



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

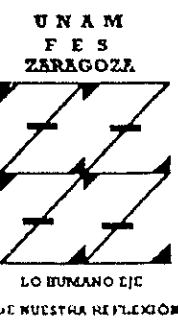
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

LABORATORIO DE ONCOLOGIA UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

"REDUCCION DE TUMORES DE CARCINOMA DE CERVIX INDUCIDOS EN RATONES DE LA CEPA CBA POR LA ADMINISTRACION DE IL-2 ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS POSITIVOS"

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE : B I O L O G A P R E S E N T A MORAN BAÑUELOS SARA HIRAN

DIRECTORA: M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA ASESORA: M. en C. TERESA CORONA ORTEGA



MEXICO, D. F.

204511

MAYO 2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

---

EL PRESENTE TRABAJO FUÉ REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, DIRIGIDA POR LA M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA Y ASESORADA POR LA M. EN C. TERESA CORONA ORTEGA.

---

---

---

---

*a mis padres: ROSA y SANTOS...  
por darme la vida...cada amanecer*

---

---

---

---

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	3
<b>Marco Teórico</b>	5
Sistema Inmunológico	5
Citocinas	6
Interleucina 2 (IL-2)	8
Receptor de IL-2 (RIL-2)	10
Presencia de RIL-2 en Células Tumorales	12
Efecto de IL-2 sobre Células Tumorales	12
Inmunoterapia con IL-2	13
Liposomas	14
Carcinoma Cérvico-Uterino (CaCu)	17
Tratamiento Inmunosupresor	18
<b>Planteamiento del Problema</b>	20
<b>Hipótesis</b>	21
<b>Objetivos</b>	22
<b>Materiales y Métodos</b>	23
<b>Resultados</b>	31
<b>Discusión de Resultados</b>	46
<b>Conclusiones</b>	55
<b>Sugerencias</b>	56
<b>Bibliografía</b>	58
<b>Apéndices</b>	69

---

---

---

---

## RESUMEN

La Interleucina 2 (IL-2) es una proteína que regula la respuesta inmune al promover la activación y proliferación de los linfocitos T. La acción de IL-2 se inicia con la unión de la proteína a su receptor membranal, el cual está presente en linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), así como en monocitos y granulocitos; además, diversos autores han confirmado que el receptor para IL-2 (RIL-2) no es exclusivo de este tipo celular, pues se ha detectado su presencia en células de carcinomas humanos. Recientes experimentos realizados por nuestro equipo de trabajo han mostrado que las líneas celulares de Carcinoma de Cérvix (CaCu) CALO e INBL, presentan el receptor membranal RIL-2; asimismo, que la proliferación de estas líneas celulares se ve inhibida ante el estímulo de altas concentraciones de esta citocina. Desafortunadamente, se sabe que la IL-2 es altamente tóxica al administrarse *in vivo*.

El objetivo del presente trabajo fué evaluar el efecto de altas concentraciones IL-2 encapsulada en liposomas en un modelo experimental *in vivo*. Para lograrlo, se encapsuló IL-2 en liposomas positivos preparados con los lípidos fosfatidilcolina y espermidin-colesterol, esperando disminuir los efectos tóxicos de la citocina al administrarse vía sistémica. Posteriormente se evaluó el efecto de IL-2 encapsulada sobre cultivos de las líneas de CaCu, CALO e INBL y sobre tumores de CaCu inducidos en ratones de la cepa CBA.

Los resultados *in vitro* mostraron que la citocina conserva su efecto antiproliferativo sobre las líneas celulares de CaCu después de encapsularla en liposomas positivos, al mismo tiempo se observó que la cantidad de lípido administrada es determinante para obtener una respuesta similar a la obtenida cuando se estimulan cultivos con la citocina en forma libre.

---

---

Por otro lado, se logró inducir tumores intraperitoneales en hembras inmunodeprimidas de la cepa CBA mediante la inyección de células de las líneas CALO e INBL. Nuestros resultados mostraron que al administrar vía intraperitoneal 80 UI/ml de IL-2 encapsulada a ratones con tumores inducidos, se logra una reducción significativa de la carga tumoral por ratón, sin provocar efectos tóxicos en los animales. Por otro lado debemos mencionar que los resultados obtenidos indican que efectivamente la IL-2 encapsulada llega al lugar donde se ha implantado el tumor y promueve la respuesta antitumoral por medio de una mayor respuesta inmune mediada por los linfocitos T.

Finalmente, es importante mencionar que es necesario esclarecer el mecanismo de acción de IL-2 encapsulada *in vitro* y su biodistribución *in vivo*, de manera que esta información nos permita diseñar una alternativa terapéutica para su evaluación y aplicación a nivel clínico en pacientes que padecen carcinoma de cérvix.

---

---

## INTRODUCCIÓN

El cáncer se caracteriza por el crecimiento no controlado de la progenie de una célula transformada, y la manera ideal de curarlo consiste en inducir una respuesta inmune específica contra las células tumorales. Aunque la función del sistema inmunológico es la defensa del organismo frente a una infección, también puede eliminar algunos tipos de tumores, sin embargo, la mayoría de los tumores evitan de algún modo el ser destruidos por el sistema inmune (Regueiro y López, 1996).

En estudios con tumores trasplantables en ratones se ha logrado desarrollar una respuesta inmune adaptativa, ya que las células malignas son reconocidas específicamente y posteriormente rechazadas, asimismo se ha comprobado la participación de los linfocitos T en dicho proceso (Whittington y Faulds, 1993). Sin embargo, las células tumorales poseen características que les permiten evitar ser reconocidas y destruidas por el sistema inmunológico, estas son: el presentar una baja inmunogenicidad, carecer de antígenos tumorales reconocidos por anticuerpos específicos o por suprimir la respuesta inmunológica al secretar citocinas inmunosupresoras como el Factor de Crecimiento Tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Regueiro y López, 1996).

Las principales terapias contra el cáncer explotan los mecanismos efectores básicos de la respuesta inmunológica adaptativa, ya sea con anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos específicos de los tumores o por medio de linfocitos T citotóxicos, los cuales reconocen péptidos específicos de células tumorales que no se encuentran en células sanas. Sin embargo, para que los linfocitos T puedan ejercer su acción es necesaria su activación vía citocinas específicas (Vuist *et al*, 1993).



---

---

La interleucina 2 (IL-2) es una de las principales citocinas del sistema inmunológico, está encargada entre otras funciones de la activación y proliferación de los linfocitos T y junto con otras citocinas como la IL-3, IL-4 e IL-10 han cobrado gran interés en el estudio de la biología de distintos tipos de cáncer humanos y en la evaluación de terapias para combatirlos, esto es debido a su participación en la regulación del crecimiento y diferenciación de distintos tipos celulares (Foa *et al.*, 1992; Terres y Coffman, 1998).

Con base en esta información, se han diseñado diversas alternativas terapéuticas utilizando las citocinas ya sea solas o en combinación, de manera que se promueva la actividad antitumoral de estas proteínas. Los resultados obtenidos en el caso de IL-2 sugieren la evaluación de diversas concentraciones y vías de administración de ésta, con el objetivo de disminuir sus efectos tóxicos al ser aplicada *in vivo* vía sistémica a pacientes con cáncer de pulmón, renal y en este caso con carcinoma de cérvix (Shulman *et al.*, 1996).

---

---

## MARCO TEÓRICO

### SISTEMA INMUNOLÓGICO

Los seres humanos contamos con un sistema de vigilancia y protección conocido como sistema inmunológico el cual nos permite defendernos de la acción de microbios, virus, sustancias o moléculas externas al organismo llamados antígenos, y en ocasiones contra moléculas biológicas y células propias (Abbas *et al.*, 1994). Este sistema ha desarrollado diversos tipos de respuestas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo

Para lograr la eliminación del patógeno que haya establecido una infección, lo primero que debe hacer el sistema inmunológico es reconocerlo como agente extraño y a continuación desarrollar una respuesta adecuada para destruirlo. Dicho sistema actúa mediante dos tipos de mecanismos que se diferencian en las estructuras de reconocimiento de los patógenos, pues la fase efectora que produce su destrucción es esencialmente similar (Regueiro y López, 1996). Tales mecanismos son: la inmunidad innata e inmunidad adquirida o específica. Durante la inmunidad innata participan células fagocitarias como monocito-macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales (NK) que lisan e inhiben el crecimiento de antígenos y células tumorales de manera inespecífica (Kägi *et al.*, 1995), mientras que en la inmunidad adquirida o específica, participan cooperativamente células llamadas linfocitos T y moléculas de membrana para provocar lisis sobre células blanco (Abbas *et al.*, 1994).

---

---

La inmunidad adquirida se divide, a su vez, en inmunidad humoral y celular, de acuerdo a las células que en ella participan. Por un lado, en la inmunidad humoral participan proteínas conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) secretadas por linfocitos B, estas se encuentran en el plasma sanguíneo y son capaces de identificar y unirse a marcadores específicos de las células blanco para eliminarlas. A su vez, en la inmunidad celular participan los linfocitos T, los cuales son encargados de llevar a cabo el reconocimiento y eliminación de las células blanco, mediante la secreción de citocinas y la acción de células efectoras (Abbas *et al.*, 1994).

## CITOCINAS

Las citocinas son proteínas producidas por células del sistema inmunológico en respuesta a determinados estímulos, por ejemplo, la presencia de un patógeno. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las linfocinas, monocinas, quimiocinas, interleucinas, interferones y factores estimuladores de colonias. Los principales productores de citocinas son las células T o linfocitos T, junto con los macrófagos. Las funciones principales de las citocinas son: regular la activación, crecimiento y diferenciación de distintas poblaciones celulares, así como activar y regular el incremento y disminución de la respuesta inmunológica, inflamatoria y reparadora de lesiones por medio de células inflamatorias como fagocitos mononucleares, neutrófilos y eosinófilos; además, regulan la activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos estimulados con antígenos específicos.

---

---

Además de tener efectos locales (autócrinos y parácrinos), las citocinas también pueden actuar sobre células blanco que se encuentran más alejadas (endócrinos) (Warrens y Lechler,1992) Todas las citocinas comparten las siguientes características: a) son de bajo peso molecular, b) son producidas cada vez que comienza la activación de la respuesta inmunológica, c) tienen una vida media limitada; d) sólo estimulan aquellas células que poseen receptores específicos para estas citocinas; y e) son extremadamente potentes a bajas concentraciones (Abbas *et al.*, 1994; Regueiro y López, 1996)

Las citocinas son de gran interés en el estudio y terapia del cáncer debido a su participación en la regulación del crecimiento y diferenciación de distintos tipos celulares: por ejemplo, los interferones (INF) pueden inhibir la replicación viral, los factores de crecimiento regulan el crecimiento y diferenciación de células de médula ósea y las interleucinas (IL) por su parte afectan a los linfocitos y macrófagos encargados de la inmunidad e inflamación (Oettgen,1991)

Estas proteínas juegan un papel muy importante dentro de las alternativas terapéuticas aplicadas a pacientes con distintos tipos de cáncer En la literatura se encuentran informes sobre la acción de Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y sobre linfomas y leucemias, así como sobre tumores sólidos de ovario y riñón (Silver,1990; Falkson *et al.*,1991). Está ampliamente estudiada la participación de las Interleucinas 1,2,3,4 y 10 en el control inmunológico y efecto antitumoral sobre carcinoma renal y pulmonar, mielodisplasias y mastocitomas. La acción de IL-2 tiene un papel muy importante en la respuesta inmunológica antitumoral ( Ganser *et al.*,1990, Schaafsma *et al.*, 1991; McIntyre *et al.*, 1992; Foa *et al.*, 1992; Terres y Coffman, 1998)

---

---

Por su parte, el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), los Factores Estimuladores de Colonias de Granulocitos (G-CSF), de Granulocitos-Macrófagos (GM-CSF), de macrófagos (M-CSF), así como la Eritropoyetina (Epo), tienen una importante aplicación en el tratamiento de pacientes con leucemias, linfomas y en aquellos con transplante de médula ósea, entre otros (Holler *et al.*, 1990, Kaplan *et al.*, 1991; Moore, 1991). Tales estudios sugieren la realización de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* para poder diseñar estrategias terapéuticas aplicables a nivel clínico.

## INTERLEUCINA 2 (IL-2)

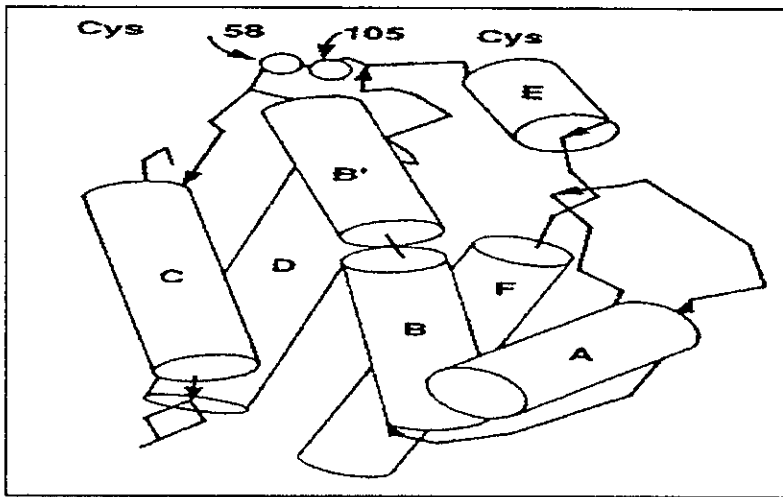
La IL-2 pertenece al grupo de citocinas que regulan la respuesta inmunológica por su acción sobre las células encargadas de la inmunidad e inflamación, además esta citocina puede actuar sobre linajes no hematopoyéticos. Al parecer, su actividad mitogénica fue descrita por primera ocasión en el año de 1965 en el medio condicionado de células sanguíneas blancas activadas (Smith, 1993), originalmente fue llamada factor de crecimiento de células T (CTGF), factor mitogénico de timocitos (TMF), factor auxiliador de células asesinas y factor coestimulador (KHF) (Cosman, 1984; Aggarwal, 1992).

La IL-2 es una glucoproteína de 15 a 18 kDa, está compuesta de cuatro hélices alfa anfipáticas arregladas de forma antiparalela, con las caras hidrofóbicas creando un núcleo hidrofóbico bastante estable, posee además un enlace disulfuro que garantiza la estabilidad de la estructura terciaria, la cual es esencial para su actividad biológica ( Figura 1), y posee un punto isoeléctrico de 6.8 a 8.2. La IL-2 es producida por células T CD4<sup>+</sup>, y en menor cantidad por células T CD8<sup>+</sup> en humanos, mientras que en ratones las células Th1 son las principales productoras (Coventry, 1996).

---

---

Esta proteína es transcrita, sintetizada y secretada por células T activadas por antígenos presentados por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), IL-1 o IL-6. La heterogeneidad del peso en la proteína se debe a la variación en la glicosilación de los residuos polipeptídicos.



**Figura 1.** Modelo esquemático de IL-2 basado en los datos obtenidos por cristalografía de rayos X. Las hélices alfa están representadas como cilindros y marcadas secuencialmente (Tomado de Smith, 1988).

---

---

IL-2 es la principal citocina responsable de la progresión de linfocitos T desde G1 hasta S en el ciclo celular y de la expansión clonal de los linfocitos T activados (Alvarado, 1997; Hassuneh *et al.*, 1997), controla la proliferación y citotoxicidad de los linfocitos T, células Th1 y Th2, células asesinas naturales (NK) y linfocitos B (Anderson y Sorenson, 1994). Induce la expresión de su receptor (RIL-2), promueve la proliferación de linfocitos granulares largos (LGL), aumenta la actividad de las células NK, incrementa la proliferación, así como la actividad tumoricida y microbicida de monocitos, células B activadas y células oligodendrogliales, así como inmunoestimulador del cerebro (Nistico y De Sarro, 1991, Ciacci *et al.*, 1993, Taniguchi y Minami, 1993).

Como ya se indicó, esta citocina actúa sobre distintos tipos celulares y entre otras funciones ejerce un efecto de crecimiento autócrino y parácrino; es una determinante importante de la respuesta inmunológica, y puede estimular una segunda síntesis de IL-2 por células T activadas, su secreción ocurre cerca de las 24 horas después de la activación inicial. IL-2 también estimula la síntesis de otras citocinas derivadas de células T tales como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y las interleucinas IL-3, IL-6 e IL-15 (Maas *et al.*, 1993).

### **RECEPTOR DE IL-2 (RIL-2)**

Para que las citocinas puedan ejercer su función necesitan unirse a receptores de membrana, formados generalmente por varias subunidades glicoproteicas, que a menudo son compartidas por más de un receptor y cuya función es transmitir las señales de activación al interior celular (Regueiro y López, 1996). La acción de IL-2 es mediada por la unión no covalente de esta a su receptor (RIL-2)

---

---

El receptor pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento hematopoyéticos, es de naturaleza multimérica ya que está compuesto por tres proteínas: la primera de 55 KDa (p55), se presenta únicamente en células T activadas (Kaplan, 1991), y es por eso llamada antígeno Tac (del inglés *T activation*). El Tac p55 o cadena  $\alpha$  une IL-2 con baja afinidad, con  $K_d$  de aproximadamente  $10^{-8}$  M. La unión de IL-2 a células que expresan solamente p55 no genera respuesta biológica detectable. Se ha observado la producción de la cadena  $\alpha$ , después de la activación antigénica de los linfocitos T.

La segunda proteína que se une es identificada como una proteína de 70 a 75 KDa (p70 o p75) denominada cadena  $\beta$ , cuya afinidad de unión a IL-2 es de aproximadamente  $10^{-9}$  M y la tercera unidad es la cadena  $\gamma$  del receptor, la cual es una proteína de 64 KDa que al unirse con p55 y p75 pueden unir IL-2 con alta afinidad con una  $K_d$  de aproximadamente  $10^{-11}$  M (Landgraf *et al.*, 1992; McMillan *et al.*, 1995).

La expresión de diferentes combinaciones de esos tres componentes, genera varias formas del receptor para IL-2, cada una de las cuales manifiesta diferentes afinidades de enlace a la citocina (**Cuadro 1**), (Taniguchi y Minami, 1993) Sin embargo, se ha observado que es indispensable la presencia de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  para que se lleve a cabo la señalización, durante la cual el receptor funciona como un sustrato para cinasas de tirosina específicas o puede activar una cinasa de tirosina al enlazarse al dominio citoplasmático SH2 de la cadena  $\gamma$ . Se ha detectado la participación de la cinasa de tirosina p56<sup>lck</sup> (específica de células T y perteneciente a la familia src) durante la señalización de IL-2. Al mismo tiempo, se produce la activación de la cinasa Raf-1 específica de serina/treonina (Nakamura *et al.*, 1994)



**Cuadro 1.** Diferentes formas y afinidades del receptor para IL-2 (RIL-2) en base a la combinación de sus tres componentes (Taniguchi y Minami, 1993).

Subunidad (es)	Afinidad a IL-2 ( $K_d$ )
$\alpha$	$10^{-8}$ M
$\beta$	$10^{-7}$ M <sup>a</sup>
$\gamma$	No detectable <sup>a</sup>
$\alpha\beta$	$10^{-10}$ M <sup>o</sup>
$\alpha\gamma$	$10^{-8}$ M
$\beta\gamma$	$10^{-9}$ M
$\alpha\beta\gamma$	$10^{-11}$ M

<sup>o</sup> Determinada unicamente en fibroblastos transfectados con el cDNA.

## PRESENCIA DE RIL-2 EN CÉLULAS TUMORALES

Se ha detectado que el receptor para IL-2, no es exclusivo de células hematopoyéticas, como son linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos y granulocitos, ya que se ha observado en células de origen no linfoide (Hassuneh *et al.*, 1997) tanto normales en páncreas y fibroblastos de pulmón, como neoplásicas en líneas linfoides y en tumores sólidos humanos de pulmón, mama, colorectal y melanoma, lo cual indica que dichos receptores pueden permitir la internalización de la citocina (McMillan *et al.*, 1995). Se ha demostrado también, que las líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaCu), CALO e INBL presentan las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor para IL-2 y que en ambos casos son funcionales, debido a que responden ante el estímulo de IL-2 (Alvarado, 1997).

## EFFECTO DE IL-2 SOBRE CÉLULAS TUMORALES

Durante las últimas décadas, se han administrado productos naturales y sintéticos con el fin de aumentar la respuesta inmune normal, como interferones, interleucinas y factores de crecimiento hematopoyético, los cuales han mostrado beneficios clínicos sustanciales en infecciones virales crónicas y cáncer como sarcomas, linfosarcoma y melanoma (Kruth, 1998)

---

---

El control del crecimiento tumoral indudablemente debe involucrar un amplio espectro de funciones efectoras de naturaleza inmune o no inmune, sin embargo, aún no esta claramente establecido, cuales de estas funciones efectoras son controladas por citocinas (Terres y Coffman, 1998)

Varios grupos de investigadores se han dado a la tarea de determinar el efecto de las citocinas en el desarrollo de inmunidad anti-tumoral, para detectar el potencial terapéutico de esas moléculas. De esta manera, en trabajos realizados por Alvarado (1997), se sugiere de manera específica la dependencia de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL por IL-2, y que dichas líneas compiten por la citocina con los linfocitos de sangre periférica normal (LSP), estando estos últimos en desventaja, ya que las células tumorales requieren entre 5-10 UI/ml de IL-2 para proliferar *in vitro*, mientras que los LSP en las mismas condiciones necesitan 100 UI/ml de esta citocina. Es importante mencionar que las células tumorales en presencia de 100 UI/ml de IL-2 inhiben su proliferación (Alvarado, 1997).

## **INMUNOTERAPIA CON IL-2**

La aplicación de los productos recombinantes humanos comercialmente disponibles se ha visto limitada por sus elevados precios: aunque su aplicación ha tenido un impacto clínico significativo en desordenes fatales de perros y gatos (Khanna *et al.*, 1997(a)). La IL-2 ha sido utilizada sola o en combinación en la inmunoterapia adoptiva tanto en animales como en humanos para inducir regresión de tumores en estadios avanzados, y ha mostrado una modesta respuesta antitumoral, sin embargo, su aplicación vía sistémica perturba vías de regulación hematopoyética y puede provocar serios efectos secundarios, por lo cual su uso es limitado (Khanna *et al.*, 1997(b))

---

---

El CaCu no es un buen candidato para someterse a un tratamiento de inmunoterapia adoptiva, ya que para esto sería necesaria la administración vía sistémica de dosis elevadas de IL-2, las cuales llegan a tener efectos colaterales graves como: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas. Estudios previos sugieren que el mecanismo de esa toxicidad involucra la activación de células efectoras inmunes y la infiltración de linfocitos a tejidos sanos (Ardizzoni *et al.*, 1994; Heniford *et al.*, 1994; McFarlane *et al.*, 1995). En la actualidad se buscan nuevas alternativas para la liberación de esta citocina como son los liposomas o la terapia génica, para evitar sus efectos tóxicos y conservar o mejorar su acción antitumoral (Janssen *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1996; Kruth, 1998).

## LIPOSOMAS

En las últimas décadas, la tecnología farmacéutica ha diseñado pequeñas vesículas esféricas llamadas "liposomas", los cuales han cobrado gran interés debido a que los investigadores han demostrado que la encapsulación de fármacos en liposomas puede inducir al mejoramiento de la eficacia del fármaco, la reducción de su toxicidad y la prolongación del efecto terapéutico (Mayer *et al.*, 1989; Betageri, 1993; Frezard *et al.*, 1994; Litzinger *et al.*, 1994; Khanna *et al.*, 1997(a y b))

Los liposomas son dispersiones coloidales de moléculas lipídicas organizadas de forma esférica que encierran dentro de sus membrana fosfolipídicas compartimentos acuosos, presentan formas esféricas o ligeramente elongadas con diámetros de 20 a 200 nanómetros; se forman espontáneamente cuando una composición de fosfolípidos son colocados en un medio acuoso, y existen diversas técnicas para generar liposomas

---

---

(Vemuri *et al.*,1990). Los liposomas se clasifican en multilaminares, unilaminares pequeños o grandes, dependiendo de su tamaño y número de bicapas lipídicas alrededor del compartimento acuoso central. Pueden presentar diferentes cargas eléctricas superficiales dependiendo del tipo de lípido utilizado para su preparación (Shargel y Yu, 1993).

Los liposomas de uso más general son los liposomas multilaminares (VML, vesículas multilaminares), estos son preparados por hidratación de capas finas de lípido y por subsecuente agitación. Los liposomas pueden acarrear fármacos de diferentes maneras. Enlazándolos a su membrana, intercalándolos en la bicapa, disolviéndolos dentro de la bicapa, o atrapándolos en la fase acuosa; además pueden formar complejos iónicos o hidrofóbicos con ácidos nucleicos y otras macromoléculas sin fijarlas físicamente (Lasic, 1996).

---

---

La encapsulación liposomal de fármacos puede alterar dramáticamente la distribución y la tasa de liberación de los principios activos en el organismo, al mismo tiempo los protege contra la hidrólisis catalítica, como lo describen Habib y Rogers (1989) al encapsular una gran variedad de analgésicos locales. Las diferencias farmacocinéticas que provoca la encapsulación de fármacos en liposomas puede provocar que estos actúen en el órgano blanco, reduciendo la toxicidad y/o aumentando la eficacia del fármaco encapsulado, al mismo tiempo hace posible una mayor absorción del mismo. En la literatura se pueden encontrar informes sobre la reducción de la toxicidad de diversas drogas al ser encapsuladas en liposomas, por ejemplo, se ha logrado reducir la cardiotoxicidad de doxorubicina, la nefrotoxicidad de anfotericina B y los efectos secundarios de gentamicina, cisplatina, valinomicina, cloroquina, entre otras drogas (Crommelin *et al.*, 1990; Juliano y Daoud, 1990; Allen, 1994) Asimismo, han demostrado efectividad para encapsular y liberar antibióticos a células blanco específicas (Robinson *et al.*, 1998).

Debido al interés generado en los últimos años sobre la aplicación de los liposomas como acarreadores de drogas, los especialistas han diseñado nuevas vesículas con objetivos y blancos específicos; entre estos nuevos liposomas se pueden enlistar: liposomas estéricamente estabilizados, polimórficos (catiónicos y fusogénicos), inmunoliposomas, sensibles al pH y termosensibles, así como combinaciones de ellos ( Lasic y Papahadjopoulos, 1995; Dass *et al.*, 1997), todos ellos con el fin de llevar más eficientemente la sustancia encapsulada al sitio o célula donde es requerida.

---

---

Aunado a su utilidad como acarreadores de drogas, los liposomas han mostrado ser una alternativa eficiente en el campo de la terapia génica, ya que son capaces de introducir el ADN dentro de las células, en la actualidad hay gran expectativa sobre su uso (Brasseur *et al.*, 1991; Betageri, 1993). De esta manera, los liposomas se pueden considerar una excelente vía para la administración de citocinas como la IL-2 esperando reducir así su toxicidad en altas concentraciones y promover su capacidad antitumoral al activar al sistema inmune contra distintos tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma de cérvix

## CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO

El carcinoma de cérvix o cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la principal causa de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres mexicanas, así como entre las mujeres de otros países, como Australia y Cuba. Se ha observado que este tipo de carcinoma tiene un origen multifactorial, asociado principalmente al uso del tabaco, la multiparidad, el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, higiene genital deficiente, amplio número de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales y bajo consumo de vitamina C,  $\beta$ -carotenos y folatos (González *et al.*, 1995; Lazcano *et al.*, 1996; Lizano y García-Carranca, 1997, Bailie *et al.*, 1998).

El CaCu es una enfermedad progresiva que se inicia con lesiones denominadas displasias, que responden al tratamiento médico de primer nivel de atención en un 85% de los casos, las lesiones siguientes son los llamados condilomas, seguidos por una etapa de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), terminando con un carcinoma *in situ* y finalmente un cáncer invasor. Una vez que el cáncer inicia (cáncer *in situ*) le toma de 10 a 20 años para convertirse en cáncer invasor (Garrido *et al.*, 1993)

---

---

Se ha detectado que el CaCu está estrechamente asociado con una etiología viral (Ho *et al.*, 1995), en particular con el papillomavirus, el herpesvirus y en menor grado con el citomegalovirus. De más de 80 subtipos de Papillomavirus Humano (HPV), alrededor de 20 de ellos se asocian con infecciones genitales y su presencia sirve de diagnóstico de displasia cervical. Los subtipos HPV 16 y 18 se encuentran con mayor frecuencia y ambos inducen transformación de células epiteliales de cérvix a cáncer *in situ* y cáncer invasor (Bergeron *et al.*, 1992; Brinton, 1992; González *et al.*, 1995; Pontén *et al.*, 1995).

### **TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR**

La secuencia de eventos que constituyen la respuesta inmune pueden ser divididos en cinco etapas. 1) identificación y procesamiento del antígeno; 2) transferencia de información y activación de células efectoras; 3) diferenciación y proliferación de linfocitos; 4) síntesis y liberación de sustancias mediadoras; 5) respuesta del antígeno a mediadores, anticuerpos y células efectoras. (Warrens y Lechler, 1992) Cada una de estas etapas puede ser bloqueada selectivamente utilizando algún tipo de drogas, de manera que la respuesta inmune se vea disminuida o suprimida.

La respuesta inflamatoria es un proceso complejo, que abarca las etapas 3, 4 y 5 de la respuesta inmune, dicho proceso puede ser bloqueado por la administración de corticosteroides (desoxicorticosterona, cortisona, hidrocortisona, colesterol, prednisona, prednisolona, 6- $\alpha$ -metilprednisolona, 9- $\alpha$ -fluorocortisol, triamcinolona y dexametasona), los cuales inhiben la respuesta inflamatoria mediante el secuestro de linfocitos y monocitos en el

---

---

bazo, ganglios linfáticos y médula ósea; inhiben el procesamiento de antígenos por los macrófagos y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, disminuye la infiltración de leucocitos de la circulación a la zona inflamatoria, inhibe el reclutamiento de neutrófilos y de macrófagos-monocitos en el área afectada, disminuyen la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales capilares en áreas de inflamación, inhiben la formación del activador del plasminógeno por los neutrófilos, disminuyen la liberación de moléculas importantes en el proceso de inflamación como son prostaglandinas y leucotrienos, y disminuyen la capacidad de monocitos circulantes para destruir microorganismos (Clark *et al.*,1990; Goodman y Gilman,1990).

Dichos eventos pueden mantenerse hasta por 12 horas después de una sola dosis del corticosteroide. Estos fármacos son utilizados en la práctica clínica para alterar las interacciones hésped-parásito, suprimir la fiebre y disminuir la inflamación (Velasco *et al.*, 1993, Regueiro y López, 1996).



---

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El carcinoma de cérvix (CaCu) se ha convertido en un grave problema de salud pública en nuestro país debido a su elevada incidencia, la cual ha causado más de 4000 muertes anuales, convirtiéndose así en la principal causa de muerte por neoplasias malignas entre la población femenina, principalmente en aquella de bajos recursos, en quienes, a pesar de las campañas de detección oportuna, el diagnóstico se realiza con alta frecuencia en estadios avanzados (Rosenberg, 1990; Lazcano *et al.*, 1996), por ello resulta necesario ampliar la cobertura de los programas nacionales de prevención y detección oportuna y del mismo modo, resulta indispensable continuar con la investigación exhaustiva que permita conocer los mecanismos de escape inmunológico de este tipo de células y proponer nuevas terapias para su tratamiento. Se ha observado que pacientes con tres o más tipos de cáncer como melanomas malignos, cáncer de riñón y de colon han mejorado con la administración de IL-2. Por otro lado, hasta el momento se ha observado que las líneas celulares de CaCu: CALO e INBL inhiben su proliferación en presencia de elevadas concentraciones de IL-2 exógena; por esta razón, con el presente trabajo se pretende confirmar *in vivo* que la IL-2 encapsulada en liposomas, puede promover la regresión de tumores de CaCu al aplicarla en ratones con tumores inducidos, de esta forma se podría diseñar una alternativa terapéutica para el tratamiento de las pacientes con dicha enfermedad.

---

---

## HIPÓTESIS

Se ha demostrado que las líneas celulares de carcinoma de cérvix, CALO e INBL presentan las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor para IL-2 y se ha detectado la endocitosis del complejo receptor/ligando. En ambos casos se observa que la proliferación celular se ve inhibida en presencia de 100 UI/ml de IL-2. Sin embargo, se sabe que la administración de dosis elevadas de IL-2 vía sistémica puede tener efectos muy tóxicos en el organismo. Por otro lado, se ha comprobado que los liposomas son un medio eficiente para el transporte de sustancias y fármacos ya que reducen su toxicidad *in vivo*. En consecuencia se espera que al administrar IL-2 encapsulada en liposomas en tumores de CaCu *in situ*, se logre la regresión del tumor y se reduzca la toxicidad de la citocina.

---

---

## OBJETIVOS

### GENERAL :

Promover la regresión de tumores de CaCu inducidos en ratones CBA administrando IL-2 encapsulada en liposomas

### PARTICULARES :

1. Obtener IL-2 del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub>
2. Encapsular IL-2 en liposomas positivos
3. Evaluar *in vitro* el efecto de IL-2 encapsulada en liposomas sobre cultivos de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL.
4. Inducir tumores en ratones de la cepa CBA y F1 con células de las líneas de CaCu, CALO e INBL.
5. Comprobar la naturaleza de los tumores inducidos en ratones por medio de análisis inmunohistoquímico.
6. Administrar IL-2 encapsulada en liposomas a ratones CBA y F1 con CaCu inducido.
7. Evaluar la masa tumoral en ratones tratados y no tratados con IL-2 encapsulada.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consistió en líneas celulares de carcinoma de cérvix, una línea celular fuente de IL-2 y ratones de laboratorio. Las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL son de estadio clínico IIB y IVB, respectivamente, obtenidas de la reserva criopreservada en el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Zaragoza), UNAM. Como fuente de IL-2 se utilizó la línea celular de fibroblastos humanos C63 transfectada con el gene para sintetizar IL-2, obtenida de la reserva criopreservada en el Laboratorio de Oncología de la UIDCC de la FES-Zaragoza, UNAM.

Las líneas celulares se cultivaron en medio líquido RPMI-1640 (Apéndice I) (Sigma, USA) suplementado con 10% SFB (v/v) adicionado con antibióticos e inactivado (HyClone, USA)(Apéndice II). Los cultivos se mantuvieron en incubadora (Form Scientific, USA) a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad. La densidad de las células tumorales fué determinada en cámara de Neubauer (American Optical, USA) y su viabilidad fué evaluada por exclusión con azul de tripano (Sigma, USA) (Apéndice III).

---

---

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones de la cepa CBA así como ratones singénicos F1, obtenidos a partir de la cruce de las cepas homocigóticas machos BALB-C y hembras Black/C-57 ( donados por la Dra Martha Legorreta, del laboratorio de Inmunología de la FES-Zaragoza, UNAM), ambas mantenidas en el Bioterio de Ratones de la FES-Zaragoza, UNAM, bajo condiciones ambientales de esterilidad, con periodos de día y noche controlados y libre demanda de alimento y agua.

### **OBTENCIÓN DE IL-2**

Para obtener IL-2 en el medio condicionado de la línea C63 transfectada con el gene para sintetizar IL-2, las células se cultivaron durante 7 días en medio RPMI-1640 en presencia de 20% de SFB, al finalizar este periodo se colectó el medio condicionado y se centrifugó a 1000 rpm durante 30 minutos para eliminar células y desechos, el medio condicionado se hizo pasar inicialmente por una membrana de 30 kDa y posteriormente se concentró al vacío hasta sequedad. El medio condicionado concentrado (mcc) se disolvió en una cantidad mínima de PBS 1X (Phosphate Buffer Solution) (**Apéndice IV**), se colocó en membrana de diálisis de 6-8 kDa (Spectrum Medical, USA) y se mantuvo durante 48 horas en una solución PBS 1X Finalmente el mcc se hizo pasar a través de una membrana de 0.22µm y se calculó el número de veces concentrado, a partir del volumen inicial y volumen final. Se mantuvo en congelación a -4°C hasta evaluar su actividad por medio de la estimulación de LSP y posteriormente encapsularlo en liposomas positivos

---

---

## **AISLAMIENTO Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA (LSP)**

Para verificar la actividad biológica de la citocina obtenida a partir del mcc, se obtuvieron 10 ml de sangre periférica humana de donadores normales, mediante jeringa conteniendo 0.1ml de heparina a una concentración de 1000 UI/ml (Rickerab/NCB, USA). La sangre fue centrifugada durante 10 min a 500 g, enseguida se aisló con pipeteo suave la capa correspondiente al suero, se les adicionó un volumen semejante de medio RPMI-1640 y fueron centrifugados nuevamente a 500g durante 10 min, después de desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en RPMI-1640 nuevamente, se separaron alícuotas de 5ml en tubos conteniendo 2.5ml de Ficoll Hypaque (Microlab, México) de 1.077 de densidad y se centrifugaron durante 30 min a 1000g, al finalizar este periodo se logró la separación de tres bandas, las células mononucleadas se aislaron por pipeteo suave de la interfase entre el paquete de eritrocitos y el medio RPMI-1640. Los linfocitos así obtenidos se lavaron tres veces con medio RPMI-1640 mediante centrifugación a 60g durante 10 min. Finalmente se colocaron en cajas Petri con capacidad de 3 ml con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y se activaron con 100UI/ml de Interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2) (Sigma, USA) y con el mcc de la línea C63, después de 7 días de cultivo se evaluó su proliferación por medio de la técnica colorimétrica de MTT.

## **ENSAYO DE MTT PARA EVALUAR PROLIFERACIÓN CELULAR**

La técnica colorimétrica de MTT(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), se utilizó para evaluar tanto la proliferación de LSP como de las líneas celulares de CaCu (Alvarado, 1997) La técnica consiste en sembrar células viables, después de 7 días de cultivo se desecha

---

---

el sobrenadante y las células se incuban durante 3-4.5 hrs con 50  $\mu$ l MTT(5 $\mu$ g/ml) El reactivo enzimáticamente reducido de color amarillo a formazán, por las células vivas, se extrae con 200  $\mu$ l de isopropanol, que disuelve los cristales de formazán. Las placas se agitan ligeramente durante 5 minutos, y posteriormente se procede a leer la solución obtenida a una absorbencia de 570 nm en lector para placas de ELISA (BIO-TEK, Instruments, Inc.USA).

### PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS POSITIVOS

Los liposomas se prepararon a partir de una modificación de la técnica de Szoka (Szoka y Papahadjopoulos, 1978), los componentes fueron los fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC) y una mezcla de espermidin-colesterol 1:1 (Esp-Ch) (5:5) (donados por el Dr. Miguel Ibañez, del Lab. de Biomembranas, ENCB-IPN), dichos componentes le otorgan carga positiva a las membranas de las vesículas que se generan. La preparación de los liposomas consiste en disolver perfectamente 5 $\mu$ mol de ambos lípidos en 1ml de cloroformo puro, bajo condiciones de esterilidad; posteriormente con ayuda de una bomba de aire estéril el cloroformo es evaporado hasta sequedad. Para la preparación de los liposomas vacíos, la capa de lípido formada en el fondo del tubo se resuspende en medio de cultivo Iscove's (Gibco, USA), enseguida en un sonicador (Laboratory Supplies, Co., USA) se provoca la formación de los liposomas mediante 2 ciclos de 5 segundos, separados por 30 segundos cada ciclo y finalmente se afora con el mismo medio de cultivo y se mantienen a 4°C, hasta su utilización, la cual no debe pasar de 7 días, para evitar su degradación por hidrólisis y oxidación (Zuidam *et al.*, 1995).

---

---

## ENCAPSULACIÓN DE IL-2 EN LIPOSOMAS POSITIVOS

Para la preparación de los liposomas con IL-2, se agregó a la capa de lípido formada después de la evaporación del cloroformo, una cantidad de IL-2 (obtenida del mcc de la línea C<sub>63</sub>) equivalente a 80 UI/ml y se utilizó el sonicador de la misma manera que en el caso de los liposomas vacíos. Finalmente, los liposomas con IL-2 encapsulada son "lavados" sometiéndolos a un ciclo de centrifugación de 45 minutos a 40 000 rpm, para eliminar toda la citocina que no fue encapsulada. El sobrenadante se desecha y el sedimento, que son los liposomas con IL-2 encapsulada se resuspendió en medio de cultivo Iscove's (HyClone, USA) y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización, que no debe realizarse después de 7 días.

## DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD ÓPTIMA DE LÍPIDO

Con el fin de minimizar la intervención del lípido al evaluar el efecto de la citocina sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCu, se estableció un experimento utilizando la línea CALO. En placas de 96 pozos de fondo plano (Nuncclon, USA) se sembraron  $5 \times 10^3$  células/pozo con 200  $\mu$ l de medio RPMI-1640/10% SFB, se estimularon durante 1 hora con IL-2 encapsulada en liposomas positivos en concentraciones de 10 u 80 UI/ml, variando la cantidad de lípido a 5, 15, 30 o 60  $\mu$ g de lípido/ml. Se evaluó la proliferación celular por medio de la técnica de MTT, cada 24 horas durante 5 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se elaboraron las gráficas correspondientes.



---

---

## PROLIFERACIÓN CELULAR DE CALO E INBL EN PRESENCIA DE IL-2 ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS

Para determinar el efecto de IL-2 encapsulada en liposomas, se establecieron cultivos de ambas líneas celulares de CaCu, CALO e INBL cuando estuvieron en fase exponencial se sembraron  $5 \times 10^3$  células/pozo en placas de 96 pozos de fondo plano con 200  $\mu$ l de medio RPMI-1640/10% SFB y se estimularon durante 1 hora con liposomas vacíos o 10UI/ml de IL-2 u 80UI/ml de IL-2 encapsulada. Se evaluó la proliferación celular por medio de la técnica de MTT, cada 24 horas durante 5 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se elaboraron las gráficas correspondientes.

## INDUCCIÓN DE TUMORES DE CaCu EN RATONES

Se establecieron cultivos de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL en medio RPMI-1640/10% SFB, cuando estuvieron en fase exponencial se despegaron de las cajas de cultivo con verseno (Apéndice V) y se resuspendieron  $7-8 \times 10^6$  células en 0.5 ml de medio RPMI-1640, por cada ratón a tratar. La suspensión de células se inyectó de inmediato a los ratones de forma intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.) en el área abdominal cercana a las patas traseras. Después de la inyección de las células los ratones continuaron en sus jaulas con libre demanda de alimento y agua durante 15-20 días.

Algunos ratones fueron inmunodeprimidos antes de la inyección de células tumorales administrando cada 48 horas hasta 5 o 6 ocasiones, dosis de 3mg de hidrocortisona (i.p.) (Weissman *et al.*, 1985) y después de la inyección de las células la misma dosis cada 48 horas durante los 15-20 días. 9 ratones fueron inmunodeprimidos solo antes de la inyección de células, 4 ratones fueron inmunodeprimidos antes y después de la inyección

---

---

y 9 no fueron inmunodeprimidos. Al final de este periodo, los ratones fueron sacrificados por asfixia con cloroformo o dislocación craneal (Vogel y Vogel, 1997). Se realizó la disección del área abdominal y se buscaron los tumores dentro y fuera de la cavidad peritoneal. Se tomó el diámetro de cada tumor con ayuda de un calibrador y se estimó el volumen tumoral mediante la fórmula:  $4/3 \pi r^3$ , donde  $r$  es el radio del tumor (Khanna *et al.*, 1997b). Cada tumor fue colocado por separado en solución Bouin para su posterior inclusión en parafina (Apéndice VI), corte histológico e identificación inmunohistoquímica.

## IDENTIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORES INDUCIDOS

Los tumores incluidos en parafina, con ayuda de la Dra. Patricia Rosas (Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la FES-Zaragoza, UNAM) fueron cortados a  $5\mu\text{m}$  y colocados en portaobjetos para realizar el análisis inmunohistoquímico, el cual consistió en identificar su naturaleza maligna por la presencia de citoqueratinas, un tipo especial de filamentos intermedios pertenecientes al citoesqueleto celular predominantes en tumores primarios y metastásicos de tipo epitelial (Rangel *et al.*, 1994) Se utilizó un sistema de detección de avidina-biotina-inmunoperoxidasa (Vector Laboratories, Inc. USA), con el anticuerpo monoclonal primario anti-citoqueratinas Kg 8.13 ( Dakoparts) (Apéndice VII)

---

---

## EFFECTO DE IL-2 ENCAPSULADA SOBRE TUMORES INDUCIDOS

Una vez transcurrido el periodo de tiempo necesario para el establecimiento del tumor de CaCu en los ratones, se les administró por vía intra peritoneal (i p.) una dosis de 300µl de liposomas vacíos, 80UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas o PBS, cada 48 horas en tres ocasiones. Los ratones se sacrificaron 2 días después de la última dosis por asfixia con cloroformo, enseguida se realizó la disección en el área abdominal y se buscaron y extrajeron los tumores; se estimó el volumen tumoral por ratón y finalmente se realizó el análisis de resultados

### ANÁLISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados *in vitro* fueron sometidos a un análisis de varianza de un factor en el diseño completamente aleatorio (ANDEVA) con el fin de contrastar las medias poblacionales correspondientes a cada tratamiento evaluado. Se utilizó un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , para determinar la diferencia entre tratamientos (Apéndice VIII) (Marques, 1991).

---

---

## RESULTADOS

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL MEDIO CONDICIONADO DE LA LÍNEA C63

La línea celular C63 es una fuente de Interleucina-2, ya que dicha línea ha sido transfectada con el gen responsable de la síntesis de esta proteína. Para el desarrollo del presente trabajo se establecieron cultivos de esta línea celular, el medio condicionado fue colectado después de 7 días de cultivo, se concentró y filtró, obteniéndose un total de 50ml de medio condicionado concentrado 38 veces. Por ensayo de proliferación con LSP y en presencia de un control positivo de 100UI/ml de IL-2 recombinante humana, se determinó una actividad del medio filtrado de 2 400 UI/ml. El medio se mantuvo en congelación a -4°C hasta realizar su encapsulación en liposomas positivos.

### DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD ÓPTIMA DE LÍPIDO

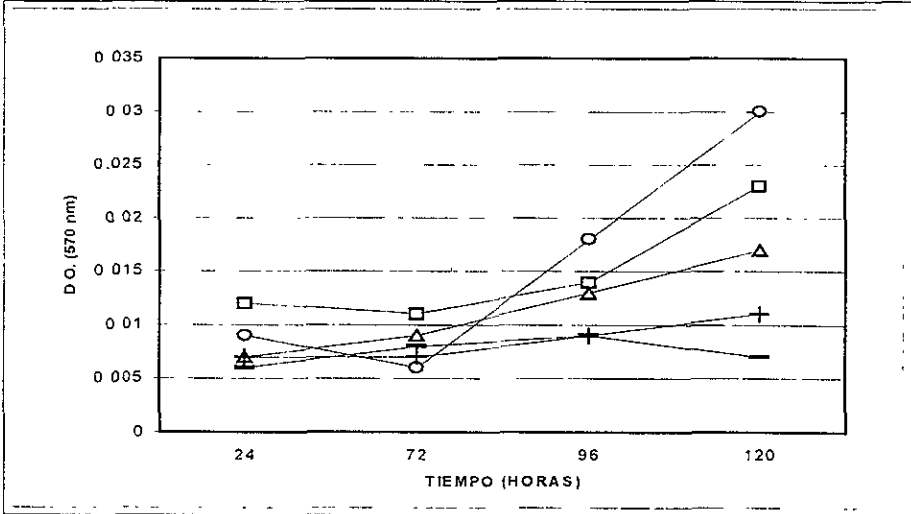
Los liposomas son un sistema acarreador y liberador de drogas muy versátil, sin embargo para asegurar que la respuesta observada en las líneas celulares de CaCu es dada por la acción de IL-2 más que por la presencia del lípido, se evaluó el efecto de diferentes cantidades de lípido con la misma concentración de citocina dentro del liposoma.

---

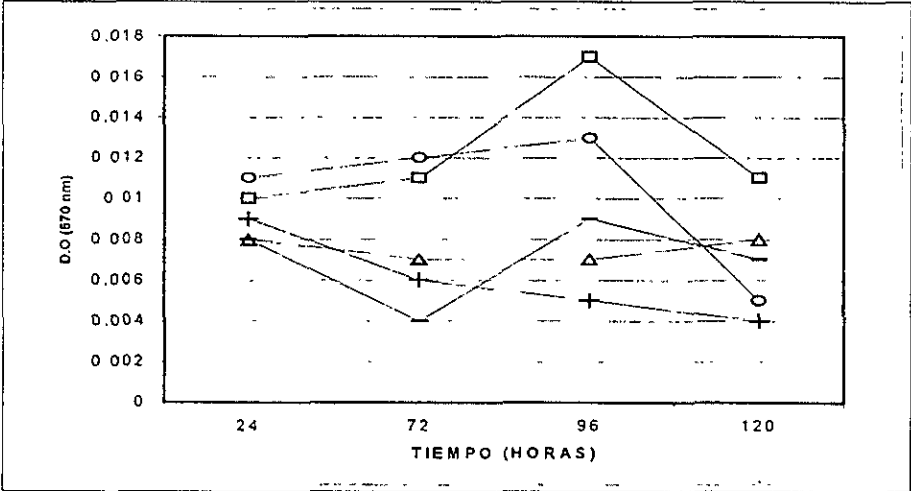
---

Para este ensayo se uso la línea celular CALO en presencia de 10 y 80 UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas y utilizando diferentes cantidades de lípido. La evaluación de la proliferación se realizó cada 24 horas durante 5 días. Los resultados muestran que al utilizar 10 UI/ml y una cantidad mayor a 15  $\mu\text{g/ml}$  de lípido, el efecto es una inhibición de la proliferación celular, mientras que al utilizar 5 y 15  $\mu\text{g/ml}$  de lípido, se obtiene un efecto proliferador, semejante al obtenido por Alvarado (1997) (Gráfica 1)

Por otro lado, en cuanto al efecto de 80UI/ml de IL-2 encapsulada, los resultados muestran que al utilizar 5  $\mu\text{g/ml}$  de lípido el efecto inhibitor de la proliferación se ve reducido con respecto al efecto observado con la citocina libre. En cuanto al uso de 15, 30 y 60  $\mu\text{g/ml}$ , el efecto inhibitor de la proliferación celular es semejante al que produce la citocina libre (Gráfica 2).



Gráfica. 1. Cultivos de la línea CALO fueron estimulados durante 1 hora con 10UI/ml de IL-2 (○), 10UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas positivos utilizando 5(□), 15(Δ), 30(+), y 60(-)µg de lípido. La evaluación se realizó cada 24 horas durante 5 días por medio de la técnica de MTT. Ninguno de los tratamientos presenta diferencia significativa,  $\alpha=0.05$



Gráfica. 2. Cultivos de la línea CALO fueron estimulados durante 1 hora con 80UI/ml de IL-2 (○), 80UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas positivos utilizando 5(□), 15(Δ), 30(+), y 60(-)µg de lípido. La evaluación se realizó cada 24 horas durante 5 días por medio de la técnica de MTT. Ninguno de los tratamientos presenta diferencia significativa,  $\alpha=0.05$ .

---

---

## EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES CALO E INBL EN PRESENCIA DE IL-2 ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS POSITIVOS

Recientemente se observó que al estimular cultivos de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL con 10UI/ml el resultado es una inducción a la proliferación, mientras que en concentración de 100 UI/ml la proliferación se ve inhibida a los 4 días de cultivo (Alvarado, 1997). Tomando en consideración estos resultados, se planteó el objetivo de determinar la posible aplicación terapéutica de altas concentraciones de IL-2 encapsulada en liposomas positivos, de manera que se lograra la regresión del tumor y se disminuyeran los efectos tóxicos o secundarios de la citocina.

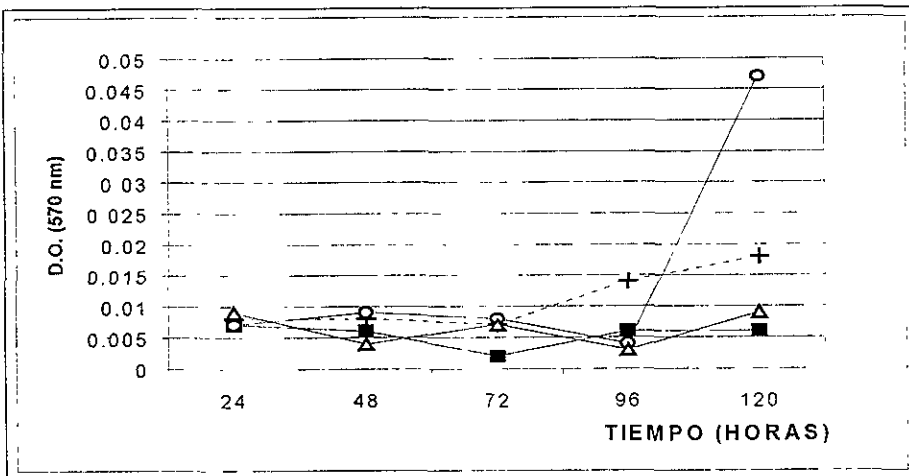
Una vez que determinamos que la cantidad óptima de lípido que almacene IL-2 y conserve la actividad antiproliferativa de la citocina es 15  $\mu\text{g/ml}$ , se estimularon cultivos celulares de las líneas CALO e INBL para comprobar que la citocina encapsulada en liposomas conserva aún su efecto inhibidor o estimulador de la proliferación. Se evaluaron ambas concentraciones, una baja de 10UI/ml con 15 $\mu\text{g/ml}$  de lípido y una elevada de 80UI/ml con 15  $\mu\text{g/ml}$  (Gráficas 3 y 4).

---

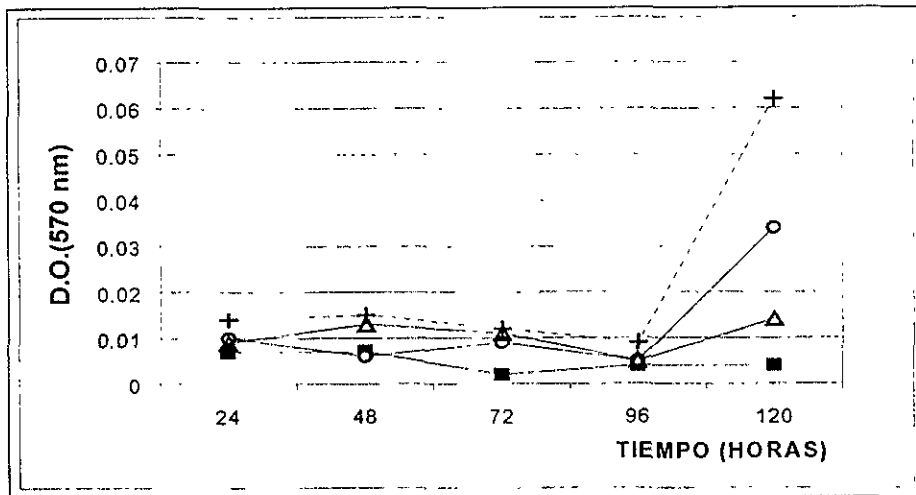
---

Los resultados indican que el efecto proliferador de 10UI/ml de IL-2 encapsulada sobre los cultivos celulares de las líneas CALO e INBL se conserva aún encapsulada en liposomas, llegando a superar el efecto de la citocina en forma libre a las 120 horas, en el caso de la línea CALO, mientras que la línea INBL presenta sensibilidad a los liposomas, por lo cual su proliferación no alcanza a superar la de las células estimuladas con la citocina libre. Por otro lado, al estimular con 80UI/ml de IL-2 encapsulada se observa una menor proliferación en ambas líneas celulares en comparación con las células no estimuladas y las estimuladas con 10UI/ml de IL-2 encapsulada. Asimismo, nuestros resultados muestran que existe inhibición de la proliferación de ambas líneas celulares en presencia de liposomas vacíos de manera similar al efecto de IL-2 encapsulada (**Gráficas 3 y 4**)





**Gráfica. 3.** Cultivos de  $5 \times 10^3$  células de la línea CALO estimulados durante 1 hora con liposomas positivos vacíos (■), 10UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas(○) y 80UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas (Δ), utilizando 15µg de lipido en ambos casos. Células no estimuladas(+). La evaluación se realizó cada 24 horas durante 5 días por medio de la técnica de MTT. Ninguno de los tratamientos presenta diferencia significativa,  $\alpha=0.05$ .



**Gráfica. 4.** Cultivos de  $5 \times 10^3$  células de la línea INBL estimulados durante 1 hora con liposomas positivos vacíos (■), 10UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas(○) y 80UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas (Δ), utilizando 15µg de lipido en ambos casos. Células no estimuladas(+). La evaluación se realizó cada 24 horas durante 5 días por medio de la técnica de MTT. Ninguno de los tratamientos presenta diferencia significativa,  $\alpha=0.05$ .

---

---

## INDUCCIÓN DE TUMORES DE CaCu EN RATONES CBA Y F1

La aplicación de nuevas alternativas terapéuticas implica una exhaustiva evaluación previa, sobre modelos *in vitro* e *in vivo* antes de ser aplicada a nivel clínico. Para ello, el uso de ratones como modelo *in vivo* es ampliamente utilizado. Con el objetivo de obtener un modelo de CaCu y corroborar el efecto observado *in vitro* de 80UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas positivos, se evaluaron diversos métodos de inducción de tumores de CaCu a partir de la inyección intraperitoneal (i p ) o subcutánea (s c.) de células de las líneas CALO e INBL en ratones de las cepas CBA y F1

Inicialmente se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa CBA mantenidos bajo condiciones ambientales normales, los ratones se inocularon vía i p con  $1.5 \times 10^6$  células tumorales, después de 15 días fueron sacrificados y revisados para localizar masas tumorales; ningún tipo de crecimiento tumoral fue observado. Dados los resultados, se decidió utilizar ratones mantenidos en bioterio bajo condiciones ambientales estériles, animales que se caracterizan por tener una capacidad de respuesta inmunológica reducida en comparación con los ratones mantenidos bajo condiciones ambientales normales. Esta baja respuesta inmunológica se debe a que los animales son mantenidos libres de patógenos en una área estéril, la cual puede permitir la generación del tumor.

En los ensayos posteriores se utilizaron animales bajo condiciones ambientales de esterilidad con una dosis de células tumorales de  $7.8 \times 10^6$  células por ratón, los cuales fueron previamente inmunodeprimidos. La inmunosupresión se realizó siguiendo dos protocolos:

---

---

I Inmunosupresión con hidrocortisona antes y después de la inyección de las células tumorales.

II Inmunosupresión con hidrocortisona sólo antes de la inyección de las células tumorales.

Los resultados obtenidos muestran que se logró inducir la formación de tumores de CaCu en ratones de la cepa CBA al aplicar ambos tratamientos de inmunosupresión e incluso en los ratones no inmunodeprimidos. Las hembras de esta cepa presentaron la mayor carga tumoral al ser inmunodeprimidas antes y después de la inyección intraperitoneal de células tumorales de la línea INBL. Por otro lado, los ratones de la cepa F1 resultaron más difíciles de manejar y presentaron una carga tumoral inferior a la observada en los ratones de la cepa CBA. Los ratones F1 presentaron el mayor volumen tumoral sin haber sido inmunodeprimidos y al inyectarles las células en forma subcutánea (Tabla 1)

Ensayo	No. de ratones	Cepa	Sexo	Linea tumoral	Inmuno $\Downarrow^a$	Inmuno $\Downarrow^d$	T X Ratón	CT X Ratón (mm <sup>3</sup> )	Vía
1†	4	CBA	H,M	C,I	-	-	Ø	Ø	i.p
2	6	CBA	H,M	C	-	-	1	33.5	i.p.
				I	-	-	1	14.1	
				C	✓	-	1	1.7	
				I	✓	-	2	47.6	
				C	✓	✓	1	33.5	
I	✓	✓	1	179.5					
3	4	CBA	H	C,I	✓	-	1	1.7	s.c
4	4	F1	M	I	-	-	1	0.5	i.p
				I	✓	-	1	4.1	
				I	✓	✓	Ø	Ø	
5	4	F1	M	I	-	-	1	22.4	s.c
				I	✓	-	Ø	Ø	

Tabla 1. Inducción de tumores en las cepas CBA y F1. Se inocularon con  $7-8 \times 10^6$  células C:CALO o I:INBL, vía i.p.:intraperitoneal o s.c.:subcutánea; resuspendidas en 0.5ml de medio RPMI-1640. H:hembras,M:machos; Inmuno  $\Downarrow^a$ : se inmunodeprimieron antes de inyectar las células tumorales con dosis de 3mg de hidrocortisona cada 48 horas 5 ocasiones. Inmuno  $\Downarrow^d$ : se inmunodeprimieron después de inyectar las células tumorales con dosis de 3mg de hidrocortisona cada 48 horas durante 15-20 días. Los ratones se sacrificaron 15-20 días después de la inoculación de las células y se determino T x ratón: número de tumores promedio por ratón; CT X ratón:Carga tumoral promedio por ratón, a partir de la suma de la carga tumoral por ratón entre el número de ratones por tratamiento; Ø:no se detectó tumor.

†: Sin condiciones ambientales de esterilidad.

---

---

## IDENTIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORES INDUCIDOS

Los tumores obtenidos de los ratones CBA inoculados con células CALO o INBL fueron incluidos en parafina, se cortaron en secciones de 5µm y se colocaron en portaobjetos. La evaluación inmunohistoquímica consistió en aplicar una técnica de tinción con inmunoperoxidasa indirecta con el anticuerpo monoclonal Kg 8.13, el cual muestra gran reactividad en presencia de citoqueratinas del tipo 13 características de epitelios de naturaleza maligna, asimismo se utilizó el anticuerpo anti CD3 para identificar la presencia de linfocitos infiltrados en el tumor

El análisis bajo el microscopio de las secciones tumorales muestra reactividad positiva para citoqueratinas del tipo 13, lo cual nos indica su naturaleza maligna (Moll *et al.*,1982; Rangel *et al.*,1994) Sin embargo, la positividad fue mayor en las secciones obtenidas de tumores inducidos con células INBL (en la mayoría de las células observadas) que en las secciones obtenidas de tumores inducidos con células CALO (más de la mitad de las células observadas) (**Figura 2, A y B**)

Por otro lado, la presencia de linfocitos infiltrados en el tumor fue escasa al inocular células CALO (**Figura 32, A y B**) En el caso de los tumores generados a partir de células INBL se observa una tinción mayor, lo cual indica la presencia de linfocitos infiltrados

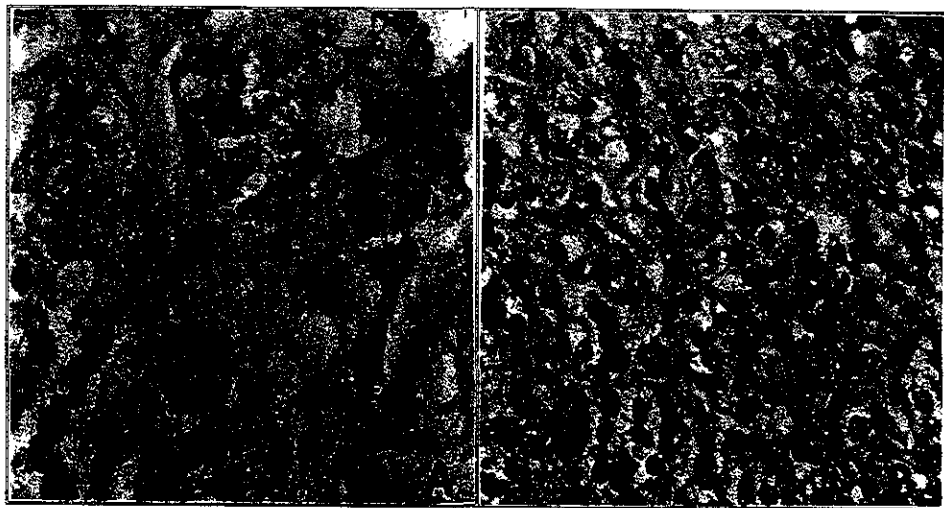


Figura 2 . Presencia de citoqueratinas en secciones tumorales de ratones tratados con  $7-8 \times 10^6$  células CALO (A) o INBL (B). Las secciones fueron teñidas con un kit de inmunoperoxidasa usando el anticuerpo monoclonal anti-citoqueratinas Kg. 8.13. Se observa reactividad positiva en ambos casos, mayor al inocular células INBL (400x).

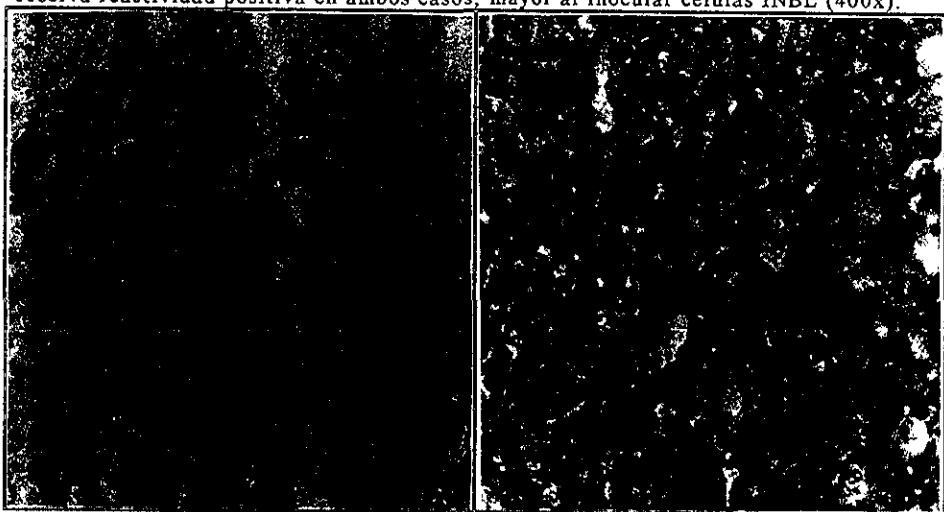


Figura 3. Presencia de linfocitos T infiltrados en secciones tumorales de ratones tratados con  $7-8 \times 10^6$  células CALO (A) o INBL (B). Las secciones fueron teñidas con un kit de inmunoperoxidasa usando el anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los linfocitos infiltrados son escasos al inocular células CALO, mientras que con INBL se observa una mayor presencia (400x)

## EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE TUMORES INDUCIDOS EN RATONES AL ADMINISTRAR IL-2 ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS

Una vez que se logró comprobar que 80UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas positivos mantiene su capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales de las líneas CALO e INBL y se logró inducir tumores en ratones utilizando estas mismas líneas, se procedió a evaluar el efecto de la citocina encapsulada sobre el modelo *in vivo*.

Se utilizaron 9 ratones de la cepa CBA inmunodeprimidos y no inmunodeprimidos e inoculados con  $8 \times 10^6$  células por ratón de la línea INBL, siguiendo el protocolo que se muestra en la **Tabla 2**.

TRATAMIENTO	Inmuno $\downarrow^a$	Inmuno $\downarrow^d$	CLAVE
PBS	-	-	I+PBS
Liposomas vacíos	-	-	I+L-v
IL-2 en liposomas en 80UI/ml	-	-	I+L-IL-2
PBS	✓	-	H+I+PBS
Liposomas vacíos	✓	-	H+I+L-v
IL-2 en liposomas en 80UI/ml	✓	-	H+I+L-IL-2
PBS	✓	✓	H+I+H+PBS
Liposomas vacíos	✓	✓	H+I+H+L-v
IL-2 en liposomas en 80UI/ml	✓	✓	H+I+H+L-IL-2

**Tabla 2.** Tratamiento de ratones hembras CBA inoculados con  $8 \times 10^6$  células INBL en 0.5 ml de medio RPMI-1640 via i.p. Fueron tratados con 300µl de PBS, Liposomas vacíos u 80UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas.

**Inmuno $\downarrow^a$ :** inmunodeprimidos antes de la inyección de las células con 5 dosis de 3mg de hidrocortisona i.p. cada 48 horas.

**Inmuno $\downarrow^d$ :** Se inmunodeprimieron después de la inyección de las células tumorales con dosis de 3mg de hidrocortisona i.p. cada 48 horas durante 20 días.

---

---

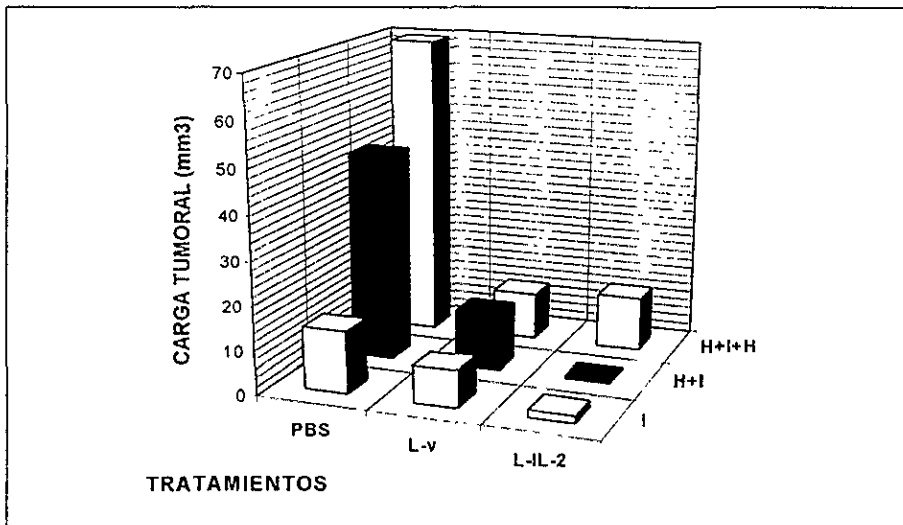
Después de 20 días de la inoculación de las células tumorales se administraron los tratamientos que consistieron en la inyección i.p. de 300µl de liposomas positivos vacíos, 80UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas y 300 µl de PBS, durante los días 20, 22 y 24 después de inocular las células tumorales a los 30 días se sacrificaron todos los animales, se registró el número y volumen de los tumores en cada ratón y se determinó la carga tumoral por ratón (**Tabla 3**).

Se observa que al administrar IL-2 encapsulada en liposomas y liposomas vacíos, el efecto sobre el crecimiento del tumor es semejante, ambos logran reducir considerablemente la carga tumoral en ratones inmunodeprimidos y no inmunodeprimidos. Sin embargo, la reducción es más notable cuando se administra la citocina encapsulada y se inmunodeprimen sólo antes de la inyección de las células tumorales (**Gráfica 5, Figura 4**).



Tratamiento	No. de tumores por ratón	Vol. de cada tumor (mm <sup>3</sup> )	Carga Tumoral Total por ratón (mm <sup>3</sup> )
I+PBS	1	14.14	14.14
I+L-v	2	4.18,4.18	8.36
I+L-IL-2	4	0.52,0.52,0.52,0.06	1.62
H+I+PBS	2	14.14,33.51	47.65
H+I+L-v	5	4.18,4.18,4.18,0.52,0.06	13.12
H+I+L-IL-2	3	0.52,0.06,0.06	0.65
H+I+H+PBS	2	65.45,4.18	69.63
H+I+H+L-v	4	4.85,4.85,0.52,0.52	10.74
H+I+H+L-IL-2	2	8.18,4.18	12.36

Tabla 3. Carga tumoral total por cada tratamiento. El volumen tumoral se estimó a partir de la fórmula  $\frac{4}{3}\pi r^3$ , donde r: radio del tumor en mm, se utilizó un ratón por cada tratamiento. Se observa menor carga tumoral en los tratamientos con IL-2 encapsulada en liposomas y con liposomas vacíos.



Gráfica 5. Carga Tumoral total en cada tratamiento. El volumen tumoral se estimó a partir de la fórmula  $\frac{4}{3}\pi r^3$ , donde r: radio del tumor en mm. Se observa una reducción tumoral al aplicar los tratamientos con IL-2 encapsulada en liposomas y con liposomas vacíos.

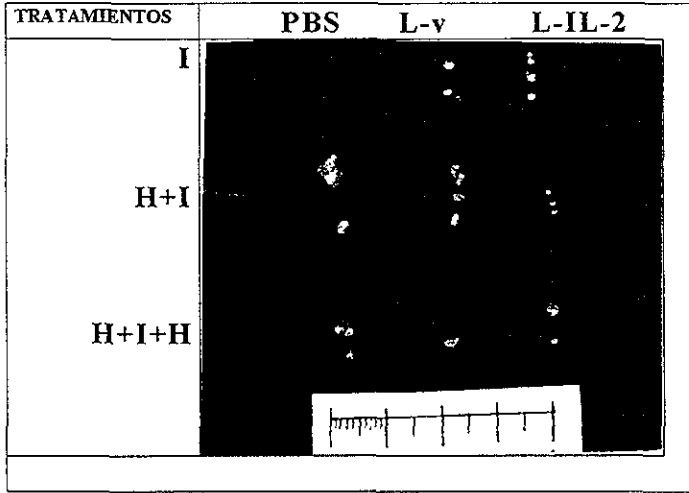


Figura 4. Tumores inducidos en ratones CBA por la administración de  $8 \times 10^6$  células INBL(I) en 0.5 ml de medio RPMI-1640 vía i.p. Fueron tratados con PBS, Liposomas vacíos(L-v) o IL-2 encapsulada en liposomas positivos (L-IL-2), e inmunodeprimidos(H) como se indica en Tabla 2.

---

---

## DISCUSION DE RESULTADOS

Los efectos inmunológicos de la interleucina 2 (IL-2) sobre la proliferación y producción de citocinas por los linfocitos T, B, monocitos y células NK han sido ampliamente estudiados, dichos efectos son mediados por la unión de la proteína a su receptor membranal en estas células. La principal función de la IL-2 es la inducción de la proliferación de linfocitos T activados y asimismo, promueve que estos linfocitos T activados produzcan y liberen otras citocinas como  $INF\gamma$ , factores de crecimiento y diferenciación de células B como IL-4, IL-6 y factores de crecimiento hematopoyético: IL-3, IL-5 y GM-CSF. Las células activadas por IL-2 también aumentan su citotoxicidad, adicionalmente IL-2 puede inducir un incremento en la capacidad antitumoral de macrófagos (Talmadge *et al.*, 1987; Loeffler *et al.*, 1991; Gridley *et al.*, 1993; Vuist *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1994).

Aunque se ha detectado la presencia del receptor para IL-2 en células de origen no hematopoyético y de tipo neoplásico, como el carcinoma de cérvix (McMillan *et al.*, 1995, Alvarado, 1997), los mecanismos de acción de la citocina sobre estas células no están claramente establecidos.

Con respecto a las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL, recientemente se demostró que ambas líneas responden al estímulo de IL-2 y que al igual que las células hematopoyéticas poseen las subunidades del receptor para IL-2  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . Cuando estas células fueron estimuladas con IL-2 en una concentración de 10UI/ml, se observó un aumento en su proliferación, lo cual fue interpretado como un posible escape inmunológico, al competir las células tumorales con los linfocitos T por la citocina

---

---

Por otro lado, cuando las mismas líneas celulares fueron estimuladas con 100UI/ml de IL-2 su proliferación fue inhibida. Dicha información coloca a esta citocina como una posible alternativa terapéutica para pacientes con CaCu, sin embargo se sabe que la toxicidad IL-2 vía sistémica es dependiente de la dosis administrada (Smith, 1993), debido a ello, se busco una manera de aplicar la citocina en la concentración que se había observado que inhibe la proliferación de las células tumorales, y al mismo tiempo se evitarán sus efectos tóxicos (Bernstein, 1991).

La alternativa diseñada consistió en encapsular IL-2 en liposomas, ya que estas vesículas fosfolipídicas han demostrado gran eficiencia para encapsular fármacos o citocinas, conservando y en ocasiones aumentando sus propiedades terapéuticas al mismo tiempo logran disminuir sus efectos tóxicos. Dichas vesículas adquieren una determinada carga, ya sea positiva, negativa o neutra, dependiendo de los componentes utilizados para su fabricación, esta característica les confiere cierta afinidad por un tipo específico de células (Gabizon *et al.*, 1994, Vaage *et al.*, 1994(a y b); Khanna *et al.*, 1997(a y b); Villa, 1998). En el presente trabajo IL-2 fue encapsulada en liposomas cargados positivamente, ya que en estudios previos (Villa, 1998) se demostró una alta afinidad de estos liposomas hacia las células de origen epitelial. Así mismo, se ha confirmado el origen epitelial de las células de CaCu (Nair *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos muestran que los liposomas positivos multilaminares compuestos de fosfatidilcolina: espermidin-colesterol son capaces de encapsular IL-2 dentro de sus membranas debido a su hidrofobicidad, como se ha demostrado anteriormente al utilizar otras preparaciones de liposomas unilaminares y multilaminares con IL-2 (Kedar *et al.*, 1994; Fleury *et al.*, 1995).

---

---

Al mantener la IL-2 encapsulada en liposomas a 4°C se aseguró la estabilidad de la citocina y se evitó su salida del liposoma, como lo recomiendan otros autores (Zuidam *et al.*, 1995)

El efecto proliferador de la citocina sobre los cultivos celulares de la línea CALO en una concentración de 10UI/ml se conservó aún encapsulada en liposomas y llega a superar el efecto de la citocina administrada en forma libre. Sin embargo, fue determinante la cantidad de lípido utilizada durante el estímulo, ya que el efecto proliferador de la citocina se ve disminuído, pero no abatido, a causa de la toxicidad de grandes cantidades de lípido sobre el cultivo, en este caso 30 y 60µg/pozo.

Por otro lado, nos interesaba demostrar, que la citocina encapsulada a una concentración de 80UI/ml conserva su efecto inhibitor de la proliferación sobre cultivos celulares. Los resultados muestran que al encapsular esta cantidad de IL-2 utilizando 15 y 30µg de lípido, el efecto inhibitor es más claro que en el caso de la citocina libre y con 60µg de lípido. Al utilizar 5µg de lípido se observa mayor proliferación, posiblemente debido a que la cantidad total de citocina que llegó a las células no logró inhibir la proliferación, por el contrario, el efecto fue estimulador, indicando que es importante establecer la cantidad óptima de citocina y lípido que se debe utilizar

El efecto inhibitor de la proliferación de 80UI/ml de IL-2 encapsulada se comprueba al compararlo con el efecto de 10UI/ml de IL-2 encapsulada, o con liposomas vacíos y el comportamiento de las células no estimuladas. En ambas líneas celulares los liposomas vacíos provocaron una inhibición de la proliferación semejante a la obtenida con 80UI/ml de

---

---

IL-2 encapsulada, lo cual indica que los lípidos que forman los liposomas tienen algún efecto sobre los cultivos celulares, por lo cual es conveniente realizar el mismo tipo de evaluación con otra composición lipídica, ya que este tipo celular puede ser muy sensible a alguno de los componentes de los liposomas.

Lo anterior podría explicar el por que 10UI/ml de IL-2 encapsulada no supera la acción estimuladora de la citocina libre en la misma concentración. Al parecer la línea celular INBL es más sensible a la presencia del lípido que CALO. El hecho de que 10UI/ml de IL-2 encapsulada no mostrara una mayor proliferación que las células no estimuladas se puede atribuir al efecto inhibidor del colesterol utilizado en la formación de los liposomas, ya que se ha reportado que las líneas celulares de otras patologías son sensibles a este componente (Frézard *et al.*, 1994).

El posible mecanismo de acción antiproliferativo de IL-2 en altas concentraciones sobre los cultivos de CaCu no está claramente establecido, nuestros resultados indican que puede estar implicada una saturación de receptores membranales y la entrada de elevadas cantidades de citocina a la célula, provocando un efecto inhibidor de la proliferación. Se puede descartar un efecto tóxico de la citocina sobre los cultivos, ya que la población celular no decae hasta cero y se observa una ligera proliferación después de las 48 horas. El hecho de que las células tumorales de CaCu en presencia de altas dosis de IL-2 muestren un ligero incremento en su proliferación se puede atribuir a la recientemente demostrada capacidad de esta línea celular de producir sus propios factores de crecimiento otorgándoles ventajas adaptativas en condiciones adversas, como es la falta de suministro de factores de crecimiento (Torres, 2000)

---

---

Al confirmar la efectividad de los liposomas positivos para encapsular IL-2 y observar que IL-2 encapsulada supera el efecto antiproliferativo de IL-2 libre sobre los cultivos celulares de CaCu, se procedió a establecer un modelo *in vivo* para evaluar esta alternativa terapéutica

La utilización de modelos animales es considerado un requisito indispensable para determinar la eficiencia de nuevas terapias y realizar su aplicación en pacientes humanos con cáncer u otros padecimientos. En la lucha contra el cáncer, los ratones son ampliamente utilizados como modelo, los tumores en ellos pueden ser espontáneos (Vaage *et al.*, 1994(b)), inducidos por la inyección de células tumorales o alguna droga cancerígena (Maas *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1992, Park *et al.*, 1995; Terres y Coffman, 1998) o pueden ser implantados subcutáneamente a partir de cultivos semisólidos o biopsias (LoRusso *et al.*, 1990; Dubinett *et al.*, 1993).

El modelo *in vivo* utilizado en el presente trabajo se obtuvo a partir de la inoculación de ratones de la cepa CBA con células de CaCu, por medio de la inyección de una suspensión de células de las líneas CALO e INBL. Los resultados indican que el factor determinante para la formación del tumor es su capacidad de respuesta inmunológica, determinada por la cepa a la que pertenezca y a la esterilidad del medio en que se mantengan a los animales, ya que se observó que ratones de la misma cepa pero mantenidos en un ambiente no estéril responden de manera distinta a la inyección de las células tumorales

---

---

Asimismo, se observó que la manipulación de la capacidad inmunológica de los ratones asegura la formación del tumor, ya que al realizar la inmunosupresión o inmunodepresión previa a la inyección de las células tumorales se obtuvo una mayor carga tumoral, debido a la disminución de la reacción inflamatoria y la reducción de la actividad de los macrófagos (Velasco *et al.*, 1993) El observar que la administración de hidrocortisona utilizada provocó en los animales una reducción en su actividad física, nos sugiere buscar una cepa en la cual no sea necesaria la inmunodepresión para lograr la generación de tumores de CaCu, en este caso la opción es generar tumores subcutáneos en ratones “desnudos”.

Se sabe que en humanos los esteroides como hidrocortisona son eficaces ya que inmunodeprimen el sistema inmunológico al administrarse cada tercer día y evitan el rechazo de transplantes en la fase inicial debido a la disminución de la reacción inflamatoria y la disminución de linfocitos circulantes (Chapel y Haeney, 1992), los resultados obtenidos confirman el efecto inmunodepresor de la hidrocortisona en los ratones de la cepa CBA al encontrarse una mayor carga tumoral en los ratones tratados con hidrocortisona. El análisis inmunohistoquímico permite asegurar que esas masas encontradas en los ratones tratados con células CALO e INBL son tumores de CaCu, y pueden ser utilizados como modelo *in vivo* para el estudio y terapia de este tipo de cáncer.

El uso de IL-2 en la terapia del cáncer se ha extendido en los últimos años, diversos grupos de investigadores han evaluado el efecto de la citocina sola (Oppenheim y Lutze, 1994; Huland *et al.*, 1997) o en combinación con otras citocinas como IFN $\alpha$  para metastasis pulmonar avanzada y carcinoma renal metastásico ( Kim *et al.*, 1991, Lissoni *et al.*, 1993; Huland *et al.*, 1994), con IL-1 en el tratamiento de adenocarcino-



---

---

mas ( Nakajima *et al.*,1993), con IL-12 en tumores de carcinoma renal primario y metastásico (Fujioka *et al.*,1994; Wigginton *et al.*,1996) y con IL-4 (Sosman *et al.*,1994). Dichos autores coinciden en señalar por un lado la gran utilidad de la citocina como un potente agente antitumoral, tanto en modelos animales como a nivel clínico con pacientes humanos, y por otro lado consideran la necesidad de buscar nuevas vías de administración, que permitan minimizar sus efectos tóxicos, principalmente debidos a que IL-2 promueve la liberación de citocinas como TNF, INF $\gamma$  y además óxido nítrico, los cuales generan los efectos secundarios indeseables durante la terapia con IL-2 (Shih *et al.*,1992; Fyfe *et al.*,1995; Shulman *et al.*, 1996).

Nuestros resultados indican que la administración de IL-2 encapsulada en liposomas y los liposomas mismos utilizados tanto *in vitro* como *in vivo*, muestran una considerable acción antiproliferativa y antitumoral en ambos casos. Lo cual nos proporciona una buena alternativa para las pacientes que sufren este tipo de cáncer. Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden ser atribuidos al hecho de que los liposomas aumentan el tiempo en circulación de la citocina encapsulada, debido a que liberan IL-2 de sus membranas de manera paulatina y evitan la rápida eliminación por los riñones. Recientemente se ha publicado que al encapsular IL-2 en este tipo de liposomas multilaminares conteniendo el lipido fosfatidilcolina se logra aumentar hasta 7 veces su tiempo en circulación en comparación con la citocina administrada en forma libre y asimismo informan que esta composición lipidica activa la respuesta inmunológica contra los tumores, lo cual justifica la acción antitumoral de los liposomas vacios (Kedar *et al.*,2000).

---

---

Por otro lado, sabemos que la regresión parcial o completa de algunos tumores humanos, al administrar IL-2 se debe al aumento de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T y al aumento de las poblaciones de células asesinas activadas por linfocitos (LAK) y células asesinas naturales (NK) (Yang *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1993, Whittington y Faulds, 1993, Viganò *et al.*, 1995). Asimismo, resultados recientes indican que la administración vía sistémica de IL-2 encapsulada en liposomas genera un marcado incremento en los niveles de poblaciones de leucocitos y células LAK y que la transferencia del gen de IL-2 encapsulado en liposomas inhibe el crecimiento de tumores subcutáneos de melanoma por medio de la actividad de células NK y células T citotóxicas (CTL) de linfocitos infiltrados en el tumor (TIL) (Cao *et al.*, 1999, Kedar *et al.*, 2000).

Tomando en cuenta dicha información, consideramos que al encapsular 80UI/ml de IL-2 en liposomas positivos y administrarlos vía sistémica es posible que la citocina se mantuviera en circulación IL-2 por un tiempo prolongado, lo cual permitió que IL-2 ejerciera la activación sobre poblaciones celulares encargadas de la respuesta inmunológica, y a pesar de que dichas poblaciones mantuvieron niveles bajos durante el proceso de inmunosupresión, lograron recuperarse ya que al iniciar el tratamiento con IL-2 encapsulada, los ratones no recibieron más hidrocortisona. Tal recuperación y acción antitumoral por parte de estas células se observa más claramente en el tratamiento de ratones no inmunodeprimidos después de la inyección de las células tumorales, en este caso se presentó la menor carga tumoral.

---

---

Se sugiere que las poblaciones implicadas en esta acción antitumoral son principalmente: neutrófilos, eosinófilos, granulocitos y macrófagos, así como células NK y CTL, sin embargo es necesario, que en trabajos futuros se realice la caracterización de las poblaciones celulares presentes en el exudado peritoneal de los ratones tratados con IL-2 encapsulada en liposomas positivos, tanto en aquellos inmunodeprimidos como en los que no reciban este tratamiento

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la administración de IL-2 encapsulada en liposomas positivos puede considerarse como una alternativa potencial para el tratamiento de pacientes con cáncer de cérvix. De igual manera, los liposomas positivos aún sin tener citocina entre sus membranas pueden considerarse como una alternativa. En ambos casos es necesario realizar nuevas pruebas experimentales que nos muestren más claramente las ventajas de IL-2 encapsulada y de los liposomas multilaminares constituidos de los lípidos fosfatidilcolina y espermidin-colesterol, frente al efecto de IL-2 libre.

---

---

## CONCLUSIONES

- Los liposomas positivos constituidos de fosfatidilcolina:espermidin-colesterol son capaces de encapsular IL-2 dentro de sus membranas
- Al encapsular IL-2 en liposomas se mantiene el efecto de la citocina sobre los cultivos de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL.
- Las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL son capaces de inducir tumores intraperitoneales en ratones de la cepa CBA inmunodeprimidos.
- La composición lipídica de los liposomas y su contenido de IL-2 reduce el volumen de tumores inducidos en ratones de la cepa CBA, al administrarse *in situ*.
- El efecto anti-tumoral *in vivo* de IL-2 encapsulada en liposomas es posible que este mediado por la activación de diferentes poblaciones celulares como son leucocitos, células LAK, NK y CTLs, estimuladas por la presencia de la citocina en grandes cantidades y durante un mayor tiempo en circulación.

---

---

## SUGERENCIAS

1. Realizando una evaluación detallada del mecanismo antitumoral de IL-2 encapsulada en liposomas y la acción de los liposomas vacíos, se podrían establecer las bases para una alternativa terapéutica aplicable a pacientes con carcinoma de cérvix.
2. Para determinar la rentabilidad como alternativa terapéutica de IL-2 encapsulada en liposomas en términos tanto económicos como prácticos es necesario comparar la eficiencia antitumoral y el efecto tóxico de la citocina libre y la citocina encapsulada sobre un modelo *in vivo*.
3. Se sabe que IL-2 puede quedar atrapada o enlazada a las membranas fosfolipídicas de los liposomas, sin embargo, resulta indispensable confirmar si la citocina es liberada por el liposoma en el espacio intercelular y enseguida endocitado junto con su receptor o si se introduce a la célula por endocitosis del liposoma o durante la fusión de las membranas fosfolipídicas del liposoma y la célula.
4. Es recomendable utilizar otras cepas de ratón para inducir tumores subcutáneos de CaCu, por ejemplo los ratones "desnudos". De esta manera se pueden diseñar experimentos que permitan evaluar de manera directa el efecto de diversos tratamientos sobre el tamaño de la masa tumoral.

---

---

5. La constante investigación que se realiza en el Laboratorio de Oncología de la UIDCC de la FES-Zaragoza, enfocada en especial a las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL ha permitido conocer aspectos relevantes de la biología de este tipo de tumor. La información obtenida recientemente sobre la capacidad de sintetizar, secretar y responder a sus propias citocinas (IL-2, IL-3 e IL-6), así como la presencia de receptores especiales en su membrana (RIL-2, c-kit), genera amplias alternativas de “ataque” a esta enfermedad. Una de estas alternativas es el diseño de inmunoliposomas cargados en su interior con un agente antitumoral y dirigidos a un receptor específico en la membrana de la célula blanco, es decir la célula tumoral.

---

---

## BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. 1994. Cellular and molecular immunology Edit. W B. U.S A. pp 145-157

Aggarwal, B. B. y Gutterman, J. U. 1992. Human cytokines: Handbook for basic and clinical research. Blackwell Scientific Publications., U S.A., pp. 1- 141.

Alvarado, M. J. A 1997. Presencia de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 ( IL-2 ) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza.UNAM. México, D.F.

Allen, T.M. 1994. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery Trends Pharmacol. Science. 15(7):215-220.

Amselem, S., Gabizon, A. y Barenholz, Y. 1990. Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. J. Pharm. Sciences. 79(12):1045-1050

Anderson, P.M y Sorenson, M.A. 1994. Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. Clin Pharmacokinet 27(1): 19-31.

Ardizzoni, A., Bonavia, M., Viale, M., Baldini, E., Mereu, C., Ferrini, S., Cinquegrana, A , Molinari, S., Mariani, G., Ruest, G.J, Sharenberg, J., Palmer, P.A., Russo, R., Ropolo, F., Raso, C 1994. Biologic and clinical effects of continuous infusión interlukin 2 in patients with non-small cell lung cancer. Cancer. 73(5):1353-1360.

Baillie R, Sibthorpe B, Anderson I, Smith L. 1998 Data for diagnosis, monitoring and treatment in indigenous health: the case of cervical cancer. Aust N Z J Public Health. 22(3 Suppl).303-6

Bergeron, C., Barrasso, R., Beaudenon, S., Flamant, P., Croissant, O., Orth, G. 1992. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. Great diversity and distinct distribution in low- and high-grade lesions. Am J. Surg. Pathol. 16(7):641-9.

Bernstein, Z.P.,Goldrosen, M.H., Vaickus, L., Friedman, N , Watanabe, H , Rahman, R , Park, J m Arbuck, S.G , Sweeney, J., Vesper, D.S. 1991. Interleukin-2 with ex vivo activated killer cells. therapy of advanced non-small-cell lung cancer. J. Immunotherapy 10(5):383-387.

Betageri, G V 1993. Liposomal encapsulation and stability of dideoxyinosine triphosphate Drug development and Ind. Pharm. 19 (5).531-539

---

---

Brasseur, R., Goorma-Ghtigh, E., Ruyschaert, J. M., Duquenoy, P. H., Marichal, P., Vander-Bossche, H. 1991. Lipiditraconazole interaction in lipid model membranes. *J. Pharm. and Pharmacol.* 43: 167-171.

Brinton, L. A. 1992. Epidemiology of cervical cancer-overview pp 3-22. *En: N. Muñoz, F.X. Bosch, K. V. Shah, A. Méheus ( eds.) The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer.* Oxford University Press, Oxford.

Cao, X., Wang, Q., Ju, D.W., Tao, Q., Wang, J. 1999. Efficient induction of local and systemic antitumor immune response by liposome-mediated intratumoral co-transfer of interleukin-2 gene and interleukin-6 gene *J. Exp Clin Cancer Res* 18(2):191-200

Ciacchi, C., Dignass, M. A., Koizumi, M., Podolsky, D. K. 1993. Functional interleukin 2 receptors on intestinal epithelial cells. *J Clin. Invest.* 92. 527.

Clark, W., Graid, D y Johnson, A.P. 1990. *Farmacología Clínica.* 12ª edición. Ed Médica Panamericana. México. pp.847-848.

Cosman, D., Ceretti, D.P., Larsen, A., Park, L., March, C., Dower, S., Gills, S., Urdall, D. 1984 Cloning, sequencing and expression of human interleukin-2 receptor. *Nature* 312:768.

Coventry, B. J., Weeks, S. C., Heckford, S. E , Sykes, P. J., Bradley, J., Skinner, J. M.1996. Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma. *J. Immunol.* 156:3486

Crommelin, D.J.A., Nüsslander, U.K., Peeters, P.A.N., Steerenberg, P.A., De Jong, W.H., Eling, W.M.C., Storm, G. 1990. Drug-laden Liposomes in antitumor therapy and in the Treatment of parasitic diseases. *In: Advances in Drug Delivery Systems*, 4 Eds. J.M. Anderson, S. Wankim y K. Knutson Ed. Elsevier. pp. 233-243.

Chapel, H. y Haeney, M. 1992. *Inmunología Clínica.* Ed. El Manual Moderno. México, D.F. pp.137-156

Dass, C.R., Walker, T.L., Burton, M.A., Decruz, E.E. 1997. Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes. *J. Pharm. Pharmacol.* 49:972-975.

Dubinett, S.M., Patrone, L., Tobias, J., Cochran, A.J , Wen, D.R , McBride, W.H. 1993 Intratumoral interleukin-2 immunotherapy: activation of tumor-infiltrating and splenic lymphocytes in vivo. *Cancer Immunol. Immunother* 36:156-162.



---

---

Falkson, G.I., Falkson, G., Falkson, H.C. 1991. Improved results with the addition of Interferon alpha-2b to dacarbazine in the treatment of patients with metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 9:1403-1408.

Fleury, L., Ollivon, M., Dubois, J.L., Puisieux, F., Barratt, G. 1995. Preparation and characterization of dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing interleukin-2. *Braz J Med. Biol. Res* 28(5):519-529.

Foa, R., Guarini, A., Gansbacher, B. 1992. IL-2 treatment for cancer: from biology to gene therapy. *British J. Cancer*. 66:992-998.

Frézard, F., Santaella, C., Vierling, P., Riess, J. 1994. Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethyleneglycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1192:61-70.

Fujioka, T., Nomura, K., Hasegawa, M., Ishikura, K., Kubo, T. 1994. Combination of lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 in treating metastatic renal cell carcinoma. *British. J. Urol.* 73(1):23.

Frézard, F., Santaella, C., Vierling, P., Riess, J. 1994. Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethyleneglycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys. Acta*. 1192:61-70.

Fyfe, C., Fisher, R.I., Rosenberg, S.A., Sznol, M., Parkinson, D.R., Louie, A.C. 1995. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J. Clin. Oncol.* 113(3):688.

Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A., Barenholz, Y. 1994. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.* 54:987.

Ganser, A., Seipett, G., Lindemann, A., Ottman, O.G., Falk, S., Eder, M., Herrmann, F., Becher, R., Hoffken, K., Buchner, T. 1990. Effects of recombinant human interleukin-3 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 76:455-462.

Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F. y Stern, P.L. 1993. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol. Today*. 14(10):491-499

González, R. Y., Nazabal, M., Claro, L. A., Peralta, A., Méndez, Del C. D., Cruz, C. M. 1995. Presencia de papiloma virus humano en lesiones genitales. *Bioquímica*. 20(79): 266-270.

---

---

Goodman, A. y Gilman, L. 1990. Las bases farmacológicas de la terapéutica 7ª de. Ed Médica Panamericana México. pp.1395-1396.

Gridley, D.S., Sura, S.S., Uhm, J.R., Lin, C.H., Kettering, J.D. 1993. Effects of anti-transforming growth factor-beta antibody and interleukin-2 in tumor-bearing mice. *Cancer Biother.* 8(2):159-170.

Habib, M.J. y Rogers, J.A. 1989. Stabilization of local anaesthetics in liposomes. *En: Pharm. Technology Drug Stability*. De. M.H. Rubistein. Ellis-Horwood Limited England pp.24-27.

Han, D.S., Pottin-Clemenceau, C., Imro, M. A., Scudeletti, M., Doucet, C., Puppo, F., Brouty Boyé, D., Vedrenne, J., Sahraoui, Y., Brailly, H., Poggi, A., Jasmin, C., Azzarone, B., Indiveri, F. 1996 IL-2 triggers a tumor progression process in a melanoma cell line MELP, derived from a patient whose metastasis increased in size during IL-2/TNF- $\alpha$  biotherapy. *Oncogene* 12: 1015.

Hassuneh, M. R., Nagarkatti, P. S., y Nagarkatti, M. 1997 Evidence for the participation of Interleukin-2 ( IL-2 ) and IL-4 in the regulation of autonomous growth and tumorigenesis of transformed cell of lymphoid origin. *Blood*. 89: 610-620.

Heniford, B.T., Edwards, M.J., Wilson, M.A., Klar, E.A., Doak, K.W., Miller, F.N. 1994. Interleukin-8 supresses the toxicity and antitumor effect of interleukin-2. *J. Surg Res*. 56(1):82-88.

Ho, G. Y., Burk, R. D., Klein, S., Kadish, A. S., Chang, C. J., Palan, P., Bacu, J., Tachezy, R., Lewis, R., Romney, S. 1995. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J. Natl Cancer. Inst.* 87(18): 1365-71

Holler, E., Kolb, H.J., Moller, A., Kempeni, J., Liesenfeld, S., Pechmer, H., Lehmacher, W., Ruckdeschel, G., Gleirner, B., Riedner, C. 1990. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood*. 75:1011-1016.

Huang, S.K., Lee, K.D., Hong, K., Friend, D.S., Papahadjopoulos, D. 1992. Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice. *Cancer Res*. 52.5135-5143.

Huland, E., Heizer, H., Huland, H. 1994 Inhaled interleukin-2 in combination with low-dose systemic interleukin-2 and interferon alpha in patients with pulmonary metastatic renal-cell carcinoma. effectiveness and toxicity of mainly local treatment. *J. Cancer Res. Clin Oncol*. 120(4):227-228

---

---

Huland, E., Heizer, H., Mir, T.S., Huland, H. 1997. Inhaled interleukin-2 therapy in pulmonary metastatic renal cell carcinoma; Six years of experience. *Cancer J. Sci Am* 3 Suppl. 1: S98-105

Janssen R.A.J., Mulder N.H., The T.H. y De Leij L. 1994. The immunobiological effects of interleukin-2 in vivo *Cancer Immunol. Immunother.* 39: 207-216.

Juliano, R.L y Daoud, S.S 1990. Liposomes as a delivery system for membrane-active antitumor drugs *In: Advances in Drug Delivery Systems,4.* . Eds. J.M. Anderson, S. Wankim y K Knutson De. Elsevier. pp. 225-232.

Kagi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, M. R., Hengartner, H 1995. Lymphocyte-mediated cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* : mechanism and significance *Immunol. Rev.* 146.95.

Kaplan, L.D., Kahn, J.D., Crowe, S., Northfelt, D., Neville, P., Grossberg, H, Abrams, D.I., Tracey, J, Mills, J., Volberding, P.A. 1991. Clinical and virologic effects of recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor in patients receiving chemotherapy for human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized trial. *J Clin. Oncol.* 9:929-940.

Kedar, E., Braun, E., Rutkowski, Y., Emanuel, N., Barenholz, Y. 1994. Delivery of cytokines by liposomes. II Interleukin-2 encapsulated in long-circulating sterically Stabilized liposomes: immunomodulatory and anti-tumor activity in mice. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 16(2):115-124.

Kedar, E., Gur, H., Babai, I., Samira, S., Even-Chen, S, Barenholz, Y. 2000. Delivery of cytokines by liposomes: hematopoietic and immunomodulatory activity of interleukin-2 encapsulated in conventional liposomes and in long-circulating liposomes. *J. Immunother* 23(1):131-45

Khanna, C., Anderson, P. M., Hasz, D., Neville, M., Klausner, J. S. 1997a. Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. *Cancer.* 79 (7):1409-1421.

Khanna, C, Waldrep, J. C., Anderson, P.M., Weichelbaum, R. W., Hasz, D.E., Katsanis, E., Klausner, J. S. 1997b. Nebulized interleukin 2 liposomes: aerosol characteristics and biodistribution. *J. Pharm. Pharmacol.* 49(10): 960-71.

Kim, B. y Warnaka, P 1991. Enhanced survival of INF-alpha augmented IL-2 therapy of pulmonary metastases: efficacy comparable to interleukin-2 and lymphokine activated killer cells *J Surg Res* 50(1).40.

---

---

Kruth, S.A. 1998. Biological response modifiers: interferons, interleukins, recombinant products, liposomal products. *Vet. Clin. North Am Small Anim. Pract.* 28(2): 269-95.

Landgraf, B. E., Goldstein, B., Williams, D. P., Murphy, J. R., Sana, T. R., Smith, K. A. y Ciardelli, T. L. 1992 Recombinant interleukin-2 analogs. *J. Biol. Chem* 267: 18511-18519.

Lasic, D.D. y Papahadjopoulos. 1995. Liposomes revisited. *Science* 267:1275-1276

Lasic, D D. 1996. Liposomes. *Science and Medicine*. May/June. 34-43.

Lazcano, E. C., Nájera, A. P., Alonso, R. P., Buiatti, E., Hernández, A. M. 1996. Programa de detección oportuna del cáncer cervical en México Diagnóstico situacional. *Rev Inst Nac. Cancerología*. 42: 123

Litzinger, D.C., Buiting, A.M.J., Rooijen, N.V., Huang, L. 1994. Effect of liposomes size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic polyethylene glycol-containing liposomes. *Bioch. Biophys. Acta*. 1190:99-107.

Lissoni, P., Barni, S., Ardizzoia, A., Andres, M., Sacrdino, E., Cardellini, P., Della Bitta, R., Tancini, G 1993. A randomized study of low-dose interleukin-2 subcutaneous immunotherapy versus interleukin-2 plus interferon-alpha as first line therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Tumori*. 79(6):397-400.

Lizano M. y Garcia-Carranca A. 1997. Variantes moleculares de los tipos 16, 18 y 45 de papillomavirus humano en tumores de cérvix en México. *Gac. Med. Mex.* 133 Suppl 1:43-8

LoRusso, P.M., Aukerman, S.L, Polin, L., Redman, B.G., Valdivieso, M, Biernat, L., Corbett, T.H. 1990 Antitumor efficacy of interleukin-2 alone and in combination with adriamycin and decarbazine in murine solid tumor systems. *Cancer Res*. 50:5876-5882.

Loeffler, C.M., Platt, J.L., Anderson, P.M., Katsanis, E., Ochoa, J.B., Urba, W.J., Longo, P.L., Leonard, A.S., Ochoa, A.C. 1991. Antitumor effects of interleukin 2 liposomes and anti-CD3-stimulated T-cells against murine MCA-38 hepatic metastasis. *Cancer Res* 51(8):2127-32.

Maas, R.A., Dullens, H.F.J., DeJong, W.H., Otter, W.D. 1989 Immunotherapy of mice with a large burden of disseminated lymphoma with low-dose interleukin-2. *Cancer Res*. 49:7037-7040.

Maas, R.A., Dullens, H.F.J., Otter, W.D. 1993 Interleukin-2 in cancer treatment. disappointing or (still) promising? A review. *Cancer Immunol. Immunother* 36:141-148.

---

---

Mayer, L. D., Tai, L., Ko, D., Masin, D., Ginsberg, R., Cullis, P., Bally, M. 1989. Influence of vesicle size, lipid composition and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice *Cancer Res.* 49:5922-5930.

McFarlane, M.P., Yang, J.C., Guleria, A.S., White, R.L., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., White, D.E., Rosenberg, S.A. 1995. The hematologic toxicity of interleukin-2 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer* 75(4):1030-1037

McIntyre, C.A., Chapman, K., Reeder, S., Dorreen, M.X., Bruce, L., Rodgers, S., Hayat, K., Schreenivasan, T., Sheridan, E., Hanock, B.W., Rees, R.C. 1992. Treatment of malignant melanoma and renal cell carcinoma with recombinant human interleukin-2 analysis of cytokine levels in sera and culture supernatants. *Eur. J. Cancer.* 28:58-63.

McMillan, D.N., Kernohan, N.M., Flett, M.E., Heys, S.D., Deehan, D.J., Sewell, H.F., Walker, F., Eremin, O. 1995. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localization in human solid tumor cells *in situ* and *in vitro*: evidence for a direct role in the regulation of tumor cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 60: 776.

Moll, R., Wernw, W.F., Schiller, D.L. 1982. The catalog of human cytokeratins. patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31:11-24.

Moore, M.A.S. 1991. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators *Blood* 78 1-19.

Nair, S.A., Nair, M.B., Jayaprakash, P.G., Rajalekshmy, T.N., Nair, N.K., Pillai, M.R. 1997. Cytokeratins and the evaluation of tumor differentiation in squamous lesions of the uterine cervix. *Gen Diagn Pathol.* 143(1):15-22.

Nakajima, Y., Ozaki, M., Jinnai, H., Shilayama, Y., Hiroata, T., Okuno, K., Yasutomi, M. 1993. Enhanced activity against syngeneic murine tumors by intraesplenic injection of recombinant interleukin-2 (IL-2) and interleukin-1 (IL-1). *Cancer Biother.* 8(4):319-326.

Nakamura, Y., Russell, S.M., Mess, S.A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S., Leonard, W.J. 1994. Heterodimerization of the IL-2 receptor  $\beta$ - and  $\gamma$ - chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature.* 369:330-332.

Nistico, G. y De Sarro, G. 1991. Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain?. *Trends Neurosci* 14: 146.

Oettgen, H.F. 1991. Cytokines in clinical cancer therapy. *Cancer Current Opinion in Immunol.* 3:699-705.

Oppenheim, M.H. y Lutze, M.T. 1994. Interleukin-2: solid-tumor therapy *Oncology.* 51(2):154-169.

---

---

Park, J.W., Hong, K., Carter, P., Asgari, H., Guo, L.Y., Keller, G.A., Wirth, C., Shalaby, R., Kotts, C., Wood, W.I., Papahadjopoulos, D., Benz, C.C. 1995. Development of anti-p185<sup>HER2</sup> immunoliposomes for cancer therapy. *Proc. Natl Acad. Sci* 92:1327-1331.

Pontián, J., Adami, H. O., Bergström, R., Dillner, J., Friberg, L. G., Gustafsson, L., Miller, A. B., Parkin, D. M., Sparén, P., Trichopoulos, D. 1995. Strategies for global control of cervical cancer. *Int. J. Cancer* 60: 1.

Rangel C.R., Monroy, G.A., Ibarra S.J., Herrera V.L., Rocha Z.L., Ramírez G.J.L., Herrera G.A., Medina C.A., Rodríguez M.H., Reyes M y Weiss-Steider B. 1994. Evidence of the malignant origin of two cervical cell lines InBl and CaLo. *En: Proceedings of the International Cancer Congress. De. R.S. Rao, M.G. Deo y L.D. Sanghui, y. Mittra (Coordinador). New Delhi, India. pp. 2287-2291.*

Regueiro, J. R. y López, L. C. 1996. *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune*. Editorial Médica Panamericana. España. 178 pp

Robinson, L.M., Creeth, J.E., Jones, M.N. 1998. The specificity and affinity of immunoliposome targeting to oral bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1369:278-286.

Rosenberg, S. A. 1990. *Inmunoterapia del cáncer. Investigación y Ciencia.* 26: 34.

Schaafsma, M.R., Falkenburg, J.H., Landegent, J.E., Duinkerken, N., Osanto, S., Ralph, P., Kaushansky, K., Wagemakers, G. 1991. *In vivo* production of Interleukin-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-6 during intravenous administration of high-dose interleukin-2 in cancer patients. *Blood.* 78:1981-1987.

Shargel, Y. y Yu, A.B.C. 1993. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics.* 3ª edición. Ed. Appleton and Lange. U.S.A. pp 260.

Shih, Y., Konrad, M. W., Warren, M.K., Childs, A., Paradise, C., Meyers, F.J., Groves, E.S. 1992. Suppression and transient induction of lymphokines in cancer patients after administration of polyethylene glycolated interleukin-2. *Eur. J. Immunol.* 22(3):727.

Shulman, K.L., Stadler, W. M., Vogelzang, N.J. 1996. High-dose continuous intravenous infusion of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma: The University of Chicago Experience. *Urology.* 47(2):194-7.

Silver, R.T. 1990. A new treatment for Polycythemia Vera: Recombinant interferon alpha. *Blood.* 76:664-665.

Smith, K.A. 1988. Interleukin-2: Inception, impact and implications. *Science.* 240:1169

---

---

Smith, K.A. 1993 Lowest dose interleukin-2 immunotherapy. *Blood*. 81(6):1414-1423

Sosman, J.A., Fisher, S.G., Kefer, C., Fisher, R.I., Ellis, T.M. 1994. A phase I trial of continuous infusion interleukin-4(IL-4) alone and following interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *Annals Oncol.* 5(5):447-452

Szoka, F. y Papahadjopoulos, D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:4194-4198.

Talmadge, J.E., Phillips, H., Schindler, J., Tribble, H., Pennington, R. 1987. Systematic preclinical study on the therapeutic properties of recombinant human interleukin-2 for the treatment of metastatic disease. *Cancer Res.* 47(21):5725-5732.

Taniguchi, T. y Minami, Y. 1993 The IL-2/IL-2 receptor system . A Current Overview *Cell.* 73: 5-8.

Terres, G. y Coffman R.L. 1998. The role of IL-4 and IL-10 cytokines in controlling an anti-tumor response *in vivo*. *Inter. Immunol* 10 (6):823-832.

Torres, G. C. F. 2000. Las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL secretan las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6, en la fase G1 del ciclo celular, y estas son utilizadas por ambas líneas para inducir su proliferación. Tesis de Licenciatura FES-Zaragoza. UNAM . México, D.F.

Uchida, H., Taniguchi, K., Nakamoto, K. 1990. Combination treatment with irritant and recombinant interleukin-2 in the peritoneal cavity for evoking effective antitumor activity: generation of lymphokine-activated killer cells and tumor-specific killer cells. *Jpn. J. Cancer research.* 81(4):416-424.

Vaage, J., Barberá-Gillem, E., Abra, R., Huang, A., Working, P. 1994a. Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer.* 73(5).1478-1448.

Vaage, J., Donovan, D., Loftus, T., Abra, R., Working, P., Huang, A. 1994b Chemoprevention and therapy of mouse mammary carcinomas with doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *Cancer* 73(9):2366-2371.

Velasco, A., Fernández, P., Serrano, J., Andres-Trelles, F. 1993. *Farmacología* 16ª edición. Editorial Interamericana. Madrid. pp.437-439.

Vemuri, S., Yu, Ch., Wangsatorntanakun, V., Roosdorp, N. 1990. Large-scale production of liposomes by a microfluidizer. *Drug Development and Ind. Pharm* 16 (15): 2243-2256.

---

---

Vigano, M.G., Lissoni, P., Barni, S., Tancini, G., Scardino, E., Favini, P., Baccalini, A., Verweij, F., Starda, G., Rocco, F. 1995. Lymphocyte levels before treatment with subcutaneous interleukin-2 and drug maintenance treatment in relation to the clinical efficacy in metastatic renal carcinoma. *Arch. Ital. Urol. Androl.* 67(2):143-147.

Villa, M. 1998. Liposomas como acarreadores de las citocinas IL-1 e IFN $\gamma$  dirigidas contra poblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratón. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.

Vogel, H. G. y Vogel, W.H. 1997. Drug discovery and evaluation pharmacological assays. Ed. Springer. Alemania. pag. 740.

Vuist, W.M.J., Visseren, M.J.W., Otsen, M., Bos, K., Vyth-Dreese, F.A., Figdor, C.G., Melief, C.J.M., Hekman, A. 1993. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of human peripheral blood lymphocytes with interleukin-2 and interferon  $\alpha$ . *Cancer Immunol. Immunother.* 36:163-170.

Warrens, A.N. y Lechler, R.I. 1992. Key molecular events in the induction and expression of the immune response. *En: The molecular biology of immunosuppression.* Editor. Angus W. Thomson. Editorial John Wiley and Sons England. pp. 1-36 .

Weissman, D., Parker, D.J., Rothstein, T.L., Marshak-Rothstein, A. 1985. Methods for the production of xenogeneic monoclonal antibodies in murine ascities. *J. Immunol.* 135(2):1001-1003.

Whittington, R. y Faulds, D. 1993. Interleukin-2 A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer *Drugs.* 46(3):446-514

Wigginton, J.M., Komschlies, K.L., Back, T.C., Franco, J.L., Brunda, M.J., Wiltrout, R.H. 1996. Administration of interleukin-12 with pulse interleukin-2 and the rapid and complete eradication of murine renal carcinoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* 88(1):38.

Yang, S.C., Grimm, E.A., Parkinson, D.R., Carinhas, J., Fry, K.D., Mendiguren-Rodríguez, A., Licciardello, J., Owen-Schaub, L.B., Hong, W.K., Roth, J.A. 1991. Clinical and immunomodulatory effects of combination immunotherapy with low-dose interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha in patients with advanced non-small cell lung cancer: a phase I trial. *Cancer Res.* 51(14):3669-3676



---

---

Zeng, Z, Si, C.W., Yu, M. 1994. The effect of interleukin-2, interleukin-4 and tumor necrosis factor on LAK cells activity. *Chung Hua Y Hsueh Tsa Chih.*74(4):235-7, 256.

Zuidam, N. J, Gouw, M, Barenholz, Y., Crommelin D. 1995. Physical (in)stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. *Biochim Biophys. Acta* 1240:101-110.

---

---

## APÉNDICES

ESTA TESIS  
SALIR DE LA

NO DEBE  
BIBLIOTEC

### I. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se mide aproximadamente el 90% del volumen final requerido de agua destilada y desionizada y se coloca en un recipiente de tamaño lo más cercano posible a la medida del volumen final a preparar. La temperatura del agua debe ser de 150 a 200°C. Bajo agitación lenta y constante se adiciona el RPMI-1640 (RPMI-1640 Medium Sigma Chem. USA) Hasta su disolución, no debe aplicarse calor al agua. Con un volumen menor al 5% del total de agua se enjuaga el paquete que contenga el Medio en polvo para remover cualquier traza de este que hubiera quedado adherido y se adiciona al recipiente.

A la solución obtenida se le adiciona 2.0 g de Bicarbonato de Sodio o 26.8 ml de solución de Bicarbonato de Sodio al 75% por cada litro de volumen final de medio a prepararse. El medio en su presentación comercial contiene ya el aminoácido L-glutamina, sin embargo, el cultivo celular requiere de una mayor concentración del mismo. Por tal motivo, en esta etapa de la preparación se adiciona L-glutamina (Sigma, Chem USA) en una concentración 2 mM Para prevenir contaminación, el medio es suplementado con 1000 u/ml de penicilina (Lakeside, USA) y 1 mg/ml de estreptomycin (Lakeside, USA). La agitación es útil para la total disolución de estos compuestos.

Se ajusta la solución a pH de 7.2- 7.4 a 20°C usando para este fin hidróxido de sodio.

Se adiciona la cantidad de agua requerida para complementar el volumen final y se esteriliza la solución filtrándola con membrana de poro de 0.22µ

---

---

Componentes del RPMI-1640

	Concentración (g/l)
Sales inorgánicas	
Nitrato de calcio 4H <sub>2</sub> O	0 100
Sulfato de Magnesio anhidro	0.04884
Cloruro de Sodio	6.0
Fosfato Dibásico de Sodio anhidro	0.8
Aminoácidos	
L-arginina	0 2
L-aspargina	0 050
L-ácido aspártico	0.20
L-cistina 2HCl	0 0652
L-ácido glutámico	0.2
L-glutamina	0.300
Glicina	0.10
L-histidina	0.015
L-hidroxiprolina	0.020
L-isoleucinas	0.050
L-leucina	0 050
L-lisina HCl	0.040
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.020
L-serina	0 030
L-treonina	0.020
L-triptofano	0.005
L-tirosina	0.02883
L-valina	0 020

---



---

Vitaminas	
D-biotina	0 0002
Cloruro de colina	0 003
Acido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0 035
Niacinamida	0 001
Acido-p-Amino Benzoico	0.001
Acido-D-Pantoténico	0 00025
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0 0002
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B-12	0.000005
Otros	
D-Glucosa	2 0
Glutation reducido	0.001
HEPES	5.958

## II. INACTIVACIÓN DE SUERO

La botella de Suero Fetal de Bovino (SFB) (HyClone, USA) congelado se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para que sea descongelado, posteriormente se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular como son las proteínas del complemento, que pueden interferir al inhibir la proliferación celular de los cultivos. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml para su mejor manejo

---

---

### III. PREPARACIÓN DEL COLORANTE AZUL DE TRIPANO

Para pruebas de viabilidad y conteo celular se empleó una dilución del colorante azul de tripano (Sigma USA) al 0.3 % en PBS, antes de su uso fue filtrado haciéndolo pasar a través de un filtro del No. 2 (Whatman, Inglaterra)

### IV. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Se usa para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos, así como para su administración como placebo a los ratones con tumor inducido. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato, los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de magnesio (Sigma, Chem. USA)	0.1g
Cloruro de calcio (Sigma, Chem. USA)	0.1
Cloruro de Sodio (Sigma, Chem. USA)	8.0
Cloruro de potasio (Sigma, Chem. USA)	0.2g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma, Chem. USA)	2.16g
Fosfato diácido de potasio (Sigma, Chem. USA)	0.2g

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se adiciona los 100 ml que contiene el cloruro de magnesio y el de calcio. Se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4 utilizando HCl (Sigma, Chem. USA) 8N y se afora a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con un diámetro de poro de 22 $\mu$ , la solución se almacena a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

---

---

## V. SOLUCIÓN SALINA DE VERSENO

Esta solución se emplea para despegar células tumorales adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares.

Para su preparación se pesan las siguientes sustancias.

Tris (Sigma, Chem. USA)	3.04g
Cloruro de Sodio (Sigma, Chem. USA)	8 00g
Cloruro de Potasio (Sigma, Chem. USA)	0 40g
Acido-Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA) (Sigma, Chem. USA)	0 40g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 10 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs de presión durante 20 minutos.

## VI. INCLUSIÓN DE TUMORES EN PARAFINA

La masa extraída se coloca en la solución BOUIN (ácido pícrico saturado: formol: ácido acético glacial, 15:5:1) (Sigma, Chem. USA) de 2 a 3 horas, si presenta un tamaño de 2-3mm de diámetro, si es mayor se mantiene hasta 3 horas en la solución; al finalizar este periodo se pasa a etanol al 70% de pureza por tiempo indefinido. El día de la inclusión se cambia a etanol al 96%, etanol al 100%, y cloroformo, se mantendrá de 2 a 3 horas en los alcoholes (dependiendo de su tamaño) y de 4 a 6 horas en el cloroformo. Enseguida se colocan en parafina líquida de 2 a 3 horas. Finalmente se deja solidificar la parafina en un molde y se procede a realizar los cortes en el Microtomo para el análisis inmunohistoquímico.

---

---

## VI. PRUEBA INMUNOHISTOQUIMICA PARA CITOQUERATINAS

Se elimina la parafina de los cortes histológicos colocando los portaobjetos en la estufa a 60°C durante 30 min y a 100°C durante 10 minutos. Los portaobjetos se enjuagan con Xilol (Sigma, Chem. USA), Etanol (Sigma, Chem USA) al 95% , Etanol al 75% y agua destilada durante 5 minutos en cada uno, para eliminar el exceso de parafina e hidratar el tejido. Se coloca 1 gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, Chem. USA) en cada corte y se mantiene durante 3 minutos, enseguida se enjuaga con PBS 1X. Los portaobjetos se secan, evitando tocar los cortes y se les agrega 1 gota de Suero Normal Diluido del sistema de detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA), después de 5 minutos, se sacude y seca el portaobjetos y se agregan 30 ml de anticuerpo anticitoqueratinas Kg 8 13 (Dakoparts) en dilución 1 5 en PBS 1X.

Los portaobjetos se mantienen en atmósfera de humedad a 4°C durante 24 horas. Al finalizar este periodo se enjuagan los portaobjetos con PBS 1X y se agrega el anticuerpo secundario biotinilado del sistema de detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA) durante 20 minutos, enseguida se enjuaga en PBS 1X y se agrega el complejo Avidina-Biotina del sistema de detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA) durante 20 minutos, se enjuaga nuevamente en PBS 1X y se agrega la solución Cromógena preparada con 5ml de agua destilada, 2 gotas de Buffer, 4 gotas de Diaminobencidina (DAB) del sistema de detección de sustrato peroxidasa (Vector Laboratories, USA) y 2 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, Chem USA) preparado al momento de usar, se deja como máximo 7 minutos en cada corte y se enjuaga con PBS 1X.

Finalmente, se sumergen los portaobjetos 10 segundos en hematoxilina filtrada y se enjuaga primeramente con agua corriente, enseguida con agua a 40°C y se pasan por Etanol al 75% y 96%, 5 minutos en cada uno. Se dejan secar los portaobjetos a temperatura ambiente y se remojan con Xilol para cubrirlos con resina y colocar el cubreobjetos para su posterior análisis al microscopio y almacenamiento

---

---

## VIII. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR EN EL DISEÑO COMPLETAMENTE ALEATORIO.

El Análisis de Varianza es una técnica estadística mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes, cada uno de los cuales tiene asociado una fuente de variación específica, de manera que el análisis permite conocer la magnitud de la contribución de cada una de las fuentes de variación a la variación total. Este caso supone que existen  $K$  poblaciones distintas distribuidas normalmente, con medias poblacionales  $\mu_K$ , que poseen cada una la misma varianza  $\sigma^2$ . Además supone que estas  $K$  poblaciones constituyen una gran población con media  $\mu$ , llamada Gran Media (media poblacional).

La hipótesis nula ( $H_0$ ) a probar supone que todas las medias de tratamientos o categorías son iguales. El modelo supone que la desviación de una observación con relación

a la gran media se puede descomponer en la desviación entre tratamientos (efecto del tratamiento) y desviación dentro del tratamiento (error residual), correspondiéndole a cada una de estas desviaciones un estimador insesgado obtenido a partir de las sumas de sus cuadrados. Las ecuaciones para estos estadígrafos se resumen en la siguiente tabla de ANDEVA. Cuando el estadígrafo  $F_{calculada} > F_{teórica}$ , se procede a efectuar un análisis de Diferencia Significativa Mínima de Fisher para determinar cuáles son los pares de tratamientos entre los cuales hay diferencia significativa, en caso contrario cuando  $F_{calculada} < F_{teórica}$  el resultado indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos evaluados.



**TABLA DE ANDEVA**

Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)	Suma de Cuadrados (S.C.)	Varianza o Cuadrados Medios (C.M.)	F <sub>calculada</sub>	F <sub>teórica</sub>
“entre” tratamientos	K - 1	$K \sum_{j=1}^K \frac{X_{.j}^2}{n_j} - \frac{X^2}{N} = SC_{trat}$	$CM_{trat} = \frac{SC_{trat}}{K - 1}$	$F_{calc} = \frac{CM_{trat}}{CM_{error}}$	$F_{teórica} = F_{1-\alpha; K-1, N-K}$
“dentro” de tratamientos o error residual	N - K	$K \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2 - \sum_{j=1}^K \frac{X_{.j}^2}{n_j} = SC_{error}$	$CM_{error} = \frac{SC_{error}}{N-K}$		
Total	N - 1	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2 - \frac{X^2}{N} = SC_{total}$			

---

---

## AGRADECIMIENTOS

*El presente trabajo se realizó gracias a la participación entusiasta de las siguientes personas, a quienes agradezco sinceramente el tiempo y esfuerzo dedicado:*

*A la M. en C. Rosalva Rangel por la confianza, apoyo y entusiasmo mostrado a este proyecto.*

*A la M. en C. Teresa Corona por compartir sus conocimientos sobre liposomas y manejo de ratones.*

*Al Dr. Miguel Ibáñez, del Laboratorio de Biomembranas de la ENCB-IPN, por la donación de lípidos y preparación de liposomas*

*A la Dra. Martha Legorreta, del laboratorio de Inmunología por la donación de ratones.*

*A la Dra. Patricia Rosas y la Dra. Ma. Elena Ayala, de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por su asesoría en la inclusión de tumores en parafina y la realización de los cortes histológicos.*

*A la M. en C. Leonor Rodríguez por su asesoría en las pruebas inmunohistoquímicas y la obtención de micrografías*

*A mis sinodales: el M. en C. Carlos Bautista, el Dr. Edelmiro Santiago y la Dra. Isabel Soto, por sus acertadas observaciones al trabajo escrito.*

*A mis compañeros de laboratorio: M. en C. Antonio Alvarado, Q.F.B. Miriam Villa, Verónica Cepeda y Victor Navarrete por compartir conmigo sus conocimientos y su valioso tiempo.*

*Al señor José Chavarría y el señor Ricardo por su apoyo técnico.*

---

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

### *A MI FAMILIA:*

*A mis padres, por todo el amor que recibo de ellos,  
por que todo lo que soy y lo que tengo es gracias a su apoyo.*

*A mis hermanos: Adriana, Alberto y Benny, por su cariño, apoyo,  
paciencia, confianza y compañía ... siempre.*

*A mi abuelita Hilaria González  
por su inmenso cariño.*

*A mi compañero Carlos Torres,  
por estar junto a mí...*

---

---