that form complexes with DNA, known as polyplexes and lipoplexes, respectively [6]. The cationic polymer polyethyleneimine (PEI) and PEI-based polymers condense and protect endocytosed DNA from enzymatic degradation, neutralize the acidic endosomal pH and cause endosome disruption via osmotic swelling [2]. This endosome disruption facilitates the release of polyplexes to the cytoplasm, from which they can reach the cell nucleus for efficient expression [6]. Cationic lipids coat and partially condense DNA, and the positive charge of these lipoplexes

enhances their cellular uptake via endocytosis; cationic lipids also play a role in destabilizing the endosomal membrane, which releases lipoplexes to the cytoplasm and nucleus [6,7]. In this study, we evaluated if chlorpromazine and procainamide, two compounds that induce membrane fusion [8,9], could increase lipoplex entry into mammalian cells. We also analyzed if chloroquine, a lysosomotropic agent that increases the phagolysosomal pH [6], and spermidine, a polyamine that increases DNA replication and transcription, could favor the release of lipoplexes into the cytoplasm and the expression of the transfected gene, respectively. With these strategies, we obtained increased transfection efficiencies in human (HEK293 and C-33 A) and rat (PC12) cell lines (up to 9.2-fold) and *in situ* in BALB/c mice spleens and livers (up to 6-fold), and increased expression of the transfected gene in PC12 cells, which are resistant to transfection [10]. The use of these drugs could increase the clinical potential of lipoplex-mediated gene transfection.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Chlorpromazine, procainamide, chloroquine, and spermidine were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMEM, DMEM/F-12, RPMI 1640, fetal bovine serum, horse serum, penicillin, streptomycin, Lipofectamine [2,3-dioleoyloxy-*N*-[2(spermincarboxamido)ethyl]-*N,N*-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate] (DOSPA)

* Corresponding author. Fax: +52 55 57296300x62326.

E-mail address: ibaeza@enb.ipn.mx (I. Baeza).

Molecular organization of the non-bilayer phospholipid arrangements that induce an autoimmune disease resembling human lupus in mice

CARLOS WONG-BAEZA¹, ROGELIO HERNÁNDEZ-PANDO², ALBANY RESÉNDIZ¹, ALONSO TESCUCANO¹, ISRAEL BUSTOS¹, MIGUEL IBÁÑEZ¹, CARLOS WONG¹, & ISABEL BAEZA¹

¹Biochemistry Department, National School of Biological Sciences, National Polytechnic Institute (IPN), Mexico City, and ²Pathology Department, National Institute of Medical Sciences and Nutrition “Salvador Zubirán”, Mexico City, Mexico

(Received 11 November 2011; and in revised form 26 January 2012)

Abstract

Non-bilayer phospholipid arrangements are three-dimensional structures that can form when anionic phospholipids with an intermediate form of the tubular hexagonal phase II (H_{II}), such as phosphatidic acid, phosphatidylserine or cardiolipin, are present in a bilayer of lipids. The drugs chlorpromazine and procainamide, which trigger a lupus-like disease in humans, can induce the formation of non-bilayer phospholipid arrangements, and we have previously shown that liposomes with non-bilayer arrangements induced by these drugs cause an autoimmune disease resembling human lupus in mice. Here we show that liposomes with non-bilayer phospholipid arrangements induced by Mn²⁺ cause a similar disease in mice. We extensively characterize the physical properties and immunological reactivity of liposomes made of the zwitterionic lipid phosphatidylcholine and a H_{II}-preferring lipid, in the absence or presence of Mn²⁺, chlorpromazine or procainamide. We use an hapten inhibition assay to define the epitope recognized by sera of mice with the disease, and by a monoclonal antibody that binds specifically to non-bilayer phospholipid arrangements, and we report that phosphorylcholine and glycerolphosphorylcholine, which form part of the polar region of phosphatidylcholine, are the only haptens that block the binding of the tested antibodies to non-bilayer arrangements. We propose a model in which the negatively charged H_{II}-preferring lipids form an inverted micelle by electrostatic interactions with the positive charge of Mn²⁺, chlorpromazine or procainamide; the inverted micelle is inserted into the bilayer of phosphatidylcholine, whose polar regions are exposed and become targets for antibody production. This model may be relevant in the pathogenesis of human lupus.

Keywords: Non-bilayer phospholipid arrangements, H_{II}-preferring lipids, murine lupus-like disease

Introduction

Phospholipids are the main structural constituents of all cell membranes; their amphiphatic nature leads to the formation of a smooth bilayer that delimits cells and vesicles and acts as a matrix in which proteins are inserted or anchored. The zwitterionic lipid phosphatidylcholine, which is composed of a choline head group, glycerophosphoric acid, a saturated fatty acid (such as palmitic acid) and an unsaturated fatty acid (such as oleic acid), is the most abundant phospholipid in cell membranes (Voet and Voet 2011). However, some anionic phospholipids that have a tubular hexagonal phase II (H_{II}), such as phosphatidic acid, phosphatidylserine or cardiolipin, can lead to

the formation of non-bilayer phospholipid arrangements within the lipid bilayer.

Non-bilayer phospholipid arrangements appear as protuberances on the surface of experimental membrane models, such as liposomes; they are transiently formed on the membranes of cells that are participating in membrane fusion process (Hafez and Cullis 2001, Wong-Baeza et al. 2010), and they have a role in the organization of tight junctions (Wegener and Galla 1996) and in the activation of membrane enzymes (van den Brink-van et al. 2001). Non-bilayer phospholipid arrangements can be induced and stabilized by some antibiotics, non-polar peptides, Ca²⁺ (de Kruijff et al. 1979, Verkleij et al. 1982, Cullis et al. 1991) and the drugs chlorpromazine and

Correspondence: Dr Isabel Baeza, PhD, Biochemistry Department, National School of Biological Sciences, National Polytechnic Institute (IPN), Mexico City 11340, Mexico. Tel: +52 55 57296300, ext. 62326. E-mail: ibaeza@encb.ipn.mx, isabelbaeza@yahoo.com

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Biomembranas y de Enzimología del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, y en el Laboratorio de Oncología del Centro Médico Siglo XXI bajo la dirección de la Dra. María Isabel Baeza Ramírez y del Dr. Carlos Wong Ramírez, en colaboración con el Dr. Horacio Astudillo de la Vega.

Agradecimientos

Al comité tutorial formado por:

Dra. María Isabel Baeza Ramírez

Dr. Carlos Wong Ramírez

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández

Dr. Horacio Astudillo de la Vega

Dra. Rosa María Ribas Jaimes

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), beca de doctorado con el número de becario 206850

El programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional durante los periodos

Índice

	Pag.
Abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tablas	iii
Resumen	iv
Abstract	v
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Definición de membrana.	1
I.2 Composición química membranal.	2
I.3 Lípidos membranales.	2
I.4 Forma molecular lipídica y su asociación molecular de no-bicapa.	2
I.5 Organización supramolecular de las membranas biológicas.	4
I.6 Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF).	6
I.6.1 SAAF primario.	7
I.6.2 SAAF secundario.	7
I.6.3 Anticuerpos descritos en el SAAF.	8
I.6.4 Fisiopatología y epidemiología del SAAF.	8
I.6.5 Tratamiento del SAAF.	9
I.7 Lupus eritematoso sistémico (LES).	9
I.7.1 Signos clínicos del LES.	9
I.7.2 Autoanticuerpos más comunes en el LES.	11
I.7.3 Influencia de factores genéticos en el desarrollo del LES.	12
I.7.4 Influencia de factores hormonales en el desarrollo del LES.	13
I.7.5 Influencia de factores ambientales en el desarrollo del LES.	14
I.7.6 Lupus inducido por fármacos.	14
I.7.7 Tratamiento del LES.	15
I.7.8 Modelos de lupus en ratón.	17
I.7.8.1 Modelo experimental de lupus en ratones inducido por lípidos asociados en partículas lipídicas.	18
I.8. Estudio de la expresión genética en el modelo experimental de lupus inducido por lípidos asociados en partículas lipídicas.	20
I.9 Justificación.	21
I.10 Hipótesis.	21

I.12	Objetivos.	21
I.12.1	Objetivo general.	21
I.12.2	Objetivos específicos.	21
II.	MATERIAL Y MÉTODOS	23
II.1	Esquema general de trabajo.	23
II.2	Preparación de liposomas.	23
II.3	Inducción de partículas lipídicas en los liposomas.	24
II.4	Análisis por citofluorometría de las asociaciones moleculares lipídicas.	24
II.5	Esquemas de inducción de lupus en los ratones.	24
II.6	Administración intraesplénica de los antígenos liposomales.	25
II.7	Detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones por ELISA-liposomal.	25
II.8	Detección de anticuerpos anti-cardiolipina en los sueros de los ratones por ELISA-cardiolipina.	26
II.9	Detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones por citofluorometría.	27
II.10	Extracción de los bazos de los ratones en estudio.	27
II.11	Obtención del RNA total.	28
II.11.1	Extracción del RNA total de bazo de ratón.	28
II.11.2	Cuantificación del RNA extraído de bazo de ratón.	28
II.11.3	Caracterización del RNA extraído de bazo de ratón.	29
II.12	Síntesis, amplificación y marcaje de cRNA de bazo de ratón.	29
II.12.1	Purificación del cRNA de bazo de ratón.	31
II.13	Microarreglos de RNA 4x44K de todo el genoma de ratón.	31
II.13.1	Hibridación del microarreglo 4x44K de ratón.	32
II.13.2	Lavado del microarreglo 4x44K de ratón.	32
II.13.3	Escaneo y cuantificación del microarreglo de ratón.	33
II.14	Determinación por Western-Blot de algunas proteínas de los ratones en estudio.	33
III.	RESULTADOS	36
III.1	Inducción de partículas lipídicas en liposomas con manganeso y cloropromacina y su detección por citofluorometría.	36
III.2	Desarrollo del modelo experimental de lupus inducido por lípidos asociados en partículas lipídicas.	37
III.3	Detección de autoanticuerpos en los sueros de los ratones en estudio.	39

III.3.1	Detección de autoanticuerpos anti-partículas lipídicas por ELISA-liposomal.	39
III.3.2	Detección de autoanticuerpos anti-cardiolipina por ELISA-cardiolipina.	41
III.3.3	Detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones por citofluorometría.	43
III.4	Obtención del RNA total.	45
III.5	Síntesis, amplificación y marcaje de cRNA.	47
III.6	Microarreglos de RNA 4x44K de todo el genoma de ratón.	47
III.7	Determinación por Western-Blot de algunas proteínas de los ratones en estudio.	51
IV.	DISCUSIÓN	53
V.	CONCLUSIONES	62
VI.	PROSPECTIVAS	63
VII.	APORTACIONES CIENTÍFICAS	64
VIII.	ANEXO	65
IX.	BIBLIOGRAFÍA	67

Abreviaturas

2° Ab-FITC	Segundo anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a FITC
A₀	Área de la región polar lipídica
A_H	Área transversal de las cadenas hidrocarbonadas
B-216	Anticuerpo monoclonal B-216, con especificidad de reconocimiento a partículas lipídicas
CPA	Células presentadoras de antígeno profesionales
CPZ	Cloropromacina
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Tamaño relativo liposomal (Forward scatter)
LBP	Proteína de unión a lipopolisacárido
LES	Lupus eritematoso sistémico
LPS	Lipopolisacárido
PA	Fosfatidato
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PC	Fosfatidilcolina
PS	Fosfatidilserina
SAAF	Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos
SFT	Suero fetal de ternera
SSC	Complejidad o granularidad relativa liposomal (Side scatter)
TE	Tris-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

Lista de Figuras

		Pag.
Figura 1.	Clasificación de lípidos por su forma molecular.	3
Figura 2.	Esquema del modelo del mosaico metamórfico de Cullis <i>et al.</i> (1980).	5
Figura 3.	Fotografía de una paciente con LES.	10
Figura 4.	Formación de partículas lipídicas.	16
Figura 5.	Ratones hembra BALB/c que desarrollaron lupus experimental.	19
Figura 6.	Electroferograma de RNA de bazo de ratón.	30
Figura 7.	Efecto del manganeso en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1).	36
Figura 8.	Efecto de la cloropromacina en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1).	37
Figura 9.	Ratones hembra BALB/c de 14 semanas de edad que desarrollaron lupus experimental con partículas lipídicas inducidas con cloropromacina 3 mM.	38
Figura 10.	Ratones hembra BALB/c de 18 semanas de edad que desarrollaron lupus experimental con partículas lipídicas inducidas con manganeso 5 mM.	38
Figura 11.	Comparación de los títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas en los sueros de los ratones al usar como antígenos liposomas con partículas inducidas con Mn ⁺⁺ o con cloropromacina.	39
Figura 12.	Títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones que recibieron partículas inducidas con Mn ⁺⁺ .	40
Figura 13.	Títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones que recibieron partículas inducidas con cloropromacina.	41
Figura 14.	Títulos de anticuerpos anti-cardiolipina en sueros de ratones que recibieron liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn ⁺⁺ .	42
Figura 15.	Títulos de anticuerpos anti-cardiolipina en sueros de ratones que recibieron liposomas con partículas lipídicas inducidas con cloropromacina.	42
Figura 16.	Comparación de los títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas y anti-cardiolipina en sueros de ratones que recibieron liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn ⁺⁺ o con cloropromacina.	43
Figura 17.	Determinación de anticuerpos anti-partículas lipídicas por citometría.	44
Figura 18.	Electroferogramas del RNA total extraído de dos ratones de cada grupo	46

	de estudio.	
Figura 19.	Imágenes de los microarreglos comparativos 4x44K de los distintos grupos de ratones de estudio.	48
Figura 20.	Diagramas de diagnóstico de los microarreglos comparativos.	49
Figura 21.	Unión de anticuerpos a la partícula lipídica inducida con clorpromacina.	55
Figura 22.	Esquema que representa la señalización por activación de TLR-4.	59

Lista de tablas

		Pag.
Tabla 1.	Clasificación del SAAF.	7
Tabla 2.	Síntomas y signos del LES.	10
Tabla 3.	Autoanticuerpos más comunes en el LES.	11
Tabla 4.	Acciones biológicas de los estrógenos sobre células del sistema inmunológico.	14
Tabla 5.	Esquema de administración de liposomas a los ratones hembra BALB/c.	25
Tabla 6.	Composición de la mezcla para síntesis de cDNA.	30
Tabla 7.	Composición de la mezcla para síntesis de cRNA.	30
Tabla 8.	Mezcla de fragmentación para la hibridación del microarreglo 4x44K de ratón.	32
Tabla 9.	Concentración de RNA total aislado de los grupos de ratones en estudio.	45
Tabla 10.	Número de integridad (RIN) del RNA total extraído de los grupos de ratones en estudio.	47
Tabla 11.	Concentración de cRNA marcado con Cy3 o Cy5.	47
Tabla 12.	Genes de interés inmunológico que aumentaron su expresión en los grupos manganeso y clorpromacina respecto al grupo control II.	50
Tabla 13.	Genes de interés inmunológico que disminuyeron su expresión en los grupos manganeso y clorpromacina respecto al grupo control II.	51
Tabla 14.	Concentración de proteína total aislada de los grupos de ratones en estudio.	51
Tabla 15.	Detección de proteínas en el bazo de los ratones control y de los que desarrollaron la enfermedad autoinmune.	52

Resumen

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multifactorial crónica, en donde se generan autoanticuerpos que causan inflamación, dolor y daño tisular. Su etiología no se conoce con certeza, en su desarrollo participan una combinación de factores genéticos, ambientales, hormonales y algunos fármacos, antibióticos e infecciones, que en conjunto superan el umbral de tolerancia inmunológica y producen la enfermedad. Nuestro grupo de investigación ha propuesto que en el LES y en otras enfermedades autoinmunes participan lípidos asociados en partículas lipídicas. Estas partículas se encuentran en las membranas celulares, en donde participan en diferentes funciones y son transitorias, pero cuando se hacen permanentes son inmunogénicas e inducen la formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas. Esta propuesta se confirmó por el desarrollo en ratones BALB/c y NIH de una enfermedad muy parecida al LES, por la administración de los fármacos clorpromacina (CPZ), procainamida o hidralazina que inducen la formación estable de partículas lipídicas en la membrana celular, o de la administración de liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por estos fármacos o por el catión manganeso. Este modelo de lupus ha permitido hacer diferentes estudios para entender y seguir el curso de esta enfermedad, sin embargo, no se ha identificado su perfil genético, por lo que en este trabajo se usó la tecnología de los microarreglos para esta determinación. Se trabajaron 4 grupos con cinco ratones hembra BALB/c cada uno. Al grupo I se le administró solución salina fisiológica, al grupo II liposomas lisos sin partículas lipídicas, al grupo III y IV liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} o con CPZ. Todos los grupos recibieron la solución o los liposomas correspondientes dos veces por vía intraesplénica y después cada semana por vía intraperitoneal durante 4 meses. Los ratones que recibieron liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} o con CPZ presentaron lesiones faciales con alopecia al segundo y al tercer mes del inicio de la administración; en ambos grupos se detectaron al final del primer mes anticuerpos anti-partículas lipídicas por citofluorometría y ELISA-liposomal y anti-cardiolipina por ELISA al segundo mes pero en menor título que los anti-partículas. Los ratones de los grupos I y II no presentaron lesiones faciales, ni los anticuerpos anti-partículas o anti-cardiolipina a lo largo del estudio. El análisis molecular se hizo en los bazo, debido a que este órgano contiene una mayor cantidad de células mononucleares, que son las que han presentado una mayor variación en su expresión genética en el LES. Con el RNA de los bazo se hicieron los microarreglos Agilent de todo el genoma de ratón. Al comparar el perfil de expresión genética de los grupos I y II se encontró que no hubo variación y los genes que se sobre o sub expresaron no están relacionados con enfermedades autoinmunes. Al comparar los grupos que desarrollaron la enfermedad (III y IV) con el control (II), se encontró que algunos de los genes sobre expresados codifican para factores del complemento, presentación de antígenos exógenos, producción de anticuerpos, señalización por TLR-4 o por NOD-2; los que disminuyeron su expresión corresponden a reconocimiento por células NK y apoptosis. En los grupos III y IV los genes señalados tuvieron la misma expresión. El análisis de la expresión de los genes modificados sugiere que: 1) la señalización de TLR-4 por vía de TRIF conduce al aumento en interferón tipo 1, una de las principales características del LES, 2) la sobre expresión en interferón tipo 1, la disminución en el reconocimiento por células NK y la disminución de apoptosis conducen a un aumento en células autoreactivas que llevan a un recrudecimiento del lupus, 3) la sobre expresión de genes de presentación de antígenos y de producción de anticuerpos también favorecen el lupus, y 4) la sobre expresión en componentes del complemento apoyan la lisis celular propuesta en el modelo en estudio. Al identificar el perfil genético de este modelo y compararlo con el del LES, se contribuye a conocer la similitud entre ambas enfermedades, así como a una mejor comprensión de las bases moleculares e inmunológicas de enfermedades autoinmunes, que lleve a desarrollar mejores estrategias para su tratamiento.

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic multifactorial autoimmune disease, where autoantibodies cause inflammation, pain and tissue damage. Its etiology is unknown, however, multiple genetic and environmental factors, hormones and some drugs, antibiotics and infections are involved, which together exceed the threshold of immunologic tolerance. Our research group proposed that lipids associated in non-bilayer phospholipid arrangements (NPA) are involved in the development of SLE and other autoimmune diseases. These structures are found in cell membranes, and are transient, but when they become permanent they are immunogenic and induce the formation of anti-NPA autoantibodies. This proposal was confirmed by the development of a disease very similar to human SLE in BALB/c and NIH mice, by the administration of the drugs chlorpromazine (CPZ), procainamide or hydralazine that induce the stable formation of NPA on plasma membrane, or by the administration of liposomes bearing NPA induced by these drugs or by manganese. The murine model of lupus has allowed us to perform different studies to understand and follow the course of this disease, however, the genetic profile has not been identified, so in this work, we used the microarray technology for this determination. We worked with 4 groups of five female BALB/c mice. Physiological saline solution was administered to group I, smooth liposomes without NPA to group II, liposomes with NPA induced by Mn^{++} or CPZ to group III and IV respectively. All groups received the corresponding solutions or liposomes by intrasplenic via twice and then intraperitoneally each week for 4 months. The mice that received liposomes with NPA induced with CPZ or Mn^{++} presented facial lesions with alopecia on the second and third month, respectively, after the beginning of the administration of liposomes; in both groups anti-NPA autoantibodies were detected at the end of the first month by cytofluorometry and liposomal-ELISA and anti-cardiolipin autoantibodies by ELISA at the second month, but in lower titer than anti-NPA. Mice in groups I and II did not show facial lesions or autoantibodies titers throughout the study. Mice were sacrificed on the fourth month after the beginning of the administration, because they showed high titers of both autoantibodies. Molecular analysis was done in the spleens, because this lymphoid organ contains a greater amount of mononuclear cells, which are those that have presented a greater variation in gene expression in patients with SLE. Genome-wide Agilent microarrays were made from the RNA of the spleens. By comparing the gene expression profile of groups I and II it was found that there was no variation, and the genes that are over or under expressed are not related to autoimmune diseases. By comparing the groups that developed the disease (III and IV) with control (II), we found that some of the overexpressed genes encode complement factors, and molecules involved in presentation of exogenous antigens, antibody production and TLR-4 or NOD-2 signaling, and the ones with decreased expression correspond to Natural Killer (NK) cell recognition and apoptosis. When comparing groups III and IV we found that the genes mentioned above are expressed equally in both conditions. The analysis of the gene expression profile suggests that: 1) the TLR-4 signaling via TRIF leads to a increase in interferon type 1, one of the main features of SLE, 2) the over-expression of type 1 interferon, and the decrease in NK cell recognition and apoptosis lead to an increase of autoreactive cells, which leads to a worsening of SLE, 3) over-expression of antigen presentation and antibody production also favor SLE, and 4) over-expression of complement component cell lysis support the model proposed in the study. By identifying the genetic profile of this model and comparing it with the human lupus profile, we can understand the similarity between the two diseases and gain a better understanding of the molecular and the immunological basis of autoimmune diseases, leading to the development of better strategies for their treatment.

I. INTRODUCCIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multifactorial crónica, en donde se generan autoanticuerpos que causan inflamación, dolor y daño tisular (Perry *et al.*, 2011). Su etiología no se conoce con certeza, sin embargo, se considera que en su desarrollo participan una combinación múltiple de factores genéticos, ambientales, hormonales, condiciones de estrés y algunos fármacos, antibióticos e infecciones, que en conjunto superan el umbral de tolerancia inmunológica (Pascual *et al.*, 2010). En el laboratorio de Biomembranas de la ENCB se ha propuesto que en el LES y en otras enfermedades autoinmunes participan los lípidos asociados en partículas lipídicas. Estas estructuras se encuentran en las membranas celulares, participan en diferentes funciones y son transitorias, pero cuando se hacen permanentes son inmunogénicas e inducen la formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas (Baeza *et al.*, 2004; 2011; Wong-Baeza *et al.*, 2012).

Esta propuesta se comprobó por el desarrollo en ratones BALB/c y NIH de una enfermedad muy parecida al LES humano, por la administración de los fármacos clorpromacina (CPZ), procainamida (PCM) o hidralazina (HDZ) que inducen la formación estable de partículas lipídicas en la membrana plasmática, o por la administración de liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por estos fármacos o por el catión manganeso (Baeza *et al.*, 2004; 2011; Wong-Baeza *et al.*, 2012). Debido a la crucial participación de la membrana en el funcionamiento celular, es claro visualizar que alteraciones en su composición y estructura pueden conducir al desarrollo de enfermedades, por lo que es importante el conocimiento molecular de la membrana para comprender su funcionamiento normal y su posible participación en diferentes enfermedades.

I.1 Definición de membrana. La membrana plasmática es la estructura que da su individualidad a las células al separarlas del medio extracelular y de otras células. Regula el paso de iones, de moléculas y de señales hacia el interior y exterior de la célula, lo que confiere la permeabilidad selectiva que mantiene las diferencias en composición entre el citoplasma y el medio, y que a su vez regulan el volumen y la respuesta celular a las diferentes señales que recibe o genera. En eucariontes la membrana divide el interior celular en compartimientos, u organelos (Baeza *et al.*, 2007; Voet y Voet, 2011). Las membranas contienen complejos multienzimáticos que catalizan reacciones vectoriales, como la cadena respiratoria, y son fundamentales en la conversión y la conservación de la energía requerida en el metabolismo y el funcionamiento celular. Participan en la adhesión intercelular y en la comunicación de las células entre sí y con el medio externo, por lo que responden a cambios extra e intracelulares. Por su flexibilidad ocurren cambios de forma durante el crecimiento y el movimiento celular, y su propiedad de auto-sellarse mantiene la continuidad

estructural en la exocitosis, la endocitosis y la división celular, que evita la pérdida del citoplasma (Vereb *et al.*, 2003; Baeza *et al.*, 2007).

I.2 Composición química membranar. Las membranas están formadas por proteínas, lípidos y carbohidratos. Las proteínas y lípidos integran casi la totalidad de su composición, mientras que los carbohidratos representan menos del 10% y se encuentran como glicolípidos o glicoproteínas (Levitan *et al.*, 2010; Voet y Voet, 2011).

I.3 Lípidos membranales. Integran del 25 al 80% del peso membranar, constituyen la matriz estructural y pertenecen a tres grupos químicos: fosfolípidos, glicolípidos y esteroides. Los fosfolípidos se encuentran en todos los organismos y son dos grupos, uno tiene sn-glicerol y forma los glicerofosfolípidos y el otro tiene esfingosina e integra los esfingolípidos (Baeza *et al.*, 2007; Voet y Voet, 2011). Los glicolípidos contienen carbohidratos, carecen de fosfato, y también son dos grupos, uno con sn-glicerol y otro con esfingosina (Alberts *et al.*, 2008). Las cadenas de hidrocarburo de los ácidos grasos y de la esfingosina integran las regiones hidrofóbicas de los lípidos, son no-polares y carecen de afinidad por el agua; mientras que los grupos polares unidos a glicerol o a esfingosina son hidrofílicos, con cargas positivas o negativas, totales o parciales. Por tener una región hidrofílica y una hidrofóbica estos lípidos son moléculas anfipáticas (o anfifílicas). Los fosfolípidos y los glicolípidos, debido a su tamaño y a su anfipatía, son las únicas moléculas que se ensamblan espontáneamente en bicapas cerradas en el medio acuoso y constituyen la matriz membranar. El efecto hidrofóbico es la fuerza principal que mantiene la organización de la bicapa lipídica (Cassimeris *et al.*, 2011). El tercer grupo de lípidos, los esteroides contienen el ciclopentanoperhidrofenantreno y confieren a la matriz lipídica mayor estabilidad. El colesterol es el esteroide de células animales y precursor de hormonas esteroideas, es anfipático, su región polar es el oxhidrilo y la estructura cíclica es hidrofóbica (Alberts *et al.*, 2008; Levitan *et al.*, 2010; Voet y Voet, 2011).

I.4 Forma molecular lipídica y su asociación molecular de no-bicapa. Estudios de difracción de rayos X de los lípidos han mostrado que el área de sus regiones polares (A_O) varía significativamente con respecto al área transversal de las cadenas de hidrocarburo (A_H) y han revelado tres formas moleculares: cilíndrica, cónica y de cono invertido (Hafez y Cullis, 2001). En los lípidos cilíndricos el área de la región polar es aproximadamente igual al área transversal de la región no-polar, por lo que el cociente A_H/A_O es ≈ 1 . En los de forma cónica el área de la región polar es menor que el área transversal de la no-polar y A_H/A_O es > 1 ; en tanto que en los de cono invertido esta relación es inversa y A_H/A_O es < 1 (Figura 1 A-C) (Cullis y Hope, 1991; Baeza *et al.*, 2007).

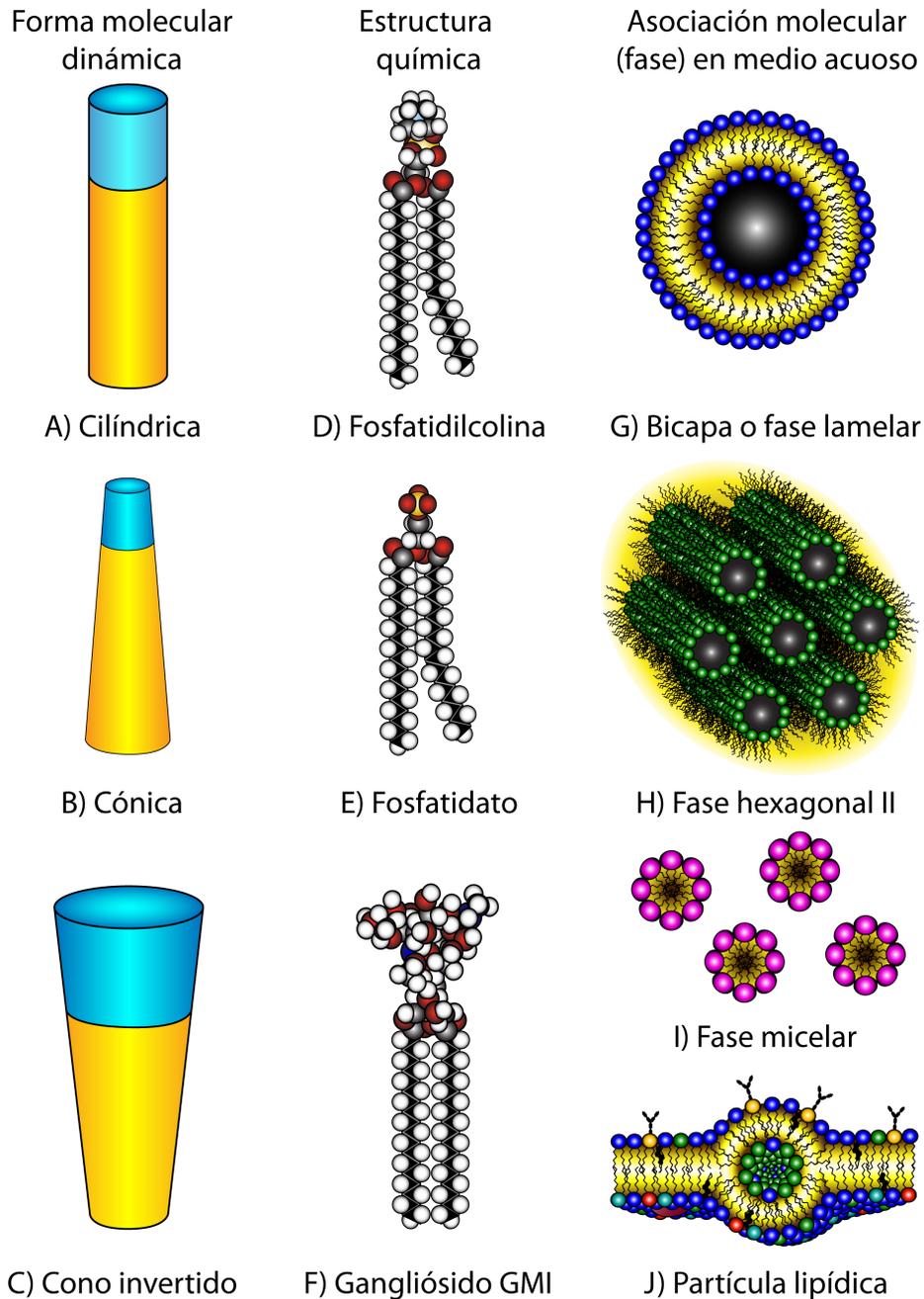


Figura 1. Clasificación de lípidos por su forma molecular. La forma molecular lipídica (A-C) depende de su estructura química (D-F) y la asociación tridimensional de los lípidos en un medio acuoso (G-I) depende de su forma molecular. Esquema de lípidos asociados en partículas lipídicas (J) (Baeza *et al.*, 2007).

Los lípidos cilíndricos, como fosfatidilcolina (Figura 1 D), fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, cardiolipina y esfingomielina, se asocian en medio acuoso en bicapas cerradas o liposomas (Figura 1 G) y representan del 60 al 70% de los lípidos membranales. Los cónicos, como fosfatidato (Figura 1 E), fosfatidiletanolamina y diacilglicerol, se ensamblan en la fase H_{II}, es decir, en cilindros empaquetados hexagonalmente, con las regiones polares hacia el interior del cilindro en donde forman un poro acuoso de $\approx 50 \text{ \AA}$ de diámetro y las no-polares hacia afuera lejos del agua

(Figura 1 H) (Hafez y Cullis, 2001). Los de cono invertido, como lisofosfolípidos y gangliósidos (Figura 1 F), se asocian en micelas, con las regiones polares hacia el exterior y las no-polares al interior (Figura 1 I). Los lípidos cónicos y de cono invertido representan del 30 al 40% de los lípidos membranales (Cullis y Hope, 1991; Baeza *et al.*, 2007).

Algunos lípidos como cardiolipina, fosfatidilserina y fosfatidato pueden asociarse en bicapa o en fase tubular H_{II} . El cambio en la asociación tridimensional indica un cambio en la forma molecular. La forma molecular de los lípidos se modifica por Ca^{2+} y por el pH, porque disminuyen el volumen de la región polar, al neutralizar su carga negativa y eliminar las moléculas de agua que la rodean; con lo que cambia la forma de cilíndrica a cónica; además, el Ca^{2+} une entre sí las regiones polares de los lípidos y favorece el cambio de bicapa a H_{II} . Es decir, la forma molecular de estos lípidos no es única, ni estática, por el contrario es dinámica y puede modificarse por cambios iónicos (Baeza *et al.*, 2007).

Es importante destacar que la membrana tiene lípidos de las tres formas moleculares, posiblemente la mayor proporción de lípidos cilíndricos con respecto a los cónicos y de cono invertido, permite su asociación en bicapas. Sin embargo, es factible que en la membrana los lípidos puedan también tener una asociación diferente a la de bicapa. Estudios de NMR de ^{31}P , han indicado la presencia de lípidos asociados en partículas lipídicas (Figura 1 J) en membranas con alta actividad metabólica como en células cancerosas y en microsomas de hígado de rata (De Kruijff, 1987; 1997). Esto ha sido confirmado por estudios de nuestro grupo de investigación, que mostraron lípidos asociados en partículas lipídicas en células cancerosas, con un anticuerpo monoclonal específico contra esta asociación lipídica (Aguilar *et al.*, 1999).

I.5 Organización supramolecular de las membranas biológicas. Singer y Nicolson propusieron en 1972 el modelo del mosaico fluido para la membrana. En este modelo, las proteínas integrales se encuentran alternadas entre la bicapa lipídica lo que constituye el mosaico y éste es fluido porque las interacciones entre los lípidos y entre lípidos y proteínas son no-covalentes, lo que permite que proteínas y lípidos se desplacen de forma lateral en la membrana. El papel de los lípidos como formadores de la bicapa es principalmente estructural y la composición de los ácidos grasos que contienen determina la fluidez de la membrana. El efecto hidrofóbico es la fuerza principal que mantiene la organización de proteínas y lípidos en este modelo. El espesor de las membranas con las proteínas periféricas e integrales es de $\approx 100 \text{ \AA}$ (Singer y Nicolson, 1972; Nelson y Cox, 2008; Griffiths *et al.*, 2010; Voet y Voet, 2011).

El modelo del mosaico fluido si bien explica múltiples propiedades de las membranas, no considera la forma molecular cilíndrica, cónica y de cono invertido de los lípidos, ni su papel funcional. Cullis y

colaboradores (1980) en el modelo del mosaico metamórfico, propusieron que la bicapa formada por lípidos de las tres formas moleculares, puede tener, de manera transitoria, asociaciones lipídicas diferentes a la bicapa (Figura 2). Estas estructuras, que forman un microdominio, pueden participar en fagocitosis, puntos de conexión entre membranas, transporte de iones y moléculas polares, fusión de membranas en la exocitosis y endocitosis, inserción de proteínas, formación de poros polares y compartimentos (Figura 2) (Cullis y Hope, 1991; Hafez y Cullis, 2001; Baeza *et al.*, 2007). La importancia de este modelo radica, en proponer asociaciones lipídicas diferentes a la bicapa, o partículas lipídicas, que participan de manera dinámica en funciones membranales, por lo que atribuye a los lípidos un papel funcional, además del estructural de Singer y Nicolson (1972).

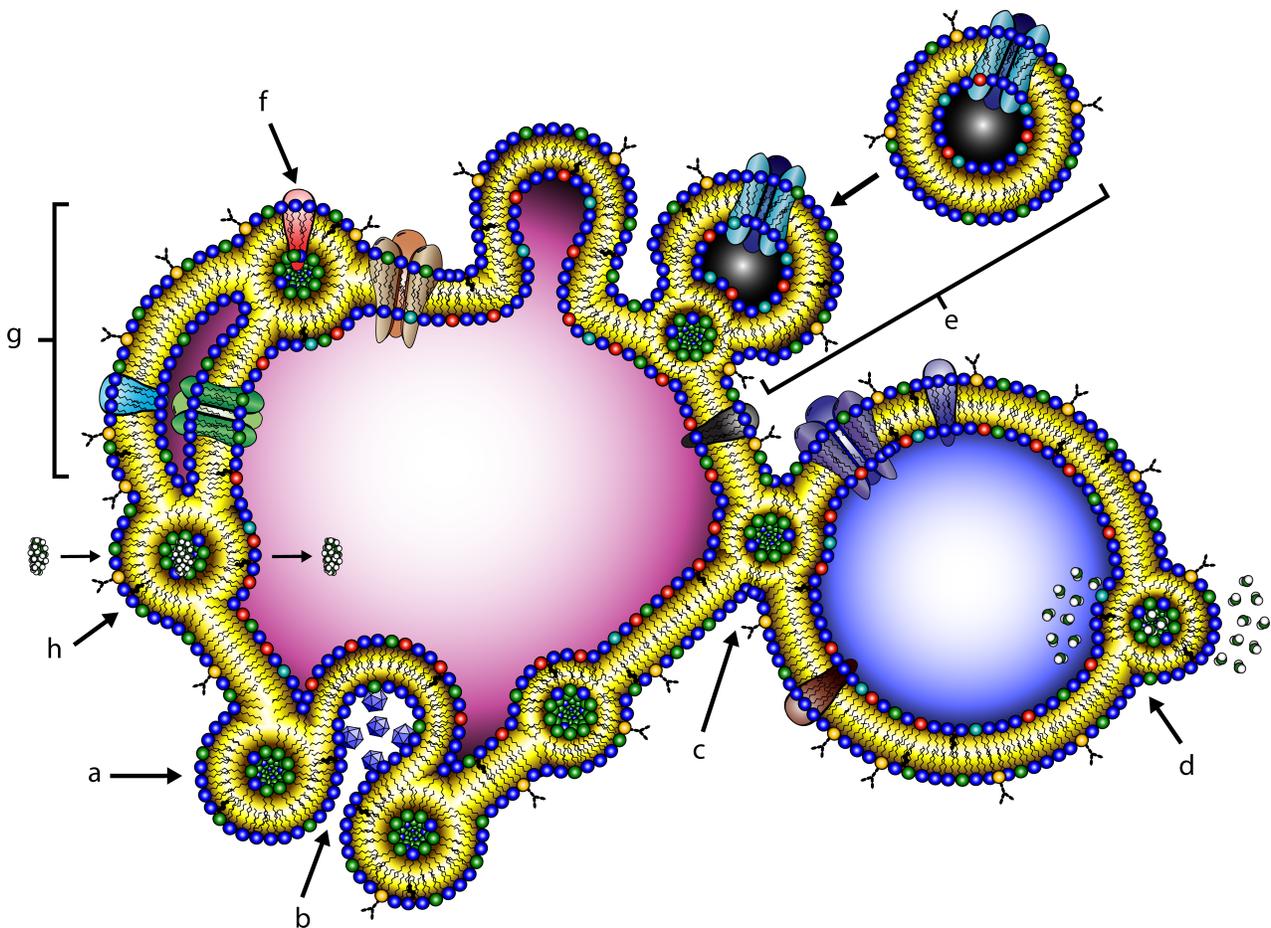


Figura 2. Esquema del modelo del mosaico metamórfico de Cullis *et al.* (1980). Es un esquema adaptado del original. Se indican moléculas de lípidos asociados en bicapas y en partículas lipídicas (a), así como algunas funciones de las partículas lipídicas como son: fagocitosis (b), unión entre células (c), transporte de iones (d), fusión de membranas (e), inserción de proteínas (f), formación de compartimentos (g) y transporte de moléculas polares (h).

Por otra parte, en células animales se forman microdominios con alta concentración de esfingolípidos que tienen ácidos grasos de cadenas muy largas y saturadas, llamadas balsas lipídicas (“lipid rafts”), lo que causa mayor interacción entre ellos y mantiene al microdominio que es más grueso que el

resto de la bicapa. En estos sitios se estabilizan mejor algunas proteínas, es decir, los microambientes lipídicos participan en la organización de proteínas membranales; también contribuyen a determinar la plasticidad, y las propiedades mecánicas y de permeabilidad de la membrana (Rawicz *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2010; Mollinedo *et al.*, 2011).

Con base en lo anterior, la matriz membranal está integrada por lípidos de las formas cilíndrica, cónica y de cono invertido asociados en bicapas fluidas, dinámicas y con microdominios, que favorecen la formación de asociaciones moleculares diferentes a la bicapa (Figura 2). Los microdominios al cambiar la organización de la bicapa le permiten participar en fusión de membranas, en modular la permeabilidad, en fijar y activar proteínas, especialmente las relacionadas con transducción de señales, con un crecimiento celular sostenido y con estimulación del metabolismo. Por lo que los lípidos, además de estructurales, son moduladores de varias funciones llevadas a cabo por las proteínas membranales (Baeza *et al.*, 2007).

Los lípidos son en general moléculas muy poco inmunogénicas (Alving *et al.*, 1984; Meroni *et al.*, 2011). De las dos asociaciones moleculares que se pueden presentar en las membranas, se considera que la de bicapa es la menos inmunogénica, porque es precisamente la que constituye la matriz lipídica de las membranas celulares. Las asociaciones lipídicas diferentes a la bicapa también son poco inmunogénicas, debido a que son transitorias y por ello no son detectadas por el sistema inmunológico; sin embargo, es posible que al ser estabilizadas por algunos iones divalentes o moléculas anfipáticas, se induzca la producción de anticuerpos hacia estas estructuras lipídicas, como se ha demostrado en estudios de nuestro grupo de investigación (Baeza *et al.*, 2004; 2011).

En la actualidad prácticamente no hay estudios en pacientes con enfermedades que presentan anticuerpos antifosfolípidos y que forman parte del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF), en que se haya analizado la presencia de anticuerpos hacia lípidos con una asociación molecular de partículas lipídicas (Baeza *et al.*, 2004). En general, los métodos de detección de anticuerpos antifosfolípidos que se emplean en el diagnóstico clínico de las enfermedades del SAAF no consideran estas asociaciones moleculares.

I.6 Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF). También es conocido como síndrome de Hughes, y es un grupo de enfermedades humanas que presentan un desorden autoinmune caracterizado por la presencia de un grupo heterogéneo de anticuerpos antifosfolípidos asociados a manifestaciones clínicas como la trombosis venosa y arterial, parto prematuro en pacientes con pre-eclampsia severa o insuficiencia placentaria, microangiopatía trombótica renal, anemia hemolítica, y

deterioro cognitivo, además, trombocitopenia y abortos repetidos (Koniari *et al.*, 2010; Meroni *et al.*, 2011; Lakos *et al.*, 2012), puede ser primario y secundario (Tabla 1) (Andreoli y Tincani, 2012).

Tabla 1. Clasificación del SAAF (Asherson *et al.*, 1996; Gigante, *et al.*, 2009; Lakos *et al.*, 2012).

<p>I. PRIMARIO. Se caracteriza por el desarrollo de trombosis arterial, trombosis venosa, trombocitopenia, pérdida fetal recurrente y producción de anticuerpos anti-fosfolípidos.</p>
<p>II. SECUNDARIO. Presenta las características del primario y asociado a:</p> <p>A. Enfermedades autoinmunes.</p> <p>a. Enfermedades de tejido conjuntivo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y vasculitis. <p>b. Otras.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus, enfermedad de Crohn´s y la enfermedad autoinmune tiroidea.
<p>B. Enfermedades malignas.</p> <p>a. Tumores sólidos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinomas (pulmón, ovario, cérvix, próstata, etc.) y timomas. <p>b. Hematológicas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma, leucemia y macroglobulinemia de Waldenströms.
<p>C. Inducido por fármacos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fenotiazinas, procainamida, anticonceptivos orales, interferón alfa, quinina e hidralazina.
<p>D. Enfermedades infecciosas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sífilis, SIDA y malaria.
<p>III. OTRAS VARIANTES DEL SÍNDROME DE ANTI-FOSFOLÍPIDOS.</p> <p>A. Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos generalizado.</p> <p>B. Síndrome microangiopático.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Púrpura trombótica, trombocitopénica y síndrome hemolítico urémico. <p>C. Síndrome de hipoprotrombinemia.</p>
<p>IV. SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLÍPIDOS SERONEGATIVO.</p>

I.6.1 SAAF primario. Se considera primario cuando el paciente presenta fundamentalmente trombosis venosa, trombosis arterial, trombocitopenia y pérdida fetal recurrente, así como la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (Gigante, *et al.*, 2009; Tripodi *et al.*, 2011; Galli, 2012).

I.6.2 SAAF secundario. Cuando está asociado con enfermedades autoinmunes como el LES, con enfermedades parecidas al LES que son inducidas por algunos fármacos como clorpromacina, promacina, quinina, procainamida e hidralazina, entre otros, enfermedades del tejido conectivo o con algunas enfermedades infecciosas como el SIDA o la hepatitis C y con enfermedades neoplásicas (Tabla 1) (Franchini y Veneri, 2005; Cervera *et al.*, 2010; Lakos *et al.*, 2012). Adicionalmente hay

otras variantes del síndrome como el generalizado, e incluso aquel donde no se detectan anticuerpos antifosfolípidos (Tabla 1). El síndrome generalizado es una complicación rara que se presenta en 1% de los pacientes. Se caracteriza por trombosis múltiples de la microvasculatura que afecta en forma simultánea a riñón, corazón, hígado y cerebro; se asocia además con dificultades respiratorias, es fatal en el 50% de los casos. (Navarrete *et al.*, 2005; Szymezak *et al.*, 2010; Andreoli y Tincani, 2012).

I.6.3 Anticuerpos descritos en el SAAF. Son muy heterogéneos y en general pertenecen a tres grupos: los anti-cardiolipina, los anti-coagulantes y los anti-partículas lipídicas (Baeza *et al.*, 2004; Meroni *et al.*, 2011; Galli, 2012) .

- Anticuerpos anti-cardiolipina. Reaccionan con diferentes fosfolípidos además de la cardiolipina. Algunos anticuerpos anti-cardiolipina muestran reactividad con un complejo formado por fosfolípidos aniónicos y la proteína plasmática β_2 -glicoproteína I (β_2 -gpl), o incluso con la β_2 -gpl sola (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2010; Szymezak *et al.*, 2010; Galli, 2012).
- Anticuerpos anti-coagulantes. Prolongan el tiempo de coagulación al interferir con las reacciones dependientes de fosfolípidos de la cascada de la coagulación. Entre ellos se han detectado anticuerpos que además reconocen a la fosfatidiletanolamina asociada a proteínas y los que reconocen a la fosfatidilserina asociada a protrombina, proteína C, proteína S o la anexina V (Koniari *et al.*, 2010; Andreoli y Tincani, 2012; Galli, 2012).
- Anticuerpos anti-partículas lipídicas. Identifican lípidos en asociaciones moleculares diferentes a la bicapa de la matriz membranal conocidas como partículas lipídicas (Wong-Baeza *et al.*, 2012). Estos anticuerpos fueron descritos por primera vez en el Laboratorio de Biomembranas de la ENCB-IPN, a partir del estudio de un grupo de sueros de pacientes con LES (Aguilar *et al.*, 1999; Baeza *et al.*, 2004; 2011).

I.6.4 Fisiopatología y epidemiología del SAAF. Se han determinado dos mecanismos implicados en la fisiopatología del SAAF: Los anticuerpos antifosfolípidos perturban los mecanismos antitrombóticos fisiológicos (inhibición de PGI₂ y de la actividad del sistema de la proteína C), o ejercen su efecto a través de un proceso de activación celular (expresión aumentada de las moléculas de adherencia, expresión del factor tisular en la superficie del endotelio y de los monocitos) (Meroni *et al.*, 2011). Cada uno de estos mecanismos causan alteraciones que llevan fundamentalmente al SAAF primario y pueden llevar al SAAF secundario si se asocia a las enfermedades descritas.

I.6.5 Tratamiento del SAAF. Presenta dos objetivos:

- Disminuir el título de los anticuerpos circulantes, incluso eliminarlos, lo que es posible en situaciones agudas pero difícil a largo plazo. Se basa en el uso de corticoides, inmunosupresores, intercambios plasmáticos o por la administración de inmunoglobulinas intravenosas (Meroni *et al.*, 2011; Galli, 2012).
- Prevenir las complicaciones tromboembólicas a corto y largo plazo, con aspirina, anticoagulantes o con la asociación de ambos (Andreoli y Tincani, 2012).

De las enfermedades que se integran en el SAAF secundario, el LES es de interés en este trabajo por el modelo en ratones que se ha desarrollado en el Laboratorio de Biomembranas de la ENCB.

I.7 Lupus eritematoso sistémico (LES). Es una enfermedad autoinmune multifactorial crónica y multisistémica que sigue un curso de alternancia de exacerbaciones y remisiones en la cual se producen lesiones citológicas y tisulares por el depósito de autoanticuerpos e inmunocomplejos con propiedades patogénicas, y afecta a 400 de cada 100,000 personas en EUA (Murphy *et al.*, 2008; Pascual *et al.*, 2010; Toong *et al.*, 2011). El LES no presenta un patrón clínico característico y el inicio de la enfermedad puede ser agudo o insidioso. Su etiología es compleja y aun no es bien conocida, e intervienen en su aparición y desarrollo factores hormonales y ambientales, la raza y la carga genética (Orozco *et al.*, 2010; Ruiz-Irastorza *et al.*, 2010; Meffre, 2011; Perry *et al.*, 2011).

I.7.1 Signos clínicos del LES. Entre sus características clínicas se incluyen fiebre, anorexia, malestar general y pérdida de peso. La mayoría de pacientes con lupus tienen lesiones cutáneas en algún momento del desarrollo de la enfermedad, el exantema típico que se presenta en la mitad de los pacientes es en la cara y tiene forma de alas de mariposa (Figura 3) (Murphy *et al.*, 2008; Pascual *et al.*, 2010; Toong *et al.*, 2011).

Otras manifestaciones cutáneas son el lupus discoide, en donde se presentan lesiones típicas en las puntas de los dedos, eritema periungeoal, infartos en la base de la uña y hemorragias en astilla, es común que en los pacientes se presente alopecia (Tierney *et al.*, 1999; Carioli *et al.*, 2010). También es posible que en el LES estén afectados todos los aparatos y sistemas como se presenta en la Tabla 2 (Stites *et al.*, 1998; Carmier *et al.*, 2010; Meroni *et al.*, 2011).



Figura 3. Fotografía de una paciente con LES. Presenta el exantema facial en forma de alas de mariposa (Murphy *et al.*, 2008).

Tabla 2. Síntomas y signos del LES (Stites *et al.*, 1998).

Órganos y sistemas	Síntomas y signos
Articulaciones y músculos	Dolor e inflamación de las articulaciones (artritis) sobre todo de los dedos de las manos, las muñecas, los codos, las rodillas y los pies, o bien dolores musculares. Poliartralgia o artritis con erosiones óseas y deformidad grave.
Piel	La afectación más conocida es el llamado “eritema con forma de alas de mariposa”, que consiste en un enrojecimiento de la piel de las mejillas y la nariz. Es frecuente la caída del cabello que se recupera con el tratamiento y la sensibilidad de la piel a la luz solar. Eritema fijo sobre la región malar o erupción eritematosa en parches con queratosis y oclusión folicular, parches de púrpura, edema angioneurótico, en 15% de los casos se presentan ulceraciones de la mucosa oral y genital.
Riñones	Lo más frecuente es la inflamación o nefritis, la afección renal clásica denominada glomerulonefritis lúpica, lo que provoca que no se eliminen bien los productos de desecho del organismo y se acumulen en la sangre o que se eliminen otras sustancias por la orina, como las proteínas, además la presencia en orina de cilindros celulares, eritrocitos y proteínas que provocan hinchazón de la cara o de las piernas. A veces la lesión del riñón produce un aumento de la presión arterial.
Pulmones	Puede provocar inflamación de la membrana que recubre al pulmón (pleuritis), lo que provoca dolor en el costado y a veces fiebre. Presencia de cuerpos de hematoxilina. En casos muy raros puede afectar a los pulmones y provocar insuficiencia respiratoria.
Corazón	Puede provocar inflamación de la membrana que recubre al corazón (pericarditis), lo que provoca dolor en el pecho y a veces fiebre. En casos muy raros puede afectar a las válvulas cardiacas y generar insuficiencia cardiaca. Endocarditis verrucosa de Libman-Sacks que consiste en la formación de vegetaciones ovoides, de 1 a 4 mm de diámetro, a lo largo de la base de la válvula aórtica.
Ojos	Presencia de un cuerpo citoide, que es una lesión exudativa blanca y vellosa que se

	origina por degeneración focal de la fibra nerviosa de la retina y presencia de escleritis.
Sistema vascular	Fibrosis concéntrica periarterial que origina la lesión denominada de hojas de cebolla, vasculitis de pequeños vasos que genera infartos en la pulpa de los dedos e hipercoagulación.
Sistema hematopoyético	Anemia, leucopenia y trombocitopenia.
Sistema nervioso central	Las complicaciones neurológicas del LES son más frecuentes de lo que se piensa y además son difíciles de diagnosticar. Pueden ir desde un episodio psicótico, hasta dolor de cabeza, déficit cognitivo o depresión, y en casos más raros otras manifestaciones como epilepsia o alteraciones del comportamiento. La afectación neuro-psiquiátrica del LES alcanza hasta el 50% de los afectados. Trastornos mentales y de conducta, como psicosis y depresión.
Articulaciones y músculos	Eritema fijo sobre la región malar o erupción eritematosa en parches con queratosis y oclusión folicular, fotosensibilidad, alopecia, parches de púrpura, edema angioneurótico, en 15% de los casos se presentan ulceraciones de la mucosa oral y genital.

I.7.2 Autoanticuerpos más comunes en el LES. Las lesiones tisulares son originadas por diversos subgrupos de autoanticuerpos e inmunocomplejos. Entre los más frecuentes están los anticuerpos anti-nucleares en especial anti-DNA, otros anticuerpos son contra las ribonucleoproteínas, las histonas y los antígenos nucleares (Tabla 3). En la actualidad la lista de anticuerpos se ha extendido para incluir anticuerpos antifosfolípidos, los anti-partículas lipídicas (descritos por nuestro grupo) y anti-colágeno del tipo II (Lahita *et al.*, 2002; Baeza *et al.*, 2011; Ou *et al.*, 2012).

Tabla 3. Autoanticuerpos más comunes en el LES (Lahita *et al.*, 2002).

Enfermedad	Autoanticuerpo	Positivo (%)
Lupus eritematoso sistémico.	Anti-DNAs	30 - 70
	Anti-Sm	20 - 40
	Anti-RNP	40 - 60
	Anti-Ro/SS-A	10 - 15
	Anti-PCNA	5 - 10
	Anti-Ku	30 - 40
	Anti-lámina B	5 - 10
	Anti-ribosoma P	5 - 10
	Anti-histona	30
	Anti-fosfolípidos	50

Sm.- Antígeno Smith, **RNP.-** anti-ribonucleoproteínas pequeñas, **Ku.-** anti-helicadas, **Ro/SS-A.-** anti-ribonucleoproteínas, **PCNA.-** anti-antígeno nuclear de células proliferantes.

Los inmunocomplejos formados por estos autoanticuerpos, entre otros, y sus antígenos específicos son los responsables de la glomérulo nefritis, la artritis y la vasculitis que afectan a las arterias de pequeño calibre de todo el organismo; la anemia hemolítica y la trombocitopenia se deben a autoanticuerpos contra los eritrocitos y las plaquetas, respectivamente (Murphy *et al.*, 2008; Toong *et al.*, 2011; Perry *et al.*, 2011).

Cuando los complejos inmunes se depositan en la membrana sinovial de las articulaciones se desarrolla poliartritis, si ocurre en la pared de vasos sanguíneos pequeños se produce vasculitis, que se manifiesta de distintas maneras: en la piel hay exantemas, especialmente en la cara, en donde pueden desarrollarse lesiones en forma de ala de mariposa, gangrena digital y ulceraciones; en el aparato digestivo hay diarrea, hemorragias y perforación intestinal; en corazón hay pericarditis y endocarditis; en el sistema nervioso se presenta encefalopatía, parálisis de nervios craneales y lesiones de la médula espinal y en el riñón se desarrolla glomerulonefritis, que es la causa más frecuente de muerte en el LES (Toong *et al.*, 2011). No obstante la importancia de los anticuerpos en la formación de los complejos inmunes y en la participación de éstos en el desarrollo de la enfermedad, no se conocen los mecanismos que desencadenan la formación de dichos autoanticuerpos. Cuando el LES se encuentra asociado al SAAF además de las características clínicas ya indicadas, se presenta trombosis arterial y venosa, trombocitopenia y abortos recurrentes (Asherson *et al.*, 1996; Meroni *et al.*, 2011; Galli *et al.*, 2012).

1.7.3 Influencia de factores genéticos en el desarrollo del LES. El lupus es una enfermedad autoinmune muy compleja que se presenta en individuos con predisposición genética, los cuales han estado expuestos a ciertos estímulos que favorecen la expresión de dicha información genética (Deng y Tsao, 2010).

Los genes de la región HLA por sus siglas en inglés "*Human Leukocyte Antigen*" o antígeno leucocitario humano, fueron la primera asociación genética descrita para el LES, ésta es una región del brazo corto del cromosoma 6, que codifica para más de 200 genes, la mayoría con función inmunológica. La región HLA presenta a su vez tres regiones, la clase I y la clase II, que contienen genes que codifican para glicoproteínas que participan en el procesamiento y presentación de péptidos a los linfocitos T, y la clase III, que contiene genes muy importantes del sistema inmunológico como son TNF, C2, C4A y C4B, los tres últimos factores del complemento. Cuando hay un déficit del componente C4A, el 80% de las personas tiene un alto riesgo de desarrollar LES. Esta enfermedad se asocia también a deficiencias heredadas de los componentes del complemento C1Q, C1R/S y C2. Se ha propuesto que la falta de síntesis de componentes del complemento interviene en el desarrollo del LES, por la acumulación en el paciente de cantidades anormales de antígenos, ya

que éstos no pueden ser eliminados (Cepika *et al.*, 2010; Deng y Tsao, 2010; Orozco *et al.*, 2010). Estudios genéticos en distintas poblaciones, han demostrado que la región HLA, principalmente las variantes de la clase II (HLA-DR2 y HLA-DR3) y clase III (MSH5 y SKIV2L), son una fuerte predisposición de presentar LES (Deng y Tsao, 2010).

Se han realizado “*Genome-Wide Association Studies*” (GWAS) o estudios de asociación de todo el genoma en distintas poblaciones del mundo, con el fin de identificar los genes que podrían participar en el desarrollo del LES (Deng y Tsao, 2010). Estos estudios han demostrado que existen varios genes fuera de la región HLA que son importantes en el desarrollo del LES. El factor cinco regulador de interferón (IRF5) es un modulador transcripcional de los genes relacionados con el interferón tipo I, que actualmente se considera como uno de los principales marcadores de esta enfermedad, ya que esta citocina se encuentra muy elevada en pacientes que presentan LES (Niewold *et al.*, 2010). La ausencia de algunos alelos del receptor de Fc γ predispone a la adquisición de esta enfermedad; cuando el receptor Fc γ -RIIA está presente, se obtiene cierta protección en la población afroamericana, que de otro modo desarrollarían lupus con nefritis de graves consecuencias (Deng y Tsao, 2010).

Otros factores como la síntesis elevada de la proteína ligadora de manosa, la presencia de IL-6, de BCL-2 (codificada por el gen de leucemia de linfocitos B) y de IL-10 se han asociado a la nefritis que se presenta en el lupus humano (Orozco *et al.*, 2010; Nakou *et al.*, 2010).

I.7.4 Influencia de factores hormonales en el desarrollo del LES. La influencia hormonal es otro factor importante en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, ya que en la mayoría de los casos éstas se presentan después de la menarquia y antes de la menopausia, periodos en los que ocurren variaciones fisiológicas, patológicas o terapéuticas que pueden modificar las concentraciones de estrógeno en suero; entre ellas, cambios durante el ciclo menstrual, el embarazo, el periodo postparto, el estrés crónico, síntesis de citocinas inflamatorias, el uso de corticoesteroides o anticonceptivos orales o de terapias de reemplazo hormonal (Mok *et al.*, 2003; Tripodi *et al.*, 2011).

Además, en pacientes con LES se han documentado alteraciones en la relación andrógenos/estrógenos, se han detectado alteraciones en el metabolismo del estrógeno que originan un incremento en la hidroxilación del C₁₆ del estrógeno, que conlleva a un incremento significativo en la concentración de 16 α -hidroxiestrona que ejerce actividades de proliferación más potentes que el 17 β -estradiol. En otros casos, concentraciones bajas de andrógenos en plasma de mujeres con lupus (testosterona, dihidrotestosterona, dehidroepiandrosterona y sulfato de dihidroepiandrosterona)

correlacionan inversamente con la actividad de la enfermedad (Cutolo *et al.*, 2004; Carioli *et al.*, 2010).

La tabla 4 resume algunas acciones de los estrógenos, en concentraciones fisiológicas o suprafisiológicas, sobre algunos tipos de células del sistema inmunológico. Ya que se ha señalado que así como los estrógenos facilitan la respuesta humoral y el incremento de la producción de citocinas Th2, dosis elevadas de andrógenos o progesterona inhiben a los linfocitos Th1 tanto en su proliferación como en la producción de IL-2 (Mok *et al.*, 2003; Carmier *et al.*, 2010).

Tabla 4. Acciones biológicas de los estrógenos sobre células del sistema inmunológico (Mok *et al.*, 2003).

Tipo celular	Efecto de los estrógenos	Dosis de los estrógenos
Linfocitos B (LcB)	Aumenta su diferenciación <i>in vivo</i> , e <i>in vitro</i> incrementa la producción de anticuerpos anti-DNA de doble cadena	Fisiológica
Linfocitos T (LcT)	Disminuye su proliferación en respuesta a mitógenos o a antígenos; también disminuye la expresión de IL-2R y la producción de IL-2 en Lc T periféricos.	Alta
Monocitos	Aumenta la expresión del ligando CD40L de Lc T, la producción de IL-10 y la liberación de la sintetasa de óxido nítrico intracelular.	Fisiológica
Otros	Aumenta la expresión de moléculas de adhesión en endotelios	Alta

1.7.5 Influencia de factores ambientales en el desarrollo del LES. Aunque existen factores genéticos y hormonales que predisponen al lupus, el entorno ambiental parece tener un papel importante en la iniciación de la enfermedad. Por ejemplo, algunos agentes infecciosos se han relacionado con la patogénesis del lupus. Entre éstos se encuentran los virus de la rubéola, el sarampión y las paperas. El mecanismo responsable no es bien conocido; sin embargo, durante las infecciones, probablemente ocurre una activación inespecífica de los linfocitos B y un desarreglo en la modulación de la respuesta inmunológica del paciente (Murphy *et al.*, 2008; Carmier *et al.*, 2010).

1.7.6 Lupus inducido por fármacos. Se genera por la ingesta crónica de ciertos fármacos (Tabla 1), los cuales inducen una respuesta inmunológica que desencadena una enfermedad muy parecida pero menos severa que el LES. Existen cerca de 38 fármacos que desarrollan esta enfermedad, la hidralazina, la procainamida y la isoniazida son los que generan un mayor número de casos (Chang y Gershwin, 2010). El proceso por el que se desarrolla esta enfermedad no es bien conocido, sin

embargo, un factor que predispone su desarrollo es la velocidad de acetilación o la velocidad con la que se metabolizan los fármacos, la cual disminuye considerablemente en pacientes con una deficiencia genética de la N-acetil transferasa (Chang y Gershwin, 2010).

También se ha determinado que estos fármacos pueden suprimir la tolerancia central y periférica, alterar la transcripción genética en linfocitos T y linfocitos B, alterar el balance y función de citocinas o sus receptores; así como modificar la estructura de la cromatina y de antígenos propios (Chang y Gershwin, 2010; Pascual *et al.*, 2010; Meffre, 2011). Sin embargo, aun no se conoce con certeza el mecanismo por el cual estos fármacos generan LES. Una posible explicación de la participación de estos fármacos en el desarrollo del lupus es la propuesta en este laboratorio, en la que se sugiere la forma en que se modifica un antígeno propio de las membranas celulares: se propone que la cardiolipina, la fosfatidilserina y el fosfatidato lípidos aniónicos de forma molecular cilíndrica, en presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} , Mn^{2+} o de los fármacos, clorpromacina, un tranquilizante, la procainamida y la hidralazina, antiarrítmicos, adquieren una forma cónica y en consecuencia se asocian en arreglos moleculares diferentes a la bicapa o partículas lipídicas (Figura 4), estas estructuras son estables y representan una forma modificada del antígeno propio, es decir el arreglo de bicapa o de partícula lipídica transitoria (Wong-Baeza *et al.*, 2012). Estas asociaciones lipídicas, pueden causar la enfermedad parecida al LES con la producción de anticuerpos antifosfolípidos, entre los cuales se encuentran los anti-partículas lipídicas, como se indica en el inciso I.7.8.1 (Baeza *et al.*, 2004; 2007; 2011).

I.7.7 Tratamiento del LES. En la actualidad no hay un tratamiento completo y eficaz para esta enfermedad. En general su tratamiento depende de la magnitud de la enfermedad, de la actividad inmunológica y de los órganos afectados (Borba *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 2011). Los síntomas como dolores musculares y articulares, así como algunos signos de serositis, pueden tratarse con antiinflamatorios no esteroideos. Sin embargo, estos fármacos pueden alterar la función renal y no están indicados en pacientes con problemas en la función renal. Los fármacos que inhiben selectivamente la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) no han demostrado mejores resultados en el tratamiento de las artralgias del lupus y existe la posibilidad de que algunos inhibidores de COX-2 exacerben la enfermedad, debido al azufre que forma parte de su molécula (Rottman y Willis, 2010). La dermatitis, la fatiga y la artritis lúpica pueden ser tratadas con anti-maláricos, dosis de 400 mg de hidroxiclороquina al día pueden mejorar las lesiones de la piel en pocas semanas.

El tratamiento con corticosteroides se reserva para pacientes con afección orgánica y evidencia de actividad serológica, como anticuerpos anti-DNA elevados, complemento hemolítico total bajo o niveles bajos de las proteínas C3 y C4. La dosis de corticoesteroides varía con la magnitud de la

enfermedad. En algunos casos puede ser necesario utilizar bolos de esteroides parenterales durante períodos cortos. Los fármacos metotrexate, ciclofosfamida y azatioprina se usan para complicaciones potencialmente mortales como la glomerulonefritis proliferativa difusa y la encefalitis lúpica (Harrison *et al.*, 2001; Cepika *et al.*, 2010).

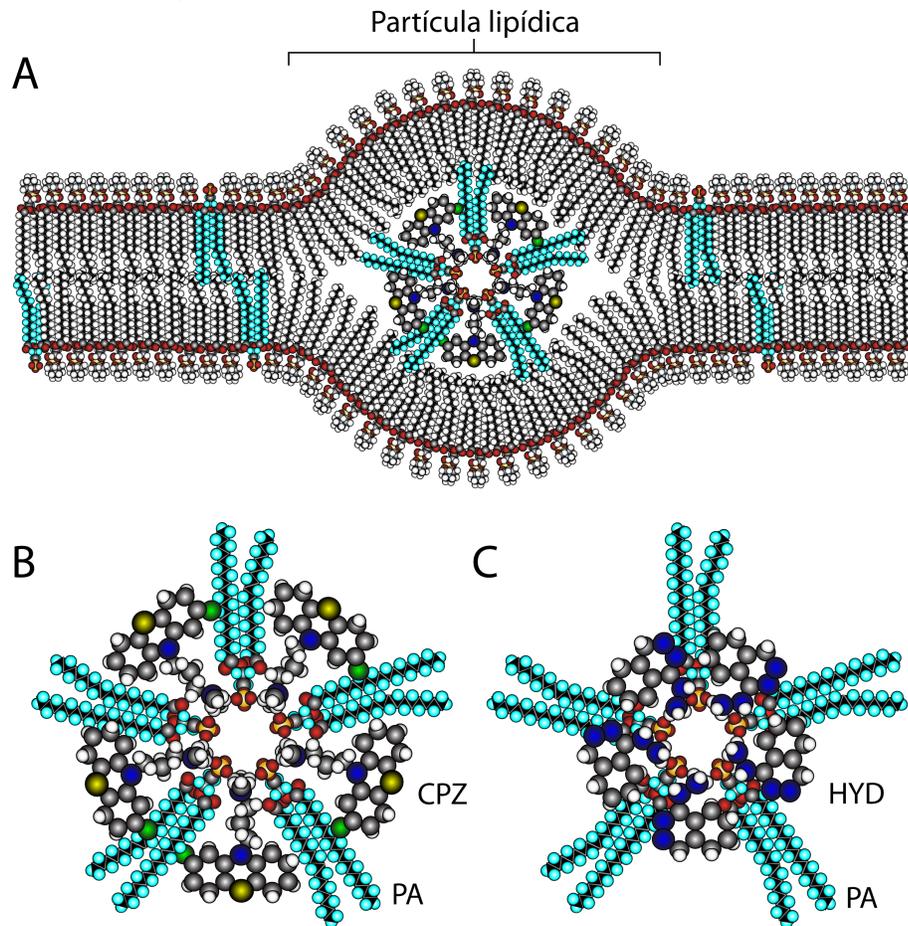


Figura 4. Formación de partículas lipídicas. En la membrana celular (A) se forma la micela invertida, inducida por los fármacos clorpromacina (CPZ) (B) e hidralazina (HYD) (C) en presencia del lípido fosfatidato (PA). La micela invertida insertada en la bicapa constituye el centro de la partícula lipídica, B y C, son esquemas de la micela invertida. Los fármacos tienen una forma molecular triangular con carga positiva en el vértice que neutraliza la carga negativa del fosfatidato de forma molecular cónica y forman la micela invertida que se inserta en la bicapa (Wong-Baeza *et al.*, 2012).

Otro de los fármacos utilizados en el tratamiento del lupus y la artritis reumatoide es la cloroquina (Nord *et al.*, 2004; Araiza-Casillas *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2010), desde 1950 se conoce su eficiencia en la remisión de estas enfermedades. El factor reumatoide disminuye después del uso prolongado de este fármaco, sin embargo, no hay datos de que la cloroquina disminuya la progresión de las lesiones óseas erosivas (Goodman-Gilman, 2001; Cepika *et al.*, 2010).

La cloroquina suprime la respuesta de los linfocitos T a los mitógenos, interfiere con la replicación de los virus, disminuye la quimiotaxis leucocitaria, desestabiliza las membranas lisosomales y captura

radicales libres. La acción de la cloroquina no es evidente sino hasta después de un periodo de 4 a 12 semanas de que se administra. Con frecuencia, el fármaco es útil como coadyuvante del tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos, y no tiene interacción adversa con otros antirreumáticos (Ingster-Moati *et al.*, 2004; Cepika *et al.*, 2010).

Adicionalmente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la cloroquina impide la formación de partículas lipídicas en membranas de liposomas y de diferentes células en cultivo, así como de linfocitos humanos, porque estabiliza la matriz lipídica membranal (Leyva, 2001; 2005; Baeza *et al.*, 2004). Por lo que este compuesto se ha utilizado en el tratamiento del lupus en los ratones BALB/c (Leyva, 2005). La cloroquina es un catión orgánico divalente que se une con los grupos polares negativos de los lípidos membranales, unión que impide el movimiento de los lípidos necesario para la formación de las partículas lipídicas. Este estabilizador de la matriz membranal, causa una disminución en la enfermedad, porque además de los efectos que se han descrito impide la formación de partículas lipídicas en las células de los ratones. Al disminuir las partículas lipídicas (antígeno) en los ratones se evita la reacción inmunológica entre estas partículas y los anticuerpos anti-partículas lipídicas.

I.7.8 Modelos de lupus en ratón. Han sido muy importantes para aclarar los mecanismos genéticos, celulares y moleculares de la autoinmunidad. El conocimiento de estos mecanismos ha dado lugar al desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de las enfermedades autoinmunes (Perry *et al.*, 2011).

Entre los modelos que se han estudiado destacan los siguientes: Los ratones NZB (Nueva Zelanda Negros) que desarrollan anemia hemolítica autoinmunitaria en las primeras etapas de su vida, con reticulocitosis, ictericia y esplenomegalia, en estos ratones se encuentran anticuerpos anti-nucleares, aunque generalmente en títulos bajos (Reininger *et al.*, 1996; Perry *et al.*, 2011). La cruce entre el ratón NZB y el NZW (Nueva Zelanda Blanco) produce ratones B/W, que desarrollan una enfermedad autoinmunitaria distinta y más agresiva que la de los NZB, con características más similares al lupus humano. Presentan títulos altos de anticuerpos anti-nucleares y anti-DNA, y glomerulonefritis por inmunocomplejos (Sfikakis *et al.*, 2005; Gulinello y Putterman, 2011); las hembras sufren una afectación más intensa que los machos (Schoenroth *et al.*, 2004; Rottman y Willis, 2010).

La cepa de ratones MRL/lpr que ha permitido la identificación y caracterización del gen *lpr* que acelera el desarrollo de lupus en estos ratones, con proliferación linfocítica no maligna, y con manifestaciones de autoinmunidad como la producción de anticuerpos anti-DNA, anti-Sm y anti-NRP, y con glomerulonefritis, vasculitis y artritis (Zhou *et al.*, 2004; Gulinello y Putterman, 2011).

Los ratones BXSB que producen espontáneamente anticuerpos anti-DNA y desarrollan glomerulonefritis por inmunocomplejos a semejanza del LES humano. Estos ratones representan un modelo único de lupus comparado con las otras cepas ya que los machos presentan una afectación más grave que las hembras (Watanabe *et al.*, 2000; Santiago-Raber *et al.*, 2004).

Las similitudes entre el lupus en ratones y el LES humano han sugerido que las estrategias terapéuticas que han sido eficaces en los ratones también podrían ser eficaces en personas con lupus. Los corticosteroides alivian la enfermedad inmunitaria en los ratones B/W y la administración de ciclofosfamida también es eficaz en esta cepa de ratones, por lo que ambos tratamientos se establecieron como una importante opción terapéutica en personas con nefritis lúpica (Rottman y Willis, 2010; Perry *et al.*, 2011).

El modelo B/W se ha utilizado para estudiar nuevas estrategias terapéuticas basadas en los conocimientos más recientes sobre la biología molecular del sistema inmunitario. Algunas estrategias están diseñadas para interferir con moléculas de la superficie celular (CD4, CD8) imprescindibles para el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T (Rottman y Willis, 2010). Otras se han diseñado para prevenir la producción de autoanticuerpos patógenos, al modular el repertorio de los linfocitos B (Rottman y Willis, 2010; Perry *et al.*, 2011). También se han basado en bloquear las citocinas que promueven la autoinmunidad o en aumentar las que pueden bloquearla. Además, se ha hecho uso de fármacos que bloquean la coestimulación de los linfocitos T, como el bloqueo de la vía B7/CD28 o de la vía CD40/CD40-ligando, que retrasa de forma importante la nefritis lúpica en los ratones B/W (Perry *et al.*, 2011). El bloqueo simultáneo de ambas vías produce un beneficio de larga duración en los ratones B/W sin provocar una inmunosupresión generalizada permanente. Estas estrategias son objeto de estudios clínicos diseñados para determinar si los resultados obtenidos en los ratones B/W se traducirán en mejores tratamientos para las personas con LES (Cunnane *et al.*, 2004; Zameer y Hoffman, 2004; Rottman y Willis, 2010).

1.7.8.1 Modelo experimental de lupus en ratones inducido por lípidos asociados en partículas lipídicas. En nuestro grupo de trabajo se desarrolló un modelo de lupus en ratones BALB/c (Figura 5) y NIH, por la administración de los fármacos clorpromacina, procainamida e hidralazina que inducen la formación de partículas lipídicas en liposomas. Los fármacos se usaron solos o en liposomas en donde indujeron la formación de partículas lipídicas y se administraron a las cepas de ratones en que se desarrolló una enfermedad con las siguientes características (Baeza *et al.*, 2004; Tescucano, 2009):

- Presencia en suero de anticuerpos anti-partículas lipídicas, y después de cuatro semanas, presencia de anticuerpos anti-cardiolipina, anti-histonas, anti-nucleares y anti-coagulantes.
- Presencia de alopecia moderada, lesiones faciales simétricas en las cepas BALB/c (Figura 5) y de forma redonda en las cepas NIH. Este tipo de lesiones son características en pacientes con lupus.
- Depósitos de inmunocomplejos entre la dermis y la epidermis, como ocurre en el lupus humano. Localización de los inmunocomplejos en la pared de los capilares glomerulares y en el mesangio glomerular.

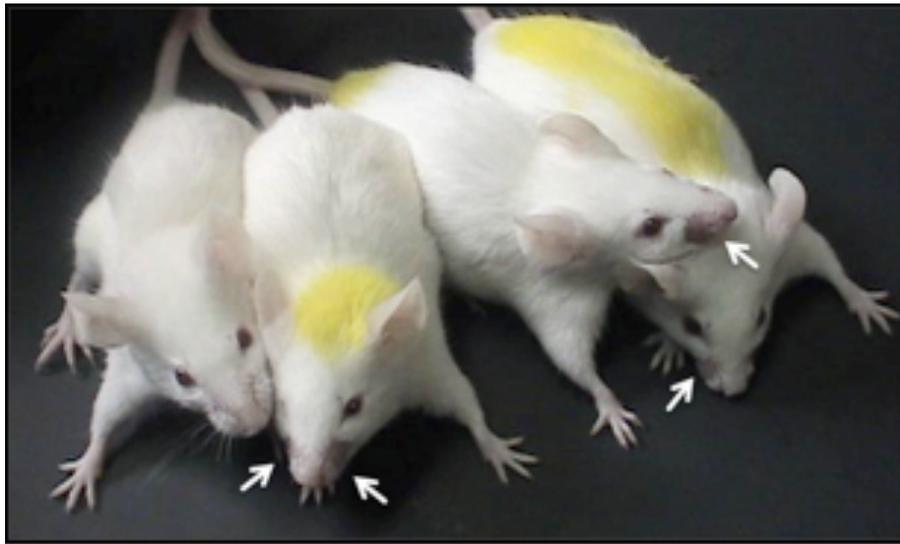


Figura 5. Ratones hembra BALB/c que desarrollaron lupus experimental. Son ratones hembra de diez semanas de edad que recibieron liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por clorpromacina (Baeza *et al.*, 2004). Las flechas muestran las lesiones faciales en los ratones.

Las lesiones faciales simétricas y el depósito de inmunocomplejos entre la dermis y la epidermis son características únicas de este modelo experimental que no se han descrito en otros modelos experimentales desarrollados en ratones.

En este modelo experimental de lupus se propone que los lípidos asociados en partículas lipídicas inducidas y estabilizadas por los fármacos son reconocidos por el sistema inmunológico, lo que lleva a la producción de anticuerpos anti-partículas lipídicas. Estos anticuerpos se unen a las partículas que se encuentran en las membranas celulares y en presencia del complemento causan ruptura de las membranas lo que expone antígenos intracelulares. Esta exposición de antígenos intracelulares explica la aparición posterior de los anticuerpos anti-cardiolipina, anti-histonas y anti-nucleares que se han detectado en dichos ratones (Baeza *et al.*, 2011), además como se ha indicado los dos últimos son característicos del LES humano.

I.8 Estudio de la expresión genética en el modelo experimental de lupus inducido por lípidos asociados en partículas lipídicas. Para analizar la expresión de genes de un organismo, se han desarrollado diversas metodologías entre las que destacan los microarreglos de DNA y RNA, microarreglos de oligonucleótidos y el análisis seriado de la expresión génica (Nakou *et al.*, 2010; Pascual *et al.*, 2010). Los microarreglos constituyen un importante avance ya que permiten evaluar, en un espacio muy reducido, la expresión de un gran número de genes. Es posible conocer la expresión génica de una sola o de varias células, comparar la expresión génica entre células sanas y enfermas, y también estudiar la expresión génica entre diferentes tejidos. En enfermedades autoinmunes humanas, estos estudios han mostrado el potencial de identificar blancos terapéuticos así como biomarcadores para el diagnóstico, valoración de la enfermedad y respuesta al tratamiento (Pascual *et al.*, 2010).

La expresión génica del modelo de lupus desarrollado en este laboratorio, se evaluará en los bazo de los ratones, debido a que distintos estudios con microarreglos en pacientes con LES, han mostrado que las células mononucleares son las que presentan una mayor variación en la expresión genética durante la enfermedad y su tratamiento, y gran parte de estas células se concentran en dicho órgano (Deng y Tsao, 2010; Pascual *et al.*, 2010). El bazo es un órgano linfóide primario del sistema inmunológico que proporciona el microambiente necesario para que se realice la interacción del antígeno con las células del sistema inmunológico y de estas células entre sí, que lleva a desarrollar una respuesta inmunológica (Murphy *et al.*, 2008). Todo esto se realiza bajo mecanismos muy estrictos de control y de regulación, sin embargo, bajo ciertas circunstancias esta regulación se altera y se supera el umbral de tolerancia inmunológica lo que desencadena procesos autoinmunitarios (Murphy *et al.*, 2008; Rottman y Willis, 2010).

La expresión genética se analizará en forma comparativa entre los bazo de los ratones BALB/c control que recibieron liposomas sin partículas lipídicas y los bazo de los ratones BALB/c que desarrollaron lupus experimental por la administración de liposomas con partículas lipídicas inducidas con clorpromacina o manganeso. También se realizarán estudios comparativos entre los dos modelos de lupus. El estudio se llevará a cabo con microarreglos de RNA con el análisis de todo el genoma de ratón. Los microarreglos de RNA son placas que contienen miles de genes de un organismo específico, estos genes están en puntos o “spots”. A la placa se le agrega el cRNA proveniente del organismo en estudio, marcado con una molécula fluorescente, el cual se hibrida con su gen homólogo en la placa; la hibridación específica cRNA-RNA se hace evidente por la emisión de una señal fluorescente de cada “spot” que se registra y cuantifica en el equipo. La importancia cuantitativa de este análisis radica en el hecho de que la cantidad de cRNA que se hibrida es proporcional a la abundancia del transcrito en la muestra biológica en estudio (Crow y Wohlgemuth,

2003; Kunz e Ibrahim, 2009). Este estudio a nivel molecular permitirá un mejor conocimiento del lupus parecido al humano que se ha desarrollado en los ratones, lo cual llevará a un mayor conocimiento del lupus eritematoso sistémico humano, que como se ha indicado tiene una etiología compleja y aun no bien conocida, para llegar a proponer un tratamiento que pudiera proporcionar una mejor calidad de vida a los pacientes.

I.9 Justificación.

El modelo de lupus desarrollado en ratones ha permitido hacer diferentes estudios para entender y seguir el curso de esta enfermedad, sin embargo, no se ha identificado su perfil genético, por lo que en este trabajo se usa la tecnología de los microarreglos para esta determinación. Al identificar el perfil genético de este modelo y compararlo con los genes involucrados en el lupus humano, se contribuye a conocer la similitud entre la enfermedad en el ratón y en el humano, lo que permitirá usar el modelo animal para obtener conocimientos a nivel molecular sobre el lupus humano y sobre otras enfermedades autoinmunes.

I.10 Hipótesis.

Al identificar los mecanismos moleculares que ocurren en el desarrollo en el ratón de la enfermedad parecida al lupus, se contribuye a un mejor conocimiento del lupus humano para ayudar a mejorar su tratamiento y prevención.

I.11 Objetivos.

I.11.1 Objetivo general.

Determinar el perfil de expresión genética en bazos de ratones que han desarrollado la enfermedad autoinmune parecida al lupus humano.

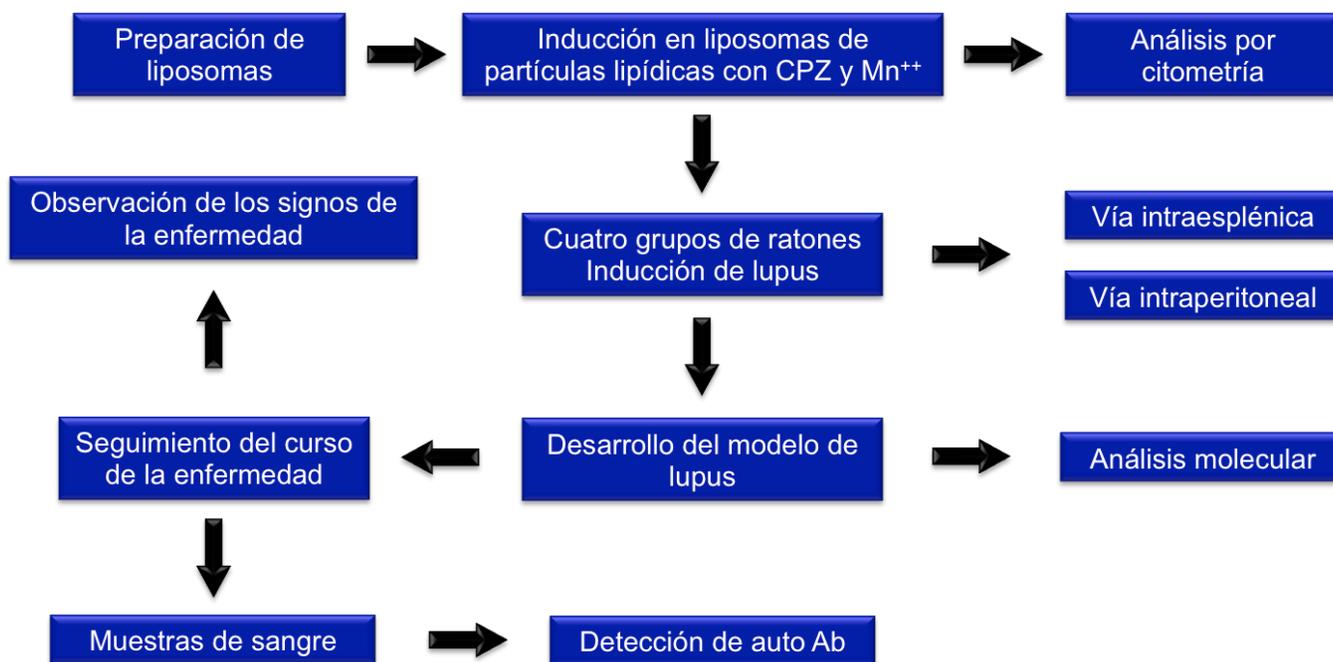
I.11.2 Objetivos específicos.

- 1) Analizar por citofluorometría la formación de partículas lipídicas inducidas por manganeso o por clorpromacina en liposomas.
- 2) Desarrollar el lupus parecido al humano en ratones hembra BALB/c mediante la administración de partículas lipídicas inducidas por manganeso o por clorpromacina en liposomas.
- 3) Seguir el curso de la enfermedad en los ratones al determinar en su suero la presencia de autoanticuerpos anti-partículas lipídicas por ELISA-liposomal y citofluorometría-liposomal, y anti-cardiolipina por ELISA-cardiolipina.
- 4) Realizar microarreglos comparativos con los bazos de:

- Ratones control que no presentan lupus y ratones que desarrollaron lupus inducido por manganeso.
- Ratones control que no presentan lupus y ratones que desarrollaron lupus inducido por cloropromacina.
- Ratones que desarrollaron lupus inducido por manganeso y ratones que desarrollaron lupus inducido por cloropromacina.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1 Esquema general de trabajo.



II.2 Preparación de liposomas. Se utilizaron liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) que se formaron por el método de evaporación en fase inversa (Szoka y Papahadjopoulos, 1978) modificado (Baeza *et al.*, 1987), para obtener liposomas unilamelares, porque estas vesículas son más uniformes en su estabilidad y en tamaño que las multilamelares (Alving *et al.*, 1984).

Los lípidos se disolvieron en 1 mL de cloroformo en un matraz de dos bocas, que se adapta a una bomba de vacío, donde se llevó a cabo la evaporación del cloroformo a presión reducida y a temperatura ambiente, para distribuir los lípidos de manera uniforme en el fondo del matraz. Posteriormente se agregaron 1 mL de éter etílico y 330 μ L de regulador Tris-salina (10 mM, 1 mM) a pH 7.0 (TS), esta mezcla se agitó en un vortex a su velocidad máxima durante 1 min, a continuación se evaporó el éter etílico durante 1 min en vacío. Durante este procedimiento se formó un gel viscoso, y después una suspensión de liposomas unilamelares. Se completó el volumen de la preparación de liposomas a 1 mL con regulador de TS para tener una concentración de 0.1 μ moles de lípido cónico en 100 μ L de suspensión de liposomas. Finalmente, se filtró la suspensión a través de una membrana Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro, para homogeneizar el tamaño de las vesículas.

II.3 Inducción de partículas lipídicas en liposomas. La formación de partículas lipídicas se llevó a cabo al incubar a 37°C durante 30 min las preparaciones de liposomas con el inductor manganeso a concentraciones de 3 a 7 mM o cloropromacina de 0.5 a 4 mM (Tescucano, 2009).

II.4 Análisis por citofluorometría de las asociaciones moleculares lipídicas. Las preparaciones liposomales obtenidas con lípidos asociados en bicapa o en partículas lipídicas se analizaron por citometría de flujo en el citómetro FACScalibur (Becton Dickinson), equipado con rayo láser de argón de 488 nm, con los siguientes parámetros en modo logarítmico: FSC (Forward scatter) o tamaño liposomal relativo en E00, umbral mínimo de detección en 52 V; SSC (Side scatter) o complejidad o granularidad liposomal relativa de 401 V, a compensación de 0.8 y FL-1 de 660 V. Los datos obtenidos de 10,000 liposomas se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star) y se obtuvieron histogramas del número de liposomas contra granularidad y gráficas de puntos del tamaño liposomal contra fluorescencia relativa; así como del tamaño contra la granularidad liposomal (Baeza *et al.*, 2004; Tescucano, 2009).

II.5 Esquemas de inducción de lupus en los ratones. Para desarrollar el modelo de lupus, se emplearon ratones hembra de la cepa singénica BALB/c de 6 semanas de edad, que se dividieron en grupos integrados por cinco ratones. Antes de iniciar los esquemas de inmunización, los ratones se sangraron por punción en la mejilla para obtener los sueros que se utilizaron como testigos negativos durante el desarrollo de este trabajo.

La inducción de lupus en ratones BALB/c se realizó a través de la administración de partículas lipídicas inducidas por manganeso o por cloropromacina en liposomas (Tabla 5). El fármaco cloropromacina se seleccionó con base a su propiedad de inducir la formación de partículas lipídicas tanto en membranas celulares como en membranas experimentales. La dosis de fármaco que se empleó esta relacionada con la dosis que genera una enfermedad similar al lupus en el humano y que es la que se usa (3 mg/Kg de cloropromacina) en el tratamiento de alteraciones psicóticas (Baeza *et al.*, 2004; Tescucano, 2009). El manganeso se utilizó porque también es un inductor de la formación de partículas lipídicas (Aguilar *et al.*, 1999).

Los liposomas que presentan partículas lipídicas se aplicaron en dos etapas: En la primera, se hicieron dos administraciones de 100 μ L de liposomas incubados con manganeso o con cloropromacina, por vía intraesplénica con 21 días de diferencia; previo a estas administraciones se aplicó por vía intraperitoneal adyuvante completo o incompleto de Freund (Tabla 5), y en la segunda, se administraron 100 μ L de estos antígenos por vía intraperitoneal cada semana hasta la aparición de

los signos de la enfermedad. Como controles negativos, se tiene un grupo de ratones a los que se les administró por vía intraesplénica liposomas sin partículas lipídicas y otro al cual se le administró solución salina fisiológica (Tabla 5).

Tabla 5. Esquema de administración de liposomas a los ratones hembra BALB/c.

Ratones	Grupos (5 ratones)		Procedimiento para inducción de lupus	Días y tipo de inmunización				
				1	1	21	21	28
BALB/c hembras	I	Control I	Solución fisiológica	Adyuvante completo de Freund	IE	Adyuvante incompleto de Freund	IE	IP
	II	Control II	Liposomas sin inductor		IE		IE	IP
	III	Manganeso	Liposomas + Mn ⁺⁺		IE		IE	IP
	IV	Cloropromacina	Liposomas + CPZ		IE		IE	IP

IE, Vía intraesplénica; IP, Vía intraperitoneal.

II.6 Administración intraesplénica de los antígenos liposomales. Los ratones se anestesiaron con éter etílico y se sujetaron de las cuatro extremidades en una base de madera estéril. A continuación se procedió a limpiar la región abdominal del ratón con una solución de cloruro de benzalconio al 1%, se rasuró y se hizo un corte de aproximadamente 0.5 cm en el abdomen, tanto de piel como de músculo con navajas de escalpelo, para llegar a la cavidad peritoneal. Se localizó el bazo y se le inyectaron 0.1 μ moles de lípidos en forma de liposomas solos o incubados con el inductor correspondiente.

Después el bazo se colocó nuevamente en la cavidad abdominal para suturar el músculo con catgut 6-0 crómico y la piel con dermalón 6-0. Por último la recuperación de cada ratón se llevó a cabo en una jaula con aserrín estéril bajo una lámpara de luz para proporcionarles calor durante 2 ó 3 h. Transcurrido este tiempo, los ratones se trasladaron a sus jaulas también con aserrín estéril.

II.7 Detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones por ELISA-liposomal. Se empleó el método descrito en este laboratorio, en el cual los liposomas con la composición lipídica de fosfatidilcolina: fosfatidato (2:1) se unen directamente a la inmunoplaaca de ELISA (Baeza *et al.*, 1995).

Se formaron liposomas como se indicó en el inciso II.2 y se colocaron 100 μ L de ésta suspensión a cada pozo de la inmunoplaaca, la cual se incubó 12 h a temperatura ambiente. Los liposomas se usaron solos o incubados con las concentraciones de inductores que se seleccionaron en el inciso II.4 a 37°C durante 30 min. A continuación se agregaron 200 μ L de la solución de bloqueo (PBS + SFT al 8%), y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se decantó la solución de bloqueo y se adicionaron a cada pozo 100 μ L del suero de los ratones en dilución 1:50

con solución de bloqueo, y se incubó 1 h a 37°C (los sueros se incubaron previamente a 56°C por 30 min para eliminar el complemento). Después la inmunoplaaca se lavó cuatro veces con la solución de bloqueo, y se adicionaron a cada pozo 100 µL del anticuerpo polivalente anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa en dilución 1:2000, se incubó 1 h a 37°C. Al término de esta incubación la placa se lavó y se adicionaron a cada pozo 100 µL del sustrato de la peroxidasa y se incubó 30 min a 37°C. La reacción se detuvo con 50 µL de ácido sulfúrico 2.5 M y se leyó la absorbencia a 492 nm en el lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS).

Como control positivo se empleó la reacción del anticuerpo monoclonal B-216 con los liposomas que llevan partículas lipídicas. Como controles negativos se utilizaron los sueros de los ratones obtenidos antes de aplicar los procedimientos para la inducción del lupus. El blanco de reactivos contiene todos los componentes del método a excepción del suero (Baeza *et al.*, 2004). Los resultados de esta prueba se expresaron en unidades arbitrarias (UA), como se informa en los laboratorios clínicos; dichas unidades se determinaron de la siguiente manera:

$$UA = \frac{A_{\text{del suero de ratones con lupus experimental}} - A_{\text{del blanco de reactivos}}}{A_{\text{del control positivo}} - A_{\text{del blanco de reactivos}}} \times 100$$

Donde: **A**, es la absorbencia a 492 nm de las muestras.

Los resultados se analizaron con el programa Graph Pad PRISM versión 5.0. Se utilizó la prueba Kruskal Wallis para datos no paramétricos, y se consideraron diferencias significativas con $P \leq 0.05$. Para determinar entre qué grupos hay una diferencia significativa se utilizó la post-prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

II.8 Detección de anticuerpos anti-cardiolipina en los sueros de los ratones por ELISA-cardiolipina. Para esta determinación se usó la técnica descrita por Loizou y colaboradores (1985). La cual se fundamenta en la técnica de ELISA que permite detectar anticuerpos anti-cardiolipina en el suero de los ratones, a través de la determinación de la actividad de la enzima conjugada a un segundo anticuerpo de cabra que se une a los anticuerpos anti-cardiolipina. En esta técnica se colocaron 4 µg de cardiolipina en 100 µL de etanol absoluto en cada uno de los pozos de la inmunoplaaca ésta se dejó a temperatura ambiente, hasta que el etanol se evaporó por completo. Posteriormente se agregaron 200 µL de la solución de bloqueo (PBS + SFT al 8%) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se eliminó esta solución y se agregaron 100 µL del suero de los ratones a una dilución 1:50 y se incubó 1 h a 37°C. Después se hicieron tres lavados con 200 µL de solución de bloqueo y se agregaron 100 µL del segundo anticuerpo polivalente anti-

inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:2000 con solución de bloqueo y se incubó 1 h a 37°C. A continuación se agregaron 100 µL del sustrato de la peroxidasa y se incubó 30 min a 37°C. Finalmente se agregaron 50 µL de H₂SO₄ 2.5 M para detener la reacción y se leyó la absorbencia a 492 nm en el lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). Se usaron como blanco de reactivos 2 pozos que contienen todos los componentes del método a excepción del suero y como control positivo se empleó el suero de un paciente con SAAF que contiene anticuerpos anti-cardiolipina. Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias y se calcularon como en el punto II.7; también se hizo el mismo análisis estadístico.

II.9 Detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones por citofluorometría. Los sueros de los ratones también se analizaron por citofluorometría para determinar autoanticuerpos contra partículas lipídicas; esta prueba es más sensible que la de ELISA-liposomal. Como controles negativos se utilizaron sueros de los ratones obtenidos antes de aplicar los procedimientos para la inducción del lupus y como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal B-216. A los liposomas se les agregaron 100 µL de los sueros de los ratones diluidos 1:50, previamente incubados a 56°C por 30 min para eliminar el complemento. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C. Posteriormente se agregaron 100 µL del segundo anticuerpo polivalente anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) en una dilución 1:2000 y las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación se llevó el volumen de las preparaciones a 1 mL con la adición de TS.

Las muestras se leyeron en un citofluorómetro FACScalibur equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Becton Dickinson). Se empleó el regulador de fosfatos para citometría, y se usaron los parámetros señalados para determinar las asociaciones moleculares en los liposomas: tamaño liposomal relativo en E00, un umbral mínimo de detección en 52 V; complejidad liposomal relativa de 401 V, a compensación de 0.8 y FL-1 de 660 V. Los datos obtenidos de 10,000 eventos se analizaron con el programa de FlowJo (Tree Star), y se obtuvieron como histogramas y gráficas de puntos.

II.10 Extracción de los bazos de los ratones en estudio. Una vez que se caracterizó el modelo en los ratones por la observación de los signos de la enfermedad y la determinación de los distintos autoanticuerpos, los ratones de cada grupo se sacrificaron al administrarles por vía intraperitoneal 100 µL de pentobarbiturato de sodio. Posteriormente se colocó cada ratón en una base de madera estéril y se le sujetaron las cuatro extremidades. A continuación se procedió a limpiar la región abdominal del ratón con una solución de cloruro de benzalconio al 1%, se rasuró y se hizo un corte de aproximadamente 0.5 cm en el abdomen, tanto de piel como de músculo con navajas de escalpelo, para llegar a la cavidad peritoneal. Se localizó el bazo y se extrajo por completo. Los bazos se

fraccionaron en cuatro con material quirúrgico estéril y se colocaron en cuatro criotubos de 1.5 mL; dos que contenían 0.5 mL de RNA-later para estudios de ácidos nucleicos y dos con 0.5 mL de Tissue-Tek para la determinación de proteínas. Los criotubos se almacenaron a -70°C .

II.11 Obtención de RNA total.

II.11.1 Extracción del RNA total de bazo de ratón. Para esta técnica se emplearon las muestras almacenadas en RNA-later que provenían de dos ratones de cada grupo (Tabla 5). Se empleó la técnica de aislamiento total de RNA de los Laboratorios Agilent, ya que es una técnica de separación por centrifugación en columna libre de fenol, con la que se puede concentrar y purificar RNA total intacto. Esta técnica puede ser utilizada para el aislamiento de RNA total de tejidos de mamíferos o de células en cultivo.

La muestra se descongeló en un baño María a 37°C durante 10 min. Una vez descongelada se fragmentó con material quirúrgico estéril y se tomaron 30 mg del bazo, el cual se sumergió en un tubo Falcon de 20 mL con 600 μL de solución de lisis, la cual contiene al agente caotrópico tiocianato de guanidinio y un amortiguador para lisis y homogeneización. Inmediatamente el tejido se disgregó con el Tissue-ruptor de QIAGEN a 15,000 rpm, con una aguja de 0.9 mm de diámetro, para evitar la formación de espuma la aguja se movió de lado a lado. El homogeneizado se transfirió a dos columnas de pre-filtración (el volumen máximo de cada columna es de 350 μL) y se centrifugaron a $16\ 000 \times g$, a 5°C . Este paso asegura la homogeneización completa del tejido y remueve todos los contaminantes celulares, inclusive todo el DNA genómico (gDNA); en esta técnica no se utilizan DNAsas por lo que es más rápida y se emplean menos pasos. Posteriormente se adicionó a cada columna 350 μL de etanol al 70% para clarificar el homogeneizado y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. La muestra se transfirió al tubo con la columna de aislamiento y se centrifugó por 30 seg a $16\ 000 \times g$. Se desechó el filtrado y se centrifugó nuevamente por 1 min para eliminar todo el líquido restante. Posteriormente se realizaron dos lavados con el regulador de enjuague que contiene etanol al 70%. La columna de aislamiento se transfirió a un tubo eppendorf nuevo libre de RNAsas y finalmente la muestra se eluyó con 20 μL de agua libre de nucleasas al centrifugar a $16,000 \times g$ por 1 min. Las muestras se separaron en alícuotas de 5 μL y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

II.11.2 Cuantificación del RNA extraído de bazo de ratón. Se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-VIS, el cual mantiene a la muestra en un sitio específico en base a la tensión superficial; esto elimina la necesidad de celdas u otros dispositivos para contener la muestra, lo que permite usar volúmenes muy pequeños y concentrados. Se tomó 1 μL de RNA de cada muestra y se

colocó en el dispositivo, como blanco de reactivos se empleó agua libre de nucleasas. La muestra es atravesada por un haz de luz generado por una lámpara de Xenón y la cantidad de luz absorbida o transmitida es detectada por una matriz CCD (dispositivo de carga acoplada). La cuantificación del RNA se hace automáticamente en base a la ley de Beer-Lambert-Bouguer, la cual es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material en estudio. La pureza se evaluó con la relación de lectura 260/280.

II.11.3 Caracterización del RNA extraído de bazo de ratón. Se realizó con el bioanalizador Agilent 2100 y se emplearon los chips RNA 6000 de Agilent. Se tomó 1 μL de RNA de cada muestra obtenida (Control I, Control II, Mn^{++} , CPZ) y se mezcló con 1 μL del colorante RNA 6000, esta mezcla se colocó en el sitio de carga del chip, al cual previamente se le habían colocado 8 μL de la matriz de separación. En esta técnica, los distintos RNAs son separados electroforéticamente por la red de microcanales presentes en el chip y son detectados por la fluorescencia emitida por la acción de un láser. Para cada muestra se obtuvieron electroferogramas e imágenes semejantes a un gel de agarosa. A partir de los electroferogramas se obtuvo el número de integridad del RNA o RIN por sus siglas en inglés “*RNA Integrity Number*”, el cual tiene una escala del uno al diez, para que el RNA tenga la integridad adecuada para realizar microarreglos, este número debe de ser mayor a seis. Para la determinación de este número se toma en cuenta todo el electroferograma (Figura 6), no solo la relación entre los fragmentos 18 y 25S.

II.12 Síntesis, amplificación y marcaje de cRNA de bazo de ratón. Se llevó a cabo con el protocolo para microarreglos de dos colores basado en análisis de expresión génica (Quick Amp Labeling) de Agilent. Para cada grupo de estudio (Controles I y II, grupos manganeso y cloropromacina) se prepararon dos mezclas de reacción para obtener cada grupo marcado con el colorante Cy3 o con el colorante Cy5. Se colocaron por separado los microlitros necesarios de cada muestra que equivalen a 200 ng de RNA total en dos tubos eppendorf de 1.5 mL; a los dos tubos se le agregaron 1.2 μL de primers y promotores para T7, y se ajustó a un volumen final de 11.5 μL . Posteriormente se desnaturalizaron a 65°C por 10 min e inmediatamente después se transfirieron a hielo, y a todas las muestras se les agregaron los componentes de la Tabla 6 para sintetizar el cDNA.

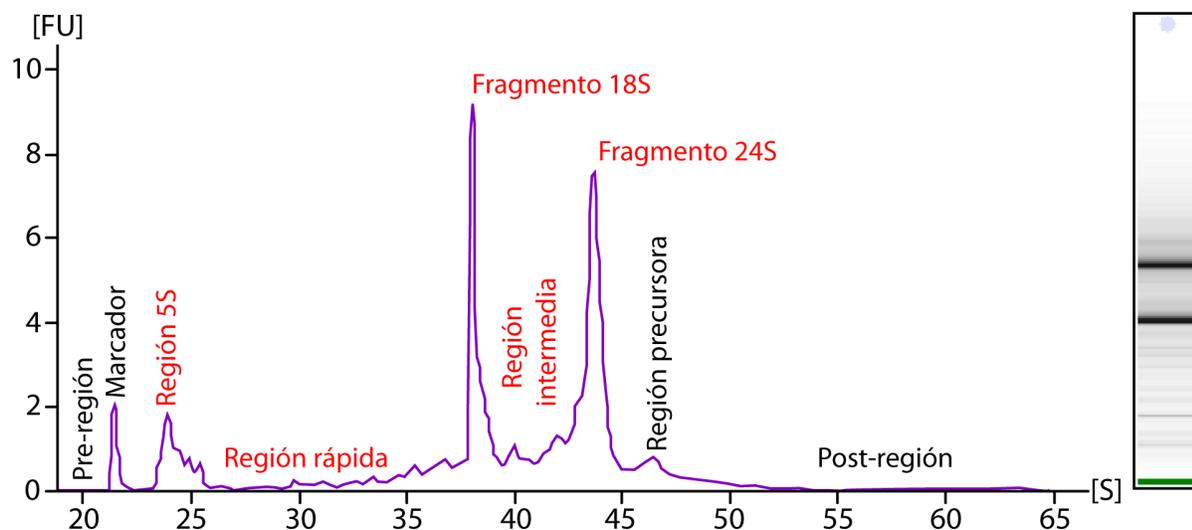


Figura 6. Electroferograma de RNA de bazo de ratón. En la gráfica se muestran las distintas regiones que se toman en cuenta para determinar el número de integridad del RNA (RIN).

Tabla 6. Composición de la mezcla para síntesis de cDNA.

*Componente	Volumen (µL) por reacción
Buffer de una cadena 5X	4
DTT 0.1 M	2
dNTP mix 10 mM	1
MMLV-RT	1
RNaseOut	0.5
Volumen total	8.5

*Son reactivos de Agilent.

La preparación se colocó en el termociclador LightCycler 2.0 para sintetizar el cDNA. Posteriormente se le agregó a las preparaciones los componentes de la Tabla 7 para sintetizar el cRNA.

Tabla 7. Composición de la mezcla para síntesis de cRNA.

*Componente	Volumen (µL) por reacción
Agua libre de nucleasas	68.9
Buffer de transcripción 4X	90
0.1 M DTT	27
Mezcla NTP	36
PEG 50%	28.8

RNasaOUT	2.3
Pirofosfato inorgánico	2.7
RNA polimerasa T7	3.6
Cy3-CTP o Cy5-CTP	10.8
Volumen total	270

*Son reactivos de Agilent.

La preparación se colocó en el termociclador LightCycler 2.0 para sintetizar el cRNA.

II.12.1 Purificación del cRNA de bazo de ratón. Se empleó la técnica RNeasy de los laboratorios Qiagen, la cual es una tecnología que combina las características selectivas de la membrana de sílice-RNeasy con la velocidad de centrifugación; características necesarias para la purificación óptima de RNA. Se transfirieron 80 μ L del cRNA obtenido a un tubo de colección de 2 mL y se le agregaron 20 μ L de agua libre de RNAsas para obtener un volumen final de 100 μ L, la mezcla se centrifugó durante 2 min a 17 000 x g en la microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5424. Se adicionaron 350 μ L de etanol al 70% y se mezcló por pipeteo a fin de proporcionar las condiciones adecuadas para la unión del RNA a la membrana de sílice. La solución se transfirió a un tubo que contiene la membrana de sílice-RNeasy y posteriormente se centrifugó a 17 000 x g durante 15 seg. A continuación la membrana de sílice-RNeasy se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 700 μ L de regulador RW1 (para lavar la membrana) y se centrifugó a 17 000 x g durante 15 seg. El filtrado se desechó y posteriormente se adicionaron 500 μ L de regulador RPE directamente al centro de la membrana y se centrifugó; estos dos últimos pasos se realizaron con el fin de eliminar contaminantes de la membrana. La membrana de sílice-RNeasy se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL, y se agregaron directamente sobre ella 30 μ L de agua libre de RNAsas para hidratarla durante 30 min en refrigeración; posteriormente se centrifugó a 17 000 x g durante 1 min. El cRNA obtenido se cuantificó como en el punto II.11.2 y se almacenó a -70°C hasta su uso en el estudio de microarreglos.

II.13 Microarreglos de RNA 4x44K de todo el genoma de ratón. La expresión de genes en los ratones que desarrollaron el lupus parecido al humano se analizó por duplicado en forma comparativa con el cRNA que proviene de los bazos de los ratones de los siguientes grupos (Tabla 5):

- Ratones del grupo control I y del grupo control II.
- Ratones del grupo control II y del grupo manganeso.
- Ratones del grupo control II y del grupo clorpromazina.
- Ratones del grupo manganeso y del grupo clorpromazina.

La técnica de microarreglos consta de cinco pasos:

- 1) Preparar las sondas de genes de secuencia conocida e imprimirlos en la superficie de la placa de boro-silicato.
- 2) Hibridar las sondas con las moléculas de cRNA en estudio marcadas previamente con una molécula fluorescente. La hibridación se lleva a cabo mediante la formación de un dúplex cRNA-RNA del tipo Watson-Crick.
- 3) Lavar el microarreglo después de la hibridación, para eliminar las moléculas de cRNA que se unieron de manera inespecífica a la placa de boro-silicato.
- 4) Analizar la intensidad de fluorescencia del producto de la hibridación, adquirir y procesar las imágenes obtenidas.
- 5) Realizar el análisis estadístico de la intensidad de fluorescencia (Crow y Wohlgemuth, 2003), los cambios en la cantidad de los transcritos pueden estimarse a partir del aumento o disminución en la intensidad de la fluorescencia. La importancia cuantitativa de los microarreglos radica en el hecho de que la cantidad de cRNA que hibrida en cada punto o "spot" es proporcional a la abundancia del transcrito en la muestra biológica (Crow y Wohlgemuth, 2003; Kunz e Ibrahim, 2009).

II.13.1 Hibridación del microarreglo 4x44K de ratón. El cRNA se desnaturalizó a 60 °C durante 5 min. Con el cRNA desnaturalizado se preparó la mezcla de fragmentación (Tabla 8), la cual se incubó por 30 min a 60 °C. Posteriormente se le agregaron 250 µL del buffer de hibridación HI-RPM 2x, se mezcló por pipeteo para evitar la formación de burbujas y se centrifugó por 1 min a 16 000 x g en la microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5424. Esta mezcla se transfirió a la ranura de carga del microarreglo y se colocó en el horno de hibridación Agilent G2545-A a 10 rpm por 17 horas a 65 °C

Tabla 8. Mezcla de fragmentación para la hibridación del microarreglo 4x44K de ratón.

Componente	Volumen µL
cRNA-Cy3	µL equivalentes a 825 ng
cRNA-Cy5	µL equivalentes a 825 ng
*Agente de bloqueo 10X	11
*Agua libre de nucleasas	Necesaria para ajustar a vol. final
*Buffer de fragmentación 25X	2.2
Volumen final	55

*Son reactivos de Agilent.

II.13.2 Lavado del microarreglo 4x44K de ratón. El microarreglo se lavó con Triton X-102 al 0.005% seguido de dos lavados con SSC 0.06 X, cada uno durante 3 min a temperatura ambiente

(las soluciones se precalentaron a 42 °C). Posteriormente se secó por centrifugación a 2 550 x g durante 5 min en la microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5424.

II.13.3 Escaneo y cuantificación del microarreglo de ratón. Se utilizó el GenePix 4000B de Agilent para realizar el escaneo del microarreglo a 5 µm de resolución, para obtener una imagen no saturada y localizar los puntos o “spots”. Esta imagen se transfirió al software GeneSpring GX de Agilent para obtener los valores cuantitativos de la señal mediante un análisis de imagen. Se aplicó un filtro para depurar la imagen de imperfecciones o señales no deseadas que pudieran encontrarse entre las muestras. Posteriormente, se generó una retícula en la que se definieron las áreas a cuantificar. Se determinó una zona de exclusión y el área para calcular la señal de fondo de la imagen. Se calculó la densidad de los píxeles en cada área definida, lo que dio como resultado una hoja de cálculo con las coordenadas, los valores de densidad, fondo y señal para cada una de las muestras en el microarreglo, los genes subexpresados, sobreexpresados y sin cambio se revelaron en diferentes colores. Los valores cuantitativos de cada señal almacenados en la hoja de cálculo se analizaron con el mismo software, se normalizaron y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Cuando los valores de fluorescencia fueron significativos con esta prueba se aplicó el procedimiento de Scheffe para determinar las diferencias significativas entre los grupos analizados ($p \leq 0.01$). En general, se asume que una diferencia de 1.5 veces (positiva o negativa) en los niveles de fluorescencia con respecto a la muestra control, refleja de manera significativa una inducción o represión de la expresión de los genes (Crow y Wohlgemuth, 2003).

Con este diseño experimental, se obtiene el perfil de expresión génica global o transcriptoma de los mononucleares presentes en los bazos de los ratones estudiados, y se puede definir cuales genes aumentan o disminuyen su expresión en las condiciones experimentales especificadas (Kunz e Ibrahim, 2009). También se pueden detectar genes candidatos, que son genes transcritos bajo diversas condiciones, pero no en otras, lo que significa que su expresión es requerida o al menos contribuye en las diferencias biológicas que se presentan en las condiciones evaluadas.

II.14 Determinación por Western-Blot de algunas proteínas de los ratones en estudio. De algunos de los genes que variaron su expresión, sobre todo los relacionados con el LES (Kunz e Ibrahim, 2009), así como de otros genes que tuvieron una mayor expresión, se determinó la expresión de la proteína correspondiente. Se emplearon las muestras de bazo almacenadas en Tissue-Tek que corresponden a las que se usaron para realizar los microarreglos. Se empleó la técnica de extracción y purificación de proteínas totales ReadyPrep™ 2D-Cleanup de BIO-RAD. La muestra de bazo se descongeló en un baño María a 37° C durante 10 min, se fragmentó con material quirúrgico estéril y se tomaron 30 mg que se sumergieron en un tubo Falcon con 1 mL de solución de

lisis que contiene TNTE al 0.5% [Tris (50 mM) - NaCl (150 mM) - Triton (0.5%) - EDTA (1 mM)]. Inmediatamente el tejido se disgregó con el Tissue-ruptor de QIAGEN a 15,000 rpm, con una aguja de 0.9 mm de diámetro, para evitar la formación de espuma la aguja se movió de lado a lado. El homogeneizado de cada muestra se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL, a los cuales se agregaron 300 µL del agente precipitante 1, se agitó en vortex a máxima velocidad durante 1 min, y se incubó en hielo por 15 min. Se agregaron 300 µL del agente precipitante 2 y se centrifugó a 12 000 x g a 5°C por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se volvió a centrifugar por 1 min a 12 000 x g para extraer todo el líquido posible de la pastilla, después se le agregaron a la pastilla 40 µL del agente de lavado 1 y se centrifugó por 5 min a 12 000 x g. Posteriormente el sobrenadante se eliminó y se le agregaron 25 µL de agua ultra pura y se incubó a -20°C por 30 min. Por último se centrifugó a 12 000 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante, las proteínas se resuspendieron en buffer de urea 8 M y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las proteínas se cuantificaron con la técnica de Bradford y se determinó su integridad mediante una electroferesis en gel de acrilamida al 13%.

Las muestras proteicas obtenidas de cada grupo de estudio (Tabla 5), se sometieron a una separación electroforética de doble dimensión (que se realizó por duplicado para cada muestra). La separación en la primera dimensión se realizó en base a su punto isoeléctrico, para lo cual se emplearon tiras de isoelectroenfoque ReadyPrep™ IPG (BIO-RAD) de 11 cm de largo con un pH de 4 - 7, que se cargaron con 400 µg de proteína durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron en el aparato de isoelectroenfoque de BIO-RAD y se corrieron durante 8 h, en este proceso las proteínas se desplazaron hacia el polo correspondiente y se detuvieron en su punto isoeléctrico. Al terminar de correr el isoelectroenfoque se retiraron las tiras del aparato y se realizó un primer lavado con buffer de equilibrio [(Urea (6 M) - Tris (2 M) - SDS (2%) + Glicerol (20%)] más DTT (2%) y un segundo con buffer de equilibrio más yodo acetamida (2.5%), durante 15 min cada uno. Posteriormente, cada tira se colocó en la parte superior de un gel de acrilamida al 13% de 20 X 20 cm para hacer la separación en la segunda dimensión en base a su peso molecular. Las tiras se cubrieron con agarosa al 0.5% adicionada con azul de bromofenol, la electroforesis se corrió a 60 V y después de 15 min a 200 V durante aproximadamente 6 h en refrigeración. Al terminar de correr la electroforesis, los geles se colocaron en 200 mL de solución fijadora [Metanol (70%) - Ácido acético (13%)] durante 30 min.

Los geles se electro transfirieron a 25 V por 5 min con el sistema Trans-Blot Turbo de BIO-RAD a una membrana de polifluoro de vinilideno (PVDF) que es un termoplástico inerte químicamente. A continuación se agregaron 5 mL de la solución de bloqueo (Caseína + Tween 20), y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se decantó la solución de bloqueo y se adicionaron en dilución 1:2000 los anticuerpos (de cabra) correspondientes a las proteínas de interés,

y se incubó 1 h a 37°C. Después se lavó dos veces la membrana PVDF con solución de bloqueo, y se adicionaron 2 mL del anticuerpo polivalente anti-inmunoglobulinas de cabra conjugado a 2 - metoxi - 2,4 - difenil - 3 (2H) - furanona (MDPF) en dilución 1:2000, se incubó 1 h a 37°C. Al término de esta incubación la placa se lavó con solución de bloqueo. Las membranas se documentaron con el ChemiDoc MP de BIO-RAD y se analizaron con el software Image Lab de BIO-RAD, en donde se cuantificaron los resultados del Western-Blot mediante la normalización de todas las proteínas identificadas con respecto a las proteínas control de concentración conocida.

III. RESULTADOS

III.1 Inducción de partículas lipídicas en liposomas con manganeso y cloropromacina y su detección por citofluorimetría. Se formaron liposomas con los lípidos fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) en TS que se incubaron con manganeso o con cloropromacina a 37°C. Los liposomas en TS tuvieron el perfil de granularidad característico por citofluorimetría para los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (Figura 7A y 8A). Cuando estos liposomas se incubaron con manganeso 3, 4, 5, 6 y 7 mM (Figura 7, B,C,D,E y F, respectivamente), o con cloropromacina 0.5, 1, 2, 3 y 4 mM (Figura 8, B,C,D,E y F, respectivamente) se observó un incremento significativo en su granularidad que revela un aumento en la complejidad de las bicapas lipídicas. Este aumento indicó la formación de partículas lipídicas que son las que ocasionaron mayor dispersión del rayo láser. Lo anterior muestra que el manganeso y la cloropromacina inducen la asociación del fosfatidato en partículas lipídicas en los liposomas (Wong-Baeza *et al.*, 2012). La formación de partículas lipídicas por los inductores no modificó la intensidad de fluorescencia de los liposomas (datos no mostrados).

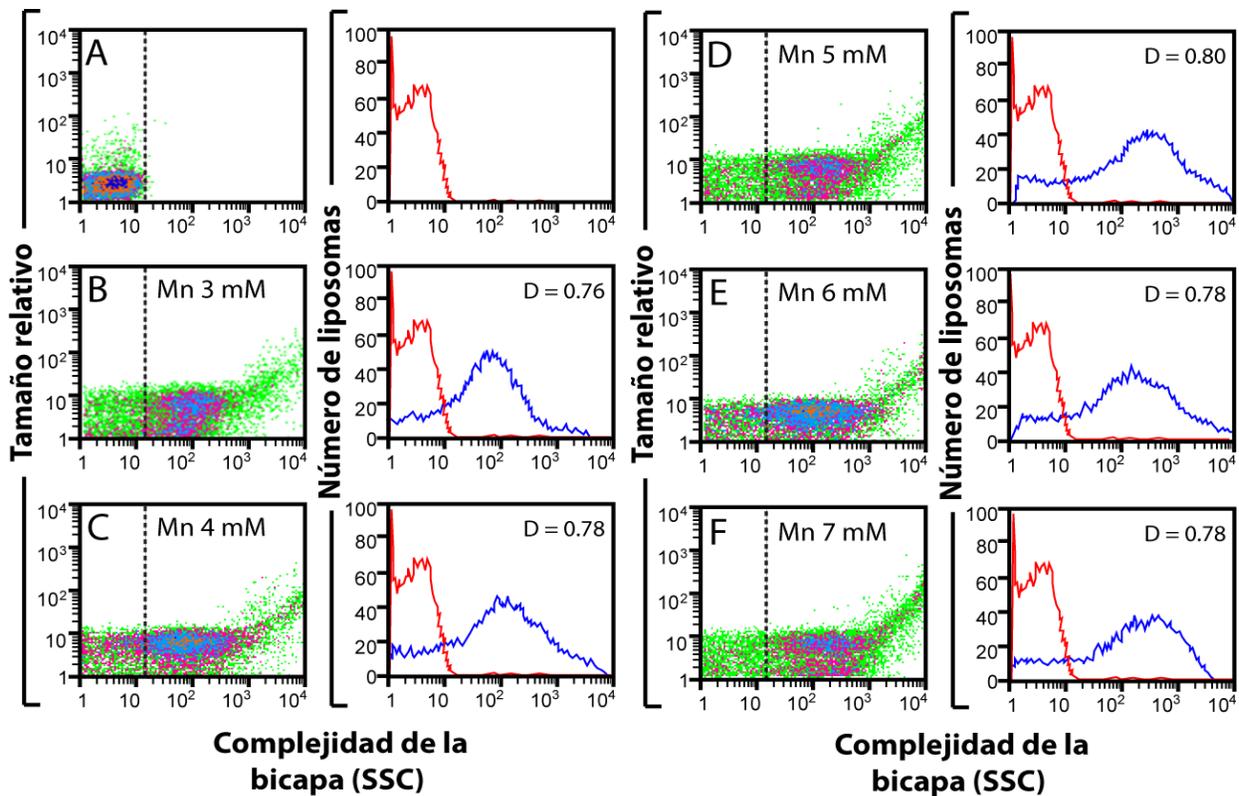


Figura 7. Efecto del manganeso en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1). Citofluorimetría de liposomas incubados con TS (A), o con manganeso a las concentraciones indicadas (B-F). Los histogramas en color rojo, así como las líneas discontinuas en las gráficas de puntos corresponden a la complejidad de la bicapa del control (A), los histogramas en color azul corresponden a la complejidad de la bicapa en presencia de manganeso. Se indica el valor de D de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

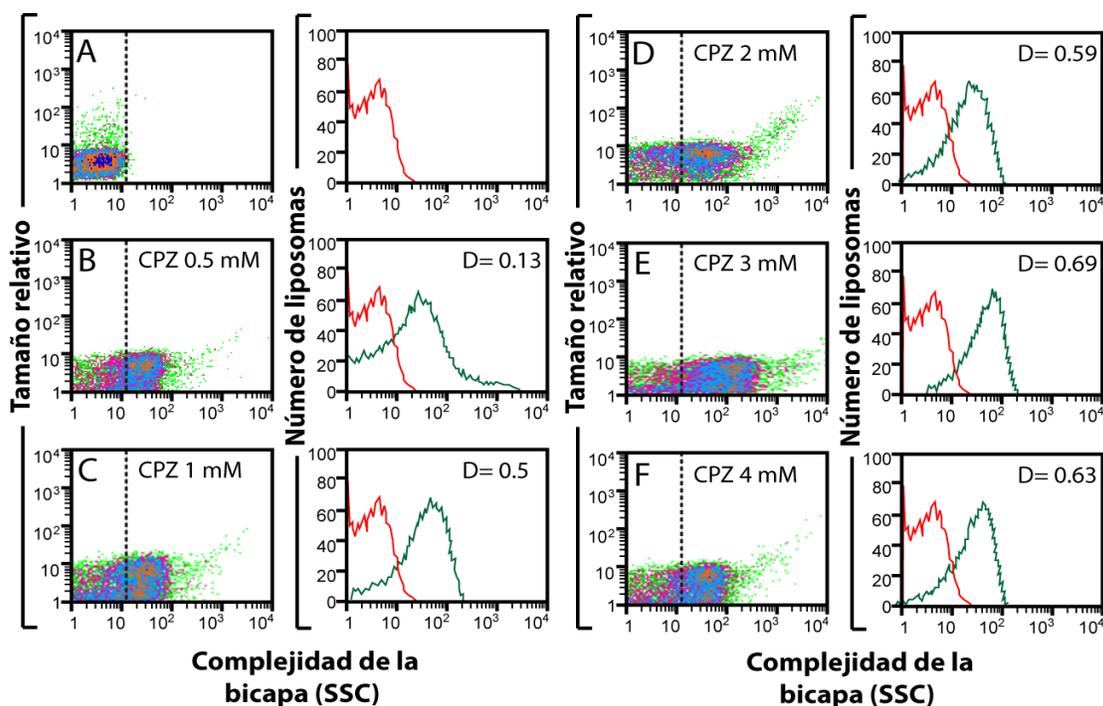


Figura 8. Efecto de la cloropromacina en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1). Citofluorometría de liposomas incubados con TS (A), o con cloropromacina a las concentraciones indicadas (B-F). Los histogramas en color rojo, así como las líneas discontinuas en las gráficas de puntos corresponden a la complejidad de la bicapa del control (A), los histogramas en color verde corresponden a la complejidad de la bicapa en presencia de cloropromacina. Se indica el valor de D de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Al incubar los liposomas con manganeso, la inducción de partículas lipídicas fue más evidente y ocurrió a una concentración de 5 mM, la diferencia en escala logarítmica de la granularidad con respecto a los liposomas solos tuvo un valor de $D=0.8$, $p \leq 0.001$. Mientras que con cloropromacina se observó un incremento en la granularidad a 3 mM, con valores de $D=0.69$, $p \leq 0.001$. Estos valores de D ($p \leq 0.001$) indican que la diferencia en granularidad entre las poblaciones de liposomas con el inductor de partículas lipídicas con respecto a los liposomas sin el inductor, es altamente significativa desde el punto de vista estadístico (Young, 1987) y revelan la presencia de partículas lipídicas en los liposomas (Aguilar *et al.*, 1999).

III.2 Desarrollo del modelo experimental de lupus inducido por lípidos asociados en partículas lipídicas. Los ratones hembra de la cepa BALB/c se dividieron en cuatro grupos con cinco ratones cada uno, que corresponden a las diferentes vías de inducción de lupus indicadas en la Tabla 5. Los ratones del grupo cloropromacina presentaron lesiones faciales con alopecia al segundo mes del inicio de la administración (Figura 9), mientras que los ratones del grupo manganeso los presentaron a los 3 meses (Figura 10). Todos los ratones de estos grupos presentaron piloerección y pérdida de peso, características que fueron más notorias en el grupo cloropromacina. Los ratones de los grupos control I y II no presentaron lesiones faciales, piloerección o pérdida de peso.

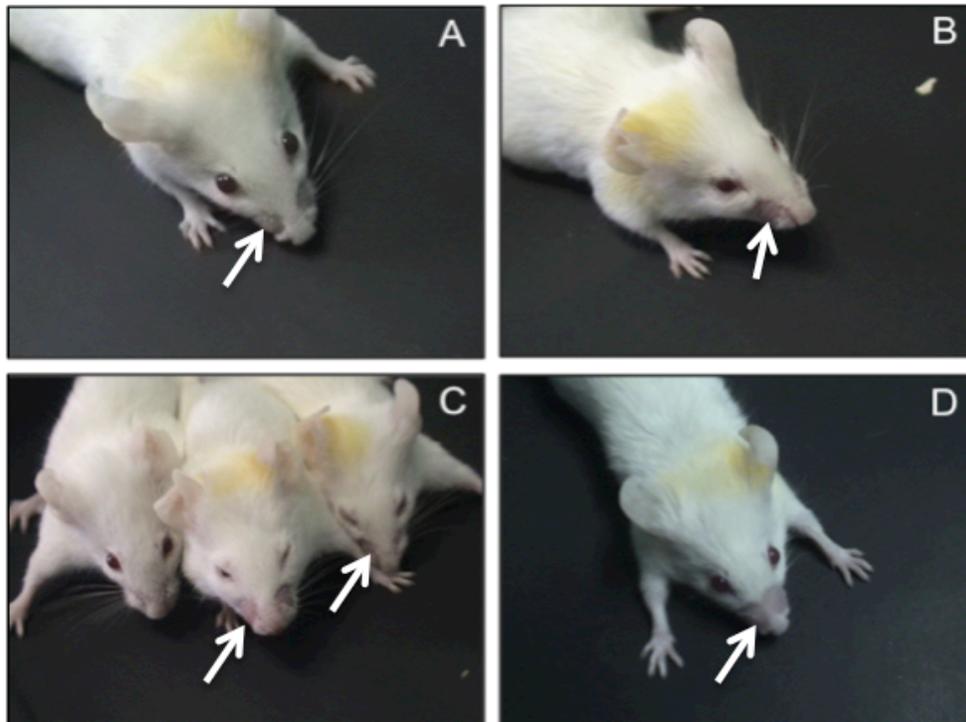


Figura 9. Ratones hembra BALB/c de 14 semanas de edad que desarrollaron lupus experimental con partículas lipídicas inducidas con clorpromacina 3 mM. Los ratones recibieron los antígenos liposomales por vía intraesplénica. Las flechas señalan las lesiones en la cara de los ratones.

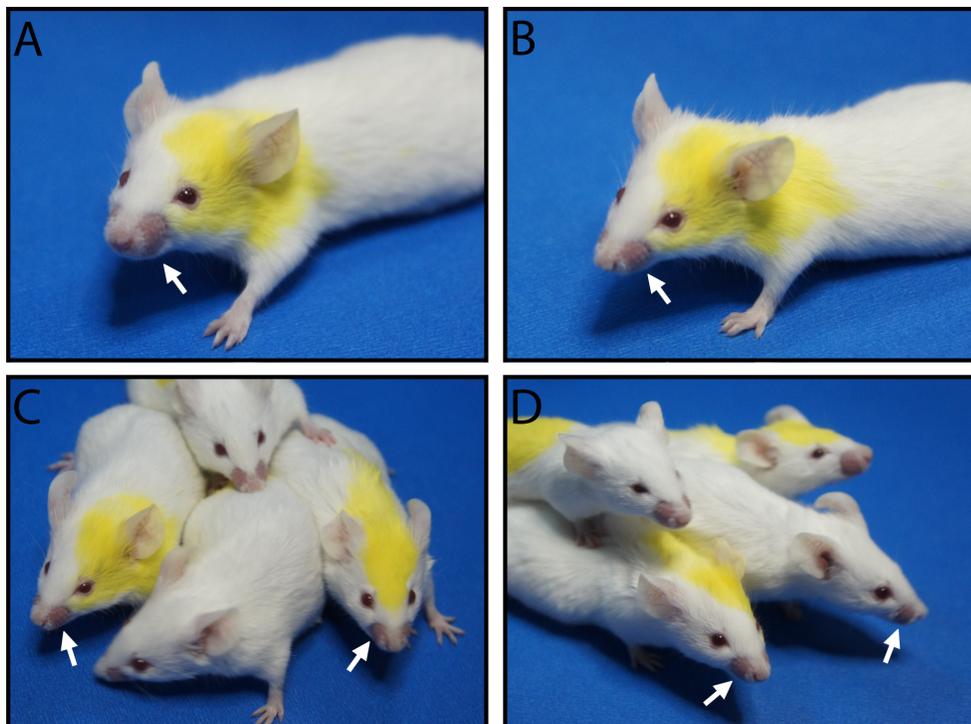


Figura 10. Ratones hembra BALB/c de 18 semanas de edad que desarrollaron lupus experimental con partículas lipídicas inducidas con manganeso 5 mM. Los ratones recibieron los antígenos liposomales por vía intraesplénica. Las flechas señalan las lesiones en la cara de los ratones.

III.3 Detección de autoanticuerpos en los sueros de los ratones en estudio. La detección de los autoanticuerpos se realizó mensualmente en todos los grupos de estudio, para lo cual se tomaron muestras de sangre por punción en la mejilla antes de la administración de los antígenos liposomales (Tabla 5) y cada mes después de la misma para determinar la presencia en suero de autoanticuerpos anti-partículas lipídicas (Tescucano, 2009) y anti-cardiolipina (Loizou *et al.*, 1985); estos sueros se separaron en alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

III.3.1 Detección de autoanticuerpos anti-partículas lipídicas por ELISA-liposomal. Los sueros de los ratones se analizaron en placas que contenían liposomas con partículas lipídicas inducidas con manganeso o con cloropromacina como antígenos, se usaron a una dilución 1:50 y se incubaron previamente a 56°C. El segundo anticuerpo polivalente anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa se utilizó en dilución 1:2000. Como control positivo se incluyó el anticuerpo monoclonal B-216 anti-partículas lipídicas que presentó un título de 170 unidades arbitrarias (Figura 11). Se registró un ligero aumento en el título de anticuerpos anti-partículas lipídicas al usar liposomas con partículas inducidas con cloropromacina como antígeno, pero no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P \geq 0.05$) al usar liposomas con partículas inducidas con manganeso (Figura 11).

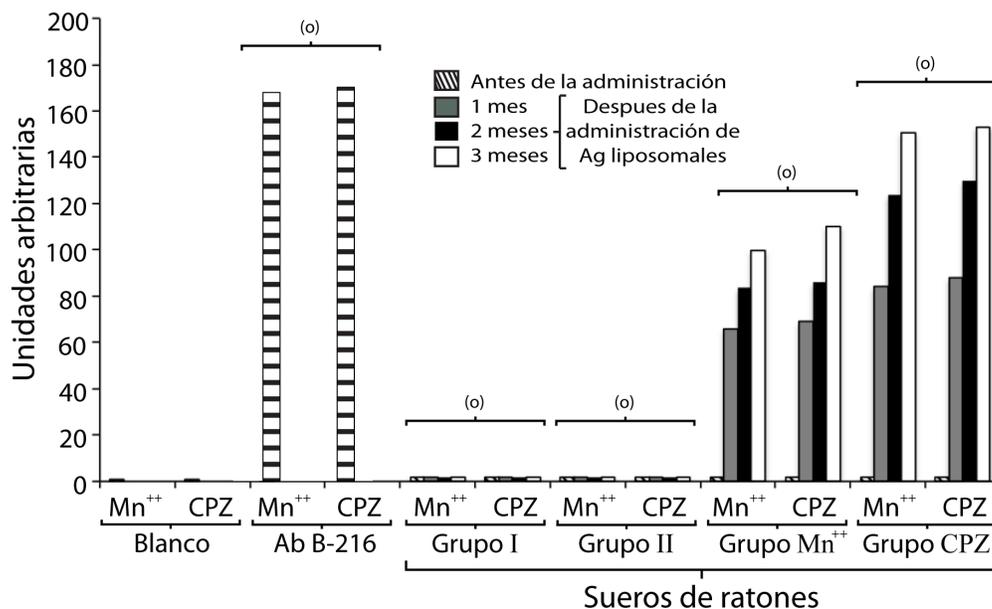


Figura 11. Comparación de los títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas en los sueros de los ratones al usar como antígenos liposomas con partículas inducidas con Mn⁺⁺ o con cloropromacina. Se usó el método de ELISA-liposomal. Blanco de reactivos (liposomas + manganeso o cloropromacina + 2° anticuerpo). Anticuerpo monoclonal B-216 en dilución 1:250. La determinación se hizo en el suero de cada uno de los 5 ratones de los 4 grupos por cuadruplicado. Se hizo el análisis estadístico de Kruskal Wallis y Dunn (0 = $P \geq 0.05$ por lo que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos indicados).

Para los blancos de reactivos (liposomas + manganeso 5 mM o cloropromacina 3 mM + segundo anticuerpo) se registraron títulos o unidades arbitrarias de cero (Figura 11), lo que refleja un bloqueo

adecuado de la inmunoplaaca de poliestireno. También hay que destacar que la dilución 1:2000 que se empleó del segundo anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa, fue adecuada, ya que este anticuerpo no se unió de manera inespecífica a la inmunoplaaca.

Al analizar los títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas en los sueros de los grupos Control I y II a lo largo del estudio (hasta 3 meses), así como de los grupos manganeso y cloropromacina antes de la administración de los antígenos con respecto a los grupos I y II, no se presentó una variación estadísticamente significativa ($P \geq 0.05$), lo que denota la ausencia de dichos anticuerpos. Los sueros de los grupos manganeso y cloropromacina, mostraron un aumento en los títulos de anticuerpos anti-partículas estadísticamente significativo ($P \leq 0.001$) respecto a antes de la administración, así como respecto a los grupos I y II, y conforme avanzaron los meses de desarrollo de la enfermedad ($P \leq 0.01$) (Figuras 12 y 13), lo que indica la presencia e incremento de anticuerpos anti-partículas en estos ratones. Como se indica en las figuras 11, 12 y 13 los anticuerpos anti-partículas se detectaron desde el primer mes después de la administración de las partículas formadas por los inductores.

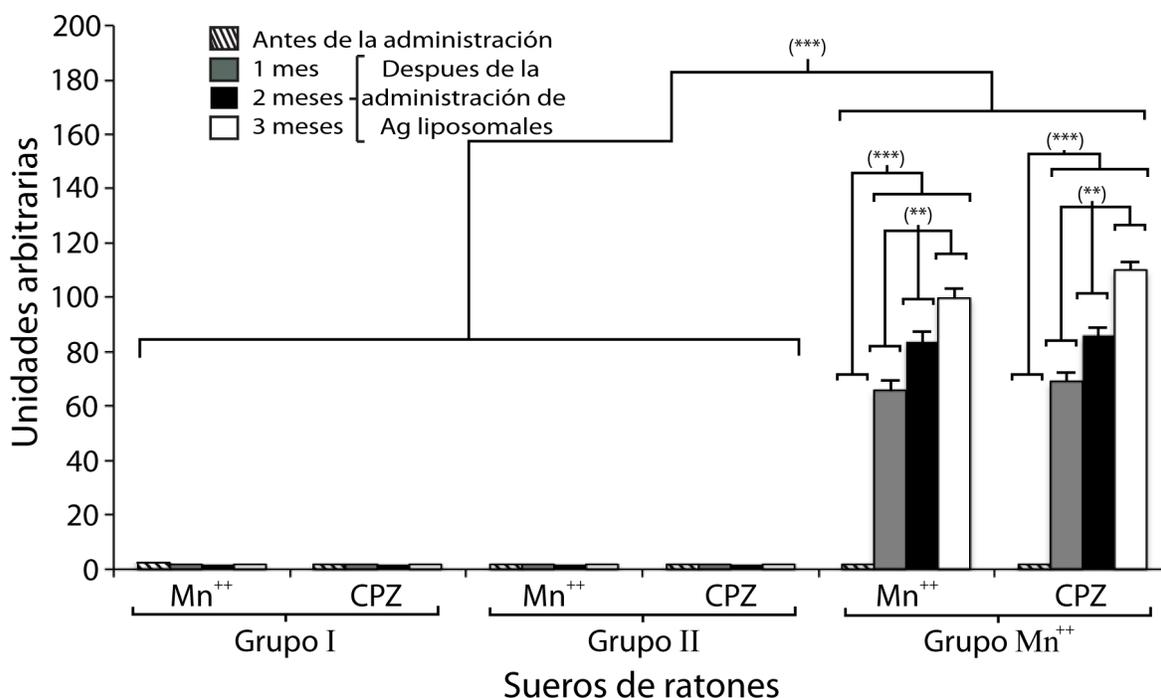


Figura 12. Títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones que recibieron partículas inducidas con Mn⁺⁺. La determinación se hizo en el suero de cada uno de los 5 ratones de los grupos I, II y manganeso por cuadruplicado. Se presenta el análisis estadístico de Kruskal Wallis y Dunn (** = $P \leq 0.01$ y *** = $P \leq 0.001$ son las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados).

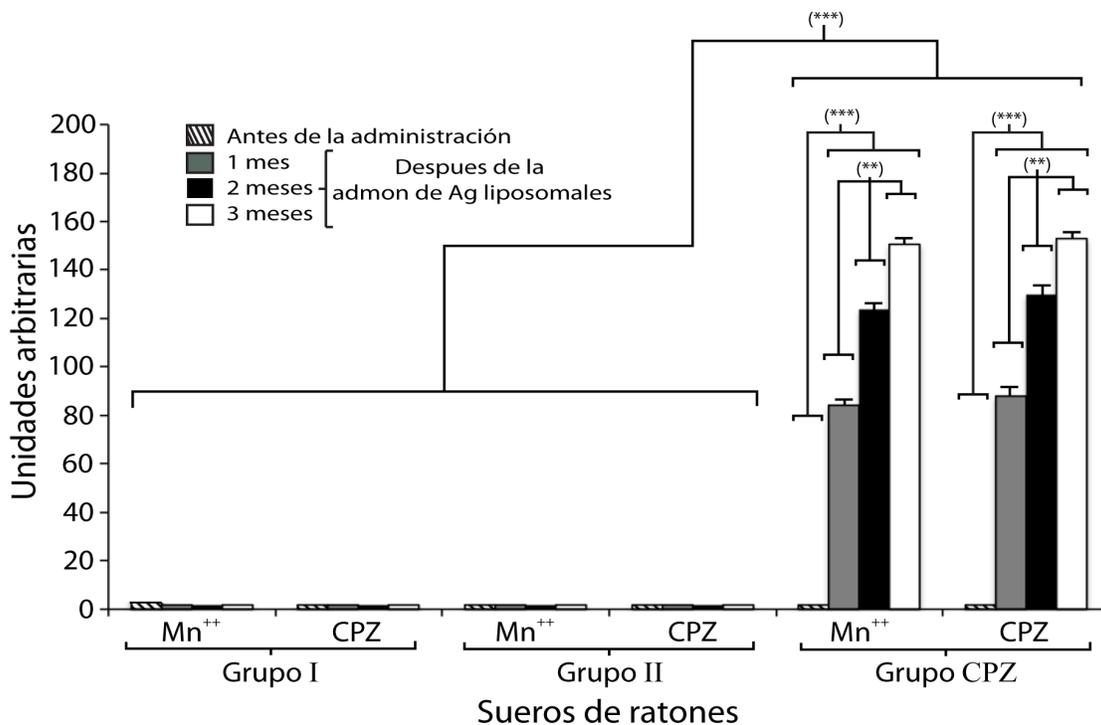


Figura 13. Títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones que recibieron partículas inducidas con clorpromacina. La determinación se hizo en el suero de cada uno de los 5 ratones de los grupos I, II y clorpromacina por cuadruplicado. Se presenta el análisis estadístico de Kruskal Wallis y Dunn (** = $P \leq 0.01$ y *** = $P \leq 0.001$ son las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados).

III.3.2 Detección de autoanticuerpos anti-cardiolipina por ELISA-cardiolipina. Se usaron sueros de los ratones antes y después de la administración de los antígenos liposomales (Tabla 5). Los sueros se analizaron en placas de poliestireno en donde se fijó previamente el antígeno cardiolipina (Loizou *et al.*, 1985), se usaron a una dilución 1:50 y se incubaron previamente a 56°C. El segundo anticuerpo polivalente anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa se utilizó en dilución 1:2000. Para el blanco de reactivos (cardiolipina + segundo anticuerpo) se obtuvieron títulos de cero (Figuras 14 y 15), lo que refleja un bloqueo adecuado de la inmunoplaaca. Al analizar los títulos de anticuerpos anti-cardiolipina en los sueros de los grupos Control I y II a lo largo del estudio (hasta 3 meses), así como de los grupos manganeso y clorpromacina antes de la administración de los antígenos y al mes del inicio de la administración, con respecto a los grupos I y II, no se presentó una variación estadísticamente significativa ($P \geq 0.05$), lo que denota la ausencia de anticuerpos anti-cardiolipina en ellos. Los sueros de los grupos manganeso y clorpromacina mostraron un aumento significativo ($P \leq 0.001$) en los títulos de anticuerpos anti-cardiolipina respecto a los grupos I y II, y un aumento ($P \leq 0.01$) dentro de los mismos grupos a partir del segundo mes del desarrollo de la enfermedad (Figuras 14 y 15), lo que indica la presencia e incremento de anticuerpos anti-cardiolipina en estos ratones. La reacción del suero del paciente con SAAF positivo a cardiolipina que se emplea como control positivo, presentó un título de 90 unidades arbitrarias. Como se observa en las figuras

14 y 15 hubo producción de anticuerpos anti-cardiolipina a partir del segundo mes del inicio de la administración de partículas lipídicas inducidas con manganeso o cloropromacina, pero en menor título que los anticuerpos anti-partículas lipídicas (Figura 16).

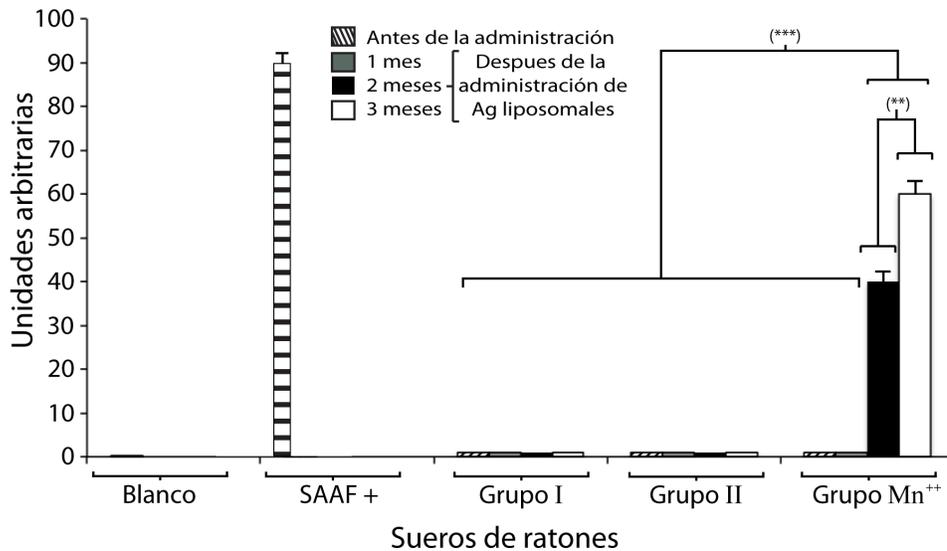


Figura 14. Títulos de anticuerpos anti-cardiolipina en sueros de ratones que recibieron liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn⁺⁺. Se usó el método de Loizou *et al* (1985). Blanco de reactivos (cardiolipina + 2º anticuerpo). Suero de paciente con SAAF en dilución 1:250. La determinación se hizo en el suero de cada uno de los 5 ratones de los grupos I, II y manganeso por cuadruplicado. Se presenta el análisis estadístico de Kruskal Wallis y Dunn (** = P≤0.01 y *** = P≤0.001 son las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados).

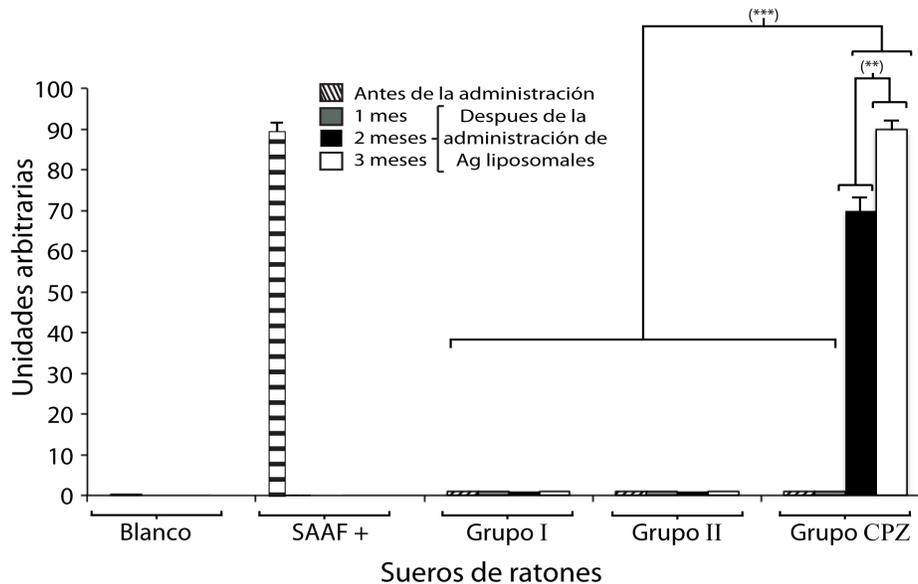


Figura 15. Títulos de anticuerpos anti-cardiolipina en sueros de ratones que recibieron liposomas con partículas lipídicas inducidas con cloropromacina. Se usó el método de Loizou *et al* (1985). Blanco de reactivos (cardiolipina + 2º anticuerpo). Suero de paciente con SAAF en dilución 1:250. La determinación se hizo en el suero de cada uno de los 5 ratones de los grupos I, II y cloropromacina por cuadruplicado. Se presenta el análisis estadístico de Kruskal Wallis y Dunn (** = P≤0.01 y *** = P≤0.001 son las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados).

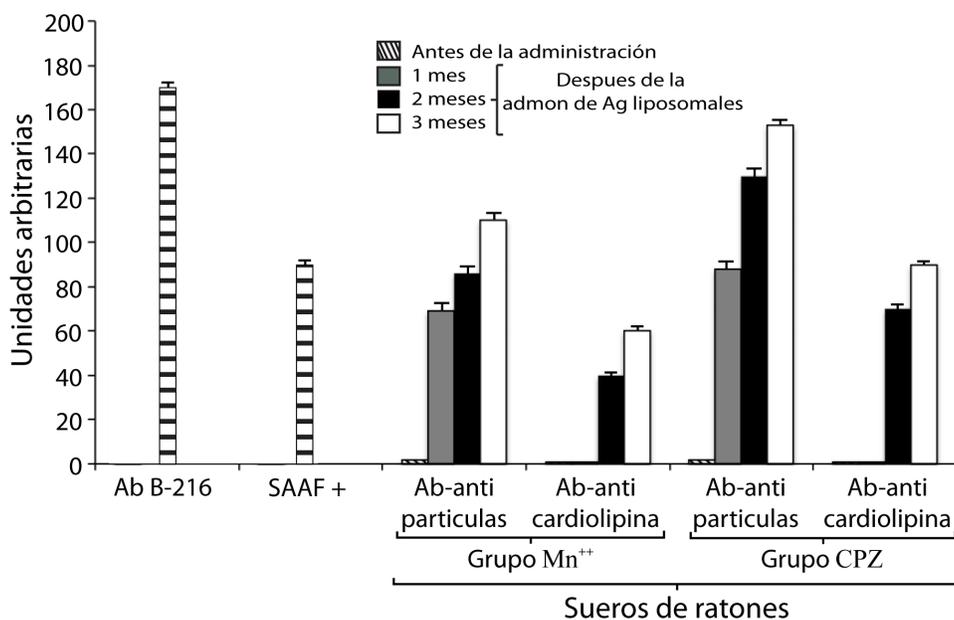


Figura 16. Comparación de los títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas y anti-cardiolipina en sueros de ratones que recibieron liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn⁺⁺ o con cloropromacina. Se usaron los métodos de ELISA-liposomal y de Loizou *et al* (1985). Anticuerpo monoclonal B-216 y suero de paciente con SAAF en dilución 1:250. Son datos de las figuras 12 a 15.

III.3.3 Detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de ratones por citofluorometría. Se utilizó como control positivo la reacción del anticuerpo monoclonal B-216 con liposomas que llevan partículas lipídicas, el análisis citofluorométrico mostró una fluorescencia relativa (Fr) que es 20 veces mayor (Fr=200, D=0.98) (Figura 17 D), respecto a los controles negativos de liposomas en TS (Figura 17 A), liposomas con manganeso (Figura 17 B) o liposomas con partículas lipídicas más el segundo anticuerpo polivalente anti-ratón conjugado a FITC (Figura 17 C). Los sueros de los ratones antes de la administración de liposomas con partículas inducidas con manganeso o con cloropromacina presentaron una fluorescencia relativa prácticamente igual a la de los controles negativos, lo que confirma la ausencia de anticuerpos anti-partículas (Figura 17 E y G); en cambio después de la administración de partículas inducidas con manganeso o con cloropromacina se obtuvo un aumento significativo en la fluorescencia relativa con valores de D=0.95 y D=0.98, respectivamente (Figura 17 F y H). Una diferencia (D) en la fluorescencia relativa, en escala logarítmica, igual o mayor a 0.5 ($p < 0.001$) entre los sueros de los ratones que recibieron partículas lipídicas y los controles negativos indica la presencia de anticuerpos anti-partículas (Baeza *et al.*, 2004).

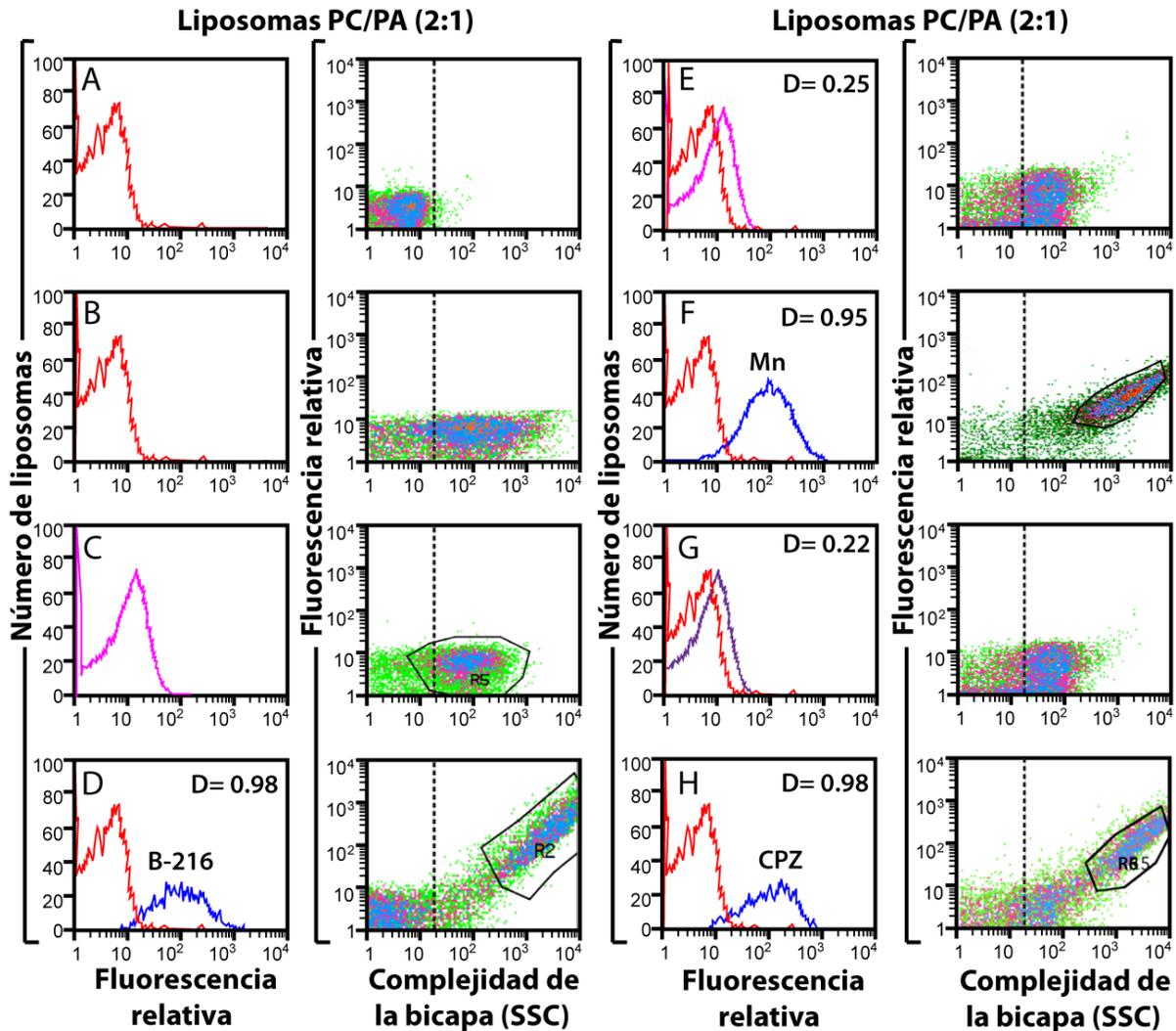


Figura 17. Determinación de anticuerpos anti-partículas lipídicas por citometría. Se emplearon liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) en TS (A), que se incubaron con $MnCl_2$ 5 mM (B) y se adicionaron con: 2° Ab-FITC (C), B-216 + 2° Ab-FITC (D), suero del ratón antes (E) o después de recibir partículas inducidas con manganeso + 2° Ab-FITC (F). CPZ 3 mM + suero del ratón antes (G) o después de recibir partículas inducidas con CPZ + 2° Ab-FITC (H). Los resultados de los sueros indicados son representativos de todos los ratones estudiados, y se obtuvieron por triplicado. 2° Ab-FITC.- anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a FITC.

Al cuarto mes de que inició la administración de los antígenos liposomales, los ratones de los grupos manganeso y clorpromacina presentaban lesiones faciales, piloerección y pérdida de peso, mientras que los ratones de los grupos I y II permanecieron sin estos cambios, además tenían títulos altos de anticuerpos anti-partículas y anti-cardiolipina; por lo que se decidió sacrificarlos para realizar los estudios moleculares, ya que si se continuaba el desarrollo de la enfermedad, los ratones empezaban a presentar una hipersensibilidad tipo III (Murphy *et al.*, 2008), que consiste en depósitos a nivel sistémico de complejos antígeno-anticuerpos, que podrían generar glomérulo nefritis y su muerte. Los bazo se extrajeron y se fraccionaron en cuatro con material quirúrgico estéril, se colocaron en

criotubos con RNA-later o con Tissue-Tek y se almacenaron a -70°C . Como se ha mencionado el estudio a nivel molecular se realizó en los bazos de los ratones, ya que en pacientes con LES se ha demostrado que las células mononucleares son los que presentan una mayor variación en su perfil de expresión genética y el bazo es un órgano linfoide en donde se concentran dichas células.

III.4 Obtención del RNA total. Se realizó en dos ratones de cada uno de los grupos a partir de las muestras almacenadas en RNA-later. Se empleó la técnica de aislamiento total de RNA de los laboratorios Agilent, que es una separación por centrifugación en columna libre de fenol, con la que se puede concentrar y purificar RNA. Esta técnica emplea menos tiempo y pasos debido a que no se utilizan DNAsas, el DNA genómico es completamente removido en una columna de pre-filtración. El RNA extraído se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis, el cual mantiene a la muestra en un sitio específico en base a la tensión superficial; esto elimina la necesidad de celdas u otros dispositivos para contener la muestra, lo que permitió usar volúmenes muy pequeños y concentrados. Para todas las muestras se obtuvo una concentración de RNA mayor a los $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ (Tabla 9), que son concentraciones adecuadas para realizar microarreglos.

Tabla 9. Concentración de RNA total aislado de los grupos de ratones en estudio.

Grupo de ratones	Concentración $\text{ng}/\mu\text{L}$	
	Muestra A	Muestra B
I (Solución salina)	80	81
II (Liposomas lisos)	78	80
III (Manganeso)	51	49
IV (Cloropromacina)	51	48

La caracterización del RNA extraído se realizó con el bioanalizador Agilent 2100 con los chips RNA 6000 de Agilent. En esta técnica, el RNA total se separó electroforéticamente por la red de microcanales presentes en el chip y fueron detectados por su fluorescencia emitida por la acción de un láser. Para cada muestra se obtuvieron electroferogramas e imágenes semejantes a un gel de agarosa (Figura 18). A partir de los electroferogramas se obtuvo el número de integridad del RNA (RIN), el cual fue mayor a 7 en todos los casos (Tabla 10), para que el RNA tenga la integridad adecuada para realizar microarreglos, este número debe de ser mayor a seis.

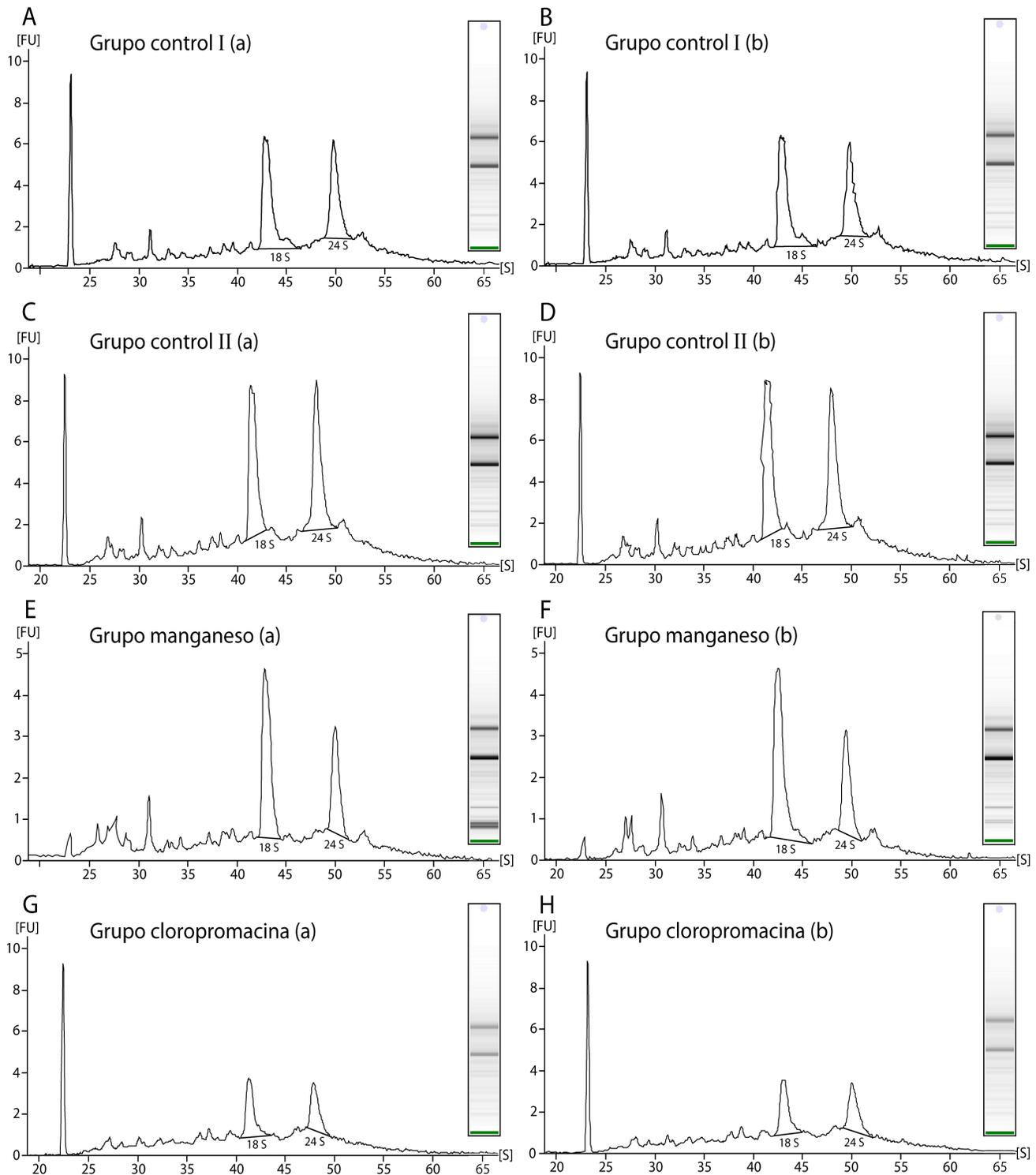


Figura 18. Electroferogramas del RNA total extraído de dos ratones de cada grupo de estudio. Se indican las regiones que corresponden al RNA ribosomal 18 y 24 S, así como una imagen semejante a un gel de agarosa.

Tabla 10. Número de integridad (RIN) del RNA total extraído de los grupos de ratones en estudio.

Grupo de ratones	RIN	
	Muestra A	Muestra B
I (Solución salina)	8.2	8.1
II (Liposomas lisos)	8.4	8.5
III (Manganeso)	7.5	7.2
IV (Cloropromacina)	7.1	7.0

III.5 Síntesis, amplificación y marcaje de cRNA. Se llevó a cabo por duplicado (muestras A y B) con el protocolo para microarreglos de dos colores basado en análisis de expresión génica Quick Amp Labeling de Agilent. Se obtuvieron por cada grupo de estudio (Controles I y II, grupos manganeso y cloropromacina) dos poblaciones de cRNA, una marcada con el colorante Cy3 y otra con el colorante Cy5, las cuales se purificaron con el kit RNeasy de Qiagen y se cuantificaron con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración de cRNA marcado con Cy3 o Cy5.

Grupo de ratones	Concentración de cRNA ng/ μ L			
	Muestra A		Muestra B	
	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5
I (Solución salina)	202	198	199	201
II (Liposomas lisos)	198	201	200	198
III (Manganeso)	200	197	198	201
IV (Cloropromacina)	200	201	202	198

III.6 Microarreglos de RNA 4x44K de todo el genoma de ratón. La expresión de genes en los bazos de los ratones BALB/c que desarrollaron el lupus parecido al humano se analizó por duplicado y en forma comparativa de la siguiente manera:

- Ratones del grupo control I y del grupo control II.
- Ratones del grupo control II y del grupo manganeso.
- Ratones del grupo control II y del grupo cloropromazina.
- Ratones del grupo manganeso y del grupo cloropromazina.

La importancia cuantitativa de este análisis radica en el hecho de que la cantidad de cRNA que se hibrida es proporcional a la abundancia del transcrito en la muestra biológica en estudio.

Los microarreglos comparativos 4x44K de todo el genoma de ratón obtenidos por duplicado se escanearon con el GenePix 4000B de Agilent a 5 μ M de resolución, y se obtuvieron imágenes no saturadas en las cuales se localizaron los distintos “spots” (Figura 19).

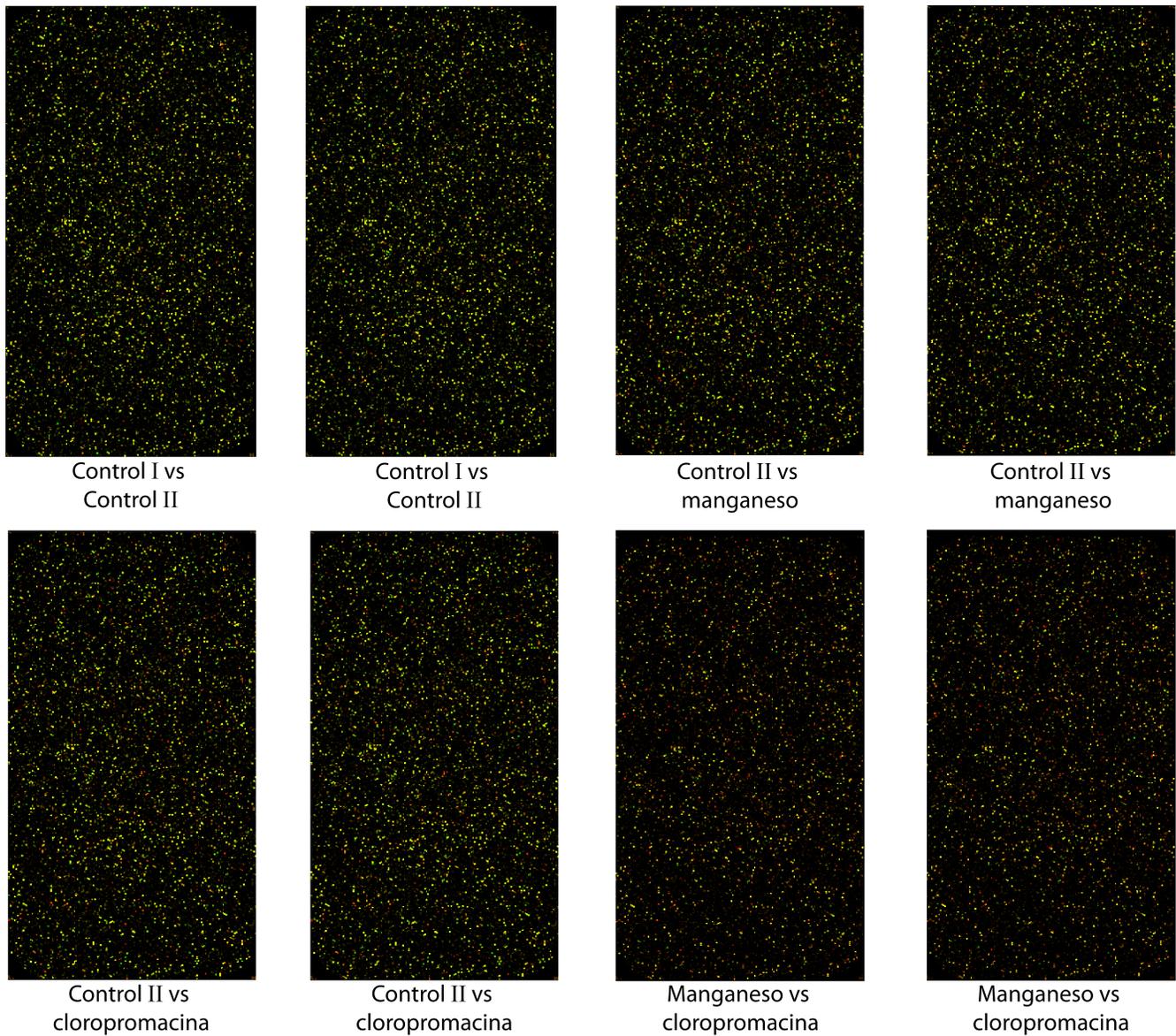


Figura 19. Imágenes de los microarreglos comparativos 4x44K de los distintos grupos de ratones de estudio. Las imágenes se obtuvieron con el GenePix 4000B de Agilent a 5 μ M de resolución.

Las dos imágenes de cada comparación se transfirieron al software GeneSpringGX de Agilent en donde se obtuvieron valores cuantitativos de la señal mediante un análisis de imagen. Esta cuantificación de los genes se hizo automáticamente al comparar la intensidad de fluorescencia de los genes que aumentan o disminuyen su expresión, con la de los genes normalizadores, los cuales

tienen una expresión casi constante debido a que están involucrados en funciones básicas de la supervivencia celular.

Los valores de fluorescencia se normalizaron y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Cuando los valores de fluorescencia fueron significativos con esta prueba, se aplicó el procedimiento de Scheffe para determinar las diferencias significativas entre los grupos analizados ($p \leq 0.01$), se generaron diagramas de diagnóstico que representan la intensidad de radio en log2 para cada spot en el microarreglo (Figura 20). En general, se asume que una diferencia de 1.5 veces (positiva o negativa) en los niveles de fluorescencia con respecto a la muestra que se compara, refleja de manera significativa un incremento o disminución de la expresión de los genes (Crow y Wohlgemuth, 2003).

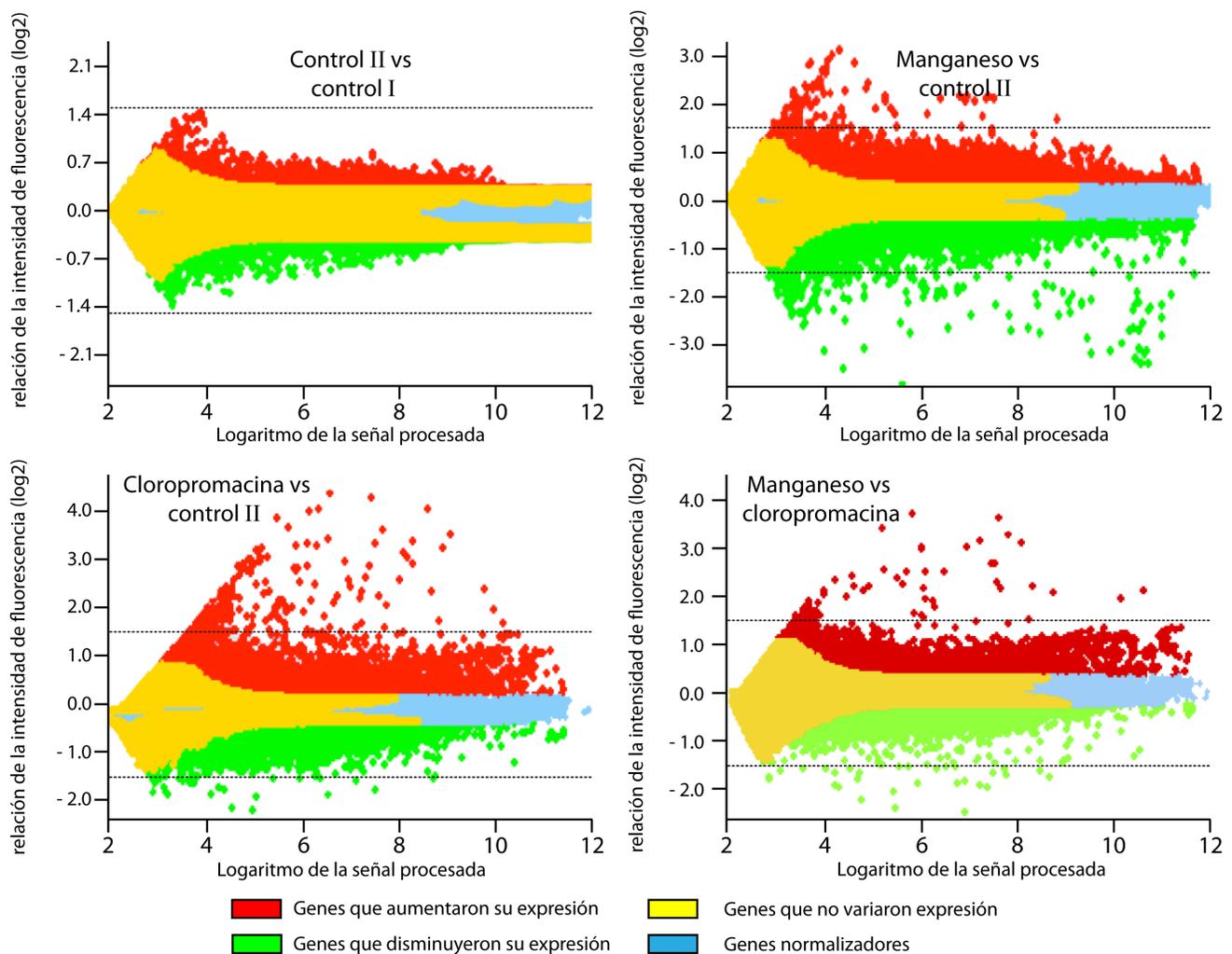


Figura 20. Diagramas de diagnóstico de los microarreglos comparativos. Los genes que aumentaron o disminuyeron su expresión que se encuentren por arriba o por debajo de la línea punteada presentan una variación estadísticamente significativa respecto al grupo con el que se compara.

Al comparar el perfil de expresión genética de los grupos control I y II con el software GeneSpringGX se determinó que no hubo una variación estadísticamente significativa, ya que ningún gen tuvo una variación de 1.5 veces positiva o negativa (Figura 20), los genes que se sobre o sub expresaron sin sobrepasar este umbral no están relacionados con enfermedades o procesos autoinmunes; debido a esta similitud entre los grupos control, la comparación con los grupos manganeso y cloropromacina solo se realizó con respecto al control II. Al comparar el control II con el grupo manganeso se obtuvo una variación estadísticamente significativa de 720 genes, 420 genes se sobre expresaron y 300 se sub expresaron; mientras que en la comparación del control II con el grupo cloropromacina, 1830 genes presentaron una variación estadísticamente significativa, 1328 genes se sobre expresaron y 502 se sub expresaron (Figura 20). Algunos de los genes que se sobre expresaron tanto en el grupo manganeso como en el cloropromacina codifican para factores del complemento, presentación de antígenos exógenos, producción de anticuerpos, señalización por TLR-4 o por NOD-2 (Tabla 12) estos genes están totalmente relacionados con enfermedades autoinmunes principalmente al LES; es importante mencionar que estos genes tuvieron la misma expresión al comparar los grupos manganeso y cloropromacina entre si. Cabe mencionar que tanto en el grupo manganeso como en el grupo cloropromacina aumentó o disminuyó la expresión de genes relacionados con otros procesos celulares (Figura 20).

Tabla 12. Genes de interés inmunológico que aumentaron su expresión en los grupos manganeso y cloropromacina respecto al grupo control II.

Proceso	Genes
Cascada del complemento	Vía clásica: <i>C1ra</i> , <i>C1s</i> , <i>C1q</i> , <i>C3</i> , <i>C4</i> y <i>C7</i> . Receptores de la vía clásica: <i>C3ar1</i> y <i>C5ar1</i> . Vía alterna: <i>Cfd</i> , <i>Cfh</i> y <i>Cfhr2</i> .
Presentación de antígenos exógenos	<i>H2-aa</i> , <i>H-2aa</i> , <i>H2-dma</i> y <i>Clip</i> .
Producción de anticuerpos	<i>Igh-vj558</i> , <i>Lyn</i> , <i>Syk</i> , <i>Plcg2</i> , <i>Can</i> , <i>Akt1</i> y <i>Nfkb1</i> .
Señalización por TLR-4	<i>Tlr-4</i> , <i>Tram</i> , <i>Trif</i> , <i>Tbk1</i> , <i>Irf3</i> , <i>lfn-α</i> e <i>lfn-β</i> .
Señalización por NOD-2	<i>Nod-2</i> , <i>Ripk2</i> , <i>Card9</i> , <i>Mapk10</i> y <i>Tnfa</i> .

Algunos genes relacionados con apoptosis y con el reconocimiento de las células NK (Natural Killers) (Tabla 13), se sub expresaron tanto en el grupo manganeso como en el grupo cloropromacina, estos genes están relacionados con procesos autoinmunes.

Tabla 13. Genes de interés inmunológico que disminuyeron su expresión en los grupos manganeso y cloropromacina respecto al grupo control II.

Proceso	Genes
Apoptosis	<i>Casp8, Cyts, Apaf1</i> y <i>Aifm1</i> .
Reconocimiento de NK.	<i>Klrb1a, Klrb1c, Klra23, Klra7, Gzmb</i> y <i>Klra22</i> .

III.7 Determinación por Western-Blot de algunas proteínas de los ratones en estudio. Las proteínas se extrajeron y purificaron con la técnica ReadyPrep™ 2D-Cleanup de BIO-RAD y se cuantificaron con la técnica de Bradford (Tabla 14). Se comprobó que tenían una integridad adecuada para la separación en dos dimensiones con un gel de agarosa al 13% (datos no mostrados).

Tabla 14. Concentración de proteína total aislada de los grupos de ratones en estudio.

Grupo de ratones	Concentración µg/µL	
	Muestra A	Muestra B
I (Solución salina)	20	21
II (Liposomas lisos)	19	20
III (Manganeso)	22	21
IV (Cloropromacina)	20	21

Las muestras proteicas obtenidas de cada grupo de estudio se sometieron a una separación electroforética de doble dimensión, la separación en la primera dimensión se realizó en base a su punto isoeléctrico, se emplearon tiras de isoelectroenfoque ReadyPrep™ IPG de BIO-RAD de 11 cm de largo con un pH de 4 - 7, debido a que las proteínas de interés (genes que se seleccionaron en el microarreglo y proteínas normalizadoras) quedan en este margen de pH. Posteriormente se realizó la separación en la segunda dimensión en base a su peso molecular, para lo cual se emplearon geles de acrilamida al 13% de 20 x 20 cm. Los geles se electro transfirieron a una membrana PVDF con el sistema Trans-Blot Turbo de BIO-RAD, y se realizó la detección de proteínas como se indicó en el punto II.13.3. Finalmente las membranas se documentaron con el ChemiDoc MP de BIO-RAD y se analizaron con el software Image Lab de BIO-RAD, en donde se cuantificaron los resultados del Western-Blot (Tabla15) mediante la normalización de todas las proteínas identificadas con respecto a las proteínas control de concentración conocida.

En la tabla 15, para cada gen analizado se indicó la proteína que se determinó por Western-Blot. En el grupo control II, que recibió liposomas lisos, la concentración de cada proteína se normalizó con respecto a las proteínas control de concentración conocida y se representó con una cruz. En los grupos III y IV, que recibieron partículas lipídicas inducidas por manganeso o por cloropromacina, el aumento en la concentración de las proteínas con respecto al control se indicó con el número de cruces, y la ausencia de una proteína se indicó con el signo (-).

Tabla 15. Detección de proteínas en el bazo de los ratones control y de los que desarrollaron la enfermedad autoinmune.

Genes	Proteínas	Grupo control II	Grupo manganeso	Grupo cloropromazina
<i>Tlr-4</i>	TLR-4	+	++	++
<i>Tram</i> y <i>Trif</i>	TRAM y TRIF	+	++	++
<i>Ifn-α</i> y <i>Ifn-β</i>	IFN- α e IFN- β	+	+++	+++
<i>Klrb1a</i>	KLRB 1a	+	-	-
<i>Klrb1c</i>	KLRB 1c	+	-	-
<i>Klra23</i>	KLRA 23	+	-	-
<i>Gzmb</i>	GZMB	+	-	-
<i>Casp8</i>	CASP 8	+	-	-
<i>Apaf1</i>	APAF 1	+	-	-
<i>Aifm1</i>	AIFM 1	+	-	-
<i>Igh-vj558</i>	Fracción constante de cadena pesada de IgG	+	++++	++++
<i>Lyn</i> y <i>Syk</i>	LYN y SYK	+	++	++
<i>C1ra</i> , <i>C1s</i> , <i>C1q</i>	C1ra, C1s y C1q	+	+++	+++
<i>C3</i>	C3	+	-	-
---	C3b	+	+++	+++
<i>C4</i>	C4	+	-	-
---	C4b	+	+++	+++
<i>C7</i>	C7	+	++	++
<i>C3ar1</i> y <i>C5ar1</i>	C3AR1 y C5AR1	+	++	++

Se indicaron las proteínas que se cuantificaron por Western-Blot para cada gen analizado. En el grupo control II, que recibió liposomas lisos, cada proteína está normalizada con respecto a las proteínas control y se representa con una cruz. En los grupos II y III que recibieron partículas lipídicas inducidas por manganeso o por cloropromacina, el aumento en la concentración de la proteína se indicó con el número de cruces y la ausencia con el signo (-).

IV. DISCUSIÓN

Nuestro grupo de investigación ha propuesto la hipótesis de que en el lupus eritematoso sistémico y en otras enfermedades autoinmunes participan los lípidos asociados en partículas lipídicas. Estas estructuras se encuentran en las membranas celulares, son transitorias y participan en diferentes funciones como en procesos de fusión de membranas (Cullis *et al.*, 1980; Hafez *et al.*, 2000, Hafez y Cullis, 2001; Wong-Baeza *et al.*, 2010), en la organización de uniones estrechas membranales (Wegener y Galla, 1996), en el transporte de iones y en fagocitosis (Cullis *et al.*, 1980) así como en la activación de enzimas de membrana (van den Brink-van *et al.*, 2001), pero cuando se hacen permanentes son inmunogénicas e inducen la formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas, los cuales se han detectado por nuestro grupo en pacientes con SAAF o con LES (Baeza *et al.*, 2004; 2011). Esta hipótesis se comprobó por el desarrollo en ratones BALB/c y NIH de una enfermedad autoinmune muy parecida al LES humano, por la administración de los fármacos clorpromacina, procainamida o hidralazina, o del catión manganeso que inducen la formación estable de partículas lipídicas en la membrana plasmática, o de la administración de liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por estos fármacos o por el manganeso (Baeza *et al.*, 2004; 2011; Wong-Baeza *et al.*, 2012). Estos resultados han permitido proponer, que los lípidos asociados en partículas lipídicas en la superficie de liposomas o en la superficie de membranas celulares (inducidas por clorpromacina, procainamida, hidralazina o manganeso) pueden conducir al desarrollo de una enfermedad autoinmune.

Consideramos que la reacción inmunológica de las partículas lipídicas con anticuerpos que reconocen a estos arreglos de no-bicapa en membranas celulares *in vivo*, es el evento inicial que desencadena en ratones la enfermedad autoinmune semejante al lupus humano; ya que el modelo experimental puede ser inducido por anticuerpos monoclonales específicos para partículas lipídicas, así como con suero de ratones que han desarrollado este padecimiento autoinmune. Los ratones presentan lesiones faciales, atrofia de la epidermis e infiltración de células mononucleares alrededor de los folículos pilosos; además, se obtuvo la banda lúpica por depósitos de inmunocomplejos entre la dermis y la epidermis, y hubo depósitos de estos inmunocomplejos en los glomérulos, en forma semejante a como ocurre en el LES humano (Baeza *et al.*, 2004).

El lupus humano es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, crónica y multisistémica, los pacientes con esta enfermedad presentan autoanticuerpos, entre ellos, anti-nucleares, anti-ribonucleoproteínas, anti-histonas y los anti-partículas descritos en este laboratorio. La biomedicina molecular del LES, trata actualmente de llegar a un conocimiento mayor de su etiología a nivel molecular, para establecer métodos de diagnóstico oportunos y diseñar tratamientos más específicos y eficientes. Referente al

análisis molecular, el modelo experimental de lupus ha permitido hacer diferentes estudios para conocer y seguir el curso de la enfermedad; sin embargo, no se ha analizado su perfil genético, por lo que en este trabajo se realiza este estudio con la metodología de microarreglos (Nakou *et al.*, 2010). Con esta metodología se está dilucidando el perfil de expresión génica global o transcriptoma de los ratones, lo que permite definir los genes que aumentan o disminuyen su expresión en el lupus producido con dos inductores de partículas lipídicas diferentes en su estructura química.

Los lípidos asociados en partículas lipídicas fueron la base de este trabajo, ya que tanto para la inducción del lupus, como para la determinación de anticuerpos anti-partículas en los sueros de los ratones, se emplearon estas estructuras lipídicas. La formación de las partículas se lleva a cabo por el rearreglo lipídico inducido por la clorpromacina o por el manganeso en la bicapa de lípidos de los liposomas o de las membranas celulares, que produce el cambio de la asociación molecular de bicapa a la de partícula lipídica (Wong-Baeza *et al.*, 2012). Las partículas lipídicas se forman principalmente de fosfatidato en presencia de inductores como los cationes divalentes calcio y manganeso, o de los fármacos de carga positiva clorpromacina, procainamida e hidralazina y son transitorias como se ha indicado porque en ausencia del inductor los fosfolípidos nuevamente se asocian en bicapa.

Los liposomas se prepararon con un lípido de forma molecular cónica, el fosfatidato, y uno de forma cilíndrica, la fosfatidilcolina, y se les adicionó el inductor de la formación de partículas clorpromacina, un tranquilizante usado en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, que es de forma molecular triangular con una carga positiva en el vértice del triángulo (Figura 21) (Singam *et al.*, 2011), o manganeso, un oligoelemento que se encuentra en concentraciones de 87 ng/dL en el suero de sujetos control (Yilmaz *et al.*, 2005). Estos inductores movilizan y agrupan a las moléculas de fosfatidato, que tiene dos cargas negativas en el vértice del cono, de tal manera que se forma una micela invertida, en donde las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos de los fosfatidatos quedan orientadas hacia afuera de la micela, en tanto que sus grupos fosfatos quedan hacia el interior de la micela, agrupados y neutralizados por los inductores que son de carga positiva (Figura 21).

Es fundamental que en la formación de la partícula lipídica los fosfatidatos sean movilizados por los inductores, ya que este movimiento cambia su asociación de bicapa a la de micela invertida, la cual se aloja entre las dos capas de la membrana y forma la partícula lipídica. La inserción de la micela abre en forma de abanico a los fosfolípidos que la rodean, de tal forma que en ese sitio los fosfolípidos de la bicapa, principalmente fosfatidilcolina, se exponen más al medio externo (Wong-Baeza *et al.*, 2012). Este arreglo espacial abierto de los fosfolípidos puede favorecer la activación de células del sistema inmunológico adaptativo con lo que se forman anticuerpos contra los fosfolípidos

que forman la protuberancia lipídica, a diferencia de la superficie de una bicapa lipídica normal en donde las cabezas polares están más cerradas, porque la carga positiva de un fosfolípido interacciona con la carga negativa de otro, lo que da una asociación lipídica que no es inmunogénica.

Con base en lo anterior se deduce que los anticuerpos contra partículas lipídicas se unen a los fosfolípidos de la bicapa abierta, que en los liposomas es la fosfatidilcolina, y no con los fosfolípidos cónicos que se desplazan y forman la micela invertida que se sumerge entre las dos monocapas de fosfolípidos (Figura 21). La especificidad de los anticuerpos anti-partículas lipídicas se ha demostrado ampliamente con el uso de moléculas que constituyen la región polar de los fosfolípidos como haptenos, en donde se ha confirmado que en los liposomas es la fosfatidilcolina la que está hacia la parte externa de la partícula lipídica (Baeza *et al.*, 2004; Wong-Baeza *et al.*, 2012).

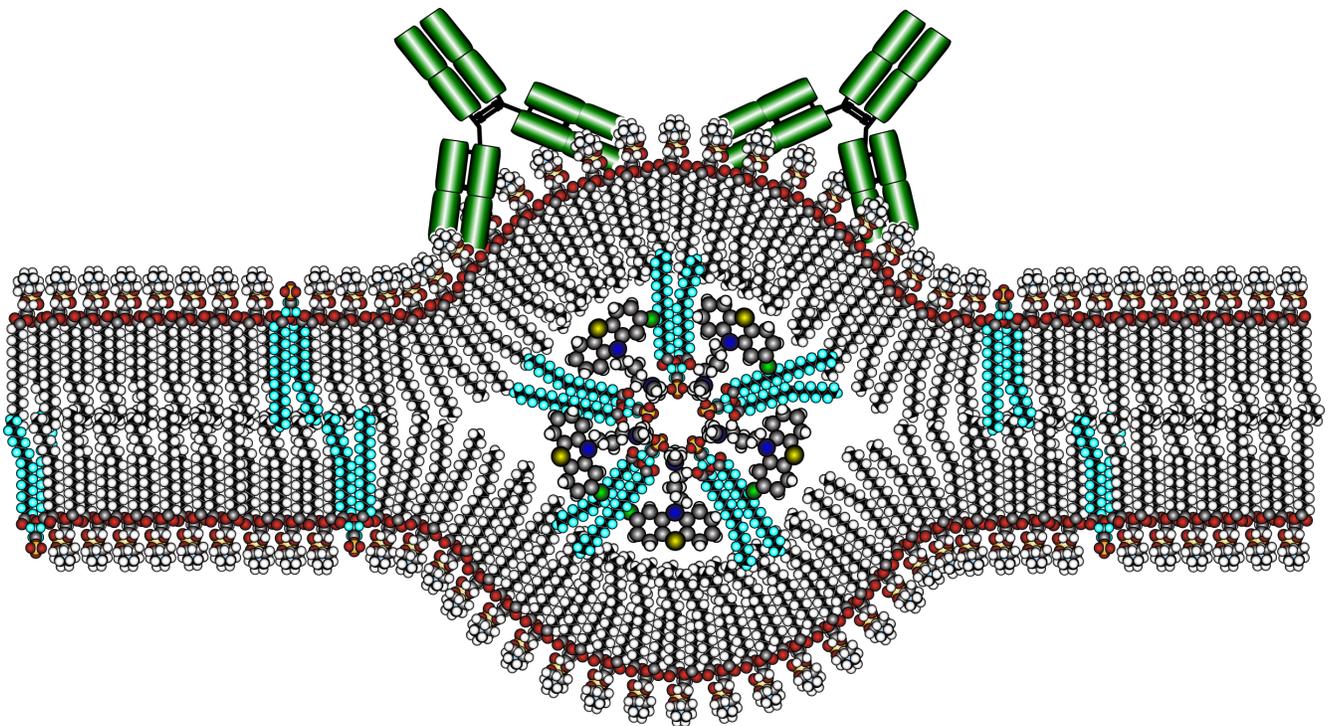


Figura 21. Unión de anticuerpos a la partícula lipídica inducida con cloropromacina. Se representa el segmento de un liposoma formado por fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) que lleva una micela invertida formada por el fosfatidato (color azul) e inducida por cloropromacina, la micela invertida está insertada en la bicapa con lo que se forma la partícula lipídica. La bicapa normal y el resto de la partícula lipídica están formadas por el fosfolípido de forma cilíndrica fosfatidilcolina. Se muestra el anticuerpo anti-partícula lipídica que reacciona con las regiones polares de la fosfatidilcolina que quedan expuestas por la separación que causa la micela al alojarse entre la bicapa de fosfolípidos.

Las asociaciones de los fosfolípidos en bicapa o en partículas lipídicas se caracterizaron por citofluorometría. La mayor dispersión del rayo láser que demuestra la presencia de las partículas lipídicas en los liposomas ocurrió con el manganeso 5 mM ($D=0.80$ a $P \leq 0.001$) o con cloropromacina 3 mM ($D=0.69$, $p \leq 0.001$).

La inducción del lupus en los ratones se basó en dos administraciones intaesplénicas de los liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por manganeso o cloropromacina. El usar adyuvante completo e incompleto de Freund antes de la primera y de la segunda inyección intraesplénica es fundamentalmente para inducir un proceso inflamatorio, es decir, generar una respuesta inmunológica innata que es necesaria para que se active la respuesta inmunológica adaptativa (Murphy *et al.*, 2008) y se genere una respuesta específica contra las partículas lipídicas. Los fragmentos de las envolturas de micobacterias del adyuvante completo, son reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por el receptor dimerizado TLR-2/TLR-6 presente en los macrófagos y células dendríticas, por lo que ocurre una señalización a través de MYD88 que permite la generación del factor de transcripción NF- κ B, el cual inicia la expresión de distintas citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 e IL-12) (Browne, 2012). Además, es posible que el aceite mineral, presente en el adyuvante completo e incompleto, se inserte en la bicapa lipídica de las membranas celulares, debido a que este es el ambiente hidrofóbico celular; el receptor NOD-2 monitorea la integridad membranal, y al detectar la presencia del aceite mineral se polimeriza junto con CARD, PYD y la caspasa 1 para formar el inflamosoma NALP3 que activa a las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Blomgran *et al.*, 2012). Estos procesos desencadenan un proceso inflamatorio el cual inicia el reclutamiento y activación de las células que participan en la respuesta inmunológica adaptativa, que es indispensable para la producción de los anticuerpos anti-partículas lipídicas del isotipo IgM e IgG que se han detectado en los ratones que desarrollan el lupus parecido al humano.

El desarrollo de la enfermedad autoinmune un mes antes al administrar a los ratones partículas lipídicas inducidas por cloropromacina con respecto a las inducidas por manganeso, puede atribuirse al mayor tamaño de la partícula lipídica formada por la cloropromacina, 5.5 nm de diámetro, que las formadas por el manganeso, 3.7 nm (Wong-Baeza *et al.*, 2012). Esta diferencia en tamaño también se vio reflejada en los títulos de anticuerpos anti-partículas lipídicas y anti-cardiolipina, los cuales fueron menores en los ratones que recibieron partículas inducidas con manganeso; sin embargo, el estudio histopatológico de piel y riñones demostró, que las alteraciones observadas fueron muy similares en los órganos provenientes de los ratones que desarrollaron la enfermedad autoinmune por la administración de partículas inducidas por manganeso o por cloropromacina (Wong-Baeza *et al.*, 2012).

En lo referente a la sobre o sub expresión de los genes obtenida en el análisis por microarreglos del genoma completo de ratones con la enfermedad autoinmune, es importante mencionar que en el grupo en donde la enfermedad se desarrolló con partículas inducidas por cloropromacina hubo un mayor número de genes que se modificaron, en total 1830 genes, de ellos 1328 se sobre expresaron

y 502 se sub expresaron; en cambio, en la enfermedad autoinmune desarrollada con partículas inducidas por manganeso, el número total de genes modificados fue de 720, 420 se sobre expresaron y 300 se sub expresaron. Esta diferencia en el número de genes puede atribuirse a los efectos que la cloropromacina puede ejercer en el organismo, entre ellos suprimir la tolerancia central y periférica, alterar la transcripción genética en linfocitos T y linfocitos B, alterar el balance y función de citocinas o de sus receptores; así como modificar la estructura de la cromatina (Chang y Gershwin, 2010), además de causar un aumento en los genes que participan en la eliminación de éste fármaco y en la transmisión de señales químicas en las placas motoras, debido a que tiene un efecto anti-psicótico. Sin embargo, cabe destacar que en la enfermedad desarrollada por las partículas generadas por ambos inductores hubo la misma sobre expresión de algunos genes para factores del complemento, para presentación de antígenos exógenos, producción de anticuerpos, señalización por TLR-4 o por NOD-2, así como la misma disminución en la expresión de algunos genes relacionados con apoptosis y reconocimiento de células NK, lo que sugiere que se presentó un mecanismo molecular muy similar en el desarrollo de la enfermedad en ambos grupos de estudio. A continuación se analizan los efectos que puede producir la sobre o sub expresión de los genes encontrados.

En estudios previos de nuestro grupo de investigación se demostró que el TLR-4 de las células HEK-293hTLR4 reconoció a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas en liposomas y no a los fosfolípidos asociados exclusivamente en bicapa (España, 2010). Esto puede deberse a la gran similitud estructural entre las partículas lipídicas y el lípido A del lipopolisacárido (LPS) de bacterias. El LPS forma en el medio acuoso arreglos lamelares (bicapas) o bien micelares cuando la forma molecular de su lípido A es cilíndrica, en contraste forma arreglos semejantes a la fase H_{II}, descrita en fosfolípidos, cuando el lípido A presenta forma cónica (Seydel *et al.*, 1989). En esta fase molecular quedan expuestas las cadenas hidrocarbonadas del lípido A al medio acuoso e inmediatamente se unen a una proteína plasmática de unión a LPS (LBP) que facilita la transferencia del LPS a CD14, que es una proteína membranal que a su vez transfiere el LPS al complejo TLR4/MD2. Cinco de las seis cadenas hidrocarbonadas del lípido cónico A se unen a un sitio hidrofóbico del co-receptor MD2, y la cadena remanente se une al TLR-4 (Park *et al.*, 2009), con lo que se lleva a cabo el reconocimiento de este ligando. Es posible que el reconocimiento de los lípidos asociados en partículas lipídicas se lleve a cabo en forma similar a la del lípido A, porque los lípidos que forman la micela invertida de la partícula son de forma molecular cónica y se encuentran en el arreglo o fase H_{II}, si bien hay más de seis cadenas de hidrocarburo en la micela invertida; estas cadenas quedarían expuestas al medio acuoso al separarse la monocapa que los cubre, quizá por competencia con la LBP y después serían transferidos por la propia LBP al complejo TLR4/MD2, en donde el reconocimiento sería similar al del lípido A. Por lo anterior es probable que el TLR-4 de las células presentadoras de antígenos como los macrófagos, células dendríticas y linfocitos B también puedan

reconocer a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas. Esta hipótesis se comprobó en este trabajo, por el incremento en la transcripción del gen que codifica para el receptor TLR-4, que se validó con su detección proteica.

Por otra parte el aumento detectado en los genes *Tram*, *Trif*, *Tbk1* e *Irf3* está indicando que la señalización del TLR-4 es por la vía de TRIF y no por MyD88 (Figura 22), cabe destacar que esta señalización lleva a la activación de los genes del interferón tipo 1 (Murphy *et al.*, 2008), y que el aumento en el interferón de este tipo es una de las principales características en los pacientes con LES (Pascual *et al.*, 2010) y actualmente no se conoce en el humano por qué aumenta el interferón de tipo 1 en la enfermedad. Por lo que la activación de la señalización del TLR-4 por vía de TRIF que conduce al aumento en la expresión de los genes del interferón tipo 1, es una aportación del presente trabajo al conocimiento a nivel molecular del lupus humano. Cabe mencionar que se detectó un aumento proporcional en las proteínas TRAM, TRIF y del interferón tipo 1 (IFN- α e IFN- β) con respecto al aumento en la expresión de los genes correspondientes.

La disminución en los genes (*Klrb1a*, *Klrb1c*, *Klra23*, *Klra7*, *Gzmb* y *Klra22*) que participan en el reconocimiento de las células NK también puede explicarse por el aumento de interferón tipo 1, el cual normalmente activa a las células NK, pero en una sobre expresión causa la muerte de las mismas (Murphy *et al.*, 2008). La importancia de la disminución de las células NK, radica en que participan en la remoción de las células autoreactivas que están involucradas en procesos de autoinmunidad, por lo que al disminuir las células NK aumentan las células autoreactivas y se favorece el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus humano. A esto se suma que se encontró una disminución en los genes de apoptosis (*Casp8*, *Cyts*, *Apaf1* y *Aifm1*) entre los cuales se encuentra el de la caspasa 8, en donde convergen varias vías de activación de apoptosis (Abdgawad *et al.*, 2012), por lo que la disminución de apoptosis también favorece la permanencia de células autoreactivas lo que exacerba la enfermedad autoinmune. Es importante mencionar que las proteínas KLRB1a, KLRB1c, KLRA23 y GZMB que participan en el reconocimiento de células NK, la caspasa 8 y las proteínas APAF1 y AIFM1 se encontraron disminuidas en los grupos manganeso y cloropromacina respecto al grupo control II.

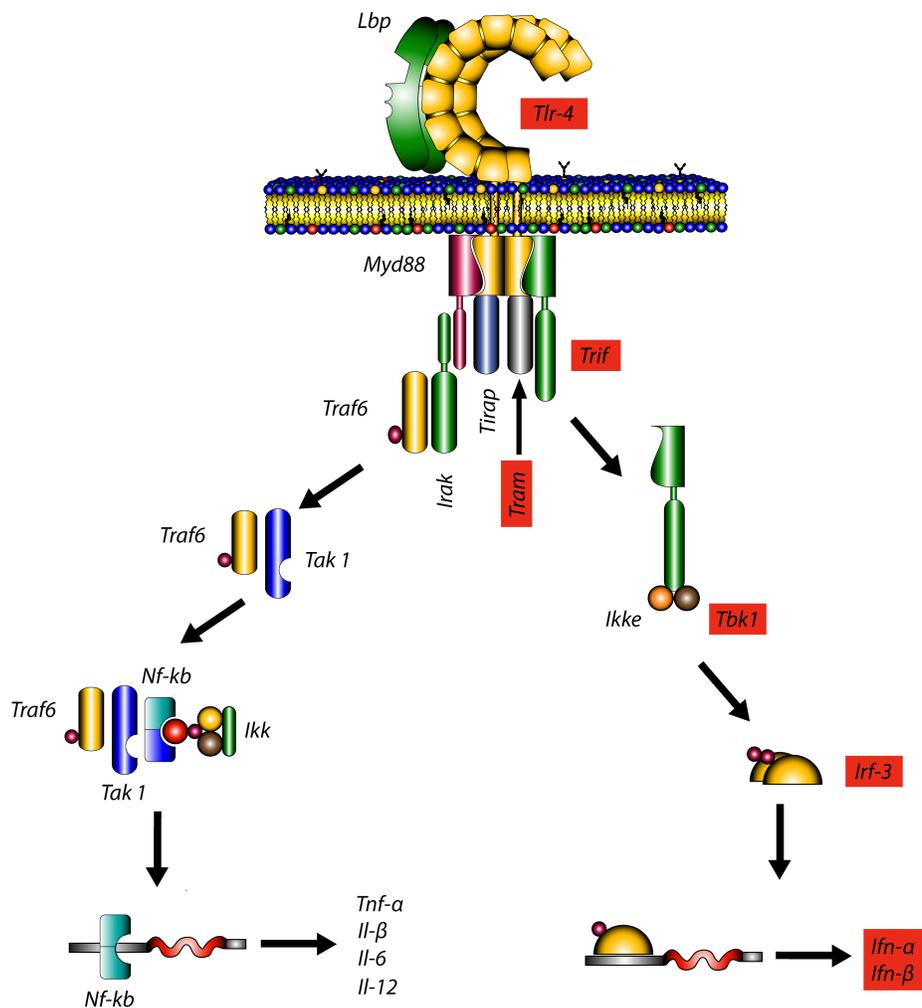


Figura 22. Esquema que representa la señalización por activación de TLR-4. Se han marcado en rectángulos en color rojo los genes *Tlr-4*, *Tram*, *Trif*, *Tbk1*, *Irf3* y los genes del interferón tipo 1 (*Ifn-α* e *Ifn-β*) que se sobre expresaron en los ratones que desarrollaron la enfermedad autoinmune en estudio.

La señalización por TLR-4 también puede activar a los linfocitos B y T (Murphy *et al.*, 2008). Ya que se conoce que la señalización aumentada de TLR-4 puede activar a estos linfocitos en forma independiente del antígeno, lo cual llevaría a la producción aumentada de anticuerpos de los isotipos IgM e IgG, entre ellos los anti-partículas lipídicas, esto explicaría el aumento en la expresión de los genes relacionados con la producción de anticuerpos que se encontró en los ratones, específicamente de los genes *Igh-VJ558*, *Lyn*, *Syk*, *Plcg2*, *Can*, *Akt1* y *Nfkb1*. El aumento en la expresión de estos genes se corroboró con la detección proteica de la región constante de cadenas pesadas para IgG codificada por *Igh-VJ558*, así como por la detección de las proteínas LYN y SYK.

La unión de los anticuerpos anti-partículas lipídicas a su antígeno en la superficie celular, entre otros anticuerpos y antígenos, causa la fijación del complemento y con ello la activación de la vía clásica del complemento que lleva finalmente a la ruptura de la célula, lo que explica el aumento de los genes

de la vía clásica: *C1ra*, *C1s*, *C1q*, *C3*, *C4* y *C7*, así como de los receptores de esta misma vía *C3ar1* y *C5ar1*, encontrada en los ratones que desarrollaron la enfermedad autoinmune. Cabe señalar que las proteínas *C7*, *C5ar1* y *C1ra*, *C1s*, *C1q* que forman el complejo *C1* que reconoce y se fija al anticuerpo se encontraron aumentadas en estos ratones; mientras que *C3* y *C4* no se detectaron, pero se encontraron aumentadas *C3b* y *C4b*, lo que indica el consumo de *C3* y *C4* por la activación de la cascada del complemento.

Esta activación de la vía clásica del complemento apoyaría la ruptura de las células que ha propuesto este grupo de investigación: cuando la reacción inmunológica entre los anticuerpos anti-partículas y los fosfolípidos asociados en partículas que se encuentran en las membranas celulares ocurre en presencia de complemento, se produce un daño en dichas membranas que expone antígenos intracelulares como la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana plasmática, la cardiolipina de las mitocondrias, el núcleo celular e incluso el DNA. Esta exposición al sistema inmunológico de antígenos intracelulares, puede explicar la presencia posterior de anticuerpos anti-fosfatidilserina, anti-cardiolipina, anti-nucleares y anti-histonas como se ha descrito en los ratones (Baeza *et al.*, 2004; Wong-Baeza *et al.*, 2012). En consecuencia la presencia de los anticuerpos anti-partículas lipídicas lleva al desarrollo de la enfermedad autoinmune parecida al LES humano (Baeza *et al.*, 2004). Para la producción de anticuerpos contra los antígenos intracelulares, es necesario que las células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) como las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B, capten los antígenos intracelulares liberados y los presenten como antígenos externos; este proceso de presentación de antígenos podría explicar el aumento en los genes relacionados con la presentación y procesamiento de antígenos exógenos, específicamente de los genes *H2-aa*, *H-2aa*, *H2-dma* y *Clip* encontrados en los ratones que desarrollaron la enfermedad autoinmune en estudio. La detección de un aumento en la expresión de las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) codificado por los genes *H2-aa*, *H-2aa*, en los ratones de los grupos manganeso y cloropromacina respecto al grupo control II, correlaciona con el aumento en la expresión de los genes indicados.

La ruptura de las células libera a la circulación sanguínea además de los antígenos intracelulares complejos antígeno-anticuerpo, como los partícula lipídica-anticuerpo anti-partícula, los cuales se depositan principalmente en los vasos sanguíneos de menor calibre, debido a que en las células endoteliales que los recubren está presente el receptor FcγRII para la fracción contante de las inmunoglobulinas del isotipo IgG, lo que contribuye a una hipersensibilidad de tipo III (depósitos de complejos antígeno-anticuerpo a nivel sistémico) (Perry *et al.*, 2011). Estos complejos antígeno-anticuerpo también pueden fijar complemento lo que acentúa aun más la expresión de los genes de la vía clásica del complemento y de sus receptores que se encontró en los ratones en estudio.

Como se ha indicado anteriormente el receptor NOD-2 monitorea la integridad membranal. La integridad de las membranas posiblemente está alterada por la presencia de las partículas lipídicas que han sido estabilizadas por los inductores cloropromacina o manganeso, esta alteración en la integridad de las membranas conduce a la polimerización de NOD-2 con CARD, PYD y la caspasa 1 para formar el inflamosoma NALP3 (Blomgran *et al.*, 2012), lo que explicaría el aumento en los genes de la señalización por NOD-2 (*Nod-2*, *Ripk2*, *Card9*, *Mapk10* y *Tnfa*) registrada en los ratones en estudio. Esta señalización es similar a la que se ha descrito para el aceite mineral del adyuvante de Freund, sin embargo se descarta que el aumento en la expresión de estos genes se deba al aceite mineral porque el análisis molecular se realizó cuatro meses después de la administración del adyuvante, por lo que la señalización puede atribuirse a la detección por el receptor NOD-2 (del que se encontró aumentada su expresión proteica en los grupos de ratones que recibieron partículas inducidas por manganeso o por cloropromacina) de la presencia de las partículas lipídicas en la membrana celular. La activación de las citocinas pro-inflamatorias que produce el inflamosoma NALP3 (Blomgran *et al.*, 2012) lleva al proceso inflamatorio previo que se requiere a la respuesta inmunológica adaptativa como se describió anteriormente.

Es importante mencionar que la sobre o sub expresión de genes encontrada se correlacionó con la concentración de proteínas detectada en los dos grupos de ratones que desarrollaron la enfermedad autoinmune.

De lo expuesto anteriormente se puede concluir, que en los grupos de ratones que recibieron partículas lipídicas inducidas por manganeso o cloropromacina, se desarrolló la enfermedad autoinmune parecida al lupus humano debido a la sobre expresión de algunos genes para factores del complemento, para presentación de antígenos exógenos, producción de anticuerpos y para la señalización por TLR-4 o por NOD-2, así como a la disminución de la expresión de algunos genes relacionados con apoptosis y con reconocimiento de las células NK. Esta sobre y sub expresión de genes apoya nuestra hipótesis de que son las partículas lipídicas y los anticuerpos anti-partículas lipídicas las que desencadenan en los ratones la enfermedad autoinmune parecida al lupus humano, y que posiblemente también participen en el desarrollo del LES humano.

Esta conclusión es reforzada ampliamente porque la expresión genética de procesos relacionados con autoinmunidad fue básicamente igual en los ratones que recibieron partículas lipídicas inducidas por manganeso o por cloropromacina, es decir, las partículas lipídicas como antígenos ejercen la misma función independientemente del inductor que participa en su formación.

V. CONCLUSIONES

- 1) La enfermedad autoinmune desarrollada en ratones hembras BALB/c fue similar cuando se administraron partículas lipídicas inducidas por manganeso o por cloropromacina.
- 2) El arreglo molecular de bicapa no alteró la expresión genética en los ratones con respecto al control que recibió solución salina fisiológica.
- 3) Se encontró una variación estadísticamente significativa de 720 genes en el grupo de ratones que recibieron partículas lipídicas inducidas por manganeso con respecto al grupo control, 420 genes se sobre expresaron y 300 se sub expresaron.
- 4) Se encontró una variación estadísticamente significativa de 1830 genes en el grupo de ratones que recibieron partículas lipídicas inducidas por cloropromacina con respecto al grupo control, 1328 genes se sobre expresaron y 502 se sub expresaron.
- 5) Los genes que se sobre expresaron y que están relacionados con procesos de autoinmunidad: algunos genes para factores del complemento, presentación de antígenos exógenos, producción de anticuerpos y señalización por TLR-4 o por NOD-2, fueron los mismos en los grupos de ratones que recibieron partículas lipídicas inducidas por manganeso o por cloropromacina.
- 6) Los genes que se sub expresaron y que están relacionados con procesos de autoinmunidad: algunos genes relacionados con apoptosis y con reconocimiento de las células NK, fueron los mismos en los grupos de ratones que recibieron partículas lipídicas inducidas por manganeso o por cloropromacina.
- 7) La sobre y sub expresión de genes refuerza la hipótesis de que son las partículas lipídicas y los anticuerpos anti-partículas lipídicas las que desencadenan en los ratones la enfermedad autoinmune parecida al lupus humano.
- 8) Las partículas lipídicas como antígenos ejercen la misma función independientemente del inductor que participa en su formación.

VI. PROSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la sobre expresión de algunos genes que codifican para componentes del complemento, para presentación de antígenos exógenos, en la producción de anticuerpos, y en la señalización por TLR-4 o por NOD-2; así como los que disminuyeron su expresión correspondientes al reconocimiento por células NK y a la apoptosis, que permiten proponer que en la enfermedad en el ratón ocurren los siguientes eventos: 1) la señalización de TLR-4 es por la vía de TRIF y conduce a un aumento en la expresión de interferón de tipo 1, 2) hay un aumento en el número de células autoreactivas, 3) ocurre un aumento en la lisis celular, abren un amplio campo de investigación para demostrar experimentalmente que dichos eventos se llevan a cabo durante el desarrollo de la enfermedad en el ratón.

Adicionalmente se puede analizar el papel de los genes que se sobre o sub expresaron en la señalización de vías diferentes a las estudiadas en este trabajo, así como se puede analizar la sobre o sub expresión de genes diferentes a los estudiados y que pueden tener relación con procesos de autoinmunidad o de otras enfermedades. Por otra parte se pueden analizar los mecanismos de regulación molecular involucrados al detectar los micro RNAs presentes.

Los conocimientos obtenidos permitirán una mejor comprensión de las bases moleculares e inmunológicas de enfermedades autoinmunes, que lleve a desarrollar mejores estrategias para su tratamiento.

VII. APORTACIONES CIENTÍFICAS

Encontrar que la activación de la señalización de TLR-4 es por la vía de TRIF y conduce a un aumento en la expresión de interferón de tipo 1, que es una de las principales características del LES pero sin conocerse el porqué de ese aumento, contribuye al conocimiento a nivel molecular del lupus humano.

La sobre expresión en interferón de tipo 1 correlaciona totalmente con la disminución encontrada tanto en la expresión de genes del reconocimiento por células NK como de la apoptosis, lo que en conjunto puede conducir a un aumento en células autoreactivas, este aumento en células autoreactivas puede explicar el desarrollo de la enfermedad en el ratón y que en el humano llevaría a un recrudecimiento del LES.

La sobre expresión de genes de presentación de antígenos y de producción de anticuerpos encontrada, apoya el desarrollo de la enfermedad en el ratón por la sobre producción de anticuerpos, entre ellos los anti-partículas lipídicas, así como por la producción y depósito de complejos antígeno-anticuerpo que es característico de la enfermedad en el ratón y del LES.

La sobre expresión en componentes del complemento apoyan la lisis celular propuesta en la enfermedad en el ratón, debido a la fijación de complemento en los complejos partícula lipídica-anticuerpo anti-partícula localizados en la membrana de las células del ratón. Esta lisis celular explica la liberación de antígenos intracelulares con la aparición posterior de anticuerpos como los que se han descrito en el LES, pero sin conocerse el proceso que expone los antígenos intracelulares.

El encontrar la misma sobre y sub expresión de genes relacionados con enfermedades autoinmunes en los ratones que recibieron partículas lipídicas inducidas por manganeso o por cloropromacina, sugiere un mecanismo molecular muy similar en el desarrollo de la enfermedad en ambos grupos de ratones y que las partículas lipídicas ejercen la misma función en forma independiente del inductor que participa en su formación.

VIII. ANEXO

1. Lípidos.

Los lípidos que se utilizaron en este trabajo fueron el ácido L- α -fosfatídico y la L- α -fosfatidilcolina de yema de huevo, la cardiolipina de corazón de bovino, y la L- α -fosfatidilserina de cerebro de bovino; se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, US); la pureza de los lípidos se analizó por cromatografía en capa fina de sílica gel, con el eluyente cloroformo:metanol:ácido acético:agua (65:25:8:4 v/v).

2. Reactivos y soluciones. Todos los reactivos usados fueron de grado analítico.

Solución de tris-salina.

Tris	10 mM
Cloruro de sodio	1 mM
Ajustar el pH a 7.0	

Regulador de fosfatos para el citómetro de flujo.

Cloruro de sodio	138.9 mM
Fosfato de potasio monobásico	1.9 mM
Fosfato de sodio dibásico	12.2 mM
EDTA	1.0 mM
Cloruro de potasio	3.8 mM
Cloruro de litio	10.1 mM
Agua desionizada	1.0 L
Ajustar el pH a 7.4	

Regulador de fosfatos (PBS).

Cloruro de sodio	138.9 mM
Fosfato de potasio monobásico	1.9 mM
Fosfato de sodio dibásico	12.2 mM
Agua desionizada	1.0 L
Ajustar el pH a 7.4	

Solución de bloqueo (PBS-SFT al 5%).

Suero fetal de ternera	5 mL
------------------------	------

Regulador PBS a pH 7.0 95 mL

Solución de sustrato de la peroxidasa.

Ortofenilendiamina	10 mg
Regulador TS de pH 7.0	25 mL
Peróxido de hidrógeno al 30%	20 μ L

Anticuerpos IgG anti-inmunoglobulinas de ratón (Sigma St. Louis, MO, US) estos anticuerpos son obtenidos en cabra:

- 1) Anti Fc de IgG, IgA, IgM, conjugado a peroxidasa (POD).
- 2) Anti Fc de IgG, IgA, IgM, conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- 3) Anti Fc de IgG, IgA, IgM, conjugado a 2 - metoxi - 2,4 - difenil - 3 (2H) - furanona (MDPF).

Soluciones de cloropromacina 3 mM.

Se preparó una solución stock de cloropromacina 1 M con 0.355 g/mL en agua desionizada, de la cual se hicieron las diluciones correspondientes para tener las concentraciones indicadas.

Solución de manganeso 5 mM.

Se hizo una solución stock de manganeso 1 M con 0.054 g/mL en agua desionizada, de la cual se harán las diluciones correspondientes para tener las concentraciones indicadas.

3. Placas para ELISA.

Se utilizaron para ELISA placas de poliestireno, de 96 pozos de fondo plano y de alta capacidad de unión de lípidos (COSTAR Co, Cambridge, USA).

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdgawad, M., Pettersson, A., Gunnarsson, L., Bengtsson, A., Geborek, P., Nilsson, L., Segelmark, M. & Hellmark, T. (2012). Decreased neutrophil apoptosis in quiescent ANCA associated systemic vasculitis. *PLoS One*. 7 (3): e32439.
- 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.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Pub. Inc. New York & London pp. 385 – 481.
- Alving, C., Schijo, S. & Mattsby-Baltzer, I. (1984). Preparation and use of liposomes in immunological studies. En: *Liposomes technology*. G. Gregoriadis Ed. Vol. III. CRC Press, Boca Raton pp. 157 – 175.
- Andreoli, L. & Tincani, A. (2012). Beyond the “Syndrome”: Antiphospholipid Antibodies as risk factors. *Arthritis Rheum*. 64 (2): 342 – 345.
- Araiza-Casillas, R., Cárdenas, F., Morales, Y. & Cardiel, M.H. (2004). Factors associated with chloroquine-induced retinopathy in rheumatic diseases. *Lupus*. 13 (8): 621.
- Asherson, R.A., Cervera, R., Piette, J. & Shoenfeld, Y. (1996). The antiphospholipid syndrome: History, definition, classification & differential diagnosis. En: *The antiphospholipid syndrome*. CRC Press, Boca Raton, New York, Londres. 3 – 12.
- Baeza, I., Garigio, P., Rangel, L., Chávez, P., Cervantes, L., Argüello, C., Wong, C. & Montañez, C. (1987). Electron microscopy and biochemical properties of polyamine-compacted DNA. *Biochemistry*. 26: 6387 – 6392.
- Baeza, I., Aguilar, L., Alvarado-Aleman, S., Escobar-Gutierrez, A., Mondragón, R., González, S., Ibáñez, M. & Wong, C. (1995). Identification of phosphatidate nonlamellar phase of liposomes by flow cytometry. *Biochem Cell Biol*. 73: 289 – 297.
- Baeza, I., Leyva, E., Campos, B., Lara, M., Ibáñez, M., Farfán, N., Orozco, H., Flores-Romo, L., Hernández-Pando, R. & Wong, C. (2004). Antibodies to nonbilayer phospholipid arrangements induce a murine autoimmune disease resembling human lupus. *Eur J Immunol*. 34: 1 – 11.
- Baeza, I., Ibáñez, M. & Wong, C. (2007). *Biomembranas y fenómenos de transporte*. En: *Bioquímica*. J. J. Hicks Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, Sidney, Toronto. pp. 168 – 200.
- Baeza, I., Ibáñez, M. & Wong, C. Method for antiphospholipid syndrome. United States Patent US 7,867,723. (2011).
- Blomgran, R., Patcha, V., Verma, D., Bergström, I., Söderkvist, P., Sjöwall, C., Eriksson, P., Lerm, M., Stendahl, O. & Särndahl E. (2012). Common Genetic Variations in the NALP3 Inflammasome Are Associated with Delayed Apoptosis of Human Neutrophils. *PLoS One*. 7 (3): e31326.
- Browne, EP. (2012). Regulation of B cell responses by Toll-like receptors. *Immunology*. Epub ahead of print.

- Borba, E.F., Turrini-Filho, J.R., Kuruma, K.A., Bertola, C., Pedalini, M.E., Lorenzi, M.C. & Bonfá, E. (2004). Chloroquine gestational use in systemic lupus erythematosus: assessing the risk of child ototoxicity by pure tone audiometry. *Lupus*. 13 (4): 223 – 227.
- Cairoli, E., Espinosa, G. & Cervera, R. (2010). Biological therapies in systemic lupus erythematosus. *Rev Med Chil*. 138 (7): 881 – 887.
- Carmier, D., Marchand-Adam, S., Diot, P. & Diot E. (2010). Respiratory involvement in systemic lupus erythematosus. *Rev Mal Respir*. 27 (8): 66 – 78.
- Cassimeris, L., Lingappa, VR. & Plopper, G. (2011). *Lewin`s Cells*. 2nd Ed. Jones and Bartlett. Boston, Toronto, London, Singapore. pp: 97 – 145 y 192.
- Cepika, A.M., Bendelja, K., Vergles, J.M., Malenica, B., Kapitanovic, S. & Gagro, A. (2010). Monocyte response to LPS after exposure to corticosteroids and chloroquine with implications for systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*. 72 (5): 434 – 443.
- Cervera, R. & Espinosa, G. (2010). Antiphospholipid syndrome: long-time research on pathogenic mechanisms has finally lead to new therapeutic strategies. *Expert Opin Ther Targets*. 14 (12): 1279 – 1282.
- Crow, M.K. & Wohlgemuth, J. (2003). Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis Res Ther*. 5: 279 – 287.
- Cullis, P.R., De Kruijff, B., Hope H.J., Nayar, R. & Schmid S.L. (1980). Phospholipids and membrane transport. *Can J Biochim*. 58: 1091 – 1100.
- Cullis, P.R. & Hope, M.J. (1991). Physical properties and fuctional roles of lipids in membranes: In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins & membranes*. New Comprehensive Biochemistry. Vance, D. E. y Vance, J. editors, New York. Pp. 1 – 41.
- Cunnane, G., Chan, O.T., Cassafer, G., Brindis, S., Kaufman, E., Yen, T.S. & Daikh, D.I. (2004). Prevention of renal damage in murine lupus nephritis by CTLA-4Ig and cyclophosphamide. *Arthritis Rheum*. 50 (5): 1539 – 1548.
- Cutolo, M., Sulli A., Capellino, S., Villaggio, B., Montagna, P., Seriolo, B. & Straub, R. (2004). Sex hormones influence on the inmune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*. 13: 635 – 638.
- Chang, C. & Gershwin, M. (2010). Drugs and autoimmunity – A contemporary review and mechanism approach. *J Autoimmun*. 34: 266 – 275.
- Deng Y, Tsao B.P. (2010). Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol*. 6 (12): 683 – 692.
- De Kruijff, B. (1987). Polymorphic regulation of membrane lipid composition. *Nature*, 329: 587 – 588.
- De Kruijff, B. (1997). Biomembranes. Lipids beyond the bilayer. *Nature*. 386: 129 – 132.

- España, L. (2010). Participación de los receptores tipo “TOLL” en el reconocimiento de lípidos asociados en partículas lipídicas. Tesis de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología Molecular. ENCB-IPN.
- Franchini, M. & Veneri, D. (2005). The antiphospholipid síndrome. *Hematology*. 10:265 – 269.
- Galli, M. (2012). Interpretation and recommended testing for antiphospholipid antibodies. *Semin Thromb Hemost*. Epub ahead of print.
- Gigante, A., Gasperini, M.L., Cianci, R., Barbano, B., Giannakakis, K., Donato, D., Fuiano, G. & Amoroso, A. (2009). Antiphospholipid antibodies and renal involvement. *Am J Nephrol*. (30): 405 – 412.
- Goodman-Gilman, A. (2001). *The pharmacological basis of therapeutics*. 10th Ed. McGraw-Hill. New York pp. 1077.
- Green, K.J., Getsios, S., Troyanovsky, S. & Godsel, L.M. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2 (2): 125 – 132.
- Griffiths, G.M., Tsun, A. & Stinchcombe, J.C. (2010). The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J Cell Biol*. 189 (3): 399 – 406.
- Gulinello, M. & Putterman, C. (2011). The MRL/lpr mouse strain as a model for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. 2011: 207504.
- Hafez, I.M., Ansell, S. & Cullis, P.R. (2000). Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids. *Biophys J*. 79: 1438 – 1446.
- Hafez, I.M. & Cullis, P.R. (2001). Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 47(2-3): 139 – 148.
- Harrison, T.R., Longo, D.L. & Jameson, J.L. (2001). *Principles of Internal Medicine*. 15th ed. McGraw-Hill. pp. 1922 – 1937.
- Ingster-Motai, I., Crochet, M., Manchon, E., Anquetil, D., Lestrade, C., Jacob, A., Le Brun, D. & Albuissou, E. (2004). Analysis of 925 patients on long-term hydroxychloroquine or chloroquine treatment: results of ophthalmological screening. *Lupus*. 13: 64 – 69.
- Koniari, I., Siminelakis, S.N., Baikoussis, N.G., Papadopoulos, G., Goudevenos, J. & Apostolakis, E. (2010). Antiphospholipid syndrome; its implication in cardiovascular diseases: a review. *J Cardiothorac Surg*. 5 (1): 101.
- Kunz, M. & Ibrahim, S.M. (2009). Cytokines and Cytokine Profiles in Human Autoimmune. Disease and Animal Models of Autoimmunity. *Mediators Inflamm*. 2009:979258.
- Lahita, R.G., Chiorazzi, N. & Reeves, W.H. (2002). *Tratado de enfermedades autoinmunitarias*. 2^a Ed Mc. Graw-Hill-Interamericana. pp. 575 – 587.
- Lakos, G., Favaloro, E.J., Harris, E.N., Meroni, P.L., Tincani, A., Wong, R.C. & Pierangeli, S.S. (2012). International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-b2-glycoprotein I testing: report from 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum*. 64 (1): 1 – 10.

- Levitan, I., Fang, Y., Rosenhouse-Dantsker, A. & Romanenko, V. (2010). Cholesterol and ion channels. *Subcell Biochem.* 51: 509 – 549.
- Leyva, E. (2001). Dinámica molecular lipídica en presencia de fármacos. Maestría en Biomedicina y Biotecnología Molecular. ENCB-IPN, México, D. F.
- Leyva, E. (2005). Diseño y síntesis de un análogo de la cloroquina inhibidor de la formación de partículas lipídicas para el tratamiento de Lupus experimental. Doctorado en Biomedicina y Biotecnología Molecular. ENCB-IPN, México, D. F.
- Loizou, S., McCrea, J., Rudge, A., Reynolds, R., Boyle, C. & Harris, E. (1985). Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol.* 62: 738 – 745.
- Meffre, E. (2011). The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases. *Ann NY Acad Sci.* 1246:1 – 10.
- Meroni, P.L., Borghi, M., Raschi, E. & Tedesco, F. (2011). Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol.* (6): 309 – 330.
- Mok, C. & Lau, C. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 56: 481 – 490.
- Mollinedo, F., Fernández, M., Hornillos, V., Delgado, J., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Nieto-Miguel, T., Villa-Pulgarín, J.A., González-García, C., Ceña, V. & Gajate, C. (2011). Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death Dis.* (2): e158.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2008) *Janeway's Immuno Biology* 7th ed. Garland Pub. Inc. New York and London. pp. 399 – 654.
- Nakou, M., Bertias, G., Stagakis, I., Centola, M., Tassioulas, I., Hatzia Apostolou, M., Kritikos, I., Goulielmos, G., Boumpas, D.T. & Iliopoulos, D. (2010). Gene network analysis of bone marrow mononuclear cells reveals activation of multiple kinase pathways in human systemic lupus erythematosus. *PLoS one.* (10): e13351.
- Navarrete, N., Macías, P., Jaén, C., Hidalgo, C., Cáliz, R. & Jiménez, A. (2005). Two cases de catastrophic antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 14: 907 – 909.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry.* 5th ed. W. H. Freeman and Company, New York. pp. 370 – 390.
- Niewold, T.B., Clark, D.N., Salloum, R. & Poole, B.D. (2010). Interferon alpha in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 948364.
- Nord, J.E., Shah, P.K., Rinaldi, R.Z. & Wiesman, M.H. (2004). Hydroxychloroquine cardiotoxicity in systemic lupus erythematosus: a report of 2 cases and review of the literature. *Arthritis Rheum.* 33: 336 – 351.
- Orozco, G., Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Morgan, A.W., Wilson, A.G., Wordsworth, P., Steer, S., Hocking, L., Thomson, W., Worthington, J. & Barton, A. (2010). Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 70 (3): 463 – 468.

- Ou, J.N., Wiedeman, A.E. & Stevens, A.M. (2012). TNF- α and TGF- β Counter-Regulate PD-L1 Expression on Monocytes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* 2295.
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., & Lee, J. O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD2 complex. *Nature* 458: 1191 – 1195.
- Pascual, V., Chaussabel, D. & Banchereau, J. (2010). A genomic approach to human autoimmune diseases. *Annu Rev Immunol.* 28: 535 – 571.
- Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y. & Morel, L. (2011). Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 271694.
- Rawicz, W., Smith, B.A., McIntosh, T.J., Simon, S.A. & Evans, E.A. (2008). Elasticity, Strength, and Water Permeability of Bilayers that Contain Raft Microdomain-Forming Lipids. *Biophys J.* 94 (12): 4725 – 4736.
- Reininger, L., Winkler, T.H., Kalberer, C.P., Jourdan, M., Melchers, F. & Rolink, A.G. (1996). Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZB x NZW) F1 mice. *J Exp Med.* 184 (3): 853 – 861.
- Rottman, J.B. & Willis, C.R. (2010). Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis. *Vet Pathol.* 47 (4): 664 – 676.
- Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W. & Khamashta, M.A. (2010). Antiphospholipid syndrome. *Lancet.* 376 (9751): 1498 – 509.
- Santiago-Raber, M.L, Laporte, C., Reininger, L. & Izui, S. (2004). Genetic basis of murine lupus. *Autoimmun Rev.* 3 (1): 33 – 39.
- Schoenroth, L.J., Hart, D.A., Pollard, K.M. & Fritzler, M.J. (2004). The effect of the phytoestrogen coumestrol on the NZB/W F1 murine model of systemic lupus. *J Autoimmun.* 23 (4): 323 – 332.
- Seydel, U., Oikawa, M., Fukase, K., Kusumoto, S. & Brandenburg, K. (2000). Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem.* 267: 3032 – 3039.
- Sfikakis, P., Boletis, J., Lionaki, S., Vigklis, V., Fragiadaki, K., Iniotaki, A. & Moutsopoulos, H. (2005). Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial. *Arthritis Rheum.* 52(2): 501 – 513.
- Singam, A.P., Mamarde, A. & Behere, P.B. (2011). A single blind comparative clinical study of the effects of chlorpromazine and risperidone on positive and negative symptoms in patients of schizophrenia. *J Psychol Med.* 33 (2): 134 – 40.
- Singer, S. & Nicolson, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science.* 175: 720 – 731.
- Stites, D., Terr, A. & Parslow, T. (1998). *Inmunología básica y clínica.* 9ª ed. Manual Moderno. pp. 547 – 553.

- Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 75:4194 – 4198.
- Szymezak, J., Ankri, A., Fischer, A.M. & Darnige, L. (2010). Hydroxychloroquine: A new approach of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Rev Med Interne*. 31(12): 854 – 857.
- Tescucano, A.R. (2009). Desarrollo y caracterización de un modelo de lupus en ratones con el fármaco hidralazina. Maestría en Biomedicina y Biotecnología Molecular. ENCB-IPN, México, D. F.
- Tierney, L., McPhee, S. & Papadakis, M. (1999). Diagnostico clínico y tratamiento. 34th. Ed. *El Manual Moderno*. México D.F. pp 796 – 799.
- Toong, C., Adelstein, S. & Phan, T. (2011). Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. (4): 17 – 28.
- Tripodi, A., Groot, P.G. & Pengo, V. (2011). Antiphospholipid síndrome: laboratory detection, mechanisms of action and treatment. *J Int Med*. 110 – 122.
- van den Brink-van der Laan, E., Dalbey, RE., Demel, RA., Killian, JA. & de Kruijff, B. (2001). Effect of nonbilayer lipids on membrane binding and insertion of catalytic domain of leader peptidase. *Biochemistry*. 40: 9677 – 9684.
- Vereb, G., Szöllösi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, L., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T.A. & Damjanovich. (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci Usa*. (14): 8053 – 8058.
- Voet, D. & Voet, J.G. (2011). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA. pp: 394 – 407.
- Watanabe, H., Garnier, G., Circolo, A., Wetsel, R., Ruiz, P., Holers, V.M., Boackle, S., Colten, H. & Gilkenson, G. (2000). Modulation of renal disease in MPL/lpr mice genetically deficient in the alternative complement pathway factor B. *J Immunol*. 164: 659 – 667.
- Wegener, J. & Galla, HJ. (1996). The role of non-lamellar lipid structures in the formation of tight junctions. *Chem Phys Lipids*. 81: 229 – 55.
- Wong-Baeza, C., Bustos, I., Serna, M., Tescucano, A., Ibáñez, M., Montañez, C., Wong, C. & Baeza, I. (2010). Membrane fusion inducers, chloroquine and spermidine increase lipoplex-mediated gene transfection. *Biochem Biophys Res Commun*. 396 (2): 549 – 554.
- Wong-Baeza, C., Hernández-Pando, R., Reséndiz, A., Tescucano, A., Bustos, I., Ibáñez, M., Wong, C. & Baeza, I. (2012). Molecular organization of the non-bilayer phospholipid arrangements that induce an autoimmune disease resembling human lupus in mice. *Mol Membr Biol*. 9 (2): 52 – 67.
- Yilmaz, A., Sari, R.A., Gundogdu, M., Kose, N. & Dag, E. (2005). Trace elements and some extracelular antioxidant protein levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 24: 331 – 335.
- Young, I.T. (1987). Proof without prejudice: use of the Kolmogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources. *J Histochem Cytochem*, 7: 935 – 941.

- Zameer, A. & Hoffman S.A. (2004). B and T cells in the brains of autoimmune mice. *J Neuroimmunol.* 146 (1-2): 133 – 139.
- Zhou, G., Fujio, K., Sadakata, A., Okamoto, A., Yu, R. & Yamamoto, K. (2004). Identification of sistemically expanded activated T cell clones in MRL/lpr and NZB/W F1 lupus model mice. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 448 – 455.