



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS NEUTROS  
Y CATIÓNICOS COMO ACARREADORES DE  
INTERLEUCINA 2 (IL-2)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

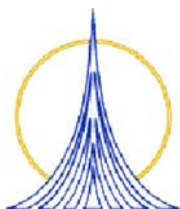
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**MIRIAM ARACELI HERNÁNDEZ JIMÉNEZ**

DIRECTOR DE TESIS: **DR. MIGUEL ÁNGEL A. IBÁÑEZ HERNÁNDEZ**

ASESORA DE TESIS: **DRA. MARÍA TERESA CORONA ORTEGA**



MÉXICO, D.F.

MARZO 2005



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS NEUTROS  
Y CATIÓNICOS COMO ACARREADORES DE  
INTERLEUCINA 2 (IL-2)**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio de Oncología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la dirección del Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández y la Dra. Maria Teresa Corona Ortega.

México, D.F. Marzo 2005

Los estudios de resonancia magnética nuclear de  $^{31}\text{P}$ , se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Norberto Farfán del Departamento de Química del CINVESTAV-IPN.

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión, se llevaron a cabo en colaboración con Dr. Oliver del Departamento de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y Dr. Luis Felipe Jiménez del Laboratorio de microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo contó con el apoyo económico del programa PAPIIT IN216502

## A MIS PADRES:

Francisca Jiménez Pérez      y      Protasio Hernández Hernández

Por que gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida y a ellos les debo lo que soy.

A mi hermano:

Gerardo Hernández Jiménez.

## **AGRADECIMIENTOS**

A esta honorable Institución por todo el apoyo que me ha brindado.

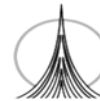
A mis directores de tesis, Dra. Maria Teresa Corona Ortega y Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández, por sus consejos y observaciones durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. María Isabel Baeza Ramírez, por su apoyo.

A la M.C. Emma Leiva por su invaluable ayuda durante la realización de este trabajo.

A las profesoras, Rosalva Rangel Corona, Leonor Aguilar Santelises y Araceli García del Valle, por sus acertados consejos que enriquecieron este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Biomembranas, quienes de alguna manera han contribuído para la culminación de este trabajo.



## INDICE

ABREVIATURAS O SIGLAS UTILIZADAS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. MARCO TEÓRICO.....	8
A. Citocinas.....	8
1. Interleucinas.....	9
2. Interleucina 2 (IL-2).....	9
3. Inmunoterapia con IL-2.....	11
B. Carcinoma Cérvico-Uterino.....	12
C. Liposomas.....	14
1. Características generales de los liposomas.....	14
2. Lípidos que forman liposomas.....	16
3. Autoensamblaje de los lípidos anfipáticos.....	17
4. Formación de liposomas.....	23
5. Importancia del uso de los liposomas.....	24
6. Utilización de liposomas como vehículos para citocinas.....	26
7. Unión preferencial de los liposomas a sus células blanco.....	27
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
IV. OBJETIVO GENERAL.....	30
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
VI. HIPÓTESIS.....	32



---

VII.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	33
VIII.	POBLACIÓN.....	34
IX.	VARIABLES.....	35
X.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
XI.	RESULTADOS.....	41
XII.	DISCUSIÓN.....	58
XIII.	CONCLUSIONES.....	62
XIV.	BIBLIOGRAFÍA.....	63





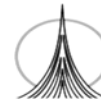
## ABREVIATURAS O SIGLAS UTILIZADAS

CaCu	Cáncer Cérvico Uterino
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL-1	Detector del citofluorómetro de fluorescencia verde
FSC	Detector del citofluorómetro del tamaño relativo
H <sub>II</sub>	Arreglo lipídico de la fase hexagonal II
HPV	Virus del papiloma humano
ILs	Interleucinas
INFs	Interferones
LAK	Células asesinas activadas por citocinas.
LICAIL-2	Liposomas catiónicos con IL-2 encapsulada
LICAVA	Liposomas catiónicos vacíos



---

LINEIL-2	Liposomas neutros con IL-2 encapsulada
LINEVA	Liposomas neutros vacíos
MAF	Factor activador de macrófagos, del inglés Macrophage Activating Factor
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Célula asesina natural, del inglés: Natural Killer
$^{31}\text{P}$ -NMR	Resonancia magnética nuclear de fósforo ( $^{31}\text{P}$ )
PBS	Regulador de fosfatos
SSC	Detector del citofluorómetro de granularidad o complejidad relativa
Tc	Temperatura de transición
TS	Regulador de tris-salina pH 7.0



## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 Representación esquemática de liposomas	14
Figura 2 Lípidos anfipáticos	17
Figura 3 Polimorfismo lipídico	19
Figura 4 Diferentes estados de la bicapa lipídica	20
Figura 5 Representación esquemática de una micela invertida	22
Figura 6 Fotografías de liposomas neutros	37
Figura 7 Fotografías de liposomas catiónicos	38
Figura 8 Citofluorometría de liposomas neutros	39
Figura 9 Citofluorometría de liposomas catiónicos	40
Figura 10 Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas neutros	41
Figura 11 Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas catiónicos	42
Figura 12 Citofluorometría de liposomas neutros	44
Figura 13 Citofluorometría de liposomas catiónicos	44
Figura 14 Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas neutros	45
Figura 15 Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas catiónicos.	46
Figura 16 Citofluorometría de liposomas neutros lavados	47
Figura 17 Citofluorometría de liposomas catiónicos lavados	48
Figura 18 Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas neutros lavados	49



---

Figura 19	Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas cationicos lavados	49
Figura 20	Caracterización de liposomas catiónicos vacíos	51
Figura 21	Caracterización de liposomas catiónicos con IL-2 encapsulada sin lavar	52
Figura 22	Caracterización de liposomas catiónicos con IL-2 encapsulada lavados por ultracentrifugación	53



## I. INTRODUCCIÓN

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; sin embargo, ha cobrado gran interés en el estudio de la biología de distintos tumores ya que se usa como una alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cánceres. La IL-2 ha sido utilizada sola o en combinación con otros fármacos en la inmunoterapia adoptiva, tanto en animales como en humanos, para producir regresión de tumores en estados avanzados; donde se ha demostrado que tiene una respuesta antitumoral; no obstante que su aplicación por vía sistémica perturba las rutas de regulación hematopoyética y puede provocar serios efectos secundarios, como: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, edema, oliguria e hipotensión entre otros; por lo cual su uso es limitado. Por lo anterior, en la actualidad se buscan nuevas alternativas para la administración de esta citocina, una de ellas es su encapsulación en liposomas para evitar sus efectos tóxicos y conservar o mejorar su acción antitumoral. Con el propósito de evaluar en un futuro el efecto de IL-2 encapsulada en liposomas sobre células tumorales, es necesario caracterizar a los liposomas utilizados, así como la interacción de éstos con la IL-2; por lo anterior, en el presente trabajo se caracterizaron a los liposomas neutros y catiónicos que contenían IL-2, mediante la evaluación de cambios morfológicos por citofluorometría de flujo, microscopía electrónica de transmisión y resonancia magnética nuclear de fósforo.



## II. MARCO TEÓRICO

### A. CITOCINAS

El Dr. S. Cohen en 1974, fue quien usó la palabra “citocina” para describir cualquier sustancia soluble producida por células, que ejercía efectos específicos en sus células blanco (Meager, 1991).

Las citocinas son secreciones de diversos tipos celulares como linfocitos T y macrófagos del sistema inmunológico en respuesta a un antígeno. Las funciones de las citocinas son diversas, pero las principales son: generar señalizaciones autócrinas, parácrinas y endócrinas en diferentes células, inducir la proliferación, diferenciación y activación de distintas poblaciones celulares, aumentar la citotoxicidad de las células tales como: las polimorfonucleares, macrófagos, células asesinas naturales y regular la respuesta inmunológica (Warrens y Lechler, 1992; Lydyard *et al.*, 2000).

Entre las citocinas se encuentran las linfoquinas, monocinas, quimiocinas, interleucinas, interferones y factores estimuladores de colonias, que se secretan en respuesta a estímulos directos o indirectos.

Históricamente, las citocinas han sido usadas en cuatro áreas de investigación principalmente (Oettgen, 1991): Virología, con el uso de interferones (Oettgen,1991), Inmunología, con el uso de interleucinas (McMillan *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1996), Hematología, usando factores estimuladores de colonias (De la Cruz *et al.*, 2000) y Biología Celular, usando factores polipeptídicos de crecimiento (Meager,1991).



**1. Interleucinas.** Las interleucinas (ILs) son citocinas que fueron descritas como moléculas producidas por los leucocitos cuya característica principal era participar en las respuestas inmunes o inflamatorias (Oppenheim, 1981). Recientemente con el avance de la biología molecular, se ha facilitado la purificación y caracterización de estas citocinas y se han podido evaluar sus diversos efectos biológicos en leucocitos y otros tipos celulares (Aggarwal y Gutterman, 1992, Metcalf, 1992).

Las ILs pueden participar en diferentes etapas del desarrollo hematopoyético, en la actualidad se conocen 18, que han sido plenamente caracterizadas (Soto et al., 1999). Entre ellas, la IL-1 actúa en células multipotenciales haciéndolas susceptibles a responder a otros factores (Dinarello, 1991); nuestro grupo de trabajo ha confirmado efectos directos de esta citocina en células mieloides estimulando su diferenciación (Santiago, 1993). La IL-3 es conocida como un factor proliferador múltiple con actividad de CSF (Ericson, 1994). La IL-4 y la IL-6 combinadas con CSFs estimulan la formación de colonias mieloides y por sí solas ejercen efectos activadores principalmente en células del tipo monocito-macrófago (VanSnick, 1990; Paul, 1991). La IL-10, IL-11 e IL-13 inhiben la respuesta inflamatoria (Dazan, 1996; Santucci, *et al.*, 1996; Trepicchio, *et al.*, 1996; Nicoletti, *et al.*, 1997), mientras que la IL-15 posee la cualidad reguladora tanto inhibidora como estimuladora de la respuesta inflamatoria (Alleva, 1997).

**2. Interleucina 2 (IL-2).** La Interleucina 2 (IL-2) es una citocina de 133 aa, secretada principalmente por Linfocitos T y macrófagos activados. Se descubrió como un “*Factor de crecimiento de células T*” y en el Segundo Taller Internacional de Linfocinas (Suiza, 1979) se le renombra como IL-2. El gen que codifica para la IL-2 humana se encuentra localizado en el cromosoma 4q26-28. La IL-2 contiene tres residuos cisteínicos en las posiciones 58, 105 y 125, en donde los dos primeros forman un puente disulfuro que es esencial para la actividad de la molécula. Es una glicoproteína de 13 a 17.5 kDa y con punto isoeléctrico entre 6.6



y 8.2, es una molécula hidrofóbica la cual es estable en pH bajo. (Mire-Sluis y Thorpe, 1998)

La IL-2 es producida por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Las subpoblaciones T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub> de células T cooperadoras también pueden producirla y son las células T<sub>H1</sub>, las que presentan una mayor secreción, comparadas con las células T<sub>H2</sub>. Algunos clones de las células T, líneas e hibridomas, también la producen (Mire-Sluis y Thorpe, 1998; vanderSpek *et al.*, 1996; Coventry, 1996).

Una función de la IL-2 es la activación de leucocitos, aunque existe también una activación menor en otros tipos celulares. Como muchas citocinas, la IL-2 estimula a células que pueden secretar otras citocinas y sustancias con actividad biológica, que pueden medir efectos secundarios.

La IL-2 estimula la proliferación de los linfocitos T, actúa en todas las poblaciones de células T y promueve su progresión desde la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, lo que permite un incremento en el número celular. Asimismo, estimula la actividad citolítica de subtipos de linfocitos T, aumenta la motilidad de linfocitos T e induce la secreción de otras citocinas como: INF- $\gamma$  (Smith, 1988; Smith, 1993), IL-1, IL-3 (Mass *et al.*, 1989; Mass *et al.*, 1993), IL-4 (Hassuneh *et al.*, 1997), IL-5, IL-6 (Schaafsma *et al.*, 1991; Buchli *et al.*, 1997), IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  (Anderson y Sorenson, 1994; Coventry *et al.*, 1996; vanderSpek *et al.*, 1996; Mire-Sluis y Thorpe, 1998). Se ha demostrado en timocitos que la IL-2 tiene un efecto proliferador, por lo que juega un papel importante en el desarrollo del timo (Mire-Sluis y Thorpe, 1998; Avice *et al.*, 1999). La IL-2 promueve la secreción de inmunoglobulinas y genera un aumento en los efectos inmunológicos mediados por linfocitos B (Ciacci *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1996; Hassuneh *et al.*, 1997; Vella *et al.*, 1998). Promueve la proliferación de linfocitos granulares largos; aumenta la actividad celular de las células asesinas naturales (NK) y células asesinas





activadas por citocinas (LAK), haciéndolas más eficientes (vanderSpek *et al.*, 1996). Aumenta la actividad antitumoral de los macrófagos, dependiendo del anticuerpo y oligodendrocitos (Mire-Sluis y Thorpe, 1998).

**3. Inmunoterapia con IL-2.** En el tratamiento del cáncer en estadios avanzados, se ha empleado la IL-2 sola o en combinación para inducir la respuesta citotóxica anti-tumoral con resultados alentadores (LoRusso *et al.*, 1990; Szoka *et al.*, 1994; Lode *et al.*, 1999 a y b). Sin embargo, su administración en altas dosis, vía sistémica, perturba vías de regulación hematopoyética y puede generar una serie de efectos secundarios adversos, como son: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas (Smith, 1988; Ardizzoni *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 1996 a), por lo que se ha limitado su uso en la clínica y se buscan otras formas de administración sin disminuir su actividad. Con el propósito de administrar altas dosis de IL-2, vía sistémica, se ha utilizado a los liposomas como una alternativa. Actualmente sirven como medio de transporte de diferentes medicamentos y citocinas, ya que además de proteger el contenido permite dirigirlos a un tipo celular en particular dependiendo de la composición lipídica y de su carga eléctrica (Ciacci *et al.*, 1993; Vagge *et al.*, 1994; Uno *et al.*, 1995; Meager, 1998; Mire-Sluis y Thorpe, 1998; Peng *et al.*, 1999; Craiu *et al.*, 2001).



## B. CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO (CaCu)

El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu), representa aproximadamente un 30 % de todos los padecimientos y de muertes por cáncer en las mujeres mexicanas y en otros países del tercer mundo (Cáceres *et al.*, 2001, Polednak, 1993; González *et al.*, 1995).

El CaCu es un cáncer que puede ser curable si se detecta en estadíos tempranos. La clasificación de este tipo de cáncer se lleva a cabo en función del tamaño del tumor y la invasión del estrato basal (Pontem and Adami, 1995). Se inicia con lesiones llamadas displasias (Estadío I), que responden a tratamientos médicos en un 85 % de los casos, prosigue a un condiloma (Estadío II), que de no ser tratado genera una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) (Estadío III), que conduce al establecimiento de un carcinoma *in situ*, (Estadío IV), que de no ser detectado a tiempo se convierte en un carcinoma invasor en un periodo de 10 a 20 años (Tabla 1) (Cortinas, C. 1998 DeVita, T.V., Hellman).

**Tabla 1.** Definición de los estadíos de cáncer invasivo en el cérvix.

<b>Estadío I</b>	El crecimiento esta estrictamente limitado al cérvix
<b>Estadío II</b>	El carcinoma se extiende más allá del cérvix pero no llega a la pared pélvica y/o involucra la vagina pero no su tercio inferior.
<b>Estadío III</b>	El carcinoma alcanza la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de la vagina.
<b>Estadío IV</b>	El carcinoma invade la vejiga o el recto y/o se extiende más allá de los límites descritos.

Este tipo de carcinoma tiene un origen multifactorial, asociado primordialmente al tabaquismo, la multiparidad, el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, higiene genital deficiente o nula, gran número de compañeros sexuales, uso de

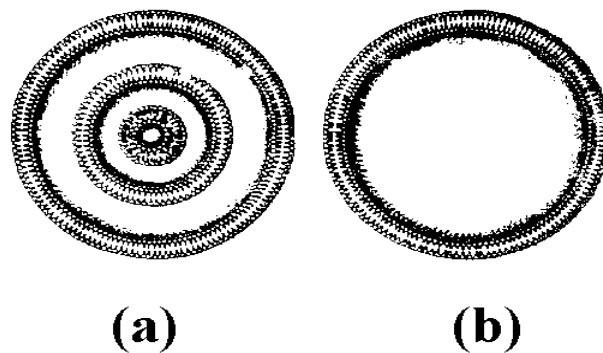


anticonceptivos orales y la carencia en la dieta de  $\beta$ -carotenos, folatos y vitaminas A y C (DeVita, T.V., Hellman, González, R.I., Nazabal, Morán, B.S.H. 2000, 57. Polednak, P.A.1993). Se ha confirmado que el CaCu se asocia fuertemente con una etiología viral, como son: el Papillomavirus (HPV), el Herpesvirus y en menor grado el Citomegalovirus los que se asocian a la enfermedad (Ho,G.Y *et al.*, 1995). Los subtipos 16 y 18 del HPV son los que se encuentran con mayor frecuencia y ambos inducen progresivamente la transformación de células epiteliales del cérvix a cáncer *in situ* para finalmente establecerse un cáncer invasor. (Pontem,J *et al.*,1995)



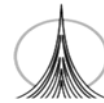
## C. LIPOSOMAS

**1.- Características generales de los liposomas.** Los liposomas son vesículas microscópicas formadas por una o varias bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos, las cuales delimitan uno o varios compartimentos acuosos en el interior, su tamaño varía de 0.02 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1) (Bangham *et al.*, 1965).



**Figura 1. Representación esquemática de liposomas.**  
a) multilamelares, b) unilamelares

Debido a sus características, los liposomas se han utilizado como modelos experimentales en el estudio de algunas propiedades de la membrana celular, como: la permeabilidad, la fluidez, la organización molecular de los lípidos y de las proteínas membranales, así como la inmunogenesidad de partículas lipídicas asociadas a enfermedades auto inmunes (Bangham, 1968; Margolis, 1984, Baeza *et al.*, 2004). Además, la interacción liposoma-célula es un modelo para estudiar procesos fisiológicos, como la fusión y la adhesión celular (Papahadjopoulos y Kimelberg, 1973; Papahadjopoulos *et al.*, 1990; Leckband *et al.*, 1993). Debido a la semejanza del arreglo lipídico entre el liposoma y la matriz membranal, así como a la manera espontánea en que se forman los liposomas en un medio acuoso, estas vesículas se han empleado como un modelo experimental de estructuras precelulares en los estudios sobre el origen de la vida, ya que al formarse aislan microambientes de los alrededores y al mismo tiempo, constituyen



una barrera con una permeabilidad altamente específica (Baeza *et al.*, 1987; 1990; 1992). Finalmente, la capacidad de los liposomas para atrapar moléculas biológicamente activas en su interior acuoso o en su bicapa lipídica, ha permitido que estas vesículas puedan utilizarse como vehículos para transportar fármacos, enzimas o ácidos nucleicos a células en diferentes sistemas biológicos (Poste, 1980; Itani *et al.*, 1987; Mannino y Gould, 1988; Friedmann, 1989; Szelei y Duda, 1989; Keown *et al.*, 1990; Janoff, 1992, Ibáñez, *et al* 1996).

Cuando los liposomas se usan como transportadores de sustancias a la célula, es muy importante alcanzar un encapsulamiento óptimo, una adecuada protección a las sustancias que llevan y una selectividad contra las células a las que van dirigidos, por esta razón se ha estudiado mucho acerca de la composición y el tipo de lípidos que los forman.

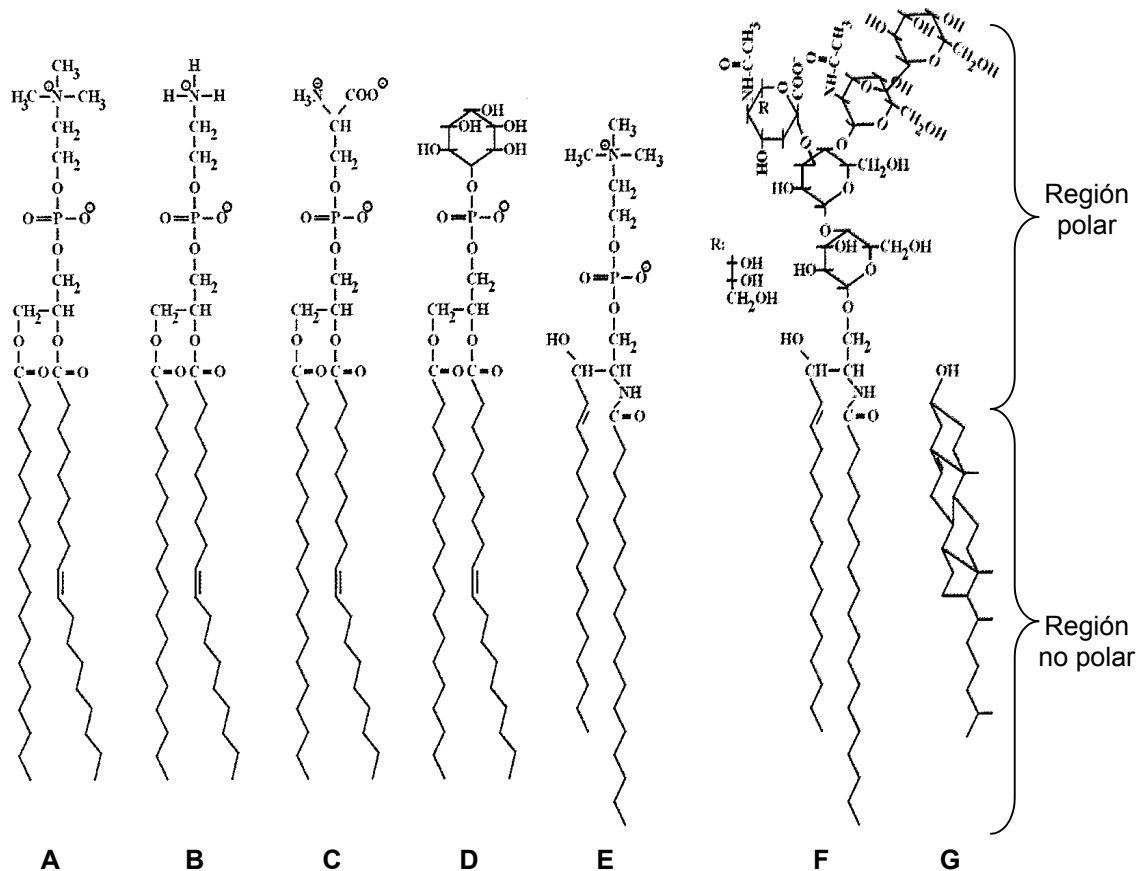
Generalmente se usan liposomas unilamelares de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, porque son muy estables e interaccionan mejor con las células, formados con lípidos anfipáticos que normalmente conforman las membranas celulares. Además, al aplicar los liposomas en animales, se pueden dirigir hacia un tipo específico de células, uniendo en su superficie anticuerpos, proteínas virales, glucolípidos o lectinas (Straubinger y Papahadjopoulos, 1983; Kaneda *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1992; Trubetskoy *et al.*, 1992). También se pueden formar con una composición lipídica semejante a la de las membranas de las células a las que se van a dirigir (Burkhanov *et al.*, 1985; Santiago, 1996).

Al interaccionar el liposoma con la célula, puede ocurrir la fusión de su bicapa lipídica de este con la membrana celular, o bien, las vesículas pueden ser introducidas a la célula por endocitosis. En cualquiera de estos dos procesos, los liposomas vacían su contenido en el citoplasma celular (Poste, 1980).



**2. Lípidos que forman liposomas.** De los diversos grupos de lípidos presentes en las estructuras biológicas, solo los lípidos que constituyen la matriz de las membranas celulares pueden formar a los liposomas, estos son: los fosfolípidos, glicolípidos y colesterol. Un aspecto fundamental en la organización y en la función de la matriz lipídica membranal, es el carácter anfipático de sus lípidos. Una molécula anfipática es aquella que contiene una región hidrofóbica y una región hidrofílica (Gitler, 1969). Las regiones hidrofóbicas son insolubles en agua y las hidrofílicas son solubles en ella. Los fosfolípidos y glicolípidos presentan una región polar en un extremo de su molécula, constituida por el grupo fosfato y/o una base nitrogenada, o por carbohidratos; y una región no-polar en el otro extremo, constituida por las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos y de esfingosina. La relación de tamaño de la región polar con respecto a la no-polar es de aproximadamente 1/3:2/3 respectivamente (Figura 2), lo cual les permite a estos lípidos asociarse entre sí y formar arreglos moleculares específicos; la bicapa lipídica es un ejemplo de estos agregados (Ibáñez, 1993).

La región hidrofílica del colesterol es su grupo hidroxilo y la parte hidrofóbica la constituye el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. En esta molécula, las regiones polar y no-polar también están orientadas hacia uno y otro extremo, pero la diferencia fundamental con respecto a los otros lípidos anfipáticos, es que su región polar es muy pequeña, por lo cual, el colesterol, por sí sólo, no forma bicapas lipídicas (Figura 2) (Cullis y Hope, 1985).



**Figura 2. Lípidos anfipáticos.** Se indica la región polar y la no polar de los lípidos. A, fosfatidilcolina. B, fosfatidiletanolamina. C, fosfatidilserina. D, fosfatidilinositol. E, esfingomielina. F, gangliósido y G, colesterol.

**3. Autoensamble de los lípidos anfipáticos.** La presencia de un extremo polar y uno no-polar en los lípidos anfipáticos, determina que estas moléculas se autoensamblen espontáneamente en un medio acuoso, en asociaciones moleculares específicas, o fases lipídicas, en donde se satisface su doble carácter de hidrofobia e hidrofilia. La parte polar del lípido interacciona con las moléculas de agua y la parte no-polar se aleja de ellas, ya que la interacción de grupos no-polares con el agua provocaría un aumento en la estabilidad de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, lo cual causaría una disminución en la entropía del sistema, que termodinámicamente no es favorable.



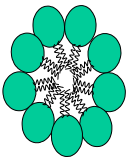
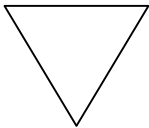
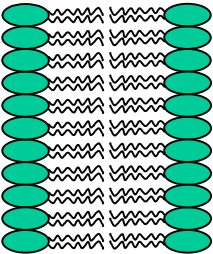
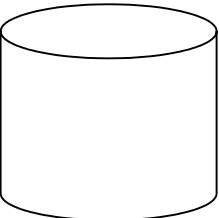
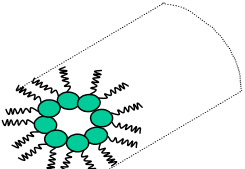
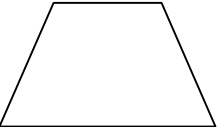
Esta situación desfavorable se contrarresta con el alejamiento de grupos no-polares de la fase acuosa, que se conoce como efecto hidrofóbico y que permite que las moléculas de agua puedan alcanzar el máximo de desorden posible (Tanford, 1973). Al presentarse el efecto hidrofóbico, los lípidos en un medio acuoso, se autoensamblan y forman las asociaciones moleculares de bicapa, de fase hexagonal II ( $H_{II}$ ) o de micela (Figura 3). En estas asociaciones moleculares, las regiones no-polares de los lípidos se atraen entre sí por fuerzas de van der Waals, en tanto que en las regiones polares, al quedar expuestas al medio acuoso, se manifiestan las interacciones hidrofílicas al máximo (Ibáñez, 1993).

Por lo tanto, el autoensamble de lípidos en asociaciones moleculares específicas no requiere de energía, es termodinámicamente espontáneo y estable; su fuerza motriz es el alejamiento de los grupos no-polares del medio acuoso, con lo que se conserva el mayor número de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, el máximo de desorden y el mínimo de energía en el sistema, (Tanford, 1973).

La bicapa lipídica es la asociación molecular que adoptan los lípidos anfipáticos que tienen una forma molecular cilíndrica, como la fosfatidilcolina (Figura 3), en los cuales el diámetro de la región polar es muy parecido al de las cadenas hidrocarbonadas. Como los extremos de la bicapa lipídica quedarían expuestos a un ambiente acuoso, la bicapa se cierra y forma una vesícula llamada liposoma. Esta asociación molecular es la estructura básica de todas las membranas biológicas (Singer y Nicolson, 1972).

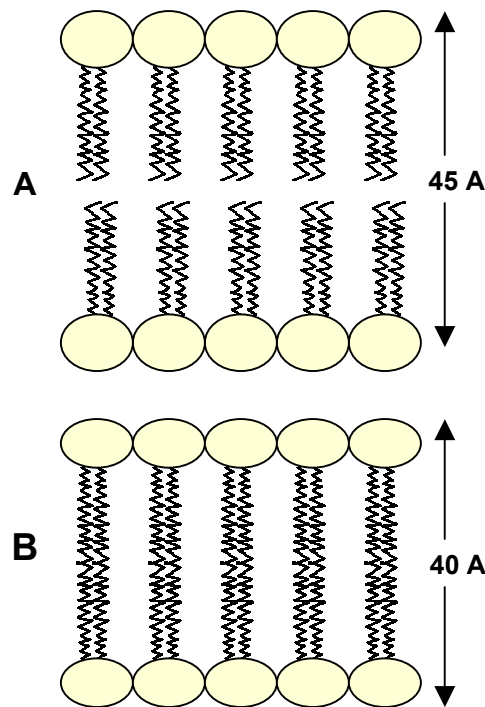




TIPO DE LÍPIDO	FASE ESTRUCTURAL	FORMA MOLECULAR
Lisofosfolípidos Detergentes	 MICELA	 CONO INVERTIDO
Fosfatidilcolina Esfingomiolina Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Fosfatidilglicerol Ácido Fosfatídico Cardiolipina	 BICAPA	 CILINDRICA
Fosfatidiletanolamina (insaturada) Cardiolipina-Ca <sup>2+</sup> Ácido fosfatídico-Ca <sup>2+</sup> (pH 6) Ácido fosfatídico (pH 3)	 HEXAGONAL II	 CONO

**Figura. 3. Polimorfismo lipídico** Diferentes configuraciones espaciales que adoptan los lípidos anfipáticos de acuerdo a su composición molecular (Ibáñez, 1993).

Las bicapas lipídicas pueden encontrarse en estado sólido (gel) o líquido (líquido cristalino), dependiendo de su composición de lípidos y de la temperatura. Cada lípido tiene una temperatura de transición ( $T_c$ ), en la cual ocurre el cambio de estado (Figura 4) (Ibáñez, 1993).



**Figura 4. Diferentes estados de la bicapa lipídica.** (A) Estado de gel donde las cadenas hidrocarbonadas se encuentran rígidas en la bicapa ocupando mayor espacio; (B) Estado líquido cristalino en donde las cadenas están desordenadas, por lo que el espesor disminuye (Ibáñez,1993).

Los liposomas con lípidos que tienen una  $T_c$  inferior a la temperatura ambiente, son líquidos y los que tienen una  $T_c$  superior son sólidos. La  $T_c$  es una función de las interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, por lo tanto depende de la longitud y la insaturación de estas cadenas. La  $T_c$  aumenta de 14 a 23°C cuando la longitud de la cadena se incrementa en 2 grupos metilenos; en tanto que la presencia de dobles ligaduras, de ramificaciones o de anillos de ciclo propano, producen una disminución hasta de 80°C en la  $T_c$ , como en los ácidos grasos de 18°C, porque interrumpen el ordenamiento regular de las cadenas hidrocarbonadas, lo cual disminuye las interacciones mencionadas (Pagano y Weinstein,1978).



El colesterol no forma liposomas por si mismo, pero se integra a las bicapas lipídicas. Su presencia en liposomas que presentan una  $T_c$  cercana a la temperatura ambiente, provoca una disminución en la fluidez de la bicapa y en la permeabilidad a solutos hidrofílicos, por lo que confiere una gran estabilidad al liposoma (Szoka y Papahadjopoulos, 1980).

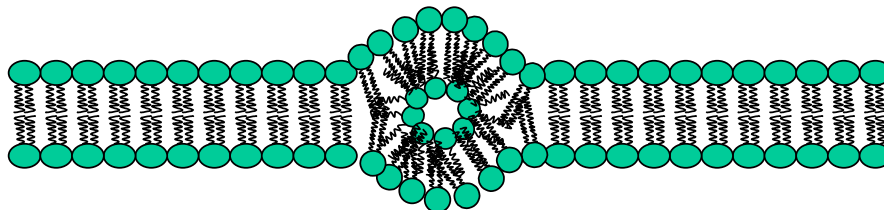
En las asociaciones moleculares de micela, la porción polar de los lípidos se encuentra en la periferia y la no-polar está hacia el centro de la estructura; debido a que los lípidos que dan este arreglo macromolecular tienen una forma molecular de cono invertido, en donde la porción más ancha corresponde a la región polar y la más estrecha a las cadenas hidrocarbonadas (Figura 3) (Ibáñez, 1993).

En la fase hexagonal ( $H_{II}$ ), las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se encuentran hacia afuera de un cilindro y las cabezas polares se encuentran hacia dentro en contacto con el medio acuoso (Figura 3). Los lípidos que se asocian de esta forma son los que tienen una forma molecular cónica, en donde la base del cono corresponde a las cadenas hidrocarbonadas y el vértice a la región polar, como la fosfatidiletanolamina poliinsaturada, la cardiolipina y al ácido fosfatídico a pH 3 y en presencia de cationes divalentes (Ibáñez, 1993). Cuando se modifican estas condiciones, la forma del lípido cambia a cilíndrica, con lo cual su asociación molecular cambia a la de bicapa. La propiedad de los lípidos de adoptar diferentes asociaciones moleculares en un medio acuoso, en función de su forma molecular, se le conoce con el nombre de polimorfismo lipídico (Cullis y Hope, 1985). Los lípidos que dan la fase  $H_{II}$ , constituyen del 35 al 40% de los lípidos de las membranas celulares (de Kruijff, 1987) y algunos estudios de resonancia magnética nuclear, sugieren que los lípidos cónicos en las membranas celulares se encuentran en un arreglo semejante al  $H_{II}$ , llamado micela invertida (Cullis and Hope, 1985) (Figura 5). Estudios posteriores han sugerido que estas micelas invertidas aumentan entre mayor sea la actividad biológica de las membranas, y se les ha relacionado con las siguientes funciones:



- a) En la formación de puntos de contacto entre membranas, como en los procesos de fusión membranal.
- b) En la yuxtaposición de membranas en los cloroplastos y las mitocondrias, organelos muy ricos en lípidos cónicos.
- c) En el transporte de cationes divalentes y de moléculas como lípidos, algunos péptidos y proteínas a través de la matriz lipídica membranal (de Kruijff, 1987).

Las micelas invertidas, también llamadas partículas lipídicas, se han demostrado por microscopía electrónica de criofactura, en la bicapa lipídica de liposomas con diferente composición de lípidos, entre los cuales se encuentran los de dipalmitoilfosfatidilcolina y ácido fosfatídico (2:1) (Verkleij, 1984). Además, se ha demostrado que estas partículas transportan iones, como el  $Md^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  hacia el interior de los liposomas (Baeza *et. al.*, 1990; 1994).



**Figura 5. Representación esquemática de una micela invertida.**

Es una micela invertida formada por liposomas cónicos en el interior de una bicapa lipídica.



**4. Formación de liposomas** Los liposomas se pueden formar de lípidos naturales y/o sintéticos. Su principal constituyente es la fosfatidilcolina, pero se pueden utilizar otros lípidos o mezclas de ellos, que pueden conferir carga positiva o negativa al liposoma. La inclusión de cargas aumenta notablemente el volumen acuoso atrapado adentro de los liposomas, debido a la repulsión electrostática entre las bicapas adyacentes, la carga también afecta la interacción de los liposomas con las células (Pagano y Weinstein, 1978). Caso especial, son los liposomas estéricamente estabilizados, que son aquellos a los que se les ha añadido moléculas de polietilenglicol al fosfolípido con la finalidad de que los liposomas tengan una mayor circulación en el torrente sanguíneo sin ser fagocitados (Lasic, 1996).

Generalmente los liposomas multilamelares se forman por agitación mecánica de una película muy fina de lípidos a la que se adiciona la solución acuosa con las moléculas que se van a encapsular (Banham *et al.*, 1965); estas moléculas quedan atrapadas en los espacios acuosos, si son polares, o se insertan en la bicapa lipídica si son hidrofóbicas.

Los liposomas pequeños se forman al someter a sonicación liposomas multilamelares (Lasic, 1988), con lo cual se produce una población homogénea de liposomas unilamelares (25-50 nm). El material que se desea encapsular se adiciona a la suspensión de liposomas y como la sonicación los rompe, el material externo puede ser atrapado al formarse los nuevos liposomas pequeños. Los liposomas unilamelares grandes se emplean principalmente, para encapsular macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, el método mas usado es por evaporación en fase inversa (Szoka y Papahadjopoulos, 1978). Con este método se forman liposomas de 0.1 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro.



**5. Importancia del uso de los liposomas.** La importancia del uso de liposomas como acarreadores de diversas sustancias, radica en que se ha demostrado que su utilización modifica fuertemente la farmacocinética de los productos activos, ya que la sustancia libre requiere de mayores concentraciones para ejercer su acción, pues es rápidamente excretada por los riñones y además puede tener efectos tóxicos, diferentes o no tener ninguno (Poyner, *et al.*, 1995; Duserre, *et al.*, 1995; Kamei, *et al.*, 1995; Camilleri, *et al.*, 1995).

Ha sido notable la utilización de liposomas para encapsular medicamentos antitumorales, como es en el tratamiento de adenocarcinomas en donde se han utilizado liposomas con muramil tripéptido e ifosfamida, de tal forma que son accesibles a los macrófagos aledaños al tumor, lográndose la regresión de éste (Kleinerman, *et al.*, 1995a). Por otro lado, al enviar el muramil tripéptido encapsulado en liposomas y tomar muestras para su posterior observación en el microscopio electrónico, se aprecia la aparición de una discreta subpoblación de macrófagos, distinta, morfológica y funcionalmente a la población inicial, que pudiera estar involucrada con los efectos tumorocidas (Hoedemakers, *et al.*, 1995). Más aún, se ha demostrado que existe correlación entre la regresión de tumores y la administración de medicamentos en liposomas (Xie, *et al.*, 1995). En otras investigaciones se utilizó un fármaco anti-VIH encapsulado en liposomas dirigidos a monocitos-macrófagos humanos (Betageri, *et al.*, 1993). Adicionalmente, se ha avanzado en el estudio acerca del efecto de los medicamentos encapsulados en liposomas sobre los macrófagos, esto puede inducir la secreción de citocinas que es la clave para la regresión de tumores o para la defensa contra enfermedades, como en el caso de la IL-1, el TNF y la IL-6 (Asano, *et al.*, 1995; Kleinerman, 1995b; Phillips, *et al.*, 1995; Eue, *et al.*, 1995; Pittet, *et al.*, 1995).



En la actualidad se han utilizado liposomas para nuevas estrategias de combate contra diversas enfermedades, principalmente cancerosas (Kopenhagen, et al., 1998). En una de ellas se han utilizado estas vesículas para transportar genes que codifican para diferentes citocinas, con la finalidad de que sean expresados por las células tumorales. Con esta estrategia, se han logrado efectos contra células de cáncer cervical y de colon (Tomoda, *et al.*, 1998; Shimizu, *et al.*, 1998). Otra estrategia es la utilización de oligodesoxiribonucleótidos asociados a liposomas catiónicos con la finalidad de modificar la expresión genética en células hematopoyéticas humanas, lo que abre la posibilidad de utilizarlos en protocolos clínicos (Kronenwett *et al.*, 1998).

Los liposomas son útiles en la práctica clínica, en el rastreo linfático por centelleo en el que se utilizan micropartículas marcadas o coloides que se distribuyen en la corriente linfática. En la actualidad se ha propuesto una nueva estrategia alternativa, enviando liposomas con marcaje dirigidos a los macrófagos de esas zonas (Pittet, *et al.*, 1995).

Otra forma de utilización de liposomas es para la fabricación de vacunas mediante el encapsulamiento del antígeno para generar respuesta inmune de los linfocitos T citotóxicos (CTLs, del inglés: cytotoxic T lymphocyte). De hecho, existe información acerca de la estimulación de CTLs por antígenos liposomales, lo que apoya la idea de la utilización de liposomas como vacunas sintéticas contra antígenos intra o extracelulares (Alving y Waseff, 1994; Kersten y Crommelin, 1995; Rao, *et al.*, 1995; Barnes y Michell, 1995; Lezama-Dávila y Gallagher, 1995; Bergers, *et al.*, 1994; Alving, 1993; Ho, *et al.*, 1994; Nair, *et al.*, 1993). Existen estudios acerca del procesamiento de los antígenos liposomales por los macrófagos y varios autores proponen que el antígeno es procesado por los macrófagos a través de un proceso citoplásmico que resulta en la liberación de los epítopes del antígeno al aparato de Golgi y al retículo endoplásmico. Los epítopes antigénicos liposomales podrían asociarse a las moléculas MHC clase I y



transportarse en vesículas hacia la superficie de las células para la presentación e inducción de CTLs (Alving y Waseff, 1994; Rao, *et al.*, 1995; Barnes y Mitchell, 1995; Alving, 1993).

Paradójicamente, los artículos que describen diferentes usos y formulaciones con liposomas han disminuido, ya que en la actualidad se registran cientos de patentes al año con formulaciones y usos específicos de estas vesículas (Soto, 2000).

**6. Utilización de liposomas como vehículos para citocinas.** Actualmente se han encapsulado diversas citocinas en liposomas y se ha observado que pueden ejercer sus funciones tanto *in vitro* en células en cultivo como *in vivo* en animales de experimentación. Uno de los primeros informes de una citocina encapsulada en liposomas data de 1985 en el cual un factor denominado MAF (Factor activador de macrófagos, del inglés: Macrophage Activating Factor) producido por linfocitos, termoestable y especie específico, al ser encapsulado en liposomas podía romper la barrera de la especificidad (Kleinerman y Fidler, 1985). Esta citocina ejerce sus funciones estimulando un receptor interno después de haber traspasado la membrana de la célula no específica.

Se han utilizado IL-1, TNF e IFN $\gamma$  encapsuladas en liposomas para causar efectos tumorocidas en células de cáncer de mama (Saito, *et al.*, 1995, Coradini, *et al.*, 1998). Además se ha utilizado TNF $\alpha$  encapsulado para combatir sarcomas (van der Veen, *et al.*, 1998) así como IL-2 para el tratamiento de metastasis en hígado (Okuno, *et al.*, 1998).





**7. Unión preferencial de los liposomas a sus células blanco.** La capacidad fagocítica de los macrófagos y su participación en la degradación de los lípidos hacen que estas células sean la vía principal de eliminación de los liposomas. Precisamente, por esta razón se han fabricado liposomas modificados o no convencionales, para permitir que circulen o permanezcan por más tiempo en el sitio de inyección y de esta manera sean capaces de liberar gradualmente su contenido para que éste ejerza su función (Lasic, 1996).

Algunos investigadores han modificado liposomas añadiéndoles azúcares para dirigirlos a poblaciones celulares específicas; además, se postula que asociar azúcares con diversas proteínas, puede facilitar la unión de éstas con su receptor (Kichler y Shuber, 1995; Wadhwa y Rice, 1995; Yachi, *et al.*, 1995).

La liberación de las citocinas en sus células blanco es un punto que no ha sido muy estudiado. Como ya se mencionó, los macrófagos son la vía principal de captación de los liposomas, por lo que se están utilizando liposomas modificados para hacer llegar medicamentos, citocinas o diversas moléculas a una población celular específica, precisamente librando la fagocitosis de los macrófagos. Independientemente de la célula blanco a la cual van dirigidos, los liposomas pueden seguir tres caminos para interactuar con ellas: fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido en el citoplasma, entrar en la célula vía endocitosis o fagocitosis; y romperse en un área cercana a la célula blanco, liberando su contenido permitiendo que entre en contacto con las células (Poste, 1980; Zhou y Huang, 1994).



### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El encapsulamiento liposomal de fármacos puede alterar fuertemente su distribución y su tasa de liberación en el cuerpo; sin embargo, los protege contra la degradación o inactivación. Las diferencias farmacocinéticas que produce el encapsulamiento de fármacos en liposomas pueden provocar que éstos actúen en el órgano blanco, reduciendo la toxicidad y/o aumentando la eficacia del fármaco, haciendo posible una mayor absorción local del mismo. De esta manera, los liposomas se pueden considerar un excelente vehículo para la administración exógena de citocinas que pueden ser tóxicas, como la IL-2, cuya administración in vivo causa serios problemas. El empleo de liposomas puede reducir los efectos adversos al administrar la IL-2 en altas concentraciones para activar la respuesta antitumoral a través de linfocitos y macrófagos contra distintos tipos de cánceres, como el carcinoma cérvico-uterino (CaCu).

En trabajos anteriores del Laboratorio de Oncología de la FES Zaragoza, se utilizó la IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos para el tratamiento de ratones con tumores inducidos de CaCu; obteniéndose una disminución de la masa tumoral así como disminución de los efectos tóxicos. Se utilizaron liposomas catiónicos, a pesar de que los lípidos catiónicos no existen en la naturaleza, porque existen informes de la predilección de las células epiteliales por estas vesículas. Debido a que los resultados previos han sido alentadores, es necesario determinar la naturaleza de la interacción entre la citocina y los liposomas; por lo anterior, en el presente trabajo se estudió las características de los liposomas vacíos y con la IL-2 encapsulada y compararlos con la interacción con liposomas neutros, debido a que éstos son similares a las membranas de cualquier célula. Aunado a lo anterior, se considera de suma importancia conocer la morfología de dichos liposomas para que en estudios posteriores se pueda seguir su farmacocinética para demostrar su eficacia y seguridad de aplicación en el tratamiento de tumores inducidos en ratones, pues es uno de los pasos previos para que en un futuro



---

podiera aplicarse en el tratamiento con la IL-2 encapsulada en liposomas a pacientes con CaCu. Creemos que el presente trabajo no sólo permitirá el avance de esta forma específica de tratamiento del CaCu, sino también en la generación de nuevos conocimientos de investigación básica en el campo de los liposomas como modelos de membrana.



---

## **IV. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar diferentes tipos de liposomas que encapsulan la IL-2.



---

## V. OBJETIVOS PARTICULARES

Encapsular la IL-2 en liposomas neutros y catiónicos.

Determinar por Microscopía Electrónica de Trasmisión la morfología y el tamaño de los liposomas con IL-2 encapsulada.

Determinar por RMN  $^{31}\text{P}$  las asociaciones moleculares de los lípidos en los liposomas con IL-2 encapsulada.

Determinar las características morfológicas de los liposomas con IL-2 encapsulada por citofluorometría



---

## VI. HIPÓTESIS

De acuerdo a las características fisicoquímicas de la IL-2, existe la posibilidad de que al ser encapsulada en liposomas se incorpore a la bicapa lipídica o quede unida, por interacciones electrostáticas, a la superficie externa de éstos. La presencia de la citocina en la superficie de los liposomas facilitaría el proceso de unión a su receptor y la consecuente señalización al interior de las células blanco, lo cual haría más eficiente la respuesta citotóxica requerida para la reducción de tumores inducidos en ratones.



---

## VII. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El estudio realizado es de tipo experimental.



---

## VIII. POBLACIÓN

Los objetos de estudio con los que se llevo a cabo la investigación son liposomas neutros y catiónicos formados con fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y colesterol o fosfatidilcolina y espermidin-colesterol.





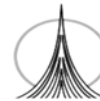
## IX. VARIABLES

### **Variables de control.**

- Concentración de IL-2 (100 UI/mL)
- Tipo de liposoma (neutro y catiónico)
- Método de preparación de los liposomas

### **Variables de respuesta.**

- Interacción de la proteína con respecto al tipo de liposoma
- Morfología de los liposomas
- Tamaño de los liposomas



## X. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. LÍPIDOS

Los lípidos que se utilizaron en este trabajo fueron: fosfatidilcolina de yema de huevo, fosfatidiletanolamina, colesterol (Sigma Chem) y espermidin colesterol (sintetizado en el Lab. de Biomembranas de la ENCB del IPN).

### 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

#### a) Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio	8.20g
Cloruro de potasio	0.28g
Fosfato potásico monobásico	0.26g
Fosfato sódico dibásico	2.35g

Todos los componentes se disolvieron con agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 N y se llevó a un volumen final de 1000 mL. Esta solución se filtró con membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro para eliminar impurezas.

#### b) Regulador de fosfatos para citofluorometría (pH 7.4)

Cloruro de sodio	81.2g
Fosfato potásico monobásico	02.6g
Fosfato sódico dibásico	23.5g
Cloruro potásico	02.8g
EDTA	03.6g
Cloruro de litio	04.3g



Todas las sales se disolvieron en agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4, se llevó a un volumen de 10 L y se filtró con membranas Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro para eliminar impurezas.

### **c) Anticuerpos**

1<sup>er</sup> anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti-IL-2 de humano. (R&D, Systems)

2<sup>o</sup> anticuerpo IgG de conejo anti IgG de ratón acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Zimed)

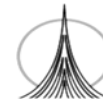
### **d) IL-2**

IL-2 recombinante (R&D, Systems)

## **3. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS**

En este trabajo se utilizaron liposomas neutros y catiónicos, estos se utilizaron en diferentes técnicas y estudios como citofluometría-liposomal y  $^{31}\text{P}$ -NMR. Generalmente los liposomas fueron preparados el mismo día en que se efectuaron los estudios.

Los liposomas neutros se prepararon disolviendo 10  $\mu\text{mol}$  de lípidos totales: fosfatidilcolina (PC): fosfatidiletanolamina (PE): colesterol (CHOL), en relación molar 4:2:4, respectivamente. Los lípidos se colocaron en un matraz de dos bocas en 1 mL de cloroformo, posteriormente se evaporó el disolvente y los lípidos quedaron distribuidos de manera uniforme en el fondo del matraz. Después los lípidos se disolvieron en 1.2 mL de éter dietílico y se les agregaron 333  $\mu\text{L}$  de regulador PBS a pH 7.4. El matraz se agitó con un vortex a su velocidad máxima durante 45 segundos y se procedió a evaporar el disolvente durante 45 seg más, durante este procedimiento se formó un gel viscoso el cual se transformó en una



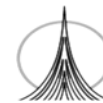
suspensión de liposomas. Esta suspensión de liposomas se llevó a un volumen final de 1 mL con regulador de PBS.

Los liposomas catiónicos se prepararon disolviendo 10mmol de los siguientes lípidos: fosfatidilcolina (PC) y espermidin-colesterol (ESP-CHol), 1:1 respectivamente; los lípidos se colocaron en un tubo de 13 x 100 mm y se adicionó 1 mL de cloroformo, posteriormente se evaporó el disolvente con vacío para que los lípidos quedaran distribuidos de manera uniforme en el fondo del tubo, después los lípidos se resuspendieron en 333  $\mu$ L de PBS a pH 7.4 y se procedió a sonicar por tres ciclos de cinco segundos por 30 segundos de reposo, finalmente la suspensión de liposomas se llevó a un volumen de 1000  $\mu$ L.

Para encapsular la IL-2 en los liposomas, ésta se adicionó en los 333  $\mu$ L de PBS a la capa de lípido formada después de la evaporación del cloroformo, en una cantidad de 33UI.

#### **4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN DE LOS LIPOSOMAS QUE ENCAPSULAN IL-2.**

Se prepararon liposomas catiónicos y neutros vacíos y con IL-2 encapsulada, posteriormente se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L de liposomas y se colocaron en rejillas de cobre con 200 mallas que estaban cubiertas con formvar, se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y después se eliminó el líquido por decantación con papel filtro. Posteriormente las muestras se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo al 4% durante 5 minutos, se elimina el exceso de líquido y se deja secar durante 24 hr. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión y se tomaron fotografías a 40 K, 75 K y 150K de aumento.



## 5. CITOFUOROMETRÍA DE LOS LIPOSOMAS QUE ENCAPSULAN IL-2.

Se prepararon liposomas catiónicos y neutros vacíos y con IL-2 encapsulada. A los liposomas que tenían IL-2 se lavaron con PBS y se centrifugaron 45 min a 40,000 rpm, empleando tubos para ultracentrífuga (Beckman ultra-clear No. 344060) de 14 x 95 mm. A continuación se eliminó el sobrenadante y la pastilla de liposomas se resuspendió en 1,000  $\mu$ L de PBS a pH 7.4, posteriormente se tomaron muestras de los liposomas vacíos y con IL-2 encapsulada a una concentración de 0.1  $\mu$ mol del lípido en 100  $\mu$ L de PBS a pH 7.4 en cada tubo; posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L del primer anticuerpo monoclonal contra IL-2 a una concentración de 5  $\mu$ g / mL; estas preparaciones se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se adicionó el segundo anticuerpo conjugado a FITC a una dilución 1:80 y se incubó 1 h a 37 °C en obscuridad. Después de la incubación, se completó el volumen a 1,000  $\mu$ L con PBS a pH 7.4 a cada tubo. Los testigos que se incluyeron fueron: con el 1<sup>er</sup> anticuerpo, segundo anticuerpo conjugado a FITC solos y el de los liposomas vacíos; a estas se les aplicó el tratamiento completo descrito.

Las preparaciones liposomales obtenidas se colocaron en tubos para citofluorimetría de 12 x 75 mm (Elkay Products, Inc.) y se leyeron en el citofluorómetro FACScalibur equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson Co.), se empleó el regulador de fosfatos para citofluorimetría, y se usaron los siguientes parámetros en el citofluorómetro: E00 = 2.96 LIN, SSC-H = 232 LOG, FL1 = 412 LOG y TH = 90. Finalmente se realizó el análisis de los datos obtenidos con el programa de Cellquest (Beckton Dickinson).



---

## **6. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{31}\text{P}$ DE LOS LIPOSOMAS QUE ENCAPSULAN IL-2.**

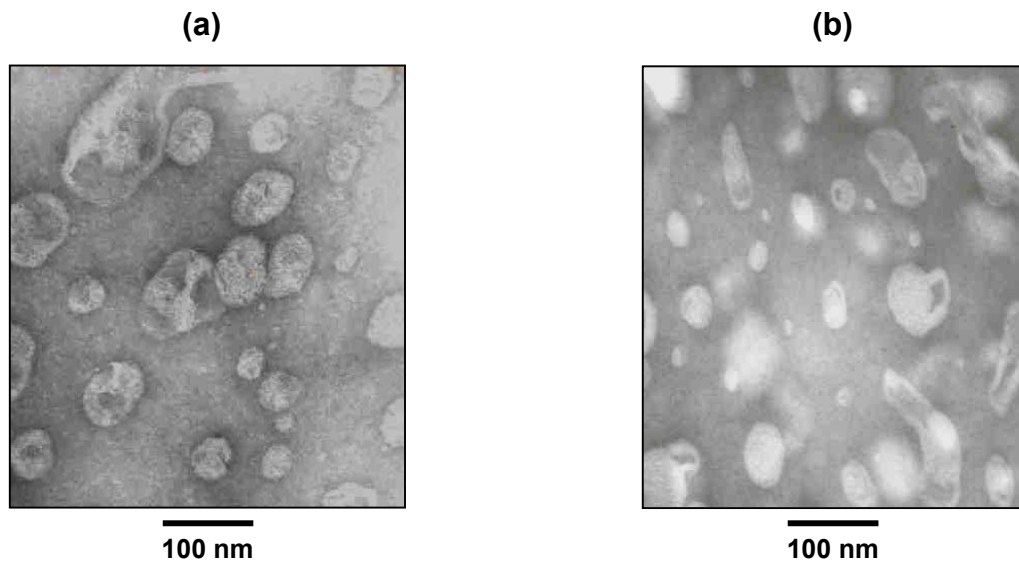
El método que se siguió para este estudio fue descrito por Jones y col, modificado por Baeza y col. Los liposomas catiónicos se prepararon por el método antes descrito y contenían 140  $\mu\text{moles}$  de los lípidos fosfatidilcolina y espermidilcolesterol (5:5). Estas se prepararon en presencia o ausencia de IL-2 y se colocaron en una celda de 5 mm (OD) para el estudio de resonancia magnética nuclear. Los espectros se obtuvieron en el espectrofotómetro (JOEL FX90Q), con transformadas de Fourier, a 36.23 MHz y 37  $^{\circ}\text{C}$ , con una amplitud de 7.5 KHz, con pulso de 7  $\mu\text{seg}$ , con un decaimiento de pulsos de 2.8 seg, y un total de 30,000 acumulaciones. Para iniciar la señal en el espectrofotómetro se adicionó a las muestras agua deuterada.



## XI. RESULTADOS.

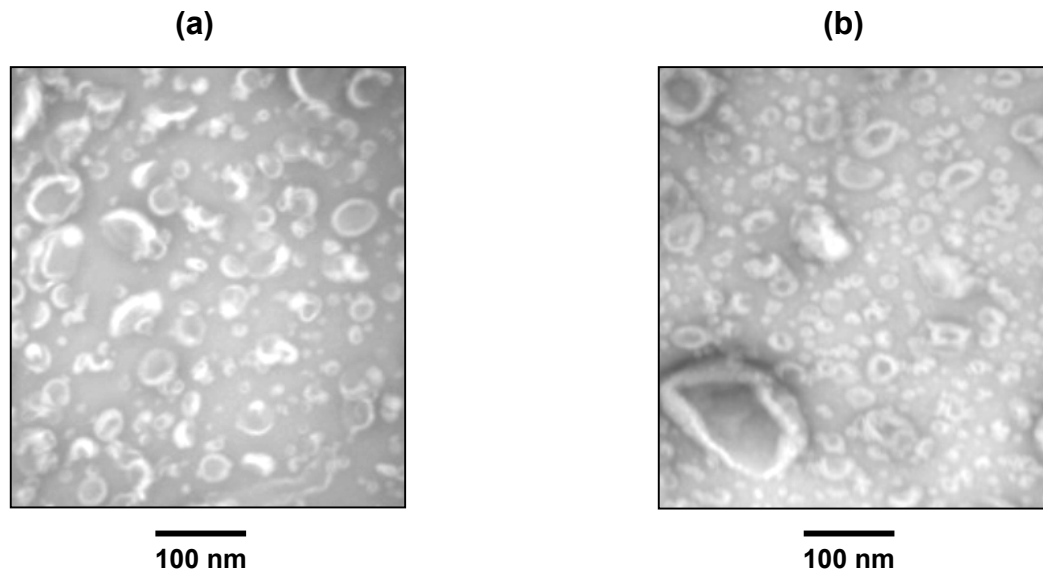
### 1. DETERMINACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE LOS LIPOSOMAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN.

Para caracterizar la morfología de los liposomas, se hicieron liposomas neutros o catiónicos, vacíos o con IL-2 encapsulada y se prepararon por la técnica de tinción negativa para observarlos en microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 JEOL. Al analizar las rejillas, se observó que los liposomas neutros vacíos son esféricos y presentan una variedad de tamaño entre 8 y 75 nm de diámetro, predominando los liposomas de mayor tamaño. Cuando los liposomas contenían IL-2 encapsulada, la morfología y el tamaño de las vesículas no cambió (Figura 6).



**Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión de liposomas neutros.**  
a) Liposomas vacíos, b) Liposomas neutros que encapsulan IL-2. Aumento de 75,000 X

Con respecto a los liposomas catiónicos vacíos, se observó que son esféricos y que su tamaño varía de 25 hasta 125 nm de diámetro, predominando los liposomas pequeños. Cuando se encapsula la IL-2 en estos liposomas catiónicos no se observa una diferencia clara en cuanto el tamaño y la morfología en comparación con los vacíos (Figura 7).

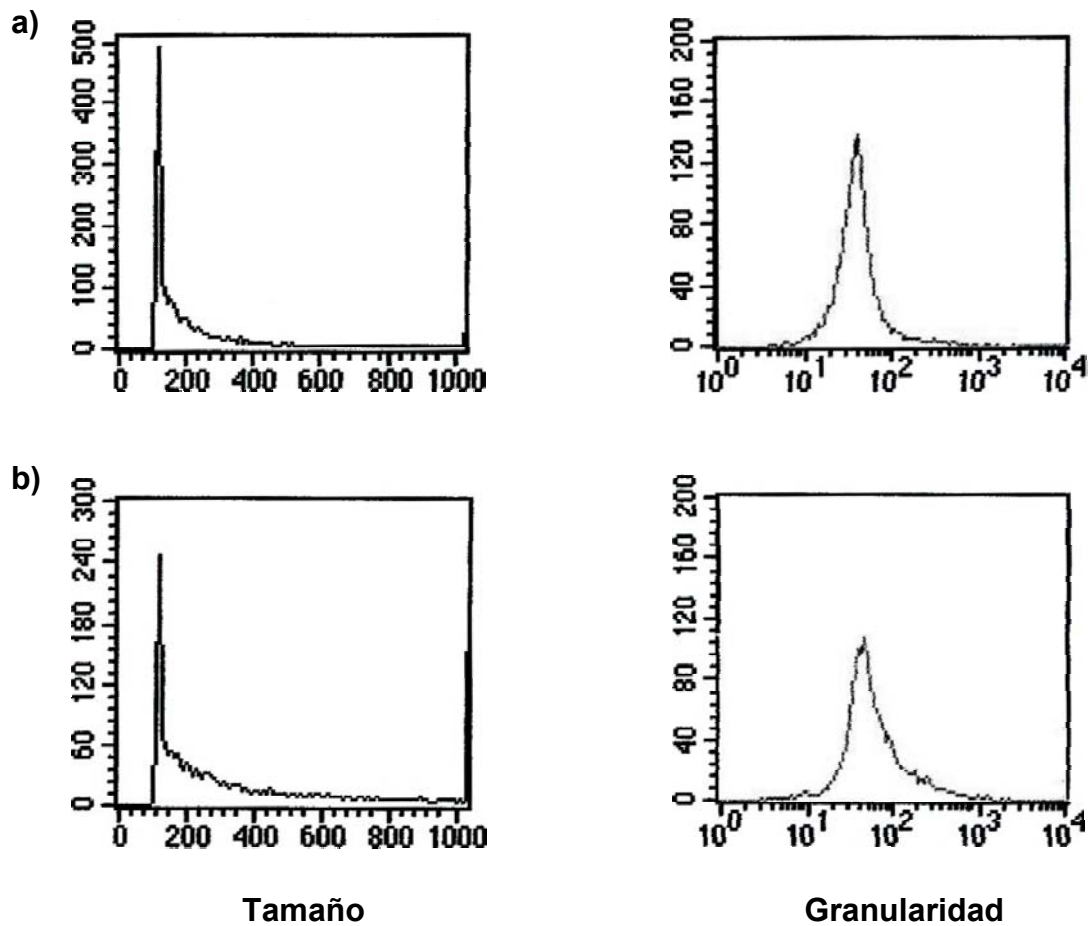


**Figura 7. Microscopía electrónica de transmisión de liposomas catiónicos.**  
a) liposomas vacíos, b) Liposomas que encapsulan IL-2. Aumento de 75,000 X

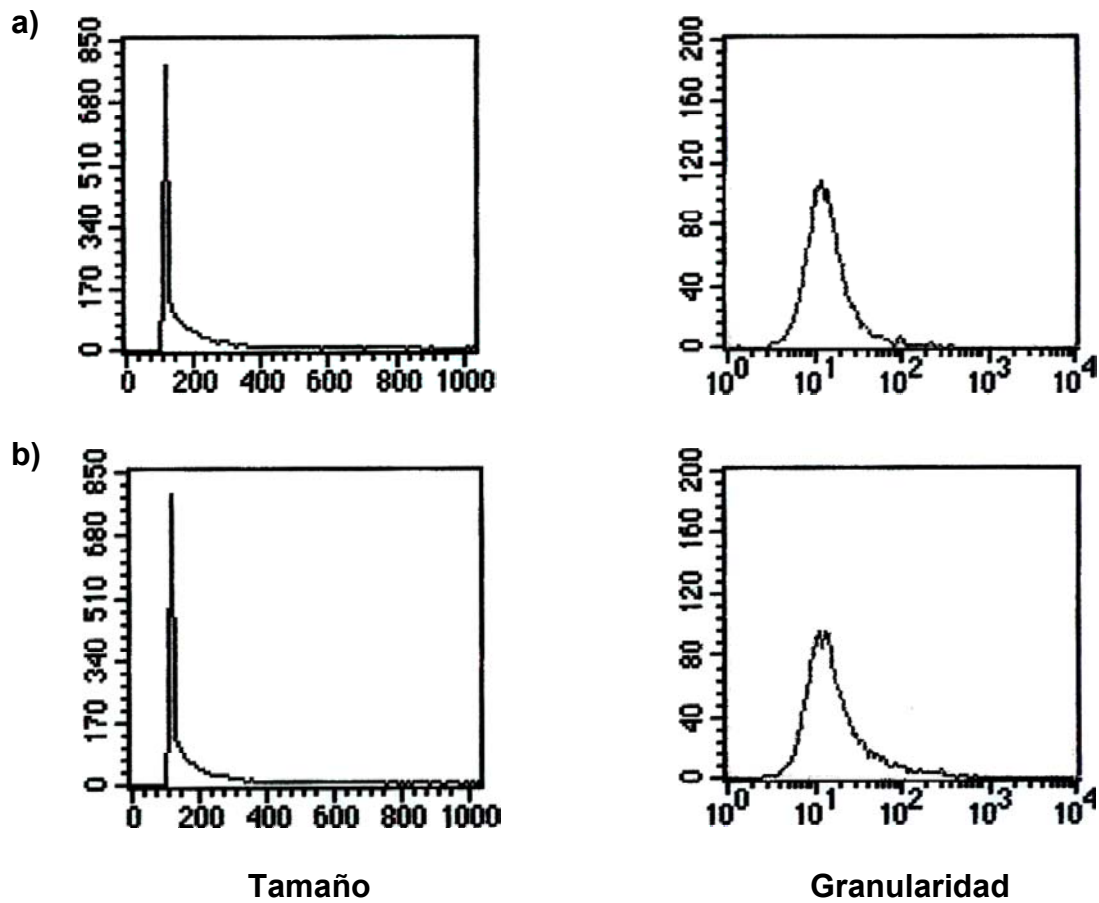
## 2. DETERMINACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE LOS LIPOSOMAS POR CITOFUOROMETRÍA DE FLUJO.

Con la finalidad de conocer si existe diferencia en la granularidad (complejidad) y el tamaño de los diferentes liposomas, se prepararon liposomas catiónicos o neutros, vacíos o con IL-2 encapsulada. Los resultados obtenidos por citofluorometría de flujo indicaron que los liposomas neutros o catiónicos no presentan diferencias en la granularidad y el tamaño, ya sea vacíos o con IL-2 encapsulada (Figuras 8 y 9).





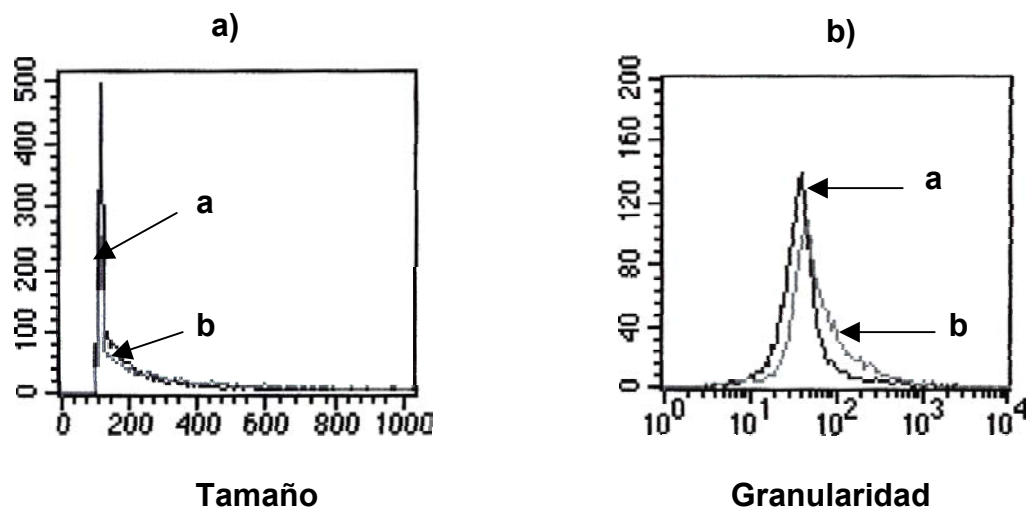
**Figura 8. Citofluorometría de liposomas neutros:** Los liposomas se prepararon con fosfatidilcolina:fosfatidiletanolamina:colesterol en proporción molar 4:2:4. **a)** liposomas vacíos (control), **b)** Liposomas con IL-2 encapsulada. Las abscisas indican el tamaño o la granularidad (complejidad) relativos en escala logarítmica y las ordenadas el número de liposomas.



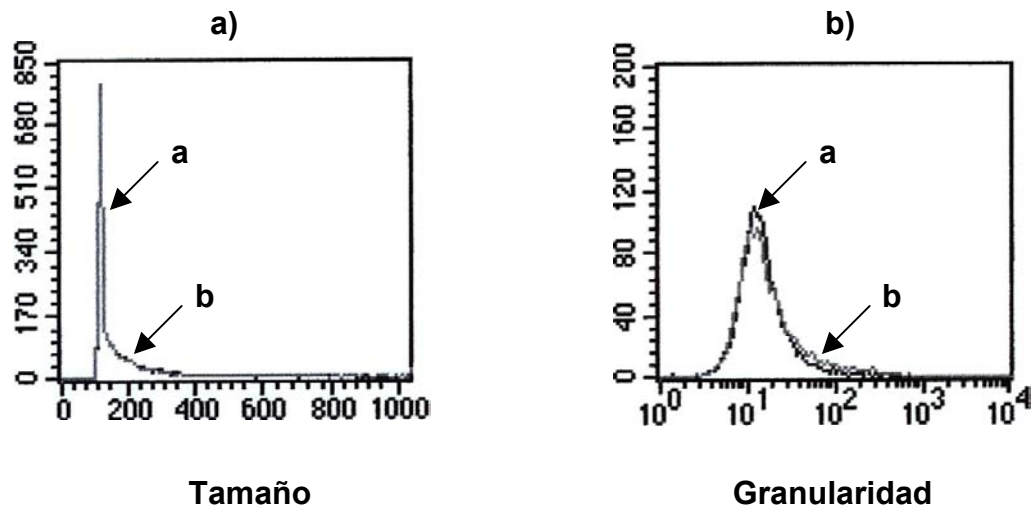
**Figura 9. Citofluorimetría de liposomas catiónicos:** Los liposomas se prepararon de fosfatidilcolina: espermidil-colesterol en proporción molar 5:5. **a)** liposomas vacíos (control), **b)** Liposomas con IL-2 encapsulada. Las abscisas indican el tamaño o la granularidad (complejidad) relativos en escala logarítmica y las ordenadas el número de liposomas.



Utilizando el método estadístico de Kolmogorov-Smirnov se graficaron los histogramas de las comparaciones entre los liposomas neutros y catiónicos. Se obtuvo que no existe diferencia significativa entre los dos tipos de liposomas, vacíos o encapsulando la IL-2 en cuanto al tamaño y la granularidad (complejidad) (Figura 10-11). Se determinaron los valores de la diferencia (D) en escala logarítmica, del tamaño y la granularidad entre los liposomas vacíos o con IL-2 encapsulada. Obteniendo valores menores a 0.5 en todos los casos (tabla 2). Para establecer la existencia de una diferencia significativa el valor de D debe ser mayor a 0.5.



**Figura 10. Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas neutros.** Histogramas sobrepuestos de liposomas vacíos (control) / Liposomas con IL-2 encapsulada. **a)** Comparación del tamaño. **b)** Comparación de la granularidad (complejidad)



**Figura 11. Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas catiónicos.** Histogramas sobrepuestos de liposomas vacíos (control) / Liposomas con IL-2 encapsulada. **a)** Comparación del tamaño. **b)** Comparación de la granularidad (complejidad)

**Tabla 2.** Análisis estadístico de los diferentes liposomas por el método de Kolmogorov-Smirnov.

COMPARACIONES	Tamaño	Granularidad
LINEVA -- LINEIL-2	0.23	0.33
LICAVA -- LICAIL-2	0.02	0.07

Se prepararon liposomas catiónicos y neutros, vacíos o con IL-2 encapsulada. Se realizó el análisis estadístico con el programa Cellquest que establece la diferencia significativa de tamaño y granularidad entre los liposomas.

Donde:

LINEVA = Liposomas neutros vacíos

LINEIL-2 = Liposomas neutros con IL-2 encapsulada

LICAVA = Liposomas catiónicos vacíos

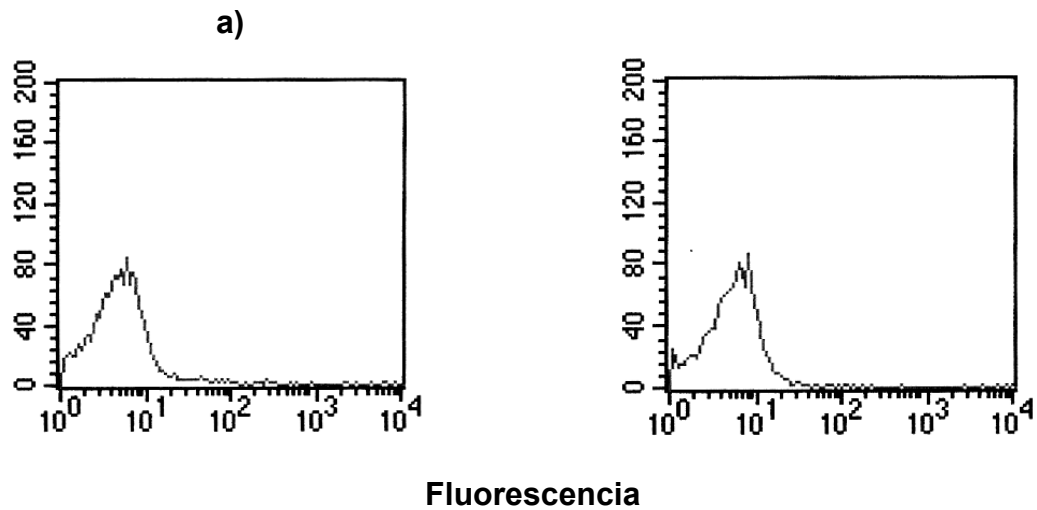
LICAIL-2 = Liposomas catiónicos con IL-2 encapsulada



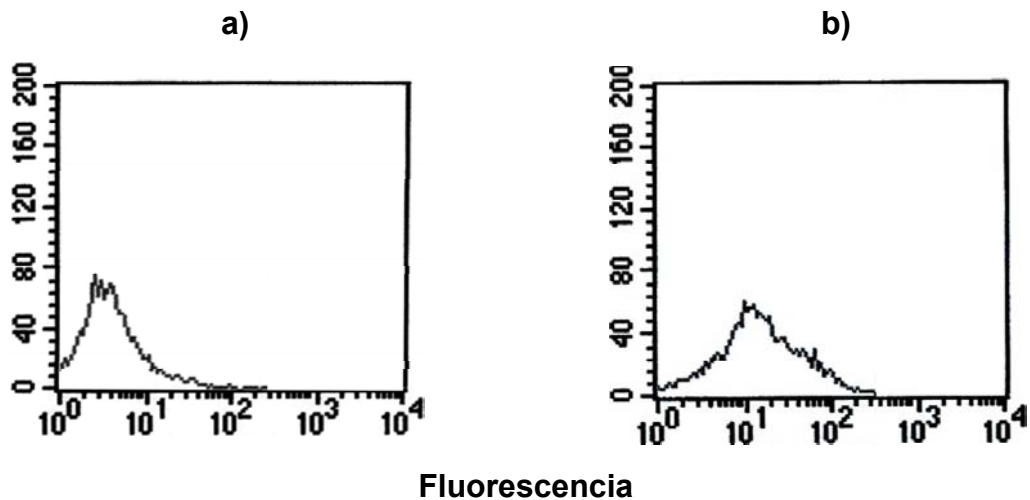
### **3. IDENTIFICACIÓN DE IL-2 ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS POR CITOFLUOROMETRÍA.**

Con la finalidad de conocer la localización de la IL-2 en los liposomas, se procedió a preparar liposomas neutros o catiónicos vacíos o con IL-2 encapsulada. Cuando los liposomas contenían IL-2 encapsulada, se procedió a lavarlos por ultracentrifugación para eliminar la citocina no incluida. Los liposomas lavados se incubaron con el anticuerpo monoclonal contra IL-2 y posteriormente se agregó un anticuerpo marcado con FITC. Al analizar las muestras en el citofluorómetro de flujo, se encontró que los liposomas neutros con IL-2 encapsulada no presentan fluorescencia (Figura 12). En cambio, los liposomas catiónicos que tienen IL-2 encapsulada, presentan fluorescencia (Figura 13).

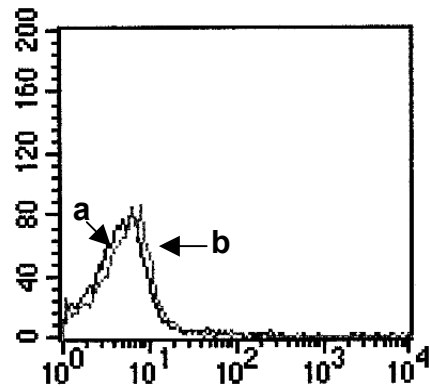
Los resultados del análisis estadístico por el método de Kolmogorov-Smirnov, se graficaron en histogramas y se realizaron las comparaciones entre liposomas vacíos y con IL-2 encapsulada. En los liposomas neutros no se observó ninguna diferencia significativa entre los vacíos y los que encapsulan IL-2 (Figura 14). En cambio en los liposomas catiónicos se observó una diferencia significativa entre los vacíos y los que encapsulan IL-2 (Figura 15), obteniéndose una D de 0.55. (Tabla 3).



**Figura 12. Citofluorometría de liposomas neutros:** Los liposomas se incubaron con el primer anticuerpo monoclonal IgG anti-IL-2, con el segundo anticuerpo anti-IgG acoplado a FITC. **a)** Liposomas vacíos (control), **b)** Liposomas con IL-2 encapsulada lavados por ultracentrifugación. Las abscisas indican la intensidad de la fluorescencia relativa en escala logarítmica y las ordenadas el número de liposomas.

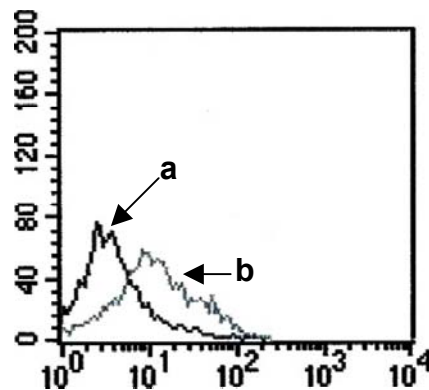


**Figura 13. Citofluorometría de los liposomas catiónicos:** Los liposomas se incubaron con el primer anticuerpo monoclonal IgG anti-IL-2, con el segundo anticuerpo anti-IgG acoplado a FITC. **a)** Liposomas vacíos (control), **b)** Liposomas con IL-2 encapsulada lavados por ultracentrifugación. Las abscisas indican la intensidad de la fluorescencia relativa en escala logarítmica y las ordenadas el número de liposomas.



Fluorescencia

**Figura 14. Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas neutros.** Histogramas sobrepuestos de liposomas, a) vacíos (control) / b) Liposomas con IL-2 encapsulada. Comparación de la fluorescencia relativa.



Fluorescencia

**Figura 15. Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorometría de los liposomas catiónicos.** Histogramas sobrepuestos de liposomas, a) vacíos (control) / b) Liposomas con IL-2 encapsulada. Comparación de la fluorescencia relativa.



**Tabla 3.** Análisis estadístico de los diferentes liposomas por el método de Kolmogorov-Smirnove.

<b>COMPARACIONES</b>	<b>Fluorescencia</b>
LINEVA -- LINEIL-2 lavados	0.11
LICAVA -- LICAIL-2 lavados	0.55

Se prepararon liposomas catiónicos y neutros, vacíos o con IL-2 encapsulada lavados por ultracentrifugación, se incubaron con el primer anticuerpo monoclonal IgG anti-IL-2 y después se le adicionó el segundo anticuerpo anti-IgG acoplado a FITC. Se realizó el análisis estadístico con el programa Cellquest que establece la diferencia significativa de fluorescencia entre los liposomas.

Donde:

LINEVA = Liposomas neutros vacíos

LINEIL-2 = Liposomas neutros con IL-2 encapsulada

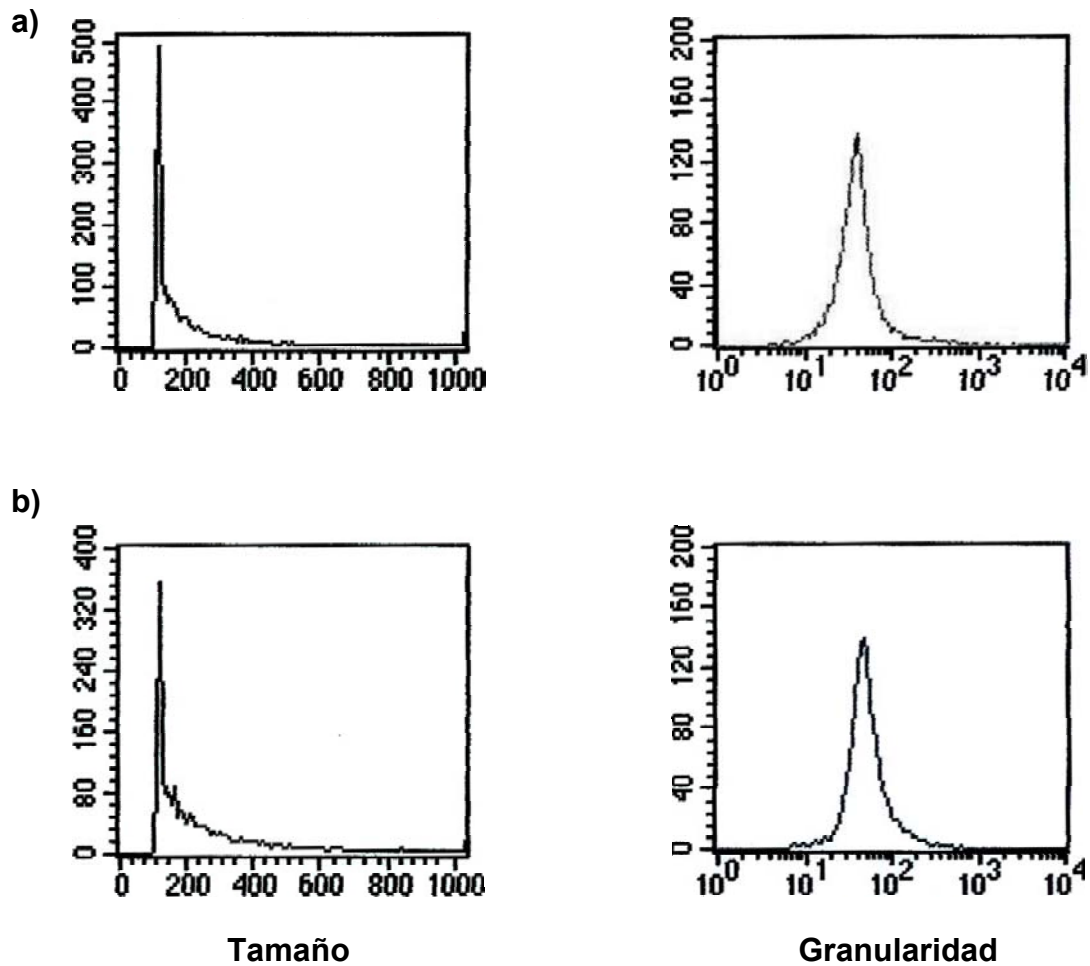
LICAVA = Liposomas catiónicos vacíos

LICAIL-2 = Liposomas catiónicos con IL-2 encapsulada

#### **4. DETERMINACIÓN POR CITOFUOROMETRÍA DE FLUJO DE LA MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE LOS LIPOSOMAS LAVADOS MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN.**

Debido a que los resultados de la detección de la IL-2 mostraron diferencias en los liposomas catiónicos lavados con respecto a los vacíos, se repitieron los estudios de tamaño y granularidad para todos los liposomas lavados. Los resultados indicaron que únicamente los liposomas que contenían IL-2 encapsulada lavados por ultracentrifugación, presentaron un aumento en su granularidad (complejidad) (Figuras 16-19). Lo que se confirmó por el método estadístico de Kolmogorov-Smirnove (Tabla 4).

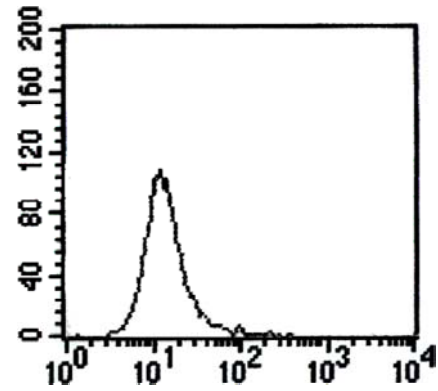
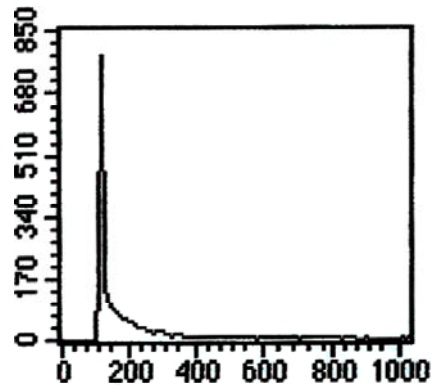




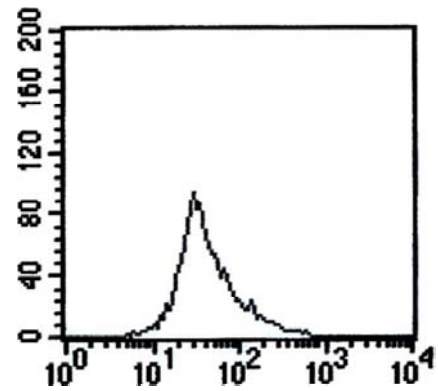
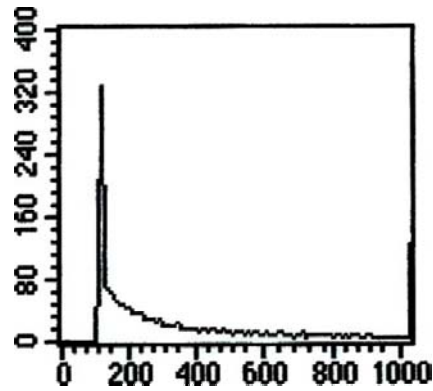
**Figura 16. Citofluorometría de liposomas neutros.** a) Liposomas vacíos (control), b) Liposomas con IL-2 encapsulada lavados por ultracentrifugación. Las abscisas indican el tamaño o granularidad (complejidad) relativos en escala logarítmica y las ordenadas el número de liposomas.



a)

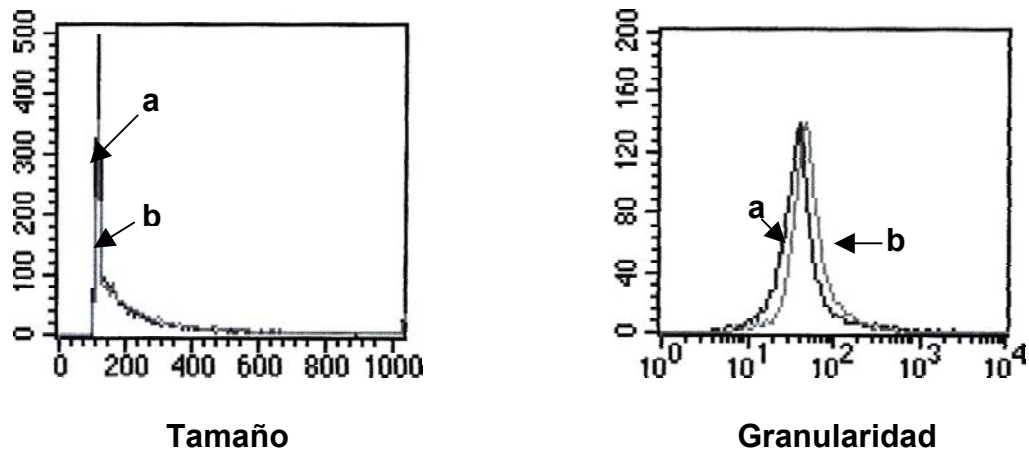


b)

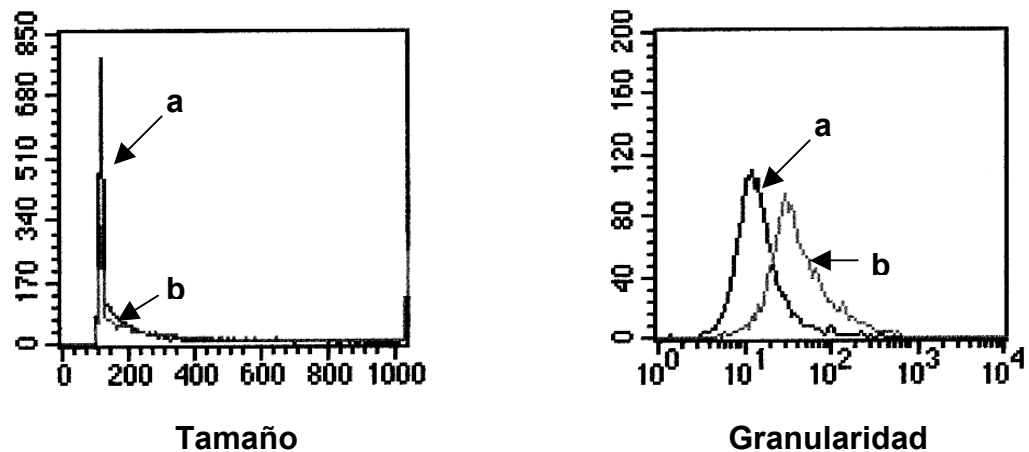


Tamaño

Granularidad



**Figura 18. Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorimetría de los liposomas neutros lavados.** Histogramas sobrepuestos de liposomas a) vacíos (control) & b) Liposomas con IL-2 encapsulada.



**Figura 19. Comparación de los histogramas obtenidos por citofluorimetría de los liposomas cationicos lavados.** Histogramas sobrepuestos de liposomas a) vacíos (control) & b) Liposomas con IL-2 encapsulada.



**Tabla 4.** Análisis estadístico de los diferentes liposomas por el método de Kolmogorov-Smirnov.

<b>COMPARACIONES</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Granularidad</b>
LINEVA -- LINEIL-2 lavados	0.08	0.32
LICAVA -- LICAIL-2 lavados	0.28	0.70

Se prepararon liposomas catiónicos y neutros, vacíos o con IL-2 encapsulada lavados por ultracentrifugación. Se realizó el análisis estadístico con el programa Cellquest que establece la diferencia significativa de tamaño y granularidad entre los liposomas.

Donde:

LINEVA = Liposomas neutros vacíos

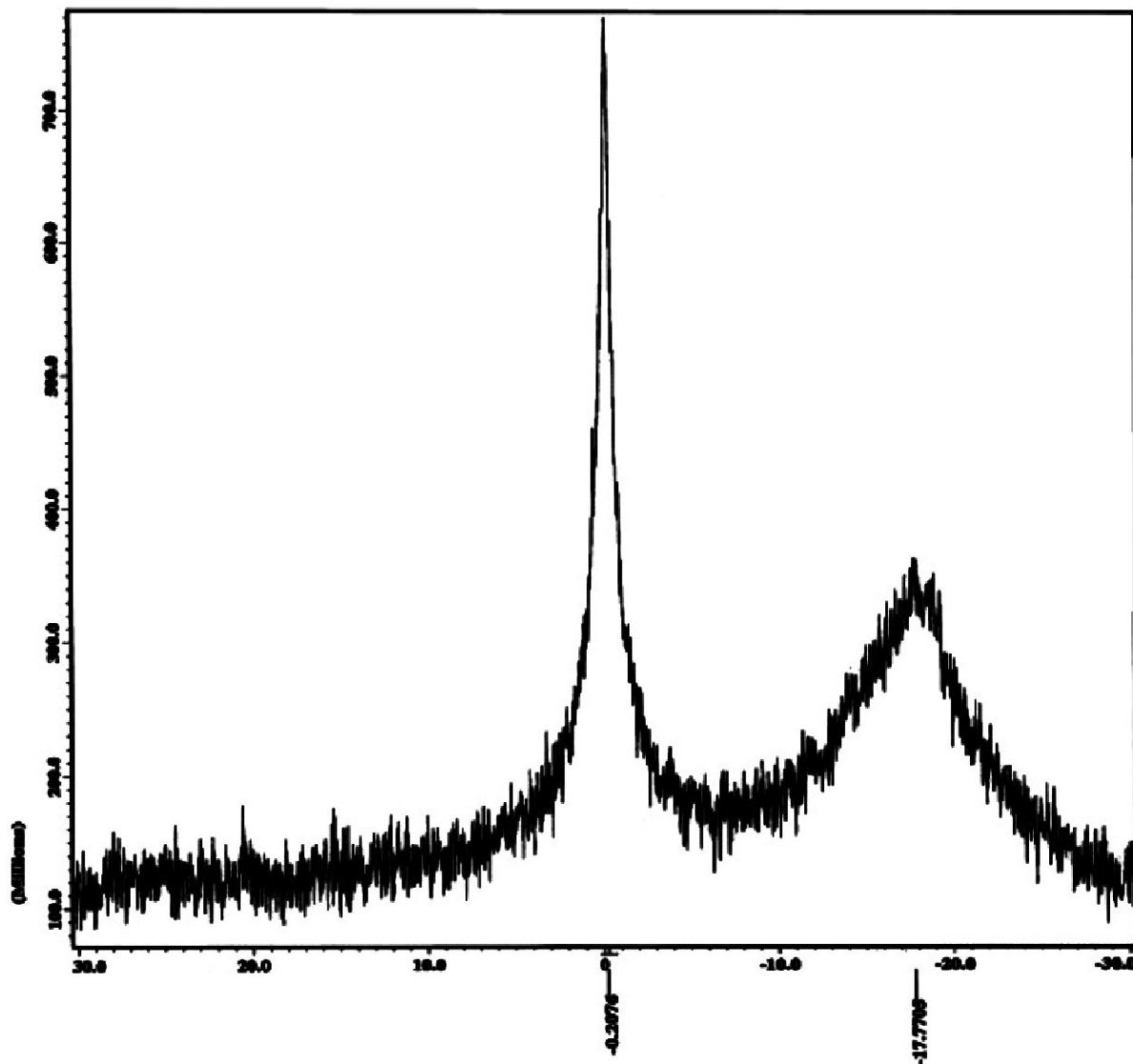
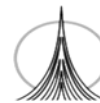
LINEIL-2 = Liposomas neutros con IL-2 encapsulada

LICAVA = Liposomas catiónicos vacíos

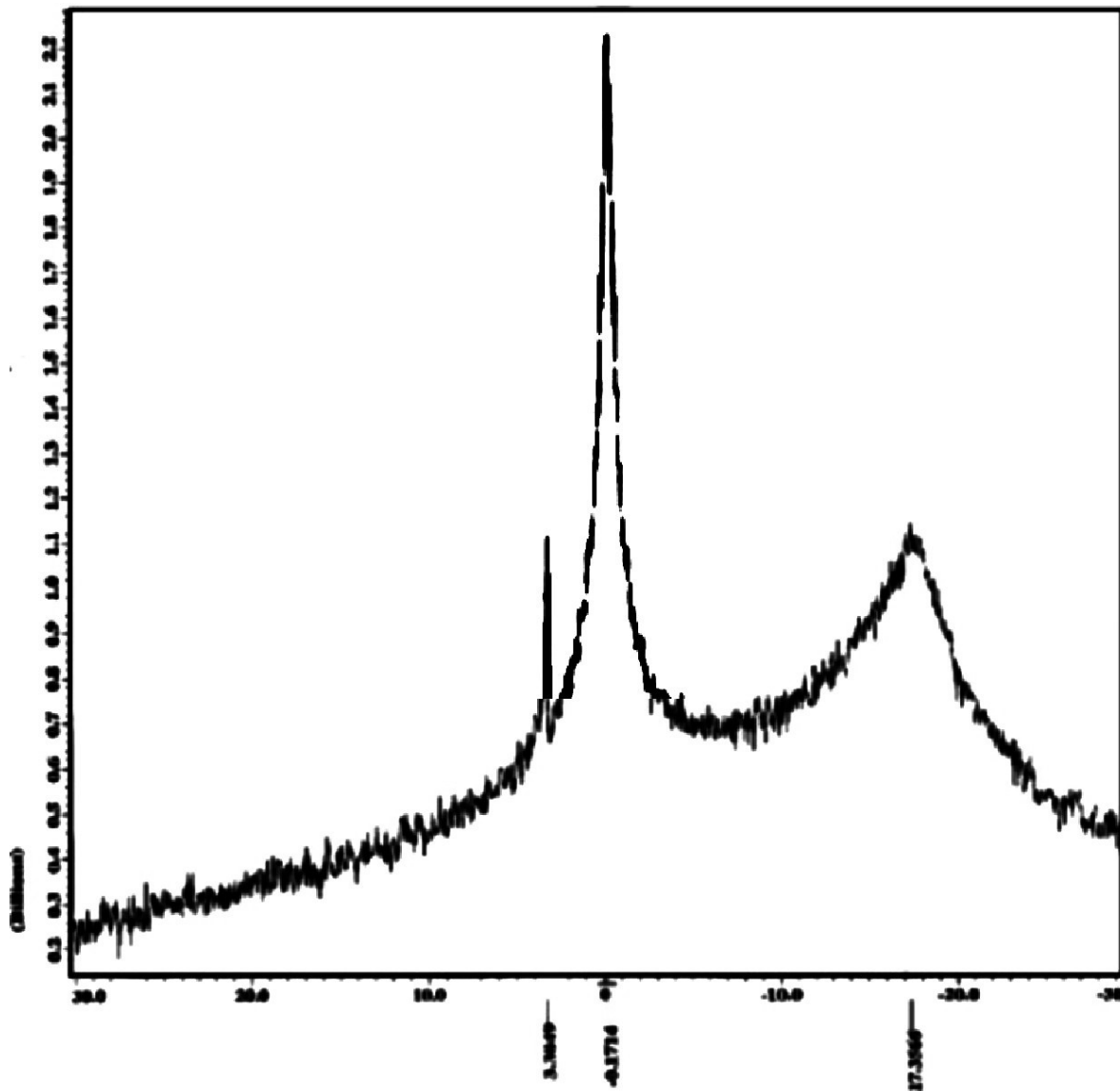
LICAIL-2 = Liposomas catiónicos con IL-2 encapsulada

## **5. CARACTERIZACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{31}\text{P}$ DE LOS LIPOSOMAS CATIONICOS.**

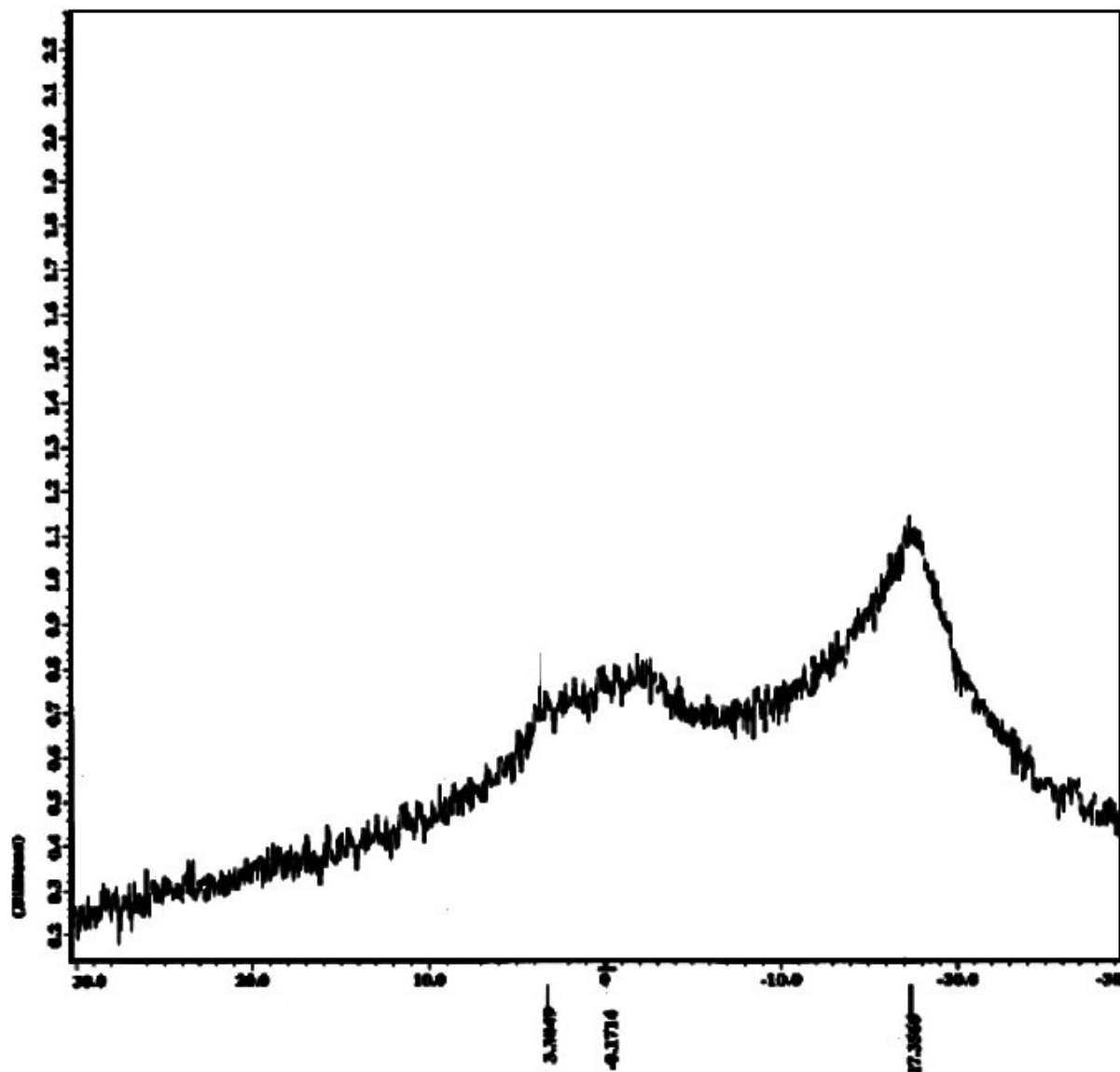
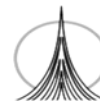
Con el objeto de determinar la forma en que los lípidos se asocian en los liposomas vacíos o con IL-2 lavados por ultracentrifugación, se prepararon los diferentes tipos de liposomas para determinar la resonancia magnética nuclear de  $^{31}\text{P}$  con señales angostas y con un máximo cercano a 0.0 ppm. Los liposomas catiónicos vacíos o con IL-2 encapsulada empleados en este estudio, presentaron espectros de absorción similares que indican únicamente la presencia de bicapas lipídicas y en el caso de las muestras sin lavar se aprecia un pico correspondiente a liposomas pequeños (Figuras 20-22).



**Figura 20. Caracterización de liposomas catiónicos vacíos.** Se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de  $^{31}\text{P}$ . Los espectros se tomaron de liposomas catiónicos vacíos.



**Figura 21. Caracterización de liposomas catiónicos con IL-2 encapsulada sin lavar.** Se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de  $^{31}\text{P}$ . Los espectros se tomaron de liposomas catiónicos con IL-2 sin lavar.



**Figura 22. Caracterización de liposomas catiónicos con IL-2 encapsulada lavados.** Se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de  $^{31}\text{P}$ . Los espectros se tomaron de liposomas catiónicos con IL-2 lavados.



## XII. DISCUSION

El Carcinoma Cérvico-Uterino (CaCu), representa aproximadamente un 30% de todos los padecimientos y muertes por cáncer, tanto en las mujeres mexicanas (Cáceres *et al.*, 2001), como en las mujeres de otros países del tercer mundo (Polednak, 1993; González *et al.*, 1995).

En el tratamiento del cáncer en estadios avanzados se ha empleado IL-2 sola o en combinación con otros fármacos para inducir la respuesta citotóxica anti-tumoral con resultados alentadores (LoRusso *et al.*, 1990; Szoka *et al.*, 1994; Lode *et al.*, 1999 a y b). Sin embargo, su administración en altas dosis, vía sistémica, perturba vías de regulación hematopoyética y puede generar una serie de efectos secundarios adversos, como son: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas (Smith, 1988; Ardizzoni *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 1996 a), por lo que se ha limitado su uso en la clínica y se buscan otras formas de administración sin disminuir su actividad. Con el propósito de administrar altas dosis de IL-2 vía sistémica, se ha pensado en el uso de liposomas como una alternativa, pues actualmente se utilizan como medio de transporte de diferentes medicamentos y citocinas; ya que además de proteger al compuesto permite dirigirlo a un tipo celular en particular dependiendo, de la composición y carga eléctrica de éstos (Ciacci *et al.*, 1993; Vagge *et al.*, 1994; Meager, 1998; Mire-Sluis y Thorpe, 1998; Peng *et al.*, 1999; Craiu *et al.*, 2001).

En el Laboratorio de Oncología de la UIDCC, se utilizaron liposomas catiónicos dirigidos a células epiteliales como acarreadores de altas concentraciones de IL-2 para el tratamiento de ratones con tumores inducidos con células CaCu, con lo que se obtiene una importante reducción de la masa tumoral y disminución de los efectos adversos (Nieves, 2003). Actualmente se está realizando la farmacocinética para conocer con precisión el sitio a donde van los liposomas así como la concentración de IL-2 que llega a diferentes sitios del organismo.





El presente trabajo se realizó con la finalidad de caracterizar a los liposomas catiónicos, vacíos o con IL-2 encapsulada, para poder explicar su mecanismo de acción así como para seguirlos adecuadamente en los estudios de farmacocinética al aplicarlos en el tratamiento de tumores inducidos en ratones de la cepa singénica CBA.

La morfología de los liposomas se analizó en las fotografías adquiridas por microscopía electrónica de transmisión, éstas indicaron que los liposomas catiónicos al encapsular IL-2 no cambian su morfología. Los datos obtenidos muestran que la presencia de IL-2 no provoca cambios en la morfología de los liposomas que en un momento dado pudieran permitir la exposición de la citocina en la superficie.

Los datos obtenidos a partir de los estudios por citofluorometría de flujo de tamaño y granularidad (complejidad) realizados a los liposomas neutros y catiónicos sin lavar, muestran que no existe diferencia significativa entre los liposomas vacíos y los liposomas con IL-2 encapsulada; lo anterior sugiere que la IL-2 queda totalmente encapsulada sin alterar la superficie ni el tamaño de dichos liposomas. Estos resultados son congruentes con el hecho de que al realizar la detección de la posible presencia de la citocina en la superficie de los liposomas neutros (lavados o sin lavar), no se encontró fluorescencia.

En contraste, los resultados obtenidos por citofluorometría de flujo de los liposomas catiónicos lavados por ultracentrifugación, indican que la IL-2 se encuentra presente en la superficie de los liposomas. Este interesante hallazgo podría deberse a cambios morfológicos causados por el proceso de ultracentrifugación en el cual permitiría que la citocina (pH fisiológico 7.4) con carga negativa en estas condiciones, interaccione con el lípido catiónico de la bicapa lipídica de los liposomas y se exponga en el exterior. Lo anterior resulta



relevante debido a que ayudaría a explicar la capacidad de estas partículas de interaccionar con sus células blanco (epiteliales).

Los estudios realizados por citofluorometría de flujo de granularidad (complejidad) y tamaño para detectar posibles cambios morfológicos en los liposomas catiónicos lavados, confirman lo anterior ya que no se observó cambio en el tamaño pero si se observaron cambios en la granularidad (complejidad) de dichos liposomas.

Lo anterior cobra importancia pues facilita el entendimiento del proceso mediante el cual estos liposomas son muy eficientes para acarrear IL-2, pues en el modelo de inducción de tumores desarrollado en el Laboratorio de Oncología de la UIDCC produce una fuerte regresión de masas tumorales que se puede atribuir al efecto de la citocina tal como se ha observado *in vitro*.

Finalmente los estudios de resonancia magnética nuclear de fósforo, mostraron la presencia de una población de liposomas muy pequeños en las preparaciones sin lavar, la cual desaparece al ser lavados, datos relevantes ya que se cuenta con una metodología para obtener poblaciones de liposomas homogéneos en donde se puede encapsular una cantidad equivalente de IL-2. También se demostró que los liposomas fabricados corresponden a una organización de bicapa semejante a las membranas biológicas y que la presencia de IL-2 no altera dicho arreglo molecular. Esto puede contribuir a que los liposomas al llegar a la célula blanco puedan fusionarse a su membrana acumulando altas concentraciones de IL-2 ya sea dentro o fuera de dicha célula y de esta manera inhibir la proliferación de células tumorales como sucede *in vitro*.

Finalmente, la principal aportación de mi trabajo es contar con una metodología que permitirá la localización de liposomas catiónicos en masas tumorales inducidas en ratones, además, de demostrar que IL-2 se encuentra como una proteína transmembranal que al unirse a su receptor puede activar una respuesta



---

inmunológica de rechazo tumoral por medio de células T citotóxicas; o bien, producir directamente la muerte de células tumorales que expresen el receptor para IL-2.



### **XIII. CONCLUSIONES**

- 1.- Los liposomas neutros (lavados o sin lavar) no cambian su morfología ni su tamaño al encapsular IL-2.
- 2.- Los liposomas catiónicos con 100 UI/mL de IL-2, al ser tratados por el procedimiento de lavado por ultracentrifugación, no presentan ningún cambio en el tamaño, pero si presentan cambios en la granularidad.
- 3.- La resonancia magnética nuclear de fósforo indica que el procedimiento de lavado por ultracentrifugación elimina los liposomas más pequeños, generando poblaciones homogéneas organizadas en bicapa lipídica.
- 4.- La presencia de la IL-2 no altera el arreglo molecular de bicapa en los liposomas catiónicos.
- 5.- La IL-2 queda expuesta en la superficie de los liposomas catiónicos lavados, lo que permite que quede accesible para el proceso de unión a su receptor.



#### XIV. REFERENCIAS

Aggarwal BB y Gutterman JU. (1992). Human cytokines: Handbook for basic and clinical research. Boston: Blakwell Scientific Publication; p-441.

Alving CR. (1993). Immunologic presentation of liposomal antigens. *J Liposome Res* 3:493-504.

Alving CR y Wassef NM. (1994). Novel vaccines and adjuvants: Mechanisms of action. Cytotoxic T lymphocytes induced by liposomal antigens: Mechanism of immunological presentation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: suppl s91-s94.

Alleva DG, Kaser SB, Monroy MA, Fenton MJ y Beller DI. (1997). IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition.. *J Immunol* 159:2941-2951.

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., Verna, A., Ferrini, S., Cinquegrana, A., Molinari, S., Mariani, L.G., Roest, J.G., Sharenberg, J., Palmer, A.P., Rosso, R., Ropolo, F. y Raso, C.1994.Biologic and Clinical Effects of Continuous Infusion Interleukin-2 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer.*Cancer* 73(5):1353-1360.

Asano T, McIntyre BW, Bednarczyk JL, Wygant JN y Kleinerman ES. (1995). Liposomal muramyl tripeptide upregulates adhesion molecules on the surface of human monocytes. *Oncology Res* 7: 253-257.

Avicé, N.M., Sarfati, M., Triebel, F., Delespesse, G. y Demeure, E.C.1999.Lymphocyte Activation Gene-3, a MHC Class II Ligand Expressed on Activated T Cells, Stimulates TNF- $\alpha$  and IL-12 Production by Monocytes and Dendritic Cells.*The Journal of Immunology* 162:2748-2753.

Baeza I, Wong C, Mondragón R, González S, Ibáñez M, Farfán N y Argüello C. (1994). Transbilayer diffusion of divalent cations into liposomes mediated by lipidic particles of phosphatidate. *J Mol Evol* 39: 560-568.

Baeza I, Ibáñez M, Lazcano A, Santiago C, Argüello C, Wong C y Oró J. (1987). Liposomes with polyribonucleotides as model of precellular systems. *Origins of Life* 17: 321-331.



Baeza I, Banes M, Santiago J, Wong C y Oró J. (1990). Diffusion of  $Mn^{2+}$  ions into liposomes mediated by phosphatidate and monitored by the activation of an encapsulated enzymatic system. *J Mol Evol* 31:453-461.

Baeza I, Ibáñez, M, Wong C, Chávez P, Gariglio P y Oró J. (1992). Possible prebiotic significance of polyamines in the condensation, protection, encapsulation, and biological properties of DNA. *Origins of Life* 21: 225-242.

Bangham A, Standish. M y Watking J. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13: 238-252.

Barnes KA y Mitchell RN. (1995). Detection of functional class II-associated antigen: Role of a low density endosomal compartment in antigen processing. *J Exp Med* 181: 1715-1727.

Becker, C.J., Pancook, D.J., Gillies, D.S., Furukawa, K. y Reisfeld, A.R. 1996a. T Cell-mediated Eradication of Murine Metastatic melanoma Induced by Targeted Interleukin 2 Therapy. *J. Exp. Med.* 183:2361-2366.

Bergers JJ, Den-Otter W, Dullens HFJ, De-Groot JW, Steerenberg PA, Filius PMG. y Crommelin DJA. (1994). Effect of immunomodulators on specific tumor immunity induced by liposome-encapsulated tumor-associated antigens. *Int J Cancer* 56: 721-726.

Bergers JJ, Den-Otter W, Dullens HFJ, De-Groot JW, Steerenberg PA, Filius PMG. y Crommelin DJA. (1994). Effect of immunomodulators on specific tumor immunity induced by liposome-encapsulated tumor-associated antigens. *Int J Cancer* 56: 721-726.

Betageri GV, Black CDV, Szebeni J, Wahl LM y Weinstein JN. (1993). Fc-receptor-mediated targeting of antibody-bearing liposomes containing dideoxycytidine triphosphate to human monocyte-macrophages. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 48-53.

Buchli, J.P., Wu, Z. y Ciardelli, L.T. 1997. The Functional Display of Interleukin-2 on Filamentous Phage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 339 (1):79-84.

Burkhanov S, Dormeneva E, Kosykh V, Berdichevskii V, Torchilin V, Saatov T y Repin V. (1985). Interaction between liposomes with different lipid composition and hepatocytes *in vivo*. *Bull Exp Biol Med (Engl. Tr.)* 99: 726-728.

Cáceres-C., R.J., Alvarado-M, J.A., Waga, K., Rangel-C., R., Monroy-G., A., Rocha-Z., L., Urdiales-R., J., Weiss-S., B., Haman, A., Hugo, P., Brousseau, R. y Hoang, T. 2001. Implication of Tyrosine Kinase Receptor and Steel Factor in Cell Density-dependent Growth in Cervical Cancers and Leukemias. *Cancer Research* 61:6281-6289.



Camilleri JP, Williams AS, Amos N, Douglas-Jones AG, Love WG y Williams BD. (1995). Methods for assessing splenic macrophage depletion by liposome encapsulated clodronate. *Inflamm Res* 44: 152-157.

Ciacci, C., Mahida, R., Dignass, A., Koizumi, M. y Podolsky, K. 1993. Functional Interleukin-2 Receptors on Intestinal Epithelial Cells. *J.Clin.Invest.* 92:527-532.

Coradini D, Pellizzaro C, Biffi A, Lombardi L, Pirronello E, Riva L y DiFronzo G. (1998). Effect of liposome-encapsulated alpha-or beta-interferon on breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 18(1A): 177-182.

Cortinas, C. 1998. Cancer: Herencia y Ambiente. *La Ciencia para todos.* pp. 1-24.

Coventry, J.B., Weeks, C.S., Heckford, E.S., Sykes, J.P., Bradley, J. y Skinner, M.J. 1996. Lack of IL-2 Cytokine Expression Despite IL-2 Messenger RNA Transcription in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary Human Breast Carcinoma. *The Journal of Immunology* 156:3486-3492.

Craiu, A., Barouch, H.D., Zheng, X.X., Kuroda, J.M., Schmitz, E.J., Lifton, A.M., Steenbeke, D.T., Nickerson, E.C., Beaudry, K., Frost, D.J., Reimann, A.K., Strom, B.T. y Letvin, L.N. 2001. An IL-2/Ig Fusion Protein Influences CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes in Naïve and Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Monkeys. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17(10):873-886.

Cullis P y Hope M. (1985). Physical properties and functional roles of lipids in membranes. En: *Biochemistry of Lipids and Membranes.* En: Vance, D. y Vance, J. (Eds) Benjamin/Cummings Publ. Co. Menlo Park, USA.

Dazan LE, Wu L, Bullington D y Shabced A. (1996). Viral IL-10 gene therapy inhibits TNF-alpha and IL-1 beta, not IL-6, in the newborn endotoxemic mouse. *J Pediatr Surg* 31: 411-414.

Deamer D. y Banham A. (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochem Biophys Acta* 443: 629-634.

De la Cruz, S.J., Trinh, R.K., Morrison, L.S. y Penichet, L.M. 2000. Recombinant Anti-Human HER2 $neu$  IgG3-(GM-CSF) Fusion Protein Retains Antigen Specificity and Cytokine Function and Demonstrates Antitumor Activity. *The Journal of Immunology* 165:5112-5121.

DeVita, T.V., Hellman, S., Rosenberg, A.S. 1993. *Cancer: Principles & Practice of Oncology.* 4<sup>TH</sup> edition. Vol 1. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. pp. 1168-1181.



Dieter P, Ambs P, Fitzke E, Hidaka H, Hoffman R y Schwende H. (1995). Comparative studies of cytotoxicity and the release of TNF-alpha, nitric oxide, and eicosanoids of liver macrophages treated with lipopolysaccharide and liposome-encapsulated MTP-PE. *J Immunol* 155:2595-2604.

Dinarello CA. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-1652.

Duserre N, Lessard C, Paquette N, Perron S, Poulin L, Tremblay M, Beauchamp D, Desormeaux A y Bergeron MG. (1995). Encapsulation of foscarnet in liposomes modifies drug intracellular accumulation, *in vitro* anti-HIV activity, tissue distribution and pharmacokinetics. *AIDS* 9: 833-884.

Ericson SG, Benoit EN, Mills LE y Fanger MW. (1994). The effect of recombinant human interleukin-3 and recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor on Fcg receptor expression and antibody-dependent cellular cytotoxicity of hematopoietic progenitor cells during *in vitro* myeloid maturation. *Exp Hematol* 22: 283-289.

Eue I, Zeisig R y Arndt D. (1995). Alkylphosphocholine-induce production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U-937 cells. *J Cancer Res and Clin Oncology* 121: 350-356.

Friedmann T. (1989). Progress toward human gene therapy. *Science* 244: 1275-1281.

Gariglio, P., Benitez, B.L., Berumen, J., Alcocer, M.J., Tamez, R. Y Madrid, V. 1998. Therapeutic Uterine-Cervix Cancer Bacines in Humans. *Archives of Medical Research* 29(4):279-284.

González, R.I., Nazabal, M., Claro, L.A., Peralta, A., Méndez del Castillo, D. y Cruz, C.M.E. 1995. Presencia de Papiloma Virus Humano en Lesiones Genitales. *Bioquímica* 2 XX (79):266-270.

Greenspan P, Ryu BH, Mao FW y Gutman RL. (1995). Association of negatively-charged phospholipids with low-density lipoprotein (LDL) increase its uptake and the deposition of cholesteryl esters by macrophages. *Biochemica and Biophysica Acta- Lipids and Lipids Metabolism* 1257: 257-264.

Han, D., Pottin, C.C., Imro, A.M., Scudeletti, M., Doucet, C., Puppo, F., Brouty, B.D., Vedrenne, J., Sahraoui, Y., Brailly, H., Poggi, A., Jasmin, C., Azzarone, B. y 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 IL2/INF $\alpha$  biotherapy. *Oncogene* 12:1015-1023.





Hassuneh, R.M., Nagarkatti, S.P. 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 Cells of Lymphoid Origin.Blood 89 (2):610-620.

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):1365-1371.

Hoedemakers RMJ, Atmosoerodjobriggs JE, Morselt HWM, Daemen T, Scherphof GL y Hardonk MJ. (1995). Histochemical and electron microscopic characterization of hepatic macrophage subfractions isolated from normal and liposomal muramyl dipeptide treated rats. Liver 15: 113-120.

Ibáñez M. (1993). Transferencia de genes por medio de liposomas. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México, D.F.

Imanidis G, Helbing-Strausak S, Imboden R y Leuenberger H. (1998). Vehicle-dependent in situ modification of membrane-controlled drug release. J Controlled Release 51:23-34.

Itani T, Ariga H, Yamaguchi N, Tadakuma T y Yasuda T. 1987. A simple and efficient method for transfection of DNA into mammalian cells grown in suspension. Gene 56: 267-276.

Janoff A. (1992). Lipids, liposomes and rational drugs design. Lab. Inves. 66: 655-658.

Kamei S y Kopecek J. (1995). Prolonged blood circulation in rats of nanospheres surface-modified with semitelechelic poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]. Pharmaceutical Res 12: 663-668.

Kaneda Y, Uchida T, Kim J, Ishiura M y Okada Y. (1987). The improved efficient method for introducing macromolecules into cells using HVJ (Sendai virus) liposomes with gangliosides. Exp. Cell. Res. 173: 56-69.

Kersten GFA y Crommelin DJA. (1995). Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations. Biochem and Biophys Acta- Rev Biomembranes 1241: 117-138.

Kichler A y Schuber F. (1995). Versatile synthesis of bi- and tri-antennary ligands: Interaction with the Gal/GalNAc receptor on human hepatoma cells. Glycoconjugate 12: 275-281.



Kleinerman E y Fidler D. (1985) Human lymphokines activate tumoricidal properties in human but not rodent macrophages: Elimination of species specificity by encapsulation in liposomes. En: Macrophage Biology. Alan R Liss, Inc. New York, USA. p81-96.

Kleinerman ES. (1995b). Biologic therapy for osteosarcoma using liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *Hematol-Oncol Clin of North Am* 9: 927-938.

Kleinerman ES, Meyers PA, Raymond AK, Gano JB, Jia SF y Jaffe N. (1995a). Combination therapy with ifosfamide and liposome-encapsulated muramyl-tripeptide: Tolerability, toxicity, and immune stimulation. *J Immunotherapy* 17: 181-193.

Koppenhagen FJ, Kupcu Z, Wallner G, Crommelin DJ, Wagner E, Storm G y Kircheis R. (1998). Sustained cytokine delivery for anticancer vaccination: liposomes as alternative for gene-transfected tumor cells. *Clin Cancer Res* 4: 1881-1886.

Kronenwett R, Steidl U, Kirsch M. Sczakiel G y Haas R. (1998). Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. *Blood* 91: 852-862.

Lasic D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.* 256: 1-11.

Lasic D. (1996). Liposomes. *Science & Medicine* 6:34-43.

Leckband D, Helm C y Israelachvili J. (1993). Role of calcium in the adhesion and fision of bilayers. *Biochem* 32: 1127-1140.

Lezama-Dávila CM y Gallagher G. (1995). CD4+, CD8+ and CD4-,CD8- T cells subsets can confer protection against *Leishmania mexicana* infection. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 90: 51-58.

Liu D, Mori A y Huang L. 1992. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1 containing liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 1104: 95-101.

Liu DX, Liu F y Song YK.(1995). Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. *Biochem Biophys Acta-Biomem* 1235: 140-146.



Lode, N.H., Moehler, T., Xiang, R., Jonczyk, A., Gillies, D.S., Cheresch, A.D. y Reisfeld, A.R.1999a.Synergy between an antiangiogenic integrin  $\alpha_v$  antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases.Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1591-1596.

Lode, N.H., Xiang, R., Duncan, R.S., Theofilopoulos, N.A., Gillies, D.S. y Reisfeld, A.R.1999b.Tumor-targeted IL-2 amplifies T cell-mediated immune response inducend by gene therapy with single-chain IL-12.Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:8591-8596.

LoRusso, M.P., aukerman, L.S., Polin, L., Redman, G.B., Valdivieso, M., Biernat, L. y Corbett, H.T.1990. Antitumor Efficacy of Interleukin-2 Alone and in Combination with Adriamycin and Dacarbazine in Murine Solid Tumor Systems.Cancer Research 50:5876-5882.

Maas, A.R., Dullens, J.F.H., DeJong, H.W. y Otter, D.W.1989.Immunotherapy of Mice with a Large Burden of Disseminated Lymphoma with Low-Dose Interleukin 2.Cancer Research 49:7037-7040.

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

Marquette C, VanDam AM, Vanrooijen N, Berkenbosh F y Haour F. (1994). Peripheral macrophage depletion prevents down regulation of central Interleukin-1 receptors in mice after endotoxin administration. Psychoneuroendocrinology 19: 189-196.

McMillan, N.D., Kernohan, M.N., Flett, E.M., Heys, D.S., Deehan, J.D., Sewell, F.H., Walker,F. y Eremin,O.1995.Interleukin 2 Receptor Expression and Interleukin 2 Localisation in Human Solid Tumour Cells *In situ* and *In vitro*: Evidence for a Direct Role in the Regulation of Tumor Cell Proliferation.Int. J. Cancer 60:766-772.

Mannino R. y Gould-Fogerite S. 1988. Liposome mediated gene transfer. BioTech 6: 682-690.

Meager, A.1991.Cytokines. Prentice Hall Advanced Reference Series.New Jersey, USA. pp.

Meager, T.1998.The Molecular Biology of Cytokines.John Wiley & Sons.England. pp. 1-109, 141-224, 237-245 y 259-267.

Metcalf D. (1992). Hemopoietic regulators. TIBS 17: 286-289.



Mire-Sluis, A. y Thorpe, R. 1998. Cytokines. Academic Press. Great Britain. pp. 19-33.

Morán, B.S.H. 2000. Reducción de Tumores de Carcinoma de Cervix Inducidos en Ratones de la cepa CBA por la Administración de IL-2 encapsulada en Liposomas Positivos. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.

Murai M, Aramaki Y y Tsuchiya S. (1995). Contribution of mannose receptor to signal transduction in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis of mouse peritoneal macrophages induced by liposomes. *J Leuko Biol* 57: 687-691.

Nair S, Buiting AMJ, Rouse RJD, Vanrooijen N, Huang L y Rouse BT. (1995). Role of macrophages and dendritic cells in primary cytotoxic T lymphocyte responses. *Internat Immunol* 7: 679-688.

Nair S, Sam-Babu J, Dunham RG, Kanda P, Burke RL y Rouse BT. (1993). Induction of primary antiviral cytotoxic and proliferative responses with antigens administered via dendritic cells. *J Virol* 67: 4062-4069.

Nicoletti F, Mancuso G, Cusumano V, DiMarco R, Zaccone P, Bendtzen K y Teti G. (1997). Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. *Eur J Immunol* 27: 1580-1583.

Nieves Ramírez, Miriam E. 2003. Reducción de tumores de carcinoma de cérvix inducidos en ratones singénicos de la cepa CBA por la administración de IL-2 y proteínas de fusión encapsuladas en liposomas positivos. Tesis Profesional. Carrera de Biología de la FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.

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

Oppenheim JJ. (1981). Lymphokines. En: Oppenheim JJ, Rosenstreich DL y Potter M, eds. *Cellular functions in immunity and inflammation*. London: Edward Arnold, 259-282.

Okuno K, Nakamura K, Tanaka A, Yachi K y Yasutomi M. (1998). Hepatic immunopotentiality by galactose-entrapped liposomal IL-2 compound in the treatment of liver metastases. *Surg Today* 28: 64-69.

Pagano R y Weinstein J. 1978. Interactions of liposomes with mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7: 435-468.

Papahadjopoulos D y Kimelberg H. 1973. Phospholipids vesicles (liposomes) as models of biological membranes. *Progr. Surf. Sci.* 4: 141-232.



Papahadjopoulos D, Nir S y Düzgünes N. 1990. Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22: 157-179.

Papahadjopoulos, D, Vail, W, Jacobson, K y Poste, G. 1975. Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochem. Biophys. Acta* 394: 483-491.

Paul WE. (1991). Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77: 1859-1870.

Peng, S.L., Penichet, L.M. y Morrison, L.S. 1999. A Single-Chain IL-12 IgG3 Antibody Fusion Protein Retains Antibody Specificity and IL-12 Bioactivity and Demonstrates Antitumor Activity. *The Journal of Immunology* 163:250-258.

Phillips NC y Gagne L. (1995). Modulation of murine macrophage nitric oxide synthesis by liposomal phospholipids: Correlation with liposome immune adjuvant activity. *J Drug Target* 3: 137-147.

Pittet JC, Pepin M, Normier G, Binz H y Lepape A. (1995). Lymphoscintigraphy via the targeting of macrophages with <sup>99m</sup>Tc-J001X poly-galactoside in a model of pyogranulomas developed in sheep lymph nodes. *Nuclear Med Biol* 22: 355-365.

Polednak, P.A. 1993. Estimating Cervical Cancer Incidence in the Hispanic Population of Connecticut by Use of Surnames. *Cancer* 71:3560-4

Pontem, J., Adami, O.H., Bergstrom, R., Dilliner, J., Friberg, G.L., Gustafsson, L., Miller, B.A., Parkin, M.D., Sparén, P. y Trichopoulos, D. 1995. Strategies for Global Control of Cervical Cancer. *Int. J. Cancer* 60:1-26.

Poste G. 1980. The interaction of lipid vesicles (liposomes) with cultured cells and their use as carriers for drugs and macromolecules. En: *Liposomes in biological systems*. Gregoriadis, G. y Allison, A. (Eds.), Wiley, New York, USA.

Poyner EA, Alpar HO, Almeida AJ, Gamble MD y Brown MRW. (1995). A comparative study on the pulmonary delivery of tobramycin encapsulated into liposomes and PLA microspheres following intravenous and endotracheal delivery. *J Control Rel* 35: 41-48.

Rigotti A, Acton SL y Krieger M. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD-36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 270: 16221-16224.

Salom D, Perez-Paya E, Pascal J y Abad C. (1998). Environment- and sequence-dependent modulation of the double-stranded to single-stranded conformational transition of gramicidin A in membranes. *Biochem* 37:14279-91.



Sambrano GR y Steinberg D. (1995). Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: Role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci.USA* 92: 1396-1400.

Santiago E, Mendoza JF, Corona T, López R, Mora L, Flores F y Weiss-Steider B (1993). Induction of Fc receptors on murine macrophages and leukemic cells by interleukin-1b. *Europ Citokine Network* 4: 223-228.

Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, DiMatteo FM, Sidoni A, Migliorati G y Morelli A. (1996). Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterol* 111: 736-744.

Sato Y, Nishikawa K, Aikawa K, Mimura K, Murakamimurofushi K, Arai H y Inoue K. (1995). Side-chain structure is critical for the transport of sterols from lysosomes to cytoplasm. *Biochem Biophys Acta- Lipids and Lipid Metabolism* 1257: 38-46.

Schaafsma, R.M., Falkenburg, F.H.J., Landegent, E.J., Duinkerken, N., Osanto, S., Ralph, P., Kaushanky, K., Wagemaker, G., Damme, V.J., Willemze, R. y Fibbe, E.W.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 (8):1981-1987.

Shimizu M, Akiyama S, Ito K, Kasai Y, Takagi H, Kito M., Ohishi N. y Yagi K. (1998). Effect on colon cancer cells of human interferon-beta gene entrapped in cationic multilamellar liposomes. *Biochem Mol Biol Int* 44: 1235-1243.

Singer S y Nicolson G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science* 175: 720-731.

Smith, A.K.1988. Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. *Science* 240:1169-1176.

Smith, A.K. 1993. Lowest Dose Interleukin-2 Immunotherapy. *Blood* 81(6):1414-1423.

Soto I, Cáceres J, Mendoza J y Weiss B (Eds.). (1999). Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmune: Mecanismos celulares y moleculares. Ed. Plaza y Valdez. México, D.F.

Szelej, J y Duda E. (1989). Entrapment of high-molecular.mass DNA molecules in liposomes for the genetic transformation of animal cells. *Biochem. J.* 259: 549-553.



Szoka, 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. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann Rev Biophys Bioeng* 9: 467-508.

Tanford, C. (1973). *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes.* John Wiley and Sons. New York, London, Sydney and Toronto.

Tertov VV, Kaplun VV, Sobenin IA y Orekhov AN. (1998). Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of *in vivo* lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. *Atherosclerosis* 138:183-95.

Tomoda K, Ohishi N, Kikkawa F, Mizutani S, Tomoda Y Yagi K. (1998). Cationic multilamellar liposome-mediated human interferon-beta gene transfer into cervical cancer cell. *Anticancer Res* 18(3A): 1367-1371.

Trepicchio WL, Bozza M, Pedneault G y Dorner AJ. (1996). Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol* 157: 3627-3634.

Vagge, J., Barberá-Gillem, E., Abra, R., Huang, A., Working, P. 1994. Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer* 73 (5):1478-1488.

Van der Spek, C.J., Sutherland, A.J., Ratnarathorn, M., Howland, K., Ciardelli, L.T. y Murphy, R. 1996. DAB<sub>389</sub> Interleukin-2 Receptor Binding Domain Mutations. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (2):12145-1249.

Van Snick J. (1990). Interleukin-6: An overview. *Ann Rev Immunol* 8: 253-278.

Vella, T.A., Dow, S., Potter, A.T., Kappler, J. y Marrack, P. 1998. Cytokine-induced survival of activated T cell *in vitro* and *in vivo*. *Immunology* 95(7):3810-3815.

Wadhwa M.S. y Rice K.G. (1995). Receptor mediated glycotargeting. *J Drug Target* 3:111-127.

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.



Xie K.P, Huang S.Y, Dong Z.Y, Gutman M y Fidler I.J. (1995). Direct correlation between expression of endogenous inducible nitric oxide synthase and regression of M5076 reticulum cell sarcoma hepatic metastases in mice treated with liposomes containing lipopeptide CGP 31362. *Cancer Res* 55: 3123-3131.

Yachi K, Kikuchi H, Yamauchi H, Hirota S y Tomikawa M. (1995). Distribution of liposomes containing mannobiose esters of fatty acid in rats. *J Microencap* 12: 377-388.

Zhou X y Huang L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochem and Biophys Acta* 1189: 195-203.