

Fagocitosis de suspensiones de fosfato de cromo (III)

Jorge Cruz Arencibia, Yoiz Fano Machín, Amed Cruz Morales, Radamés Tamayo Fuente,
José Morín Zorrilla

Centro de Isótopos (CENTIS)
Ave. Monumental y Carretera La Rada, km 3, Guanabacoa. La Habana, Cuba
jcruz@ceniai.inf.cu

Resumen

En el trabajo se estudia la fagocitosis in vivo e in vitro de una suspensión de fosfato de cromo (III) marcada con ^{51}Cr y ^{32}P . Las partículas radiactivas, dispersas en un medio de gelatina al 2 % en buffer acetato de pH 4-4.5, tienen principalmente tamaños entre 0.8 μm y 5 μm . De acuerdo con los experimentos de distribución biológica en ratas a los 30 minutos se registra una acumulación de radiactividad cercana al 80 % en hígado, lo que se atribuye a la fagocitosis por las células de Kupffer de este órgano. También se evidencia que las partículas de la suspensión son fagocitadas in vitro por macrófagos peritoneales de ratón. Todo ello indica que la suspensión estudiada reúne características apropiadas para su uso en radiosinoviortesis de acuerdo con el mecanismo principal de acción en este procedimiento, fagocitosis de las partículas por células presentes en la sinovia inflamada.

Palabras clave: fagocitosis; radiofármacos; fosfatos de cromo; articulaciones de los huesos; enfermedades reumáticas

Phagocytosis in phosphate chromium (III) suspensions

Abstract

Phagocytosis in vivo and in vitro of a suspension of chromic phosphate (III) labeled with ^{51}Cr and ^{32}P is studied. The radioactive particles dispersed in a media of 2 % gelatin in acetate buffer pH 4-4.5 have a predominant size of 0.8 μm and 5 μm . According with biodistribution experiments in rats after 30 minutes near the 80 % of radioactivity is registered in the liver, probably associated with phagocytosis of the particles by liver Kupffer cells. Is also showed that the suspension particles are phagocytized in vitro by mouse peritoneal macrophages. This facts indicate that the studied suspension have appropriate characteristics to be used in radiosynoviorthesis according to the principal action mechanism described for this procedure, particles phagocytosis by cells present in the inflamed synovium.

Key words: phagocytosis; radiopharmaceuticals; chromium phosphates; bone joints; rheumatic diseases

Introducción

La sinovitis crónica, complicación articular frecuente de artritis reumatoide, hemofilia y otras enfermedades sistémicas, se trata mediante inyecciones intrarticulares de dispersiones radiactivas, procedimiento conocido como radiosinoviortesis (RSV). Esta modalidad terapéutica se realiza de forma ambulatoria y se caracteriza por su elevada tasa de éxito, bajo costo y limitados efectos secundarios [1-3]. Los esfuerzos investigativos se han encaminado a la búsqueda de radiofármacos de alta eficacia clínica y baja irradiación, principalmente de nódulos linfáticos regionales e hígado, resultado de una distribución uniforme de las partículas inyectadas, depósito de altas dosis en la sinovia dañada, sin afectar el cartílago subyacente y baja o ninguna migración (fuga) articular [4-7]. Un factor clave a estos efectos es el tamaño de las partículas inyectadas, que debe ser

lo suficientemente pequeño como para que sean fagocitadas por las células presentes en la sinovia inflamada, distribuirse en esta de manera uniforme, evitando excesiva irradiación local y lo suficientemente grande como para que no tenga lugar migración de la articulación y se irradien innecesariamente órganos vecinos [2].

Se han considerado óptimos, tamaños entre 2 μm y 5 μm [8], aunque se han recomendado también tamaños mayores [2,9]. Los sinoviocitos durante sinovitis pueden llegar a fagocitar eritrocitos enteros y restos de fibrina, y la matriz extracelular está expuesta también a la cavidad [10], lo que favorece la acción de las radiaciones sobre la sinovia enferma, además de la acción directa sobre las células que han incorporado las partículas radiactivas. Como quiera que en el mecanismo principal se considera la fagocitosis, en el presente trabajo se estima la capacidad de ser fagocitada suspensiones de fosfato de cromo (III) marcadas con ^{51}Cr y ^{32}P median-

te estudios de fagocitosis in vivo e in vitro. El tamaño predominante de partículas de estas suspensiones está entre 0.8 μm y 5 μm .

Materiales y Métodos

Las suspensiones marcadas de fosfato de cromo (III) con más del 90 % de las partículas, con un tamaño entre 0.8 μm y 5 μm , dispersas en buffer acetato de pH 4- 4.5, se obtuvieron según la metodología descrita en [11]. La distribución biológica se estudió inyectando en la vena dorso lateral de la cola de ratones OF-1, de 20 g a 30 g de peso, suministrados por el Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) de Cuba; 0.2 mL de la suspensión marcada con ^{51}Cr , resultado de diluir 1 mL de la suspensión original en 5 mL de solución de gelatina en tampón acetato. El ensayo se realizó en 5 animales y la dispersión se agitó fuertemente antes de la administración. Los conteos de actividad de las jeringas se registraron antes y después de la inyección. Los ratones se sacrificaron a los 30 minutos mediante extracción de sangre por punción cardiaca. Se colectaron sangre, hígado, bazo, pulmones, riñones, fémur y músculo, así como la cola y orina (en papel absorbente colocado en la jaula en la que se confinaron los animales). Las mediciones se realizaron en contador LB 2040 (Berthold) con detector de NaI(Tl) calibrado para ^{51}Cr . El cálculo de las dosis administradas y acumuladas se hizo con ayuda del programa Biodist, en plataforma de Microsoft Excel. Las hojas de cálculo se diseñaron para la entrada directa de los datos: actividad de las jeringuillas llenas y vacías, actividad de las muestras y de una dilución estándar de referencia y fecha, y hora de medición de cada muestra. El programa dio como resultado los porcentajes de captación por masa de tejido (%D/g) [DCC.PNO.033, 2004].

En el caso de la sangre, para calcular la dosis total acumulada, se asumió que representa el 7.4 % del peso del animal [12]. Para los ensayos de fagocitosis in vitro se utilizaron macrófagos de rata obtenidos a partir de fluido peritoneal extraído cuatro días después de una inyección intraperitoneal de 1 mL de solución de tioglicolato al 3 % (Merck, Alemania) [13]. Una vez lavadas, las células se resuspendieron en solución salina balanceada de Hank a una concentración de 2×10^6 células/mL. La suspensión de macrófagos peritoneales se colocó en tubos Lp3 (200 μL por tubo) y se incubó durante dos horas a 37 °C. Las células no adheridas se eliminaron por lavado con solución salina 0.9 %. La capa de macrófagos adherida se cubrió con 400 μL de suspensión de partículas de $\text{CrPO}_4^{[32]\text{P}}$ en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL, EE.UU.*), al que se le añadió un suplemento de suero bovino fetal, L-glutamina y una mezcla de antibióticos al 1 %. Se realizaron cinco series de experimentos en las que se evaluaron cinco concentraciones de partículas obtenidas por diluciones sucesivas de la suspensión, desde 1:2 hasta 1:48. Después de la incubación durante 18 h a 37 °C (Incubadora Jouan IG 150, Francia), se midió la actividad a cada uno de los tubos (actividad inicial,

A_0). A cada tubo se añadió 1 mL de solución de NaCl 0.9 % y se descartó el sobrenadante. Los tubos se lavaron 2 veces con 1 mL de solución salina 0.9 % y se secaron sobre papel absorbente. Posteriormente se midió la actividad que permaneció en los tubos (actividad final, A_f) y se calculó el porcentaje de actividad retenida mediante la relación $(A_f / A_0) \times 100$. El por ciento de actividad retenida en los tubos de manera inespecífica se calculó a través de la medición de la actividad que permaneció unida a tubos que no contenían células. Las mediciones se realizaron en contador LB 2040 (Berthold) con detector de NaI(Tl) calibrado para ^{32}P .

Resultados y Discusión

Los resultados de la distribución biológica en ratones y los del estudio de fagocitosis se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Resultados de distribución biológica del $\text{CrPO}_4^{[51]\text{Cr}}$ en ratones

Órgano	Por ciento dosis inyección
Hígado	77 \pm 8
Bazo	2.2 \pm 0.2
Pulmones	3.8 \pm 0.3
Riñones	1.6 \pm 0.1
Cola	4.9 \pm 0.5
Sangre*	10.6 \pm 0.8

n = 5

*Dosis total en sangre

El intervalo indicado de los datos corresponde a sus desviaciones estándar.

Tabla 2. Actividad retenida en los tubos con células para diferentes concentraciones de $^{32}\text{P}\text{CrPO}_4$

Dilución $\text{CrPO}_4^{[32]\text{P}}$	Actividad retenida (Ar, por ciento)
1:2	0.9-7.1
1:4	2.5-10.4
1:8	8.9-18.1
1:16	20.8-46.1
1:48	37.6-58.1

Como se aprecia en la tabla 1, cerca del 80 % de la dosis inyectada se registra en hígado y bazo. La baja retención en pulmones (3.8 %) permite afirmar que la fracción más abundante tiene un tamaño menor de 10 μm , pues se conoce que las partículas con tamaños mayores de 10 μm son retenidas por los capilares pulmonares [3,14]. Los datos de distribución biológica de otras dispersiones de fosfato de cromo (III) indican que cuando se administran por vía endovenosa preparaciones con tamaños de partículas entre 0.1 μm y 1 μm , estas son rápidamente aclaradas en sangre y fagocitadas por hígado y bazo [14-19]. Si se usa vía intracavitaria (principalmente intraperitoneal) las soluciones coloidales alcanzan también estos órganos del Sistema Retículo Endotelial (SER), no así si se inyectan suspensiones (de mayores tamaños de partículas) dada la dificultad en la migración por vía linfática. La observación de una acumulación rápida y persistente en hueso,

principalmente en médula ósea, seguida sobre todo de inyección intracavitaria, indica también que se deben extremar los cuidados en el uso terapéutico del fosfato de cromo (III)- ^{32}P de pequeños tamaños de partículas. Esto puede acentuar el riesgo del efecto deletéreo de una irradiación prolongada a médula ósea por partículas beta de difícil detección por rastreo centelleográfico superficial [14-19]. El empleo de macroagregados de albúmina sérica humana con tamaños predominantes entre $0.5\ \mu\text{m}$ y $2.0\ \mu\text{m}$ ha evidenciado fagocitosis por parte de las células de Kupffer del hígado, indicándose que aproximadamente el 65 % se acumula en ese órgano a los 4 min después de la inyección [20]. Las evidencias y resultados de la distribución biológica indican que las suspensiones tienen tamaños que favorecen su fagocitosis. Como elemento de comprobación de este importante hallazgo se empleó un modelo *in vitro* a partir de macrófagos obtenidos en el fluido peritoneal de ratas [13].

En la bibliografía especializada no se encontraron estudios de fagocitosis *in vitro* de los radiofármacos aprobados actualmente para uso en RSV. En un experimento inicial orientativo se demostró la existencia de retención de las partículas en presencia de células tipo macrófago, estadísticamente diferente de la retención inespecífica (en ausencia de células), lo que permite afirmar que la retención se debe a la interacción partículas-células. En experimentos posteriores se demostró que la retención varía al disminuir la concentración de las partículas (tabla 2), con un aumento de la actividad retenida y, por lo tanto, de las que son fagocitadas. Como la retención está expresada en porcentaje, este resulta mayor con un menor número de partículas, lo que apoya la idea de la fagocitosis en lugar de otro tipo de interacción. Estos resultados evidencian que las partículas de fosfato de cromo (III) obtenidas por el procedimiento establecido, con un tamaño mayoritario entre $0.8\ \mu\text{m}$ y $5\ \mu\text{m}$, son fagocitadas por células del SRE del hígado al ser inyectadas en ratones y por macrófagos peritoneales aislados de rata, lo que permite considerar se comporten de manera similar *in vivo*. Es presumible por tanto, que los radiofármacos de fosfato de cromo (III) marcados con adecuados emisores beta (^{32}P) en particular, sean eficaces en el tratamiento de sinovitis crónica mediante RSV.

Conclusiones

Las suspensiones de fosfato de cromo (III) marcado con ^{51}Cr , con tamaño predominante de partículas entre $0.8\ \mu\text{m}$ y $5\ \mu\text{m}$, se acumulan cerca de un 80 % en hígado de ratas. Ello es atribuible a fagocitosis por las células del SER de este órgano, presumiblemente células de Kupffer. Marcado con ^{32}P el producto es asimismo fagocitado *in vitro* por macrófagos peritoneales de ratón. Ello hace a estas suspensiones marcadas con un radionúclido apropiado como ^{32}P , potencialmente eficaces para su uso en radiosinoviortesis.

Referencias

- [1] FISCHER M, MODDER G. Radionuclide therapy of inflammatory joint diseases. Nucl. Med. Commun. 2002; 23(9): 829-831.
- [2] SCHNEIDER P, FARAHATI J, REINERS C. Radiosynovectomy in rheumatology, orthopedics and hemophilia. J. Nucl. Med. 2005; 46 (suppl 1): 48S-54S.
- [3] LLINÁS A. The role of synovectomy in the management of a target joint. Hemophilia World Congress. 2008. June 1-5. Istanbul, Turkey.
- [4] KROPÁČEK M, MELICHAR F, SRANK J, et. al. Preparation and quality control of [^{166}Ho]-macroaggregates for radiosynoviotherapy. Cancer Biother Radiopharm. 2007; 22(3): 450-452.
- [5] PANDEY U, KETAKI B, GRACE S, et. al. Evaluation of ^{90}Y phosphate particles as a possible radiation synoviotherapy agent. Nucl Med Commun. 2005; 26(5): 459-463.
- [6] SRIVASTAVA SC. The role of electron-emitting radiopharmaceuticals in the palliative treatment of metastatic bone pain and for radiosynovectomy: applications of conversion electron emitter Tin-117m. Braz Arch Biol Technol. 2007; 50: 49-62.
- [7] UNNI PR, VENKATESH CHM, RAMAMOORTHY N, PILLAI MRA. Preparation and bioevaluation of ^{166}Ho labeled hydroxyapatite (HA) particles for radiosynovectomy. Nucl. Med. Biol. 2002; 29(2):199-209.
- [8] NOBLE J, JONES AG, DAVIS MA et. al. Leakage of radioactive particle systems from a synovial joint studied with a gamma camera. Its application to radiation synovectomy. J. Bone Joint Surg. Am. 1983; 65(3): 381-389.
- [9] BUTOESCU IN, JORDAN O, DOELKER E. Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: a review of the factors influencing their performance. Eur J Pharm Biopharm. 2009; 73(2): 205-218.
- [10] GHADIALY FN, Overview article: the articular reticuloendothelial system. Ultrastructural Pathology. 1980; 1(2): 249-264.
- [11] CRUZ ARENCIBIA J, MORIN ZORRILLA J, CRUZ MORALES A, et. al. Fosfato de cromo (III) marcado con diferentes radionúclidos para uso en radiosinoviortesis. Rev Cub Farm. 2012; 46 (2): 162-172.
- [12] BROWN RP, DELP MD, LINDSTEDT SL. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. Toxicol Ind Health. 1997; 13(4): 407-484.
- [13] Cardoso M., Alvarez M, Aguirre M, Lucas, G., Brandan, N. Efecto "in vitro" del formocresol y el sulfato férrico sobre macrófagos peritoneales murinos. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. M-095. 2006.
- [14] ARSHADY R. Microsphere, microcapsule & liposome radiolabeled and magnetic particulates in medicine y biology. Vol. 3. Londres: Citus Books; 2001. p. 99.
- [15] ANGHILERI LJ. In Vivo Distribution of radioactive chromic phosphate: influence of the particle size and route of injection. Int J. Appl. Radiat. Isotop. 1965; 16(11): 623-630.
- [16] ANGHILERI LJ, MARQUES R. New colloidal chromic radiophosphate for local irradiation of the central nervous system. Int. J. Appl. Radiat. Isotop. 1967; 18(2): 97-100.
- [17] ANGHILERI LJ, PRPIC B. A New colloidal (^{68}Ga)-compound for liver scanning. Int. J. Appl. Radiat. Isotop. 1967; 18(2): 734-735.
- [18] LEVINE B, HOFFMAN H, FREEDLANDER S. Distribution and effect of colloidal chromic phosphate (^{32}P) injected into the hepatic artery and portal vein of dogs and man. Cancer 1957; 10(1): 164-172.
- [19] COOPER JAD, ZORN EM. Distribution of colloidal chromic phosphate after intracavitary administration in the rat. J Lab Clin Med. 1954; 42(6): 867-871.
- [20] RESKE SN, VYSKA K, FEINENDEGEN LE. In Vivo Assessment of phagocytic properties of kupfer cells. J. Nucl. Med. 1981; 22(5): 405-410.

Recibido: 2 de diciembre de 2014

Aceptado: 23 de abril de 2015