



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER

LABORATORIO DE ONCOLOGIA

EFFECTO DEL HPV EN CELULAS DE CANCER DE CERVIX, ROVA, VIBO, SIHA Y CASKI, ANTE LA PRESENCIA DE LIPOSOMAS NEUTROS Y ANIONICOS VACIOS.

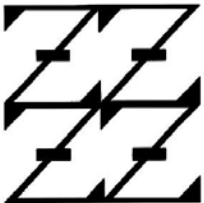
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

ACOSTA RODRIGUEZ JOSE LUIS

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. ROSALVA RALGEL CORONA

MÉXICO, D.F. AGOSTO DEL 2005

U N A M
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION



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 MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EFECTO DEL HPV EN CELULAS DE CANCER DE
CERVIX, ROVA, VIBO, SIHA Y CASKI, ANTE LA
PRESENCIA DE LIPOSOMAS NEUTROS Y ANIONICOS
VACIOS.**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Oncología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y en el Laboratorio de Biomenbranas del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, con la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona.

JOSE LUIS ACOSTA RODRIGUEZ

Este trabajo contó con el apoyo económico del programa PAPIIT IN216502.

INDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCION.....	5
MARCO TEORICO.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
HIPOTESIS.....	18
METODOLOGIA.....	19
RESULTADOS.....	20
ANALISIS DE RESULTADOS.....	36
CONCLUSIONES.....	36
RECOMENDACIONES.....	39
APENDICE.....	40
REFERENCIAS.....	45

RESUMEN

Nuestro grupo de trabajo, ha evaluado el efecto de liposomas neutros (LN), y aniónicos (LA) preparados con 10 μ mol, de lípidos, observando un efecto inhibidor de la proliferación de líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaCU), al ser cultivadas en presencia de ambos tipos de liposomas. Por otro lado, es conocido que el CaCU está fuertemente asociado con una etiología viral, por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la susceptibilidad de células de CaCU a una formulación 6:3:1 para liposomas aniónicos y 4:4:2 para liposomas neutros formados con fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletalona (PE) y Colesterol (CH), en células que son portadoras del HPV. Se realizaron cultivos *in vitro* de las líneas celulares de CaCU, VIBO y ROVA (HPV 18), CASKI y SIHA (HPV 16), las cuales fueron co-cultivadas por una hora en presencia de LN y LA, utilizando como control la línea C-33 negativa a HPV. Una vez retirados los liposomas se evaluó la proliferación celular por medio de la técnica de cristal violeta cada 24 horas por 4 días. Los resultados muestran que el mayor porcentaje de inhibición de la proliferación se presenta en la línea C-33, mientras que la menor inhibición se observó en las líneas celulares infectadas con HPV. Estos resultados sugieren que el HPV puede conferir cierta resistencia a las células de CaCU al efecto antiproliferativo de los lípidos que constituyen ambas formulaciones de liposomas empleadas. Destacando que los liposomas aniónicos tienen un efecto antiproliferativo mayor que los liposomas neutros y la sola presencia del HPV en células de cáncer cérvico-uterino, tiene un efecto directo de resistencia en la proliferación celular en las líneas cancerígenas, disminuyendo el porcentaje de inhibición en la proliferación celular.

INTRODUCCION

Se estima que el número de nuevos casos de Cáncer Cérvico uterino (CaCU) en el mundo pasó de 5.9 millones en 1975 a 10.3 millones en el año 2000^{1,2}. En México esta enfermedad es la responsable de aproximadamente el 25% de las muertes por cáncer en mujeres³. Este temor esta asociado fuertemente a muchos factores etiológicos (los factores que originan el cáncer) pero quizás los mas importantes son el virus del papiloma humano (HPV del inglés human papiloma virus) y a la acumulación de múltiples defectos del sistema inmune en el sitio del tumor. También se ha investigado el papel de ciertos tipos de virus y su asociación con los canceres, este es el caso del HPV, el cual se encuentra fuertemente asociado al desarrollo de tumores. ⁴

En los últimos años se han diseñado quimioterapias e inmunoterapia, utilizando vectores o transportadores de sustancias, dentro de estos últimos se encuentra el uso de partículas lipídicas que al unirse tienden a formar esferas, que son utilizadas para encapsular fármacos y citocinas, ⁵ como es el caso de la IL-2, TAPW o TANL donde se ha evaluado el efecto de estas citocinas encapsuladas en liposomas catiónicos en la regresión de tumores inducidos en ratones de la cepa CBA/ca, experimentos en los que se ha observado una disminución en las masas tumorales en los ratones. ⁶ Por otro lado, también se ha evaluado el efecto que tienen 100UI/MI DE IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos sobre la proliferación *in vitro* de las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL, encontrando que existe una inhibición de dicha proliferación. ⁷

MARCO TEÓRICO

Cáncer

El cáncer se puede definir como el crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en el tejido corporal, no es una enfermedad única si no un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen. Existen varios cientos de formas distintas, siendo tres los principales subtipos: los sarcomas los cuales proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. Estos factores ayudan a su clasificación.

Casi todos los cánceres forman tumores, pero no todos los tumores son malignos; la mayor parte son benignos (no ponen en peligro la salud). Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento localizado y suelen estar separados de los tejidos vecinos por una cápsula. Los tumores benignos tienen un crecimiento lento y una estructura semejante al tejido del que proceden. En ocasiones pueden producir alteraciones por obstrucción, compresión o desplazamiento de las estructuras vecinas, como sucede a veces en el cerebro. Algunos tumores benignos como los pólipos del colon son lesiones precancerosas. El principal atributo de los tumores malignos es una capacidad de diseminación fuera del lugar de origen. La invasión de los tejidos vecinos puede producirse por extensión o infiltración, o a distancia, produciendo crecimientos secundarios conocidos como metastasis. La localización y vía de propagación de las metastasis varía en función de los cánceres primarios.⁸

Cáncer cérvico-uterino

El Cáncer Cervico Uterino (CaCU) es la segunda neoplasia (como todas las neoplasias, es una alteración de la proliferación y, muchas veces, de la diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor), más común en países en vías de desarrollo, donde se diagnosticaron el 80% de los casos. En el mundo se diagnosticaron 471,000 nuevos casos en sus diferentes etapas clínicas, de ellos, 213,000 muertes fueron secundarias a la enfermedad, por lo que ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad.^{9,10}

En México, el cáncer de cérvix ha incrementado su incidencia en relación con la mortalidad general. En 1950, represento 3% del total de muertes, porcentaje que en 1999 se incremento a 12.1%.^{11,12} En los últimos 10 años el cáncer se ha mantenido como la segunda causa de muerte con 53,662 defunciones.^{7 Y 15} El CaCU, representa aproximadamente un 30% de todos los padecimientos y muertes por cáncer en las mujeres mexicanas⁹, es una enfermedad progresiva, por lo cual los investigadores la dividen en estadios del I al V.¹³

Estadio 0 o carcinoma in situ. El carcinoma *in situ* es un cáncer muy temprano. Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino, y no invaden los tejidos más profundos del cuello uterino.

Estadio I. El cáncer afecta el cuello uterino, pero no se ha diseminado a los alrededores.

I-a: Una cantidad muy pequeña de cáncer, sólo visible por microscopio, se encuentra ya en el tejido más profundo del cuello uterino.

I-b: Una cantidad mayor de cáncer se encuentra en dicho tejido.

Estadio II. El cáncer se ha diseminado a áreas cercanas, pero aún se encuentra en el área pélvica.

II-a: El cáncer se ha diseminado fuera del cuello uterino a los dos tercios superiores de la vagina.

II-b: El cáncer se ha diseminado al tejido alrededor del cuello uterino.

Estadio III. El cáncer se ha diseminado a toda el área pélvica. Puede haberse diseminado a la parte inferior de la vagina, o infiltrar los uréteres (los tubos que conectan los riñones a la vejiga).

Estadio IV. El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

IV-a: Diseminación a la vejiga o al recto (órganos cerca del cuello uterino)

IV-b: Diseminación a órganos distales como los pulmones.

Recurrente. Enfermedad recurrente (**recidiva**) significa que el cáncer ha vuelto después de haber sido tratado. Puede ocurrir en el propio cérvix o aparecer en otra localización.

El 70% de los casos que son diagnosticados en etapas localmente avanzadas (Ib a IVa), y en más del 90% corresponden al tipo epidermoide.^{10,16} Los datos estadísticos obtenidos por la secretaria de salud, IMSS, INEGI y la CONAPO muestran que la mortalidad de 1980-1990 es mayor que la obtenida de 1990-2000, es decir, muestra una disminución del 16.64% MENOS muertes por 100,000 mujeres a 12.84 muertes por 100,000 mujeres teniendo mas incidencia en zonas rurales (Oaxaca, Chiapas y Puebla) que las urbanas (CD. de México, Nuevo león y Baja California).^{17, 18 y 19}

Virus del papiloma Humano (HPV)

Los virus del papiloma humano (HPV), o papilomavirus, son un grupo de más de 100 tipos de virus. Se les llama papilomavirus porque algunos tipos pueden causar verrugas o papilomas, los cuales son tumores benignos (no cancerosos). Los papilomavirus que causan las verrugas comunes que crecen en las manos y en los pies son diferentes de los que causan formaciones en la garganta o en el área genital. Algunos virus del papiloma humano pueden hacer que aparezcan verrugas en los genitales o en el ano, o cerca de ellos. Las verrugas genitales (técnicamente conocidas como condilomas acuminados) están relacionadas generalmente con dos tipos de virus del papiloma humano, el tipo 6 y el 11. Las verrugas pueden aparecer varias semanas después del contacto sexual con una persona que tenga la infección del virus del papiloma humano o es posible que se lleven meses o años en aparecer; o, tal vez, no aparezcan nunca.

El virus del papiloma humano puede también causar formaciones planas anormales en el área genital y en el cuello del útero o cérvix (la parte inferior del útero que se extiende a la vagina). Sin embargo, las infecciones del virus del papiloma humano generalmente no causan síntomas.²⁰ Más de 30 virus de HPV, pueden pasarse de una persona a otra por medio de contacto sexual. Sin embargo, algunas veces la infección se mantiene por mas tiempo, causando o no anomalías en las células.²¹

Para que el virus del papiloma humano pueda penetrar e iniciar un proceso infeccioso se requiere una continuidad de tejidos, de manera que el virus pueda ponerse en contacto con las células permisivas, que son las *células basales* de los epitelios. Una vez que han infectado las células blanco, se inicia la replicación viral en las *células espinosas*. El ensamble de los viriones se lleva a cabo en estratos superiores de los epitelios cuando las células se han diferenciado (*células granulares*), ya que es un requisito para este evento, la maduración y diferenciación de la célula. Finalmente en las *células escamosas* los viriones son expulsados y puede inicial un nuevo ciclo de infección.²² Los virus del papiloma son específicos de especie y de tejido y sólo una subpoblación del grupo está asociada con transformación neoplásica.^{23,24,25 y 26} Aunque el epitelio escamoso parece ser el principal sitio de infección por el

HPV, también se ha visto que ésta puede ocurrir sobre las células primitivas o “de reserva”, que dan origen tanto al epitelio exo como al endocervical del tracto genital femenino.²⁷ El intervalo desde la exposición hasta el desarrollo de una lesión varía de semanas a varios meses (de 6 a 24) o quizá más).¹ Se cree que el virus entra al organismo a través de pequeños cortes o abrasiones de la piel o las mucosas. El virus debe llegar a la capa basal del epitelio o a células de metaplasia escamosa inmadura.^{23 y 26} Dependiendo de una variedad de factores pobremente entendidos la infección puede permanecer latente o volverse productiva.^{25 y 28} La infección latente se define como el mantenimiento de una infección viral sin la producción del virus infeccioso, en la que el DNA viral permanece en el núcleo como una molécula libre, circular llamada episoma.

De los más de 100 tipos de virus de HPV, solo cerca de 20, a 40 tipos ²⁹ se asocian a infección del tracto ano genital. Es ampliamente conocido que ciertos tipos de virus se asocian a diferentes tipos histológicos de cáncer, por ejemplo el tipo 18 se asocia al adenocarcinoma y carcinoma epidermoide también, los tipos 16, 31 y 33 se asocian a lesiones escamosas que pueden terminar en un cáncer epidermoide. Los tipos 16 y 18 son los responsables de la mayoría de los cánceres de cervix. Todos los tipos de virus del papiloma tienen una doble cadena encapsulada de DNA de aproximadamente 800 pares de bases, la arquitectura de estos virus no es diferente entre ellos, todos comparten una estructura llamada: estructura de lectura abierta que en inglés es ORF (Opening reading frames), en dicha zona existen los fragmentos E6 y E7,³⁰ en los tipos de virus de alto riesgo esta porción del virus esta directamente implicada en la transformación tumoral, siendo estos los oncogenes del virus.³¹

Las infecciones por HPV se clasifican en:

Con carga viral alta (tipos 11, 31, 33, etc.):

- DNA viral Episomal (no integrado al DNA de las células que infectan), usualmente no son infecciones persistentes, son con frecuencia infecciones recientes o en mujeres gestantes. Se puede predecir que no existe riesgo de persistencia y por lo tanto hay bajo riesgo de desarrollar cáncer. Las pruebas de captura de hibridación son positivas.
- DNA viral integrado en el DNA de las células infectadas, tiene un alto riesgo de transformación tumoral o cáncer, la prueba de captura de híbridos es positiva.

Con baja carga viral (tipos 16, 18, 52, etc.):

- DNA viral integrado, usualmente son infecciones persistentes, los pacientes tienen alto riesgo de desarrollar cáncer. Captura de híbridos positiva.
- DNA viral Episomal, usualmente son infecciones en proceso de eliminación o curación. El riesgo de cáncer es de bajo a moderado. La captura de híbridos es positiva.

- Infecciones por virus tipo 18: Siempre serán de un alto riesgo para el desarrollo de cáncer independientemente del grado histológico en que se encuentren, así como independientemente de la carga viral, la integración del DNA viral, etc. Todas las pacientes infectadas por éste tipo de virus tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer epidermoide y adenocarcinoma de cérvix.

Se conoce que existen virus de alto riesgo con capacidad de transformación neoplásica dependiendo del estado físico del virus en las pacientes, como es la integración al genoma de las células y de la respuesta inmunológica del tejido. Una vez establecida la inmortalización de clones celulares (grupos o colonias de células afectadas) esto conducirá a una alteración progresiva del código genético celular, los cuales aparecen como cambios histopatológicos del tejido tomado en las biopsias.

Más de 80 genomas diferentes de virus papiloma han sido secuenciados ^{32 y 33} y divididos en tres grupos, uno de infección muco-cutánea, otro grupo aislado de pacientes con epider-modisplasia verruciforme y un último grupo asociado con la transmisión sexual con más de 22 tipos capaces de infectar el tracto anogenital inferior. ^{19, 27 y 34}

La clasificación de los virus papiloma se basa en diferencias en su secuencia de ácido nucleico. Con base en la búsqueda de asociación entre los diferentes tipos de HPV y condilomas, lesiones intraepiteliales y neoplasias invasivas, los HPVs genitales pueden dividirse en tres grupos: los asociados con lesiones benignas o de bajo riesgo (HPV 21,26, 45, 49, 55, 57, 58, 59, 58-68, 72, 81) y los asociados con lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) ³⁵ y carcinomas invasivos divididos a su vez en un grupo de riesgo Intermedio (HPV 31, 33, 35, 51, 52) y un grupo de alto riesgo oncogénico (HPV 16, 18, 45, 46).³⁴ Los virus de papiloma humano más comunes y sus lesiones asociadas aparecen en la tabla 1. ^{23, 28 y 36}

Tipos de HPV detectados en lesiones cutáneas y anogenitales

Lesión	Tipo de HPV
Verrugas cutáneas	1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 28, 29,38
Condiloma acuminado	6 y 11

Neoplasia intraepitelial cervicales	6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 42-45, 51, 52, 56
Carcinoma escamocelular cérvix	16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56
Adenocarcinomas cérvix	18
Papulosis bowenoide	16, 34, 37, 42
Carcinomas y neoplasias intraepiteliales vulvares	6, 11 y 16
Carcinomas y neoplasias intraepiteliales peneanas	16 y 18
Carcinomas y neoplasias intraepiteliales anales	6, 11, 16, 18 y 33

Tabla 1. Se muestra los tipos de virus de papiloma que se encuentran en los diferentes tipos de canceres, se puede apreciar que los tipos 11, 16,18 y 33 son los mas frecuentes.

Asociación del Virus de Papiloma Humano con la neoplasia cervical

Con base en estudios epidemiológicos, desde hace más de 100 años se ha relacionado al cáncer de cervix, por mucho el cáncer genital más frecuente con un agente sexualmente transmitido, que inicialmente se creía era el virus del Herpes Simple 2 (HSV-2).^{37 y 38} Luego, la atención se centró en el HPV, que hasta entonces sólo se había asociado a condilomas genitales. Con el advenimiento de la virología molecular el virus empezó a ser entendido y se asociaron varios de los factores de riesgo conocidos para el desarrollo de estas lesiones con la infección viral.^{37 y 38}

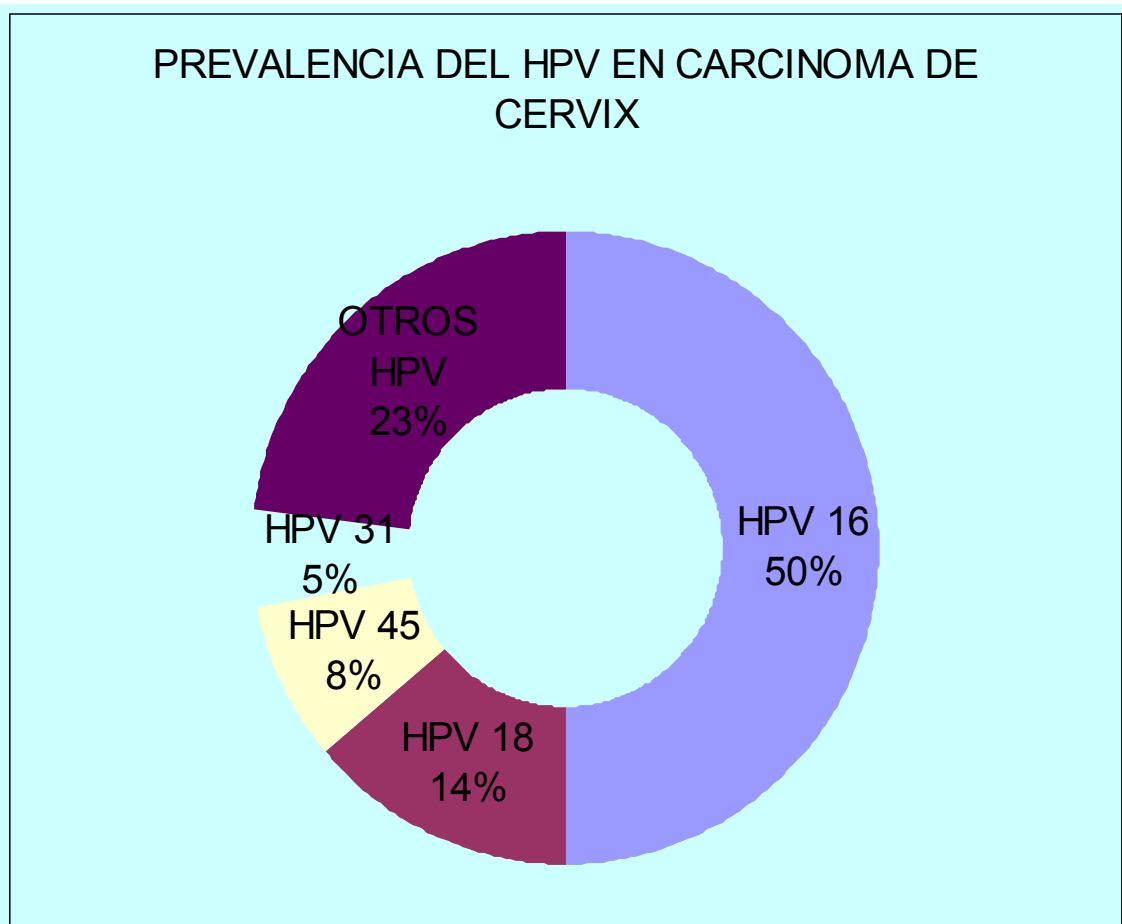
Aunque el epitelio escamoso es susceptible a la infección por HPV, la unión escamocolumnar, particularmente la “zona de transformación”, aquella que permanentemente sufre cambios en el epitelio escamoso, es el área más vulnerable a la infección.^{1 y 3} La asociación entre el HPV y el cáncer cervical se sugirió por primera vez en la década de los setenta basada en la observación de que el carcinoma escamocelular del cérvix tiene rasgos epidemiológicos similares a los de algunas enfermedades de transmisión sexual.¹⁹ Desde entonces se han desarrollado numerosos estudios que muestran una evidencia poderosa sobre el papel etiológico del virus en la neoplasia.

El cáncer cervical puede ser la primera neoplasia humana mayor para la cual se ha identificado un factor etiológico necesario único.¹⁹ Los resultados de asociación entre HPV y neoplasia varían en los diferentes estudios, al parecer según el método utilizado para la detección del virus.³ Usando métodos de hibridación se han descubierto secuencias de nucleótidos del HPV en 10 y hasta el 30% de epitelios escamosos metaplásicos de aspecto normal en mujeres entre 15 y 49 años^{38, 33, 36 y 39} y un estudio usando PCR en mujeres universitarias halló una prevalencia del 46%.³⁰ En las lesiones intraepiteliales se ha encontrado genoma viral en cérvix en 29-75% de casos de bajo grado, hasta en 90% de casos de LEI (lesiones escamosas intraepiteliales) de alto grado y en el 99.8% de los carcinomas escamocelulares y 90% de adenocarcinomas invasivos del cérvix^{30, 38, 39 y 40} Además, se ha encontrado

también DNA viral en ganglios linfáticos con carcinoma metastásico, correspondiendo al mismo tipo hallado en los carcinomas primarios.³⁸ Las más altas prevalencias de infección por HPV se han hallado en mujeres menores de 25 años,³³ las mujeres mayores tienen menor riesgo de contraer infección por el virus, posiblemente debido a inmunidad adquirida al HPV por exposiciones pasadas.⁴¹

Existen evidencias que muestran que el riesgo relativo de desarrollar cáncer en Mujeres con HPV es mayor de 50% y en un caso llegaba hasta 146%, una magnitud poco común en la epidemiología oncológica.^{32, 35, 38 y 42} La evidencia de transmisión hetero y homosexual de HPV de alto riesgo está basada principalmente en estudios epidemiológicos, ya que no ha sido posible confirmar la transmisión del mismo tipo de virus de hombre a mujer en los estudios clínicos realizados.^{35 y 43} Como ya se ha comentado, algunos tipos de HPV poseen la capacidad de actuar en la transformación maligna de las células mientras que otros no. Ciertos tipos de HPV comparten algunas características acerca de su influencia sobre los queratinocitos²⁷ (son las células más abundantes de la epidermis y son la que le dan forma y funcionalidad a esta). En la infección con una cepa de alto riesgo al parecer se requieren ciertos eventos genéticos adicionales para que ocurra la progresión a una lesión invasiva. Estos eventos están relacionados con la inactivación de anti-oncogenes celulares por el virus, lo que finalmente les daría una ventaja de crecimiento selectivo a las células infectadas, por lo tanto la transformación maligna estaría debida a una inhibición del control celular mediado por la expresión viral.^{37 y 38}

Los HPV de alto riesgo se han identificado en 90-95% de lesiones invasivas del cérvix; los tipos 16 y 18 se han encontrado aproximadamente en el 50-70% de los carcinomas y otros tipos como el 31, 33, 35, 51, 52, 58 dan cuenta de los casos restantes (Grafica 1).^{33, 37 y 42} En la población general la prevalencia de positividad para HPV de alto riesgo es dependiente de la edad, siendo más frecuente en mujeres jóvenes que en mayores de 30 años (10% vs. 3%).⁴⁰ En un estudio prospectivo se encontró que aproximadamente 30% de mujeres HPV16-positivas desarrollaron LEI de alto grado en un período de dos años.²⁵ Al estudiar los patrones morfológicos de las neoplasias encontraron que el HPV 16 está fuertemente asociado con el carcinoma escamocelular queratinizante y no con el no queratinizante, y el HPV 18 se encuentra más frecuentemente en carcinomas pobremente diferenciados, al igual que en adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos y carcinomas de células pequeñas.³⁸



Grafica 1. Se muestra el porcentaje de tipo de virus de papiloma en el carcinoma de cervix, donde se puede ver claramente que el tipo 16 es el que tiene mayor prevalencia.

Liposomas

Los liposomas son vesículas microscópicas formadas por una o varias bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos, las cuales delimitan uno o varios compartimientos acuosos en el interior, su tamaño varía de 0.02 a 10 μm de diámetro.⁴⁴ Figura 1

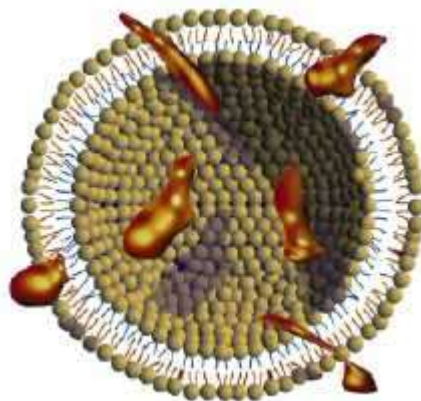


Figura 1. Representación esquemática de liposomas.

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.⁴⁵

Generalmente se usan liposomas unilaminares de 0.2 a 0.5 μm de diámetro, por que 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.⁴⁶

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 lípidos 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, 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, lo cual les permite a estos lípidos asociarse entre si y formar arreglos moleculares específicos; la bicapa lipídica es un ejemplo de estos agregados.⁴⁵

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 dentro de los liposomas, debido a la repulsión electrostáticas entre las bicapas adyacentes, la carga también afecta la interacción de los liposomas con las células.⁴⁷ Caso especial, son los liposomas estericamente 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.⁴⁸

Generalmente los liposomas multilaminares 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,⁴⁴ estas moléculas quedan atrapadas en los espacios acuosos, si son polares, o se insertan en la bicapa lipídica si son hidrofóbicos.

Los liposomas pequeños, se forman al someter los lípidos a una sonicación,⁴⁸ con lo cual se produce una población homogénea de liposomas unilaminares (25-50nm). 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 unilaminares grandes se emplean principalmente, para encapsular macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, el método mas usado es por evaporación en fase inversa.⁴⁹ Con este método se forman liposomas de 0.1 a 1 μm de diámetro.

La importancia del uso de los 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 (Se define como efecto tóxico o respuesta tóxica, cualquier desviación del funcionamiento normal del organismo que ha sido producida por la exposición de una sustancia) diferentes o no tener ninguno.⁵⁰

En la actualidad se han utilizado liposomas para nuevas estrategias de combate contra diversas enfermedades, principalmente cancerosas.⁵¹ 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 estas estrategias, se han logrado efectos contra células de cáncer cervical y de colon.⁵² Recientemente se han encapsulado diversas citocinas en liposomas y se ha observado que pueden ejercer sus funciones tanto *in vitro* como *in vivo* en animales de experimentación. Uno de los primeros informes de una citocina encapsulada en liposomas data de 1985 en el cuál un factor denominado MAF (Factor activador de macrófagos) producido por linfocitos, al ser encapsulado en un liposoma podía romper la barrera de la especificidad.⁵³ Esta citocina ejerce sus funciones estimulando un receptor interno después de haber traspasado la membrana de la célula no específica. También se han utilizado IL-1, TNF e IFN α encapsuladas en liposomas para causar efectos tumorocidas en células de cáncer de mama.⁵⁴

Por otra parte, en trabajos previos se ha demostrado que los liposomas catiónicos vacíos, constituidos de fosfatidilcolina:espermidincolesterol a una concentración de 15 μ mol, son capaces de generar un estímulo antiproliferativo y antitumoral en tumores de CaCU de INBL inducidos en ratones singénicos CBA/ca,⁶

Los liposomas constituyen en la actualidad uno de los sistemas de administración de medicamentos y de productos biológicos más atractivos por su funcionalidad, versatilidad de empleo y sus perspectivas futuras.⁵⁵ Sin embargo, los liposomas presentan algunas desventajas como son baja eficacia de transfección, una expresión transitoria, pueden ser inhibidos por componentes séricos y sobre todo poseen un cierto grado de toxicidad celular.⁵⁶ En general, la toxicidad de los lípidos, depende de la composición, concentración y tiempo de exposición, por lo que el potencial de toxicidad debe ser cuidadosamente considerado antes de utilizar liposomas como acarreadores de fármacos o productos biológicos.^{57, 58 y 59}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCU, representa aproximadamente un 30% de los padecimientos y muertes por cáncer en las mujeres mexicanas, así como entre las mujeres de otros países del tercer mundo.⁶⁰ La asociación entre el HPV y el cáncer cervical se sugirió por primera vez en la década de los setenta.¹⁹ Los virus de HPV de alto riesgo oncogénico que se encuentran presentes en más del 90 % de las pacientes con displasia de cérvix (tipos 16,18, 31, 33, etc.) tienen la capacidad de persistir como infección en las pacientes, siendo los tipos 16 y 18 los responsables de la mayoría de los cánceres de cervix, se sabe que cuando el contacto del HPV es prolongado en las células cervicales provocan la transformación e inmortalización celular así como el cáncer.³⁰ Esta prolongación del HPV esta asociada a la integración de la carga viral (DNA viral integrado al DNA de las células que infectan), aunque se ha observado que los HPV tipo 16 y 18 presentan una carga viral baja, las Infecciones por el virus tipo 18, siempre serán de un alto riesgo para el desarrollo de cáncer independientemente del grado histológico en que se encuentren, así como independientemente de la carga viral.³¹ Esto podría ser debido a que el tipo de virus del papiloma tienen una doble cadena encapsulada de DNA de aproximadamente 800 pares de bases, la arquitectura de estos virus no es diferente entre ellos, todos comparten una estructura llamada: estructura de lectura abierta que en inglés es ORF (Opening reading frames), en dicha zona existen los fragmentos E6 y E7,³⁰ en los tipos de virus de alto riesgo, como el 18, esta porción del virus esta directamente implicada en la transformación tumoral, siendo estos los oncogenes del virus.³¹ Esta claro que la carga viral y la expresión de los fragmentos E6 Y E7 provocan la transformación e inmortalización celular así como el cáncer, ¿pero tendrán otras implicaciones?, ¿Qué diferencias puede haber con otros tipos de cáncer que no estén infectados con el HPV? Y ¿como podrían reaccionar ambos tipos de cánceres (con o sin infección de HPV) ante la presencia de sustancias con un efecto antiproliferativo?

Por otra parte, los liposomas se pueden considerar una excelente vía para la administración exógena de citocinas que pueden ser toxicas en el organismo, como la IL-2 esperando reducir los efectos adversos al administrarlas en altas concentraciones para activar la respuesta antitumoral a través de linfocitos y macrófagos contra distintos tipos de cáncer como el carcinoma de cérvix.⁵

Es por eso que nuestro grupo de trabajo esta interesado en saber, que efecto tiene el HPV en células de cáncer de cérvix, ante la presencia de sustancias con efectos antiproliferativos, en este caso de liposomas neutros y aniónicos vacíos. Ya que nuestro laboratorio de investigación ha demostrado que los liposomas pueden ser tóxicos al ser formulados con altas concentraciones de lípidos, y además son utilizados para transportar citocinas dentro de ellos.^{6 y 7}

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del HPV en células de cáncer de cérvix SIHA, CASKI, ROVA, VIBO Y C-33, ante la presencia del liposomas neutros y aniónicos vacíos.

OBJETIVO PARTICULARES

- Elaborar liposomas aniónicos y neutros vacíos.
- Realizar ensayo de proliferación *in vitro* con las líneas celulares SIHA, CASKI, ROVA, VIBO Y C-33 en presencia de dos formulaciones de liposomas (aniónicos y neutros)

HIPOTESIS

De acuerdo a los datos que indican que los virus de HPV de alto riesgo oncogénico que se encuentran presentes en más del 90 % de las pacientes con displasia de cérvix,^{38 y 42} estos tienen la capacidad de persistir como infección en las pacientes, se sabe que cuando el contacto del HPV es prolongado en las células cervicales provocan la transformación e inmortalización celular así como el cáncer. Se podría pensar que la presencia del HPV pudiera dar un efecto de resistencia a las células de CaCU infectadas. Por tanto, la inhibición de la proliferación de líneas celulares de carcinoma de cervix producida por sustancias como los liposomas neutros o aniónicos puede ser modificada por la presencia de HPV en dichas células.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico.

- * Línea celular de cáncer de cervix SIHA
- * Línea celular de cáncer de cervix CASKI
- * Línea celular de cáncer de cervix ROVA
- * Línea celular de cáncer de cervix VIBO
- * Línea celular de cáncer de cervix C-33
- Medio de cultivo celular RPMI con suero fetal bovino (SFB) desactivado al 10 % v/v.
- Liposomas neutros (fosfatidilcolina, fosfatidiletalona y colesterol)
- Liposomas aniónicos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y colesterol)

Material no biológico y equipo

- Agua desionizada
- Solución salina de Verseno
- Solución amortiguadora de fosfatos
- Glutaraldehído 1.1 %
- Azul tripano 0.3%
- Cristal violeta 0.1%
- Ácido acético glacial al 10%
- Cloroformo
- Éter diétilico
- Placas de 96 pozos fondo plano
- Micropipetas 1000, 200, 100 y 20 ML
- Botellas para cultivo celular de 25cm³
- Microscopio invertido
- Cámara de Neubauer
- Tubos de eppendorf
- Matraz cónico de dos bocas
- Bomba de vacío
- Sonicador
- Centrifuga
- Tubos para centrifuga
- Campana de flujo laminar
- Incubadora (atmósfera de 5% de CO₂, temperatura de 37°C y ambiente saturado de humedad relativa)
- Lector de placas

* El material biológico consistió en las líneas celulares del carcinoma de Cervix (CaCU), SIHA, CASKI, ROVA, VIBO Y C-33, las cuales están en un estadio **IIIb**. Y se obtuvieron de la reserva crió preservada en el laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. De las cuales las líneas celulares SIHA Y CASKI, están infectadas con el HPV tipo 16 y las líneas celulares ROVA y VIBO están infectadas con el tipo 18. Por ultimo la línea celular C-33, no presenta infección

Cultivo celular.

Las líneas celulares se cultivaron en medio líquido RPMI al 10% v/v de SFB (Suero Fetal Bovino) desactivado; el cultivo se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano.

El cultivo se mantuvo en incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂, a temperatura de 37 grados Centígrados y un ambiente saturado de humedad relativa.

Elaboración de liposomas.

Se utilizaron liposomas neutros y aniónicos vacíos. La preparación de los liposomas neutros y aniónicos se realizó mediante el método de Szoka,^{5 y 61} formados por 10nmoles de lípidos fosfatidilcolina (PC):Fosfatidiletalona (PE): Colesterol (CH), 4:2:4 y Fosfatidilcolina (PC): Fosfatidilserina (PS) Colesterol (CH) 6:3:1, respectivamente, disueltos en 1 mL de cloroformo, los cuales se colocan en un matraz cónico de dos bocas de 50 mL de capacidad.

El disolvente se evapora a presión reducida y se añade 1.2mL de éter dietílico y 333µL de medio de cultivo. Se agita con vortex durante 45 segundos a la máxima velocidad y se procede a evaporar el solvente por 45 segundos más en agitación. La suspensión lechosa de liposomas se resuspende en 10mL de medio de cultivo sin suero. Para eliminar cualquier residuo se procede a lavar la suspensión por ultra centrifugación a 40,000 rpm por 45 minutos y la pastilla de liposomas se resuspende en 10 mL de medio de cultivo. Por último la suspensión se filtra en membranas Milipore con poros de 0.45µm de diámetro para obtener la preparación estéril.

Para la producción de liposomas aniónicos se emplea el mismo método (Szoka) utilizando para preparar los liposomas neutros.

Los liposomas neutros y aniónicos vacíos, se mantuvieron a 4°C, hasta su utilización, estos se emplearon durante los primeros 7 días, evitando su degradación por hidrólisis y oxidación.

Método

Se cultivaron las líneas celulares de cáncer de cervix, SIHA, CASKI, ROVA, VIBO Y C-33, en botellas de capacidad de 25 cm³, hasta que alcanzaron una proliferación no menos del 80%; a estas células se les adiciono 5mL de verseno y se dejó reposar por 10 min.; una vez despegadas se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min., se formó un botón de células al cual se le adiciono 3 mL de medio RPMI al 10% de SFB desactivado y se resuspendieron las células, se tomaron 0.3mL y se colocaron en un eppendorf, a este se adiciono 0.3 mL de azul tripano (como prueba de viabilidad) y se procedió a contabilizar las células en la cámara de Neubauer.

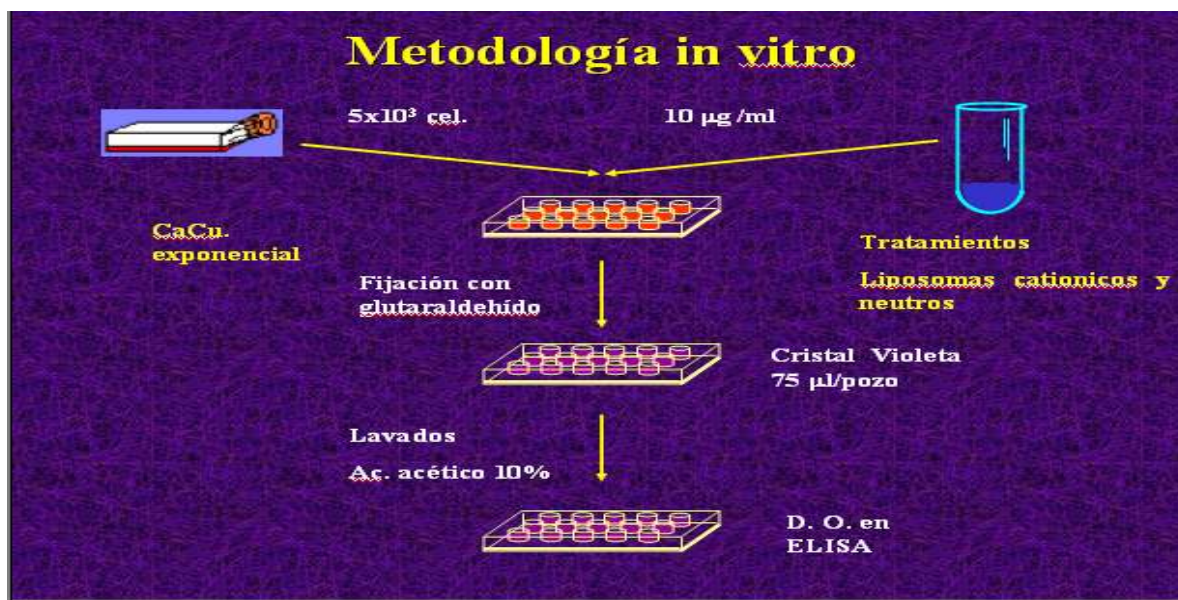
En las cajas de 96 pozos, de acuerdo a la cantidad de células se realizó el cálculo correspondiente para obtener 5X10³ células en 150µL de medio de

cultivo por pozo. 24 horas después del cultivo se le adicionaron 35µmL de liposomas neutros vacíos o aniónicos vacíos, dejándolos actuar durante una hora, transcurrido el tiempo se lavaron los 96 pozos con PBS estéril.

Una vez lavados los pozos, las células se fijan con glutaraldehído 1.1% por 20 minutos, se lavan con agua desionizada y se deja secar la placa a temperatura ambiente, este procediendo se realiza cada 24 horas.

Una vez cumplidas las 96 horas se añaden 75µL de cristal violeta al 0.1% ⁷ en cada pozo por 10 minutos con agitación, transcurrido este tiempo se lava nuevamente con agua desionizada y se deja secar a temperatura ambiente. Se adiciona 100µL de ácido acético al 10% en cada pozo, posteriormente se mantienen por 20 minutos en agitación, para después leer la placa obtenida, a una absorbancia de 570nm en un aparato de ELISA.

La proliferación se evaluó con la técnica de cristal violeta, la cual utiliza los siguientes reactivos: glutaraldehído al 1.1%, cristal violeta al 0.1%, ácido acético al 10% y agua miliQ. Figura 2



esta técnica es una herramienta muy útil en investigaciones en las cuales se aplican la observación y la experimentación. La relación de varianzas o pruebas de *F* indica realmente que la variabilidad entre las muestras no se debe al azar, si no a ciertas causas biológicas las cual es equivalente a decir que las diferencias son significativas entre las medias de las poblaciones, estimadas por las medias de las muestras. Sin embargo, la prueba de *F* no indica cuales medidas son iguales o cuales son diferentes, y que puede suceder que en una serie de muestras la prueba de *F* indique diferencias en el conjunto, pero un par en particular sea igual; por ello con los datos del análisis de varianza se hacen las pruebas de significancia de las diferencias, o las comparaciones entre medias de las muestras por medio del método de Tukey (Estadística no paramétrica). Ambos cálculos se llevaron a cabo con el programa informático Statgraphics plus 5.0

RESULTADOS

LIPOSOMAS NEUTROS Y ANIÓNICOS

Se elaboraron 10 μ mol de liposomas neutros a una formulación de 4:4:2 de los siguientes lípidos PC, CH Y PE disueltos en 10mL de PBS estéril.

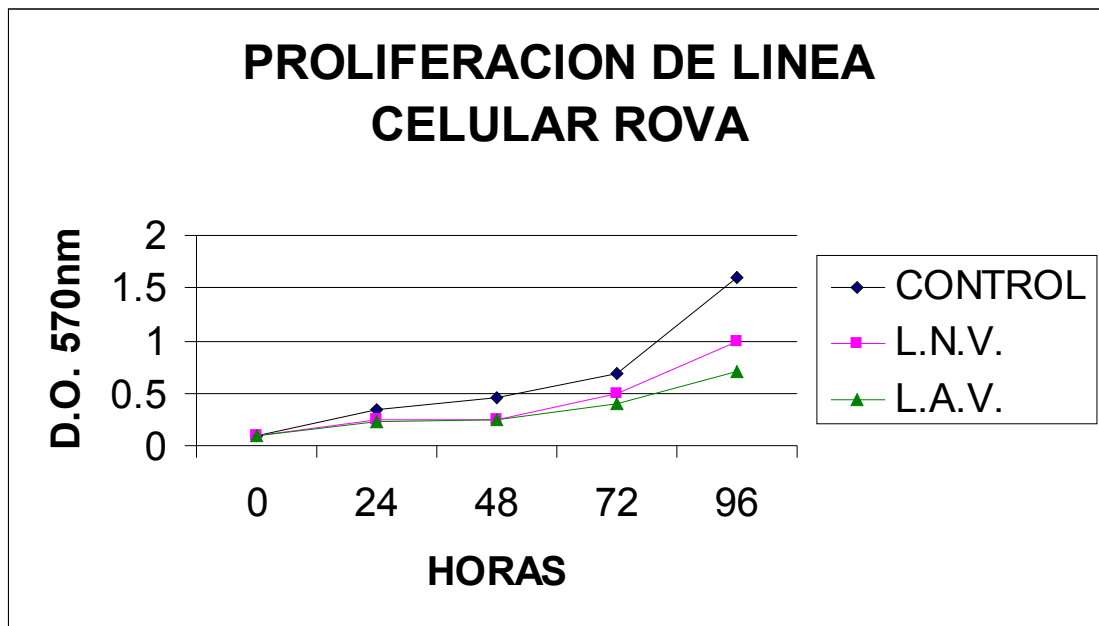
Se elaboraron 10 μ mol de liposomas aniónicos a una formulación de 6:3:1 de los siguientes lípidos PC, PS y CH disueltos en 10MI de PBS estéril.

CINETICA DE LAS LINEAS CELULARES.

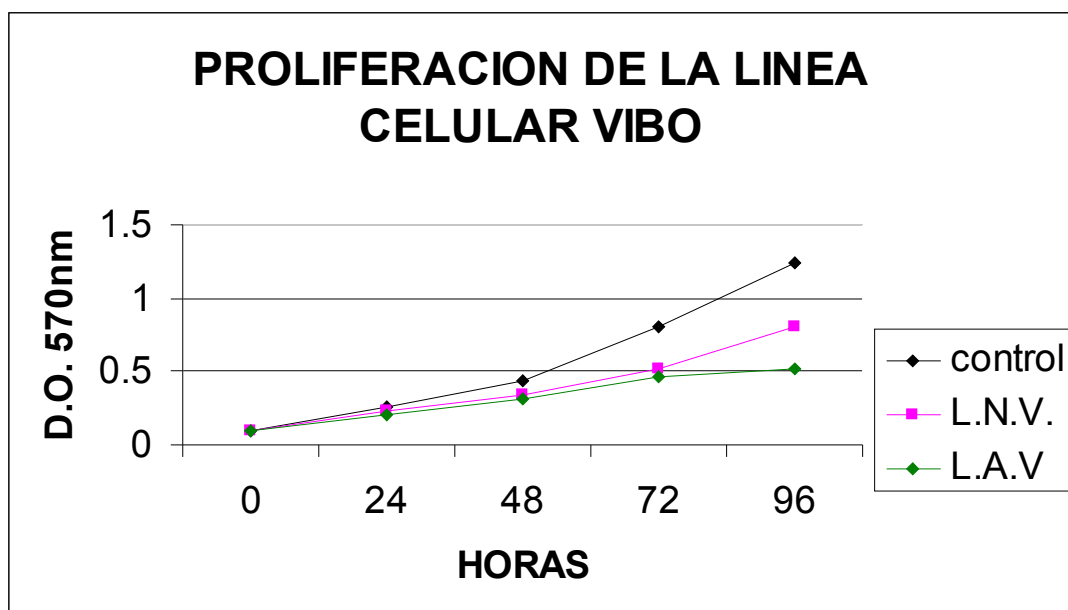
Líneas infectadas con VPH-18

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo con dos líneas células de CaCU, ROVA y VIBO, ambas infectadas con el VPH tipo 18, de alto riesgo para desarrollo de cáncer.

Inicialmente se cultivaron 5x10³ células por pozo de las líneas celulares antes mencionadas en una placa de 96 pozos, la cinética de proliferación se elaboró con los datos obtenidos cada 24 horas por 4 días los resultados indican una disminución de la proliferación de ambas líneas celulares cuando fueron cultivadas en presencia, tanto de liposomas neutros como de liposomas aniónicos vacíos. Es necesario, mencionar que se observa una diferencia en la acción antiproliferativa de las dos formulaciones de liposomas, siendo los aniónicos los que producen la mayor inhibición de la proliferación de un 28%, (tabla 3), para ROVA Y VIBO respectivamente (grafica 2 y 3).



Grafica 2. Proliferación celular de la línea ROVA de CaCU, el control (sin tratamiento), liposomas neutros vacíos (L.N.V.), y por último los liposomas aniónicos vacíos (L.A.V.).

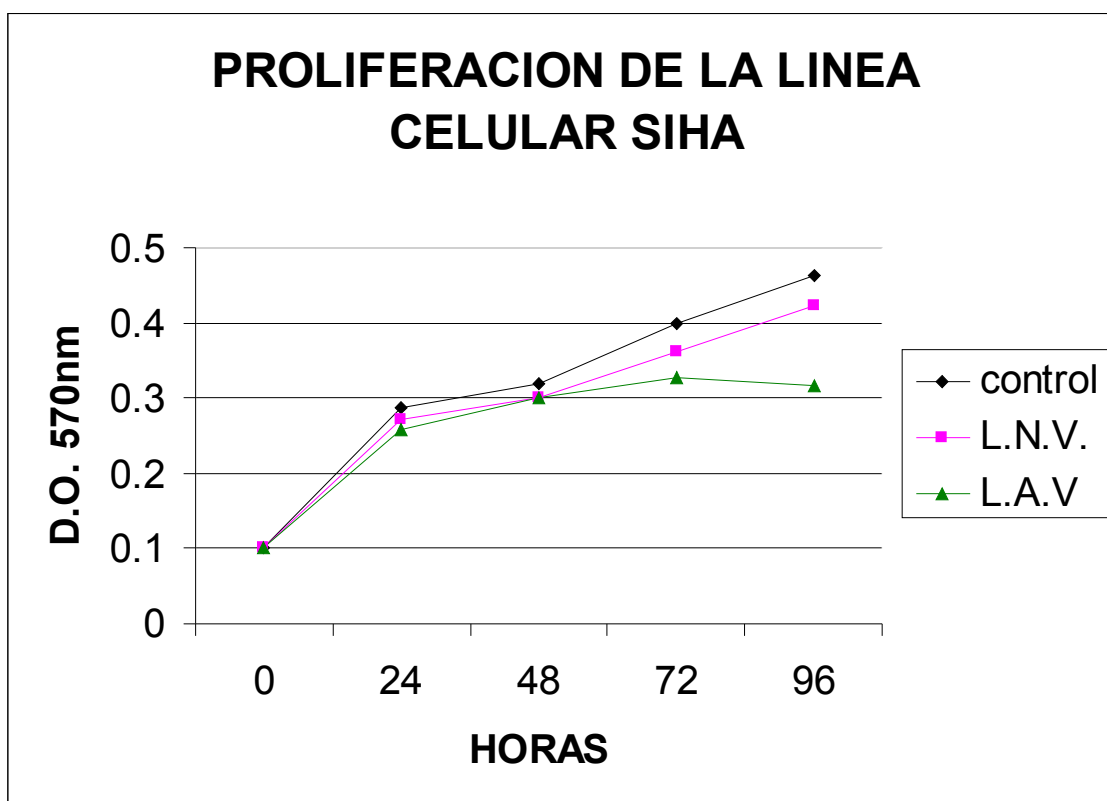





Grafica 3. Proliferación celular de la línea VIBO de CaCU, el control (sin tratamiento), liposomas neutros vacíos (L.N.V.), y por último los liposomas aniónicos vacíos (L.A.V.).

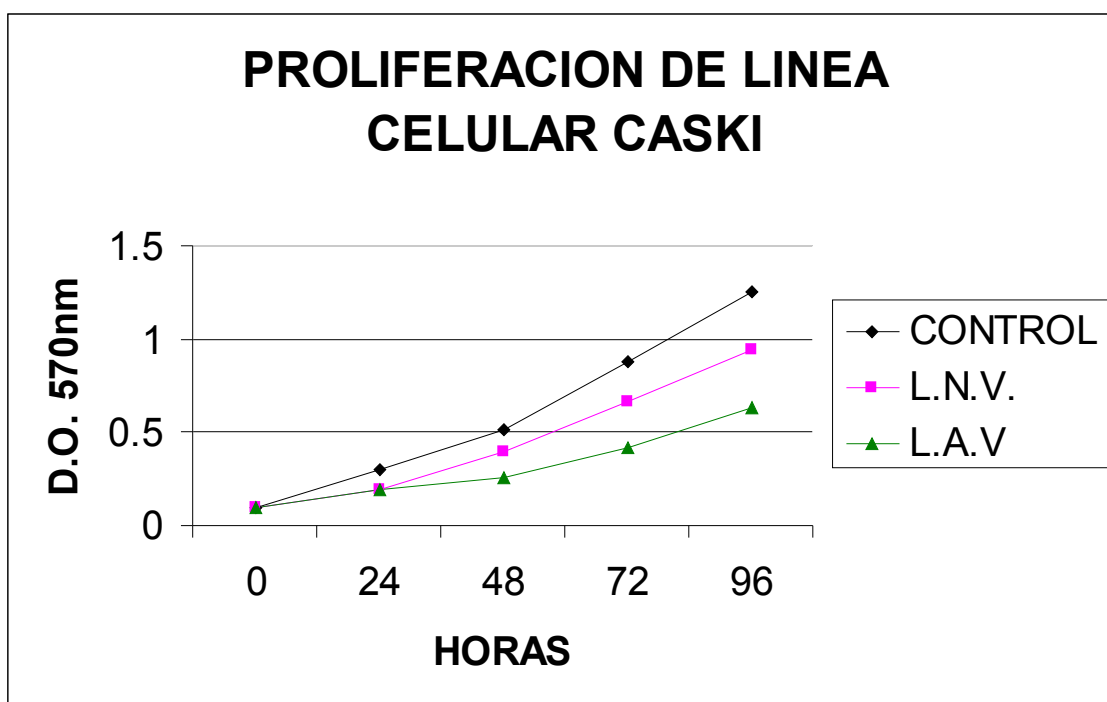
Líneas infectadas con VPH-16

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo con dos líneas células de CaCU, SIHA Y CASKI, ambas infectadas con el VPH tipo 16, de alto riesgo para desarrollo de cáncer.

Inicialmente se cultivaron 5×10^3 células por pozo de las líneas celulares antes mencionadas en una placa de 96 la cinética de proliferación se elaboró con los datos obtenidos cada 24 horas por 4 días los resultados indican una disminución de la proliferación de ambas líneas celulares cuando fueron cultivadas en presencia, tanto de liposomas neutros como de liposomas aniónicos vacíos. Es necesario, mencionar que se observa una diferencia en la acción antiproliferativa de las dos formulaciones de liposomas, siendo los aniónicos los que producen la mayor inhibición de la proliferación en un rango de 19%-24%, (tabla 3), para SIHA Y CASKI respectivamente (grafica 4 y 5).



Grafica 4. Proliferación celular de la línea SIHA de CaCU, el control  (sin tratamiento), liposomas neutros vacíos  (L.N.V.), y por último los liposomas aniónicos vacíos  (L.A.V.).

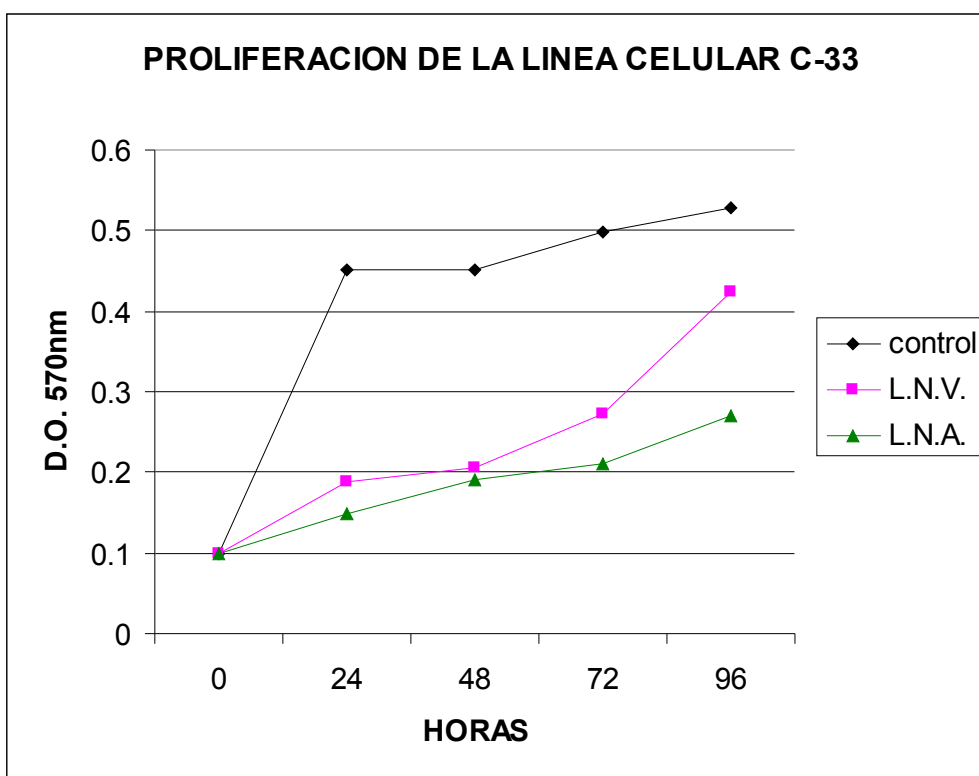


Grafica 5. Proliferación celular de la línea CASKI de CaCU, el control (sin tratamiento), liposomas neutros vacíos (L.N.V.), y por último los liposomas aniónicos vacíos (L.A.V.).

Células sin infección con VPH

Por último los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo con la línea celular de CaCU, C-33, la cual no está infectada con el VPH.

Inicialmente se cultivaron 5×10^3 células por pozo de las líneas celulares antes mencionadas en una placa de 96 la cinética de proliferación se elaboró con los datos obtenidos cada 24 horas por 4 días los resultados indican una disminución de la proliferación de ambas líneas celulares cuando fueron cultivadas en presencia, tanto de liposomas neutros como de liposomas aniónicos vacíos. Es necesario, mencionar que se observa una diferencia en la acción antiproliferativa de la formulación de liposomas neutros, el cual produce una drástica disminución en la proliferación (Grafica 6)



Grafica 6. Proliferación celular de la línea C-33 de CaCU, el control (sin tratamiento), liposomas neutros vacíos (L.N.V.), y por último los liposomas aniónicos vacíos (L.A.V.).

PORCENTAJES DE INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR

El cálculo de los porcentajes de inhibición de la proliferación celular se hizo, tomando como referencia la D.O. a 570nm del control de cada línea celular como el 100%, y comparándola con la D.O. a 570nm de cada tratamiento se obtuvo el porcentaje de inhibición de proliferación celular por cada 24 horas hasta completar los 4 días. Una vez obtenido el porcentaje de la inhibición de la proliferación celular de cada línea y tratamiento. Se realizó el promedio de los porcentajes de cada día por cada línea celular. Los cuales se pueden mostrar para liposomas neutros vacíos tabla (2), como por aniónicos vacíos tabla (3).

Dando resultados inesperados, como el porcentaje de inhibición celular en las células infectadas con HPV 16, en presencia de liposomas nuestros, el cual es de 8 a 12%, y con liposomas aniónicos, es de 19 a 24%.

Tratándose de células infectadas por VPH 18, en presencia de liposomas neutros, va de 26 a 39%, y con liposomas aniónicos, es de 28%.

Se puede apreciar claramente, que la presencia del HPV, en células de CaCU, aminora el porcentaje de inhibición de la proliferación celular en comparación del control, que es de células de CaCU sin infección de HPV.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición celular en LIPOSOMAS NEUTROS 10µmol de lípidos.

	PORCENTAJE DE INHIBICION DE PROLIFERACION CELULAR				
PROLIFERACIÓN (HRS)	VPH(-)	VPH 18		VPH 16	
	C-33	ROVA	VIBO	SIHA	CASKI
24	58	29	13	5	16
48	54	45	22	6	10
72	45	42	35	10	9
96	30	39	35	9	11
TOTAL	47	39	26	8	12

	PORCENTAJE DE INHIBICION DE PROLIFERACION CELULAR				
PROLIFERACIÓN	VPH(-)	VPH 18		VPH 16	
	C-33	ROVA	VIBO	SIHA	CASKI
24	67	20	21	10	19
48	58	13	22	15	18
72	58	30	35	18	17
96	49	47	35	32	42
TOTAL	58	28	28	19	24

Tabla 3. Porcentaje de inhibición celular en LIPOSOMAS ANIONICOS 10 μ mol de lípidos.

Actualmente no existen trabajos donde se compare el efecto que tienen los virus de alto riesgo, como el tipo 16 y 18 en carcinomas, contra carcinomas que son negativos al HPV. Tampoco se sabe si la presencia del virus confiere a las células algo más que la inmortalización. Y tampoco se sabe la respuesta de células de CaCU expuestas a sustancias antiproliferativas como liposomas.

7

En nuestros resultados se puede tener información al respecto al comparar los arreglos de cajas estadísticas, del lado izquierdo se encuentran las cajas de ANDOVA y del lado derecho se encuentran las cajas de TUKEY, existe una diferencia significativa en el caso de las cajas de ANDOVA, cuando las pestañas o extremos de las cajas NO se superponen. En el caso de las cajas de TUKEY, existe una diferencia significativa cuando las MUESCAS de las cajas NO se superponen. Con estas comparaciones podemos tener un soporte matemático fuerte de nuestros datos.

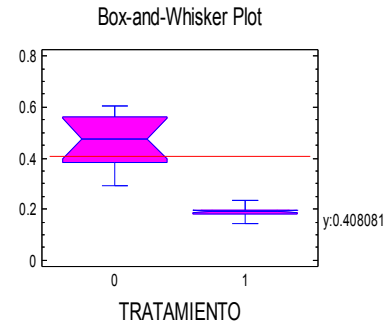
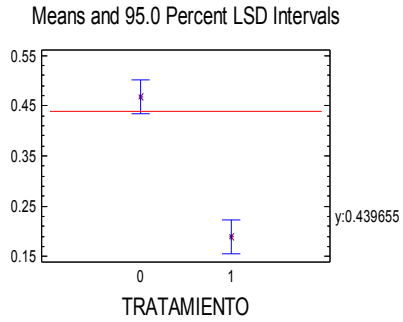
El análisis estadístico del la línea celular C-33 (arreglo 1), negativa al HPV, en ambas cajas se puede apreciar que existe una diferencia significativa, antes y después de poner el tratamiento. Confirmando así que los liposomas cuales tienen un efecto antiproliferativo en el carcinoma sin infección viral.

CONTROL

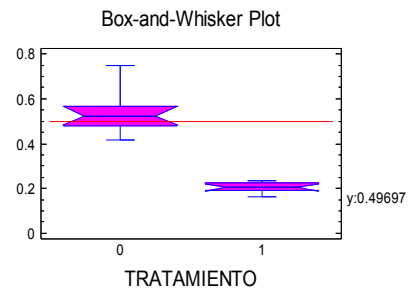
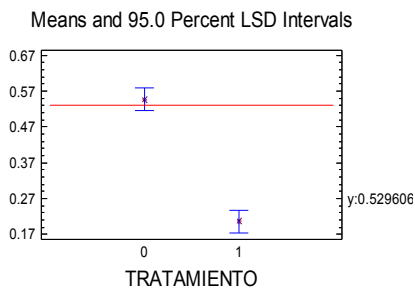
PARAMETRICO

NO PARA METRICO

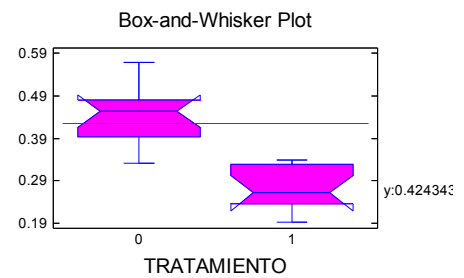
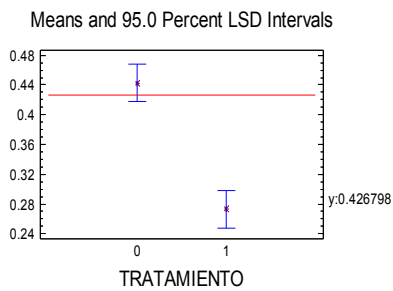
24 HORAS



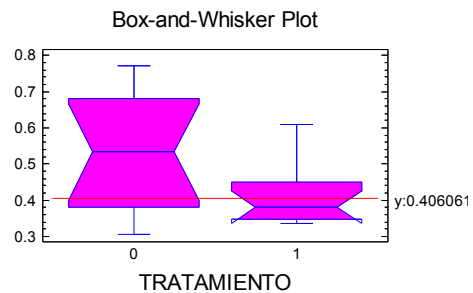
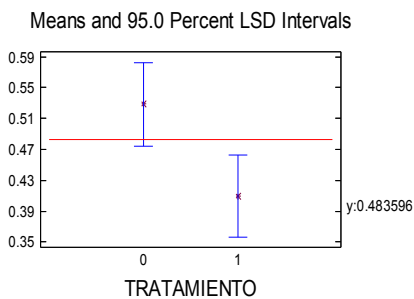
48 HORAS



72 HORAS



96 HORAS



ARREGLO 1

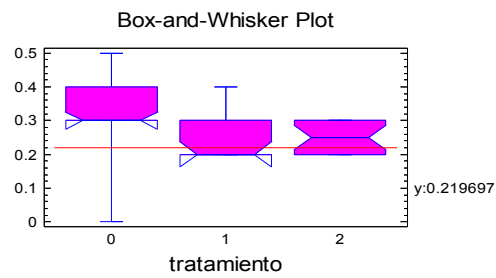
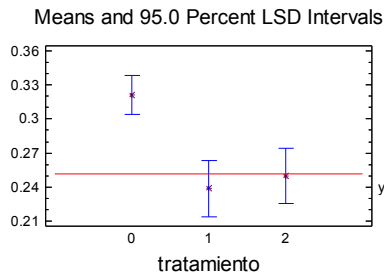
En el caso de la línea celular ROVA infectada con VPH 18, se puede ver en el análisis arreglo (2), que el efecto antiproliferativo de ambas formulaciones de liposomas puede alcanzar su mayor inhibición a las 24 horas, y se mantiene hasta las 48 horas. Esto se puede apreciar fácilmente al comparar las cajas

estadísticas tanto en ANDOVA como en TUKEY, donde existe diferencia significativa. También se puede ver que los liposomas aniónicos son los que presentan un efecto antiproliferativo mayor que los neutros a pesar de que se uso la misma cantidad de lípido para formularlos. ⁷ siendo mas evidente la diferencia significativa a 96 horas para los liposomas aniónicos comparada con el control.

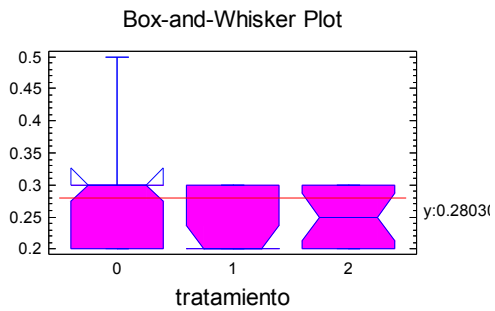
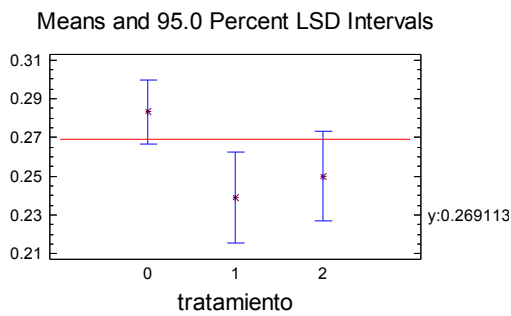
ROVA

PARAMETRICO **NO PARAMETRICO**

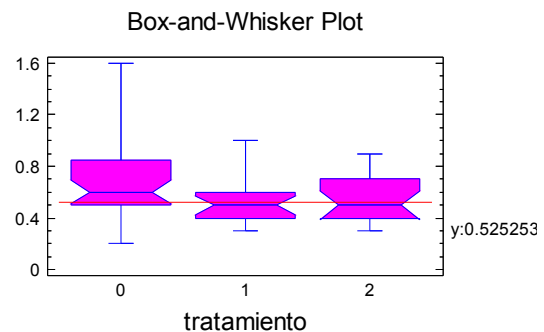
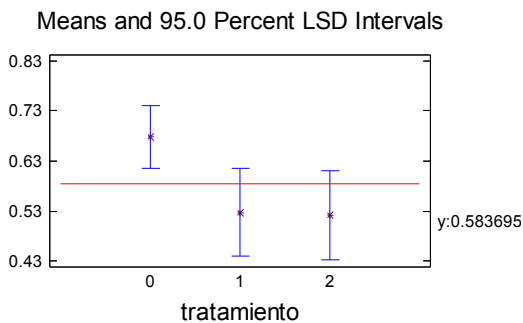
24 HORAS



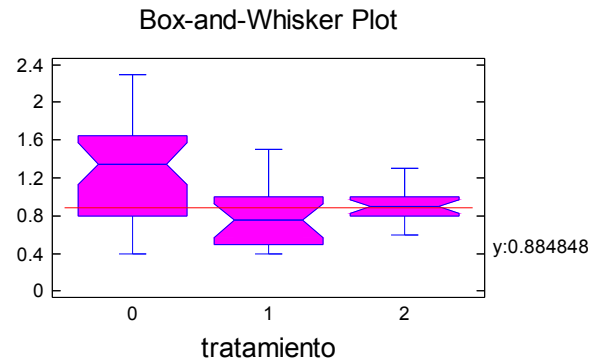
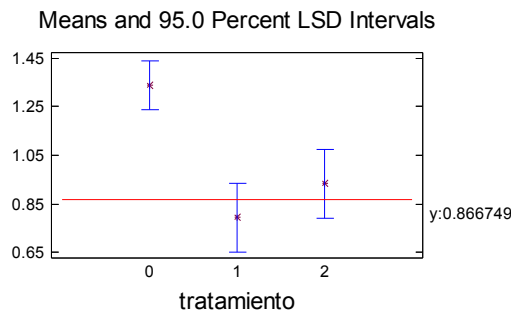
48 HORAS



72 HORAS



96 HORAS



ARREGLO 2

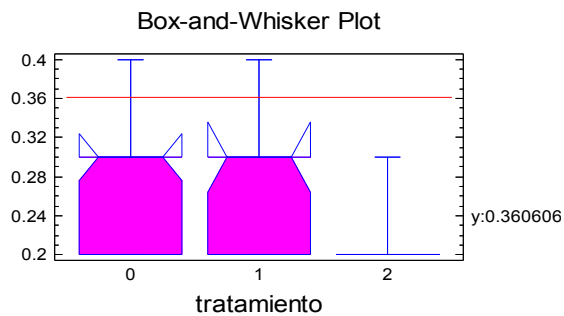
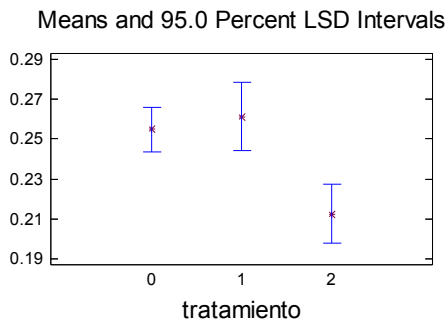
En el caso de la línea celular VIBO infectada con VPH 18, se puede ver en el análisis arreglo (3), que el efecto antiproliferativo de ambos liposomas puede alcanzar su mayor inhibición a las 24 horas, pero los liposomas aniónicos en comparación con los neutros mantiene ese efecto durante las 96 horas. Esto se puede ver al comparar las cajas estadísticas tanto en ANDOVA como en TUKEY, donde existe diferencia significativa. También se vuelve a reafirmar que los liposomas aniónicos tienen un efecto antiproliferativo mayor que los neutros.

VIBO

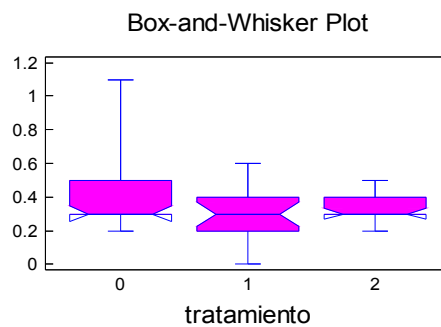
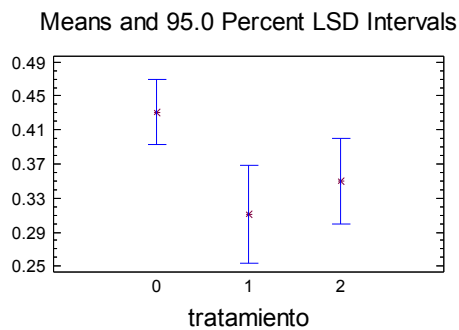
PARAMETRICO

NO PARAMETRICO

24 HORAS

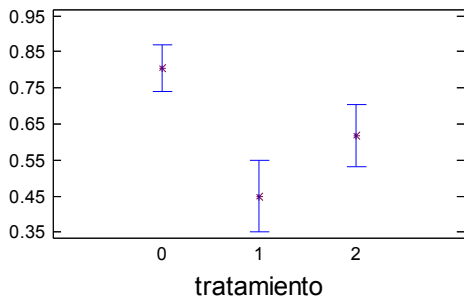


48 HORAS

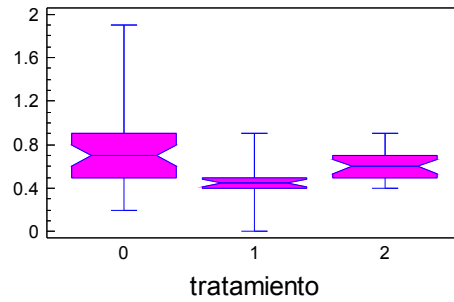


72 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

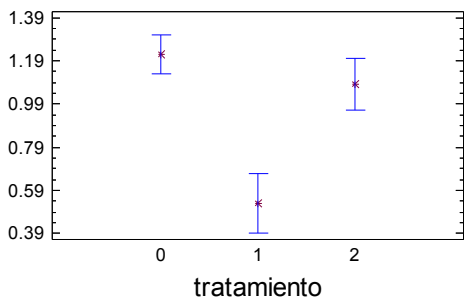


Box-and-Whisker Plot

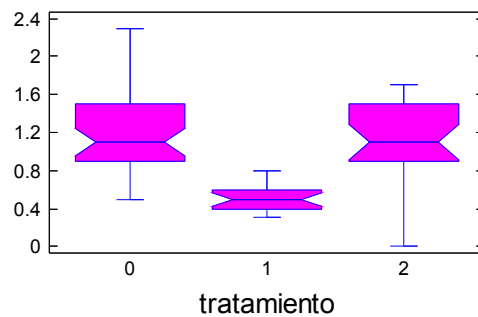


96 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals



Box-and-Whisker Plot



ARREGLO 3

En el caso de la línea celular SIHA infectada con HPV 16, se puede ver en el análisis arreglo (4), que el efecto de los liposomas es contrario a las células infectadas por HPV 18, por que se puede ver que el máximo efecto antiproliferativo, no se da a las 24 horas, como en las HPV 18, sino que la diferencia significativa se puede observar a partir de las 48 horas, y alcanza su máxima efecto a las 96 horas. Se puede observar que la mayor diferencia significativa entre los tratamientos y el control se dan después de las 48 horas.

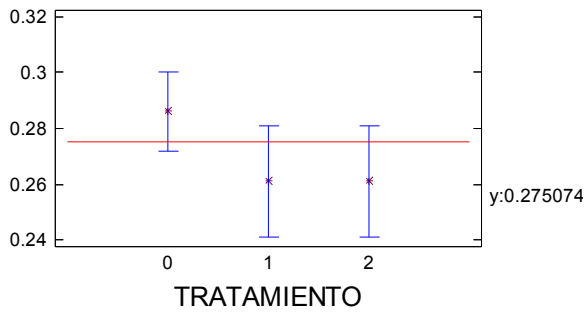
SIHA

PARAMETRICO

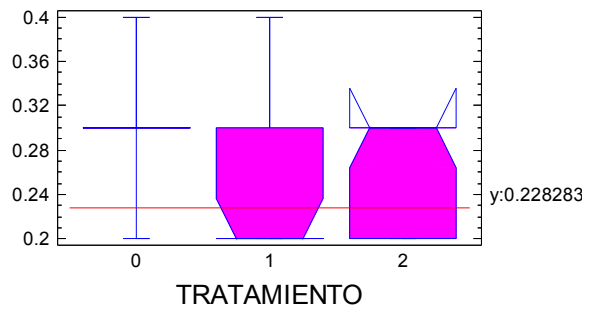
24 HORAS

NO PARAMETRICO

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

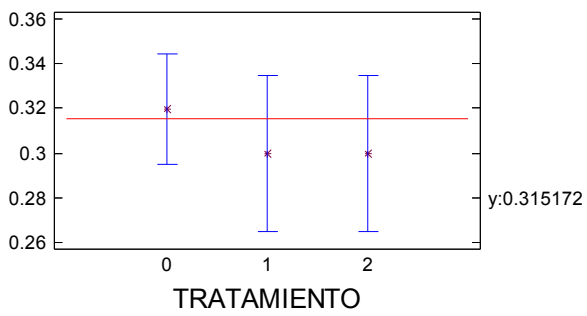


Box-and-Whisker Plot

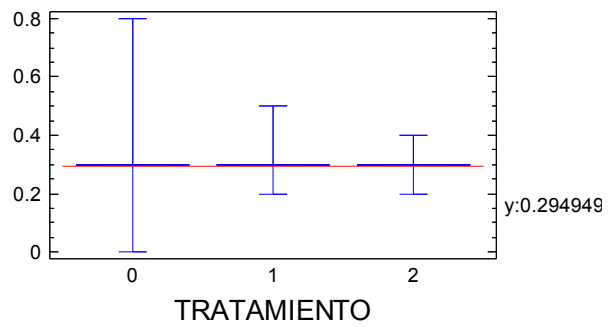


48 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

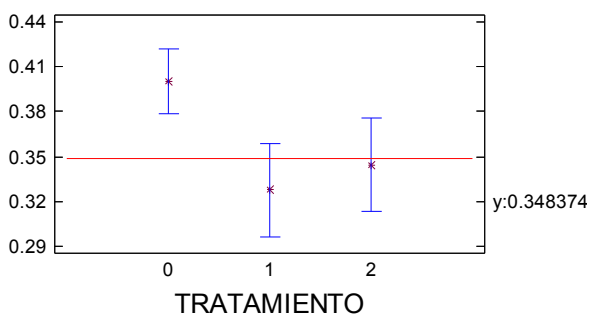


Box-and-Whisker Plot

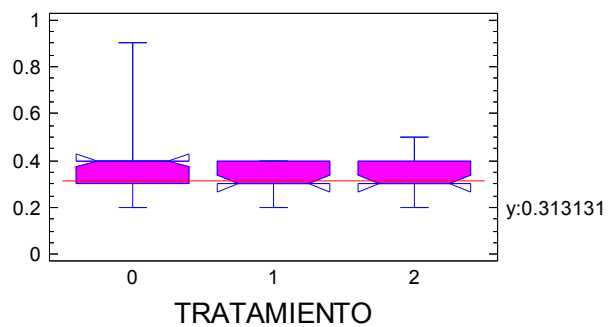


72 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

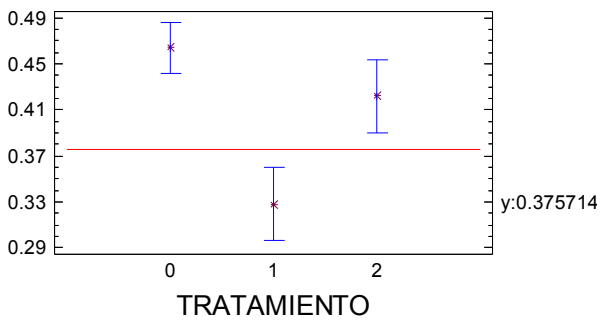


Box-and-Whisker Plot

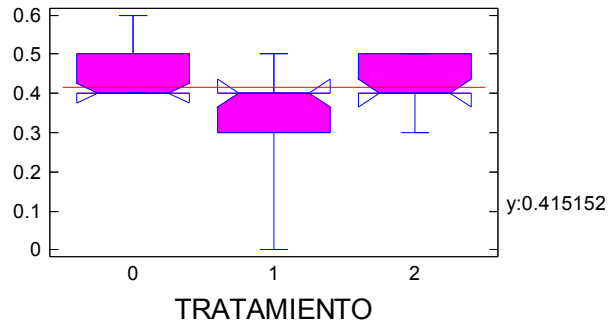


96 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals



Box-and-Whisker Plot



ARREGLO 4

En el caso de la línea celular CASKI infectada con HPV 16, se puede ver en el análisis arreglo (5), que el efecto de los liposomas es contrario a las células infectadas por VPH 18, se observa un comportamiento parecido a la línea celular SIHA, es decir, el máximo antiproliferativo, no se da a las 24 horas, como en las líneas ROVA y VIBO infectadas con VPH 18, sino que la diferencia significativa se puede observar a partir de las 48 horas, y alcanza su máximo efecto a las 96 horas. Esto no reafirma el mismo comportamiento de SIHA. Y se puede inferir que el comportamiento de las células ante la respuesta de sustancias toxicas es inverso.

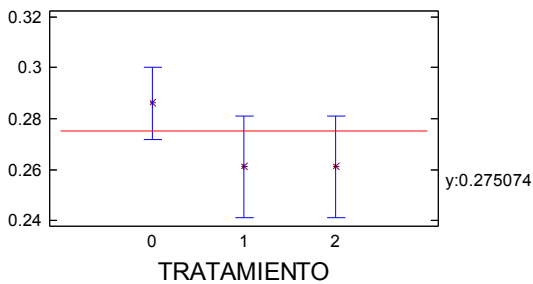
PARAMETRICO

CASKI

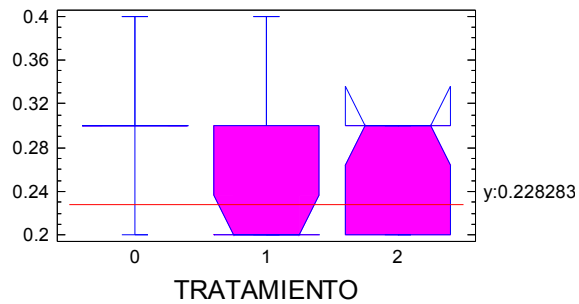
NO PARAMETRICO

24 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

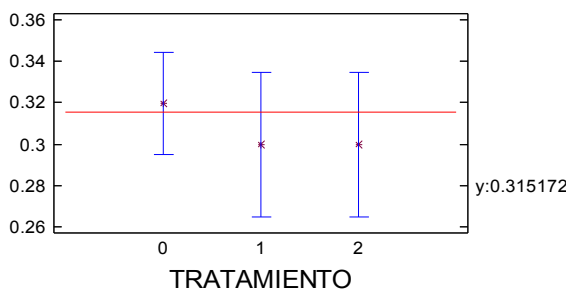


Box-and-Whisker Plot



48 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals



Multiple Range Tests for HORA48 by TRATAMIENTO				

Method: 95.0 percent LSD				
TRATAMIENTO	Count	Mean	Homogeneous Groups	

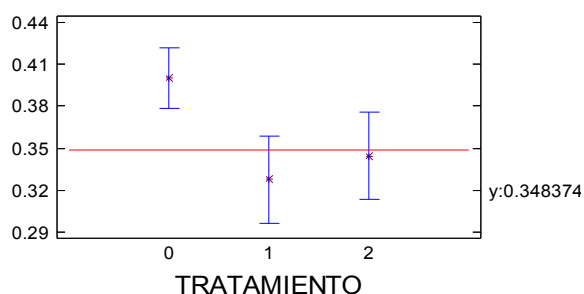
2	18	0.3	X	
1	18	0.3	X	
0	36	0.319444	X	

Contrast		Difference	+/- Limits	

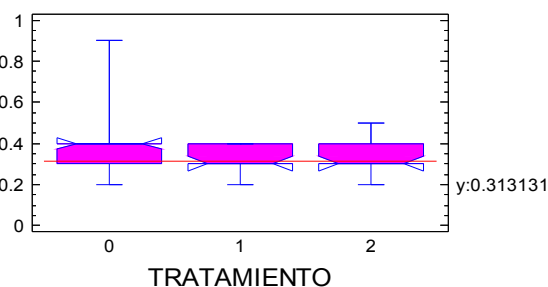
0 - 1		0.0194444	0.0602961	
0 - 2		0.0194444	0.0602961	

72 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

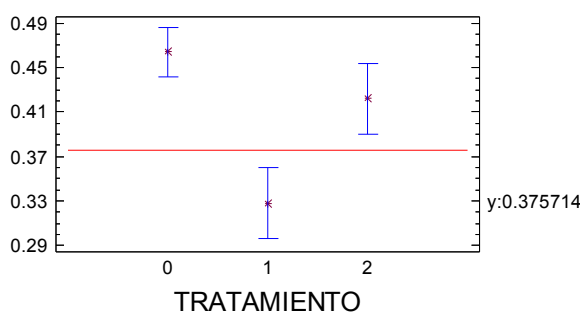


Box-and-Whisker Plot

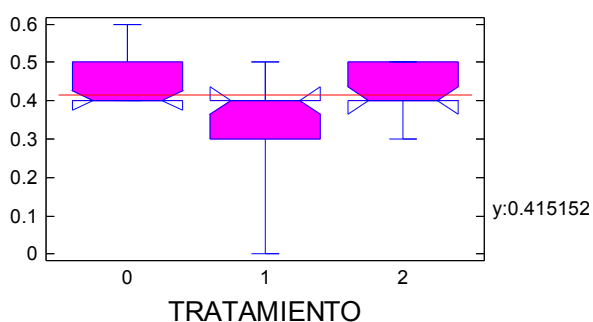


96 HORAS

Means and 95.0 Percent LSD Intervals



Box-and-Whisker Plot



ARREGLO 5

Estos resultados nos sugieren que la respuesta de las líneas infectadas con VPH 16, es más rápida, ya que el máximo efecto antiproliferativo de los liposomas se da hasta las 96 horas en comparación con las líneas infectadas con el VPH 18, en donde el máximo se encuentra a las 48 horas.

Otra herramienta importante en la cual nos podemos basar para reafirmar los resultados de las cinéticas, es el análisis de los porcentajes de inhibición celular, los cuales parecen indicar que el mayor porcentaje de inhibición lo presenta ROVA Y VIBO, el cual va de 26 a 39% con liposomas neutros y con

respecto a los aniónicos es de 28%. El cual nos puede sugerir que estas líneas infectadas con el HPV tipo 18, son mas susceptibles al efecto antiproliferativo de los liposomas en las dos formulaciones.

En el caso de SIHA Y CASKI, se puede ver una disminución significativa en los porcentajes de inhibición celular con respecto a los liposomas neutros, que va de 8 a 12% y con respecto a los aniónicos este aumento va de 19 a 24%. Reafirmando así que los liposomas aniónicos tienen un efecto antiproliferativo mayor al de los neutros. Ambos porcentajes son menores en comparación con las líneas infectas con VPH 18.

ANALISIS DE RESULTADOS

Los liposomas constituyen en la actualidad uno de los sistemas de administración de medicamentos y de productos biológicos más atractivos por su funcionalidad, versatilidad de empleo y sus perspectivas futuras.⁵⁵

Sin embargo, los liposomas presentan algunas desventajas como son baja eficacia de transfección, una expresión transitoria, pueden ser inhibidos por componentes séricos y sobre todo poseen un cierto grado de toxicidad celular.⁵⁶

En general, la toxicidad de los lípidos, depende de la composición, concentración y tiempo de exposición, por lo que el potencial de toxicidad debe ser cuidadosamente considerado antes de utilizar liposomas como acarreadores de fármacos o productos biológicos.^{57, 58 y 59}

Debido a la importancia de determinar la concentración de lípidos adecuada para la formulación de liposomas y valorar el efecto inhibitorio de los liposomas. En este trabajo se evaluó *in vitro* la inhibición de la proliferación de células de carcinoma de cérvix (CaCU) infectadas con HPV cultivadas en presencia de liposomas neutros y aniónicos.

El hecho de que en todas las líneas celulares el porcentaje de inhibición celular fuera siempre mayor en presencia de liposomas aniónicos, puede asociarse a la formulación de lípidos, con los cuales están fabricados los liposomas. Esta formulación incluye: fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, de gran interés ya que ésta última es un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de las membranas biológicas, la cual queda expuesta cuando las células se encuentran en apoptosis.⁷ Puede ser que el contacto de las células tumorales con la fosfatidilserina presente en los liposomas envíe una señal de muerte y que a esto se deba el gran porcentaje de inhibición celular obtenido al utilizar en los cultivos liposomas aniónicos.⁵⁸

Por otro lado, el CaCU, representa aproximadamente un 30% de los padecimientos y muertes por cáncer en las mujeres mexicanas, así como entre las mujeres de otros países del tercer mundo.⁶⁰

La asociación entre el HPV y el cáncer cervical se sugirió por primera vez en la década de los setenta.¹⁹ Los virus de HPV de alto riesgo oncogénico (tipos 16,18, 31, 33, etc.) que se encuentran presentes en más del 90% de las pacientes con displasia de cérvix tienen la capacidad de persistir como infección en las pacientes, siendo los tipos 16 y 18 los responsables de la mayoría de los cánceres de cérvix, se sabe que cuando el contacto del HPV es prolongado en las células cervicales provocan la transformación e inmortalización celular así como el desarrollo de una neoplasia maligna (cáncer).³⁰ Este contacto prolongado del HPV con las células del cérvix está asociada a la integración de la carga viral (DNA viral integrado al DNA de las células que infectan), que finalmente es la que determina el riesgo de que el

virus transforme a las células sanas. Con relación a esto es conveniente mencionar que los HPV tipo 16 y 18 se encuentran clasificados como virus de baja carga viral.³¹

Sin embargo, las Infecciones por el HPV tipo 18, siempre serán de un alto riesgo para el desarrollo de cáncer independientemente del grado histológico en que se encuentren presente, así como independientemente de la carga viral.³¹ Esto podría ser debido a que el tipo de virus del papiloma tienen una doble cadena encapsulada de DNA de aproximadamente 800 pares de bases, la arquitectura de estos virus no es diferente entre ellos, todos comparten una estructura llamada: estructura de lectura abierta que en inglés es ORF (Opening reading frames), en dicha zona existen los fragmentos E6 y E7,³⁰ en los tipos de virus de alto riesgo, como el 18, esta porción del virus esta directamente implicada en la transformación tumoral (siendo estos los oncogenes del virus),³¹ además de que este tipo de virus tiene una prevalencia del 14% en carcinoma de cérvix.³⁸

En el caso del HPV tipo 16, se sabe que es el virus que tiene una prevalencia alrededor del 50% en masas de carcinoma de cérvix,³⁸ se podría pensar que esta prevalencia esta asociada a los fragmentos E6 y E7,³⁰ del ADN viral y otros fragmentos, los cuales les brindan esa especificidad por el carcinoma.

Debido a la gran importancia que tiene la participación del HPV en la inmortalización celular del CaCU, la influencia de la inserción del DNA viral podría afectar, también, la proliferación celular. Por lo que si se compara la cinética de proliferación obtenida para las líneas de CaCU infectadas con HPV con la obtenida para células sin infección se tendría información acerca de la participación del HPV en este efecto. Pudiéndose sugerir una asociación entre el HPV y la inhibición de la proliferación celular. Tal como sucedió en nuestros ensayos en donde se puede apreciar que la menor inhibición de la proliferación se obtuvo en las líneas celulares infectadas tanto con HPV 16 como 18. Estos datos sugieren que el HPV no solo transforma e inmortaliza células epiteliales sino que también puede conferir menor susceptibilidad a sustancias anti-proliferativas como es el caso de los liposomas neutros y aniónicos utilizados en este trabajo.

El estudio de esta posible resistencia, a sustancias anti-proliferativas, asociada a la presencia del HPV de alto riesgo es una contribución muy importante de este trabajo ya que nos permite conocer mas acerca de los mecanismos de transformación neoplásica del carcinoma de cérvix. Que nos puede ayudar a diseñar mejores alternativas terapéuticas para las pacientes con este tipo de cáncer.

Por otro lado, debido a que el HPV 18 es considerado un virus de alto riesgo en la generación de cáncer de cérvix, se esperaría que la presencia de este tipo viral en las líneas celulares de CaCU, tuviera una mayor implicación en la regulación de la proliferación celular en comparación de aquellas infectadas con el HPV tipo 16. Es decir se espera encontrar una mayor resistencia al efecto anti-proliferativo de liposomas en las líneas células infectadas con HPV 18. No obstante, nuestros datos indican que las líneas CASKI Y SIHA positivas a HPV 16 presentaron la mayor resistencia por tanto la menor inhibición de la

proliferación en los cultivos con liposomas, lo cual se podría atribuir a la carga viral que presentan estos tipos de virus. Sin embargo, ambos tipos virales son clasificados como virus de baja carga.³¹ Por lo tanto, esta respuesta diferencial de inhibición de la proliferación de las células infectadas con HPV 16 y 18 se podría asociar al estado físico del virus en las células, es decir si se encuentra integrado al genoma o esta en estado episomal.

Un dato que es importante destacar, es el hecho de haber encontrado una relación inversamente proporcional entre el tiempo de respuesta de las células a la inhibición de la proliferación y el porcentaje de ésta que presentaron las células infectadas con HPV 16 y HPV 18. Es decir la respuesta de las líneas infectadas con VPH 16, es más rápida, ya que el máximo efecto antiproliferativo de los liposomas se da hasta las 96 horas en comparación con las líneas infectadas con el VPH 18, en donde el máximo se encuentra a las 48 horas. Lo anterior se podría asociar a la expresión de fragmentos E6 y E7 del ADN viral, los cuales tendrían que ser distintos en los dos tipos de HPV.

CONCLUSIONES

- SE ENCONTRO QUE LOS LIPOSOMAS ANIONICOS TIENEN UN EFECTO ANTIPROLIFERATIVO MAYOR QUE LOS LIPOSOMAS NEUTROS.
- SE PUDO OBSERVAR QUE LA SOLA PRESENCIA DEL HPV EN CELULAS DE CARCER CERVICO-UTERINO, TIENE UN EFECTO DIRECTO DE RESISTENCIA EN LA PROLIFERACION CELULAR EN LAS LINEAS DE CARCINOMA DE CERVIX ROVA, VIBO, CASKI Y SIHA, DISMUNUYENDO EL PORCENTAJE DE INHIBICION EN LA PROLIFERACION CELULAR.
- SE OBSERVO QUE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LAS LINEAS INFECTADAS CON EL HPV 16, ACTUAN MAS RAPIDO, ANTE LA PRESENCIA DE LIPOSOMAS. ESTA RESPUESTA SE OBSERVA EN UN INTERVALO DE 24 A 48 HORAS EN LAS PRIMERAS 24 HORAS HASTA 48 HORAS.

RECOMENDACIONES

- Determinar la carga viral de cada tipo de virus en las células infectadas con VPH 16 Y 18.
- Determinar el grado de expresión de las unidades E6 y E7 en las células infectadas con HPV 16 y HPV 18, ante la presencia de liposomas neutros y aniónicos vacíos.
- Determinar el por que los liposomas Aniónicos son mas tóxicos que los neutros, hacer pruebas bioquímicas, de microscopia electrónica, etc.

APENDICE

I.- Medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640).

COMPOSICION	RPMI 1640 (mg/l)
CaCl ₂ .2H ₂ O	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	-
KCl	40 0
Mg(SO ₄).7H ₂ O	100
NaCl	60 00
NaHCO ₃	2000
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-
NaH ₂ PO ₄	800
D-glucosa	20 00
Rojo de Fenol	5
Piruvato sòdico	-
L-arginina. HCl	-
L-asparagina. H ₂ O	50
Àcido L-aspàrtico	20
L-cistina	50
Àcido L-glutàmico	20
L-glutamina	300
Glutatiòn	1
Glicina	10
L-Histidina.HCl.H ₂ O	-
L-Histidina	15
L-hidroxiprolina	20
L-soleucina	50
L-leucina	50
L-lisina.HCl	40
L-metionina	15
L-metionina	15
L-prolina	20
L-serina	30
L-treonina	20
L-triptofano	5
L-tirosina	20
L-valina	20
Biotina	0.2
D-Ca panteonato	0.3
Cloruro de colina	3
Àcido fòlico	1
i-inositol	35
Nicotinamida	1
Acido p-aminobenzoico	1
Piridoxal.HCl	1
Riboflavina	0.2
Tiamina.HCl	1
Vitamina B ₁₂	0.0 05

II. INACTIVACION DE SUERO FETAL DE BOVINO (SFB)

La botella de suero fetal bovino (SFB) se descongela a temperatura ambiente, posteriormente se coloca en un baño María a 56° C, durante 30 minutos, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular como son las proteínas del complemento, así como inactivas otras para mayor eficacia en la nutrición celular. Posteriormente se separa en alícuotas de 50 mL para su mejor manipulación, conservándose a una temperatura de 4° C.

III. SOLUCION SALINA DE VERSENO

Se emplea para despegar células tumorales adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan los siguientes reactivos:

Tris (Sigma, chem, USA)	3.04g
KCL (Sigma, chem, USA)	8.00g
NACL (Sigma, chem, USA)	0.40g
EDTA (Sigma, chem, USA)	0.40g

IV. SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

La solución amortiguadora de fosfatos es utilizada para lavar las células después de ser estimuladas con los liposomas, manteniendo así las condiciones fisiológicas de las células; también es utilizada como vehículo para la preparación de los liposomas.

V. AZUL TRIPANO

Se emplea para pruebas de viabilidad y conteo celular, se realiza una dilución del colorante azul tripano (Sigma, Chem. USA) al 0.3% en PBS y se filtra con papel filtro Whatman número 2.

VI. GLUTARALDEHIDO

Esta solución se utilizo para filtrar las células en las placas de 96 pozos de fondo plano. Para preparar 500 mL al 1.1% se miden 11 mL de glutaraldehido (50% v/v Sigma, USA) y se le adiciona 489 de agua destilada. Esta solución debe guardarse a 4° C.

VII SOLUCION DE CRISTAL VIOLETA

Para preparar 500 mL de cristal violeta a una concentración de 0.1%, se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido formico 200 mM con una pH de 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta se diluye muy bien y por ultimo se filtra en papel Whatman numero 2.

Hidróxido de sodio (Sigma, Chem. USA)	3.96g
Ácido fórmico (Sigma, Chem. USA)	4.28mL
Cristal violeta (Sigma, Chem. USA)	1.00g

VIII. ACIDO ACETICO AL 10%

La solución de ácido acético, que se utilizo fue una a una concentración de 10%. Esta solución una vez preparada a temperatura ambiente.

Ácido acético (Sigma, Chem. USA)	10mL
Agua Milli Q (MilliQ Academic, USA)	90mL

IX. SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS). A 800ml de agua, agregar 8 g de cloruro de sodio, 2.16 g de fosfatos de sodio monobásico y 0.2 g de fosfato de potasio. Ajustar pH a 7.2 y aforar a un litro. Esterilizar en autoclave a 20lb por minuto.

REFERENCIAS

1. Parkin DM., Cáncer Incidence In: World Halth Statistical Annual, OMS, Ginebra:1987.
2. Boyle P., Global burden of cancer. Lancet 1997;3491 (suppl.II): 23-6
3. Hinojosa L.M., Dueñas A., Papel de la quimioterapia en el tratamiento del carcinoma cèrvico uterino. Revista del Instituto Nacional de Cancerología. 2000; 46:47-57
4. Berumen J, Villegas N., Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. Salud Pública Méx. 1997;39:288-297
5. Corona O. T., Inducción a la aparición de receptores Fc y a la secreción de oxido nítrico por macrófagos peritoneales de ratón utilizando liposomas como acarreadores de las citocinas IL-1 β e INF γ . Tesis Doctoral. Fez Zaragoza UNAM. Méx. D.F. 2000.
6. Mora M., Evaluación de el efecto de IL-2, TANL y la proteína de fusión TAPW en forma libre y encapsulada en liposomas catiónicos, sobre la proliferación *in vitro* de la línea celular de CaCU INBL y sobre tumores de CaCU inducidos en ratones singénicos de la cepa CBA/ca. Tesis de Licenciatura. Fez Zaragoza UNAM. Méx. D.F. 2003. pp83
7. AYALA. A. A., Efecto de la IL-2 Encapsulada en liposomas neutros y aniónicos sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL. Tesis de Licenciatura. Fez Zaragoza UNAM. Méx. D.F. 2004. pp36
8. Rojas-Espinosa., Inmunología de memoria. 2^a ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana 2001: 289-307.
9. Consensos Statemeat. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Cervical cancer Gyn Onco 1997;66:351-361
10. Mohar BA et al., Registro Histopatológico de Neoplasias en México. México: Secretaria de Salud. 1998.
11. Torres JL, López MS., Panorama epidemiológico de las enfermedades neoplásicas. En: Moreno AL, Gómez SC. Factores de riesgo en la comunidad III. Facultad de Medicina, UNAM Méx.; 1990:145-80
12. Dirección General de Estadística e informática. Principales resultados de las estadísticas sobre mortalidad en México en 1999. Sal Púb. Méx. 2001;43:67-73

13. Ponten, J. et al., Strategies for global control of cervical cancer. *International Journal of Cancer* 1995;60:1-26.
14. Cortinas, C., Cáncer: Herencia y Ambiente. La ciencia para todos. 1998 pp. 1-24.
15. Víctor M., Valdespino V., Perspectivas actuales en el estudio y en la atención a pacientes con cáncer cervicouterino. *Ginecol Obstet Méx.* 2004, 72:29:38
16. Dirección General de Estadística e informática. Principales resultados de las estadísticas sobre mortalidad en Méx., 1998. *Sal Púb. Méx.* 2000; 42:155-61
17. Palacio-Mejía L., Rancel-Gómez G., Hernández-Ávila M., Lazcano-Ponce E., Cáncer cervical, una enfermedad de la pobreza Ed. Panamericana, 2000
18. Lazcano PE., Moss S., Alonso B., Salieron CJ., Hernández AM., Programa de detección oportuna de cáncer de cuello uterino en países en vías de desarrollo, en prevención y control. México: Ed. Panamericana, 2000:155-74
19. Torres-Cosme JL., Tapia-Yáñez J., Dorantes J., Mortalidad de cáncer cervicouterino 1979-1999: *Permatol Reprod Hum.* 2002;16:35-42
20. Grado, C. y col., *Virología médica*. Editorial mediterráneo, Chile. Serie Científica Médica. N° 4, 1997.
21. Matsuura, y col., Low grade cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus infection. Long time follow-up. *Acta Cytol* 1998; 42: 625-30.
22. Berumen J. Casas L, Segura E, Amescua JL, García Carranca A., Genoma amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer; *Hum Pthol* 1995;26:676-681.
23. Bonn, D., The warts and all approach to tackling cervical cancer. *The Lancet*, march 14 1998; 351: 810.
24. Galloway, D., ¿Is vaccination against human papillomavirus a possibility? *The Lancet*, 1998; 351 (suppl III): 22-4.
25. Hildesheim, A. y col., Human papillomavirus type 16 and risk of preinvasive and invasive vulvar cancer: results from a seroepidemiological case-control study. *Obstet Gynecol* 1997; 90: 748-54.

26. Minkoff, H. y col., A longitudinal study of human papillomavirus carriage in human immunodeficiency virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected women. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 982-6.
27. Crum, K., Cibas, E., Pathology of early cervical neoplasia. Churchill-Livingstone Inc., New York, 1997.
28. Ter Harmsel, B. y col., Relationship between human papillomavirus type 16 in the cervix and intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 46-50.
29. Schiffman MH, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Greenberg MD and Lorincz AT., HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000; 283: 87-93
30. Koss, L., Human papillomavirus-passenger, driver or both? *Hum Pathol* 1998; 29 (4): 309-10.
31. Van Beurden, M. y col., Human papillomavirus DNA in multicentric vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1998; 17: 12-16.
32. Tyring, S., Introduction: perspectives on human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997. 102 (5A): 1-2.
33. Koutsky, L., Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997. 102 (5A): 3-8.
34. Nindl, I. y col., Human papillomavirus distribution in cervical tissues of different morphology as determined by hybrid capture assay and PCR. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 197-204.
35. Meijer, CJLM y col., HPV typing and testing in gynaecological pathology: has the time come? *Histopathology* 1998; 33: 83-6.
36. McCance, J., Human papillomavirus and cervical cancer. *J Med Microbiol* 1998; 47: 371-3.
37. Kurman, R., Blaustein's Pathology of the female genital tract. editor. Springer Verlag, New York, 1994.
38. Kurman, R., Norris, H., Wilkinson, E., Tumors of the cervix, vagina and vulva. Atlas of tumor pathology, third series, vol. 4, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 1992
39. Hoon Cho, N. y col., Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 339-47.
40. Hausen, H., Papillomavirus and p53. *Nature* 21 may 1998; 393: 217

41. Ho, G. y col., Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338 (7): 423-8.
42. Shah, K., Human papillomaviruses and anogenital cancers. *N Engl J Med* 1997; 337 (19): 1336-8
43. Marazzo, J. y col., Genital Human Papilloma virus infection in women who have sex with women. *J Infect Disc* 1998; 178: 1604-9.
44. Bangham A, Standish. M. y Watking J., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol Biol.* 1965 13:238-252.
45. Ibañez M., Transferencia de genes por medio de liposomas. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. 1993 México D.F.
46. Liu D. Mori A. y Huang L., Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1 containing liposomes. *Biochem. Biophys.* 1992 *Acta* 1104:95-101.
47. Pagano R. y Weinstein J., Interactions of liposomes with mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1978 7:435-468.
48. Lasic D., Liposomes. *Science and Medicine* 1996 6:34-43.
49. Szoka, J. A., Fisher, S.G., Fisher, R. I., Ellis, T.M. A phase I trial of continuous infusion interleukin-4(IL-4) alone and following interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *Annals Oncol.* 1994. 5(5): 447-452.
50. Poyner E.A., Alpar H.O., Almeida A.J., y Brown M.R.W., A comparative study on the pulmonary delivery of tobramycin encapsulated into liposomes and PLA microspheres following intravenous and endotracheal delivery. *J.Control Rel* 1995. 35: 41-48.
51. Tomoda K, Ohishi N, Kikkawa F., Mizutani S, Tomoda Y. y Yagi K., Cationic multilamellar liposome-mediated human interferon-beta gene transfer into cervical cancer cell. *Anticancer Res* 1998. 18(3A): 1367-1371.
52. Kronenwett R., Steidl U., Kirsch M., Sczakiel G. y Haas R., Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. *Blood* 1998 91:852-862.
53. Kleinerman E. y Fidler D., Human lymphokines activate tumoricidal properties in human but not rodent macrophages: Elimination de species specificity by encapsulation in liposomes. *Macrophage Biology.* Alan R. Liss, INC New York, USA. 1985 p81-86.

54. Sato Y, Nishikawa K, Aidawa K, Mimura K, Murakamimurofushi K, Arai H y Inoue K., Side-chain structure is critical for the transport of sterols from lysosomes to cytoplasm. *Biochem Biophys Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1995 1257: 38-46.
55. Dinorah G. C., Liposomas en dermatoterapia. *Revista Cubana de Farmacia* 1996; 30 (2):1-8
56. Allen T.M., Toxicity and systemic effects of phospholipids. En: Cevc G, ed. *Phospholipids handbook*. New York: Marcel Dekker 1993; 1:608-13
57. Mayhew E, Ito M, Lazo R., Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells. *PubMed National Library of Medicine Exp Cell Res.* 1987; 171 (1):195-202
58. Allen TM, McAllister L, Mausolf S, Gyorffy E. Liposome-cell interactions. A study of the interactions of liposomes containing entrapped anti-cancer drugs with the EMT6, S49 and AE1 (transport-deficient) cell lines. *PubMed National Library of Medicine Biochim Biophys Acta* 1981;643 (2):346-62
59. Fillion M.C, Phillips N.C., Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulate with cationic lipids toward immune effector cells. *PubMed National Library of Medicine Biochim Biophys Acta* 2001;1329 (2):345-56
60. Polednak A, Flannery BS. Brain, other central nervous system and eye cancer. *Cancer* 1995;75 (suppl. 1):330-77.
61. Janoff S. A., *Liposomes Rational Design*. Marcel Dekker, Inc. USA 1999; p 1-12, 63-87 y 159-179