



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Elaboración y caracterización de una suspensión de  
liposomas acoplados con un anticuerpo monoclonal anti-  
EGF-R”**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. CARLOS JUAREZ OSORNIO



TUTOR: Dr. Luis Alberto Medina Velázquez 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Agradecimientos**

Dr. Luis Alberto Medina (IFUNAM):

Gracias por el apoyo incondicional proporcionado y por la confianza al creer en la posibilidad de hacer realidad este trabajo.

Dra. Patricia García López (Lab. De Farmacología INCAN):

Gracias por el apoyo brindado, por los consejos y las valiosas contribuciones al trabajo.

Dr. David Díaz (F. Q. UNAM):

Gracias por los equipos proporcionados y por los valiosos consejos.

Dra. Elena Arechaga (Lab. De Oncología Experimental INCAN):

Gracias por las valiosas contribuciones realizadas a este trabajo y por el enorme apoyo experimental otorgado.

M. en C. Enrique Pérez (INCAN):

Gracias por el apoyo experimental y las valiosas asesorías técnicas al respecto.

CONACYT:

Gracias a la institución por el apoyo económico proporcionado para la satisfactoria realización de este trabajo. Numero de becario 211349.

Facultad de Química UNAM:

Gracias a la institución por el apoyo académico otorgado como parte del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer (UNAM-INCan) del Instituto Nacional de Cancerología, México D. F.

Este trabajo fue presentado en sesión mural en el Congreso de Innovación en Salud y Química Médica, del 5-9 de Octubre de 2009 en Boca del río Veracruz y en el Primer Simposio Nacional de Nanotecnología y Cáncer, 14-15 de Octubre de 2009, UAM-Iztapalapa, D. F. México.

**LIC. BALFRED SANTAELLA HINOJOSA**  
Coordinador de la Unidad de Administración del Posgrado  
Presente

Me es grato informarle que el Comité Académico en su sesión del 18 de mayo del presente, autorizó al alumno **CARLOS JUAREZ OSORNIO**, con número de cuenta 97135672, presentar su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias, quien defenderá el proyecto de investigación titulado: **"Elaboración y caracterización de una suspensión de liposomas acoplados con un anticuerpo monoclonal anti-EGFR"**, realizado bajo la supervisión del Dr. Luis Alberto Medina Velázquez, ante el siguiente jurado:

Presidente	Dra. Lena Ruiz Azuara	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. David Díaz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Gracia Fadrique	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Patricia García López	FES-Zaragoza, UNAM
Secretario	Dr. David Quintanar Guerrero	FES-Cuautitlán, UNAM

**Nota:** Se recuerda a los miembros del jurado que el plazo máximo para revisión de la tesis es de 30 días naturales a partir de la recepción de la misma.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 20 de mayo de 2009.  
A t e n t a m e n t e.

  
**DRA. JOSEFINA DE GYVES MARCINIAK**  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Integrantes del Jurado  
Alumno  
Expediente  
Sección Escolar de la Coordinación de Posgrados, Facultad de Química



# Capítulo 6

*BIBLIOGRAFIA*

## Bibliografía:

1. Green J. Rudel L. Environmental Pullulants and Breast Cancer. Environmental Health Perspectives. 2003(11)8:1007-19.
2. Basu S. Harfouche R., et al. Nanoparticle-mediated targeting of MAPK signaling predisposes tumor to chemotherapy. PNAS. 2008;16:7957-61
3. Juárez Osornio C. Elaboración y caracterización de nanoesferas lipídicas cargadas con *cis*-diaminodicloroplatino(II) y marcadas con núcleos radioactivos de In-111 con potencial como sistema de quimiorradiación en tratamiento de cancer. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México 2006.
4. López Rodríguez V. Estudio de biodistribución y farmacocinética de nanoesferas lipídicas cargadas con *cis*-Diaminodicloroplatino(II) y marcadas con núcleos radioactivos de Indio-111 en un modelo tumoral de cancer cérvico uterino en roedores. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México 2008.
5. [www.lifescience-online.com/CETUXIMAB.3922.html?portalPage=Drugs](http://www.lifescience-online.com/CETUXIMAB.3922.html?portalPage=Drugs). Página consultada en Septiembre de 2008.
6. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo II. Edición 9. México 1996. pp 1301-1308, 1348-1350.
7. Arteaga L. C., Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Breast Cancer Res. 2003;5(2):96-100.
8. Park J. W., Kirpotin D., Hong K., et al. Anti-HER2 Immuniliposomes: Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery. Clinical Cancer Research. 2002;8:1172-1181.
9. Maria del Campo J., Prat A. Gil-Moreno A. et al. Update on novel therapeutic agents for cervical cancer. Gynecologic Oncology. 2008(110):S72-S76.
10. Arnoldus W., Norde W., et al. The unfolding/Denaturation of Immunogammaglobulin of Isotype 2b and its F<sub>ab</sub> and F<sub>c</sub> Fragments. Biophysical Journal. 2000;79:2150-54.
11. Vermeer A., Norde W. th The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. Biophys. J. 2000;78:394-404.
12. Lilie H., Jaenicke R. Characterization od a quaternary-structured folding intermediate of an antibody Fab fragment. 1995;4:917-924.
13. Kirpotin D. Drummond D. Shao Y., et al. Antibody Targeting of Long-circulating Lipidic Nanoparticles Does Not increase Tumor localization but Does Increase Internalization in Animals models. American association for cancer research. 2006;66(13):6732-6740.
14. Lopes de Mendez D., Pilarski L.M. In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal Doxorubicin to Human B-Cell Lymphoma. Cancer Research. 1998;58:3320-30.
15. Gigi N.C., Lincoln A. E. et al. Modulation of cáncer cell survival pathways using multivalent liposomal terapeutico antibody constructs. Mol Cancer Ther. 2007;6(3):845-855.
16. Schmiedel J., Blaukat A., Li S. Matuzumab Binding to EGFR Prevents the Conformational Rearrangement Required for dimerization. Cancer Cell. 2008;13:365-373.
17. Yarden Y. Sliwkowski. Untangling the ErbB network. Molecular cell biology. 2001;2:127-137.
18. Slamon D., Leyland-Jones B., Shack S., et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 . N. Engl. J. Med. 2001;344(11):783-92.
19. Agarwal A., Saraf S., Asthana A. Ligand based dendritic systems for tumor targeting. International Journal of Pharmaceutics. 2008;350:3-13
20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Details-Search&Term=cetuximab+og> Página consultada en Noviembre de 2008.
21. Pan X., Lee R. J. Construction of anti-EGFR immunoliposomes via folate-folate binding protein affinity. International Journal of Pharmaceutics. 2007;336:276-83.



22. Erenpeisa J., Cragg M. Cancer: A matter of life cycle?. *Cell Biol. Int.* 2007;31:1507-1510.
23. Farohkzad O., Cheng J., et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. 2006;103(16):6315-20.
24. Arteaga L. C., Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003;5(2):96-100.
25. Lu Z., Jiang G., Blume-Jensen P. Epidermal Growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Molecular and Cell Biol.* 2001;21(12):4016-4031.
26. Lee C., Shrieve D. Zempolich K. Correlation Between Human epidermal Growth Factor receptor family (EGF-R, HER-2, HER-3, HER-4) phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology.* 2005;99:415-421.
27. Vilorio A., Rak J. Rockwell P., et al. Neutralizing Antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor Tyrosine Kinases Down-regulate vascular Endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo. *American Journal of Pathology.* 1997;151(6):1523-1530.
28. Mendelshon J. Blockade of receptors for Growth Factors: An anticancer Therapy. *Clinical Cancer Research.* 2000;6:747-753.
29. Kirpotin D. Drummond D. Shao Y., et al. Antibody Targeting of Long-circulating Lipidic Nanoparticles Does Not increase Tumor localization but Does Increase Internalization in Animals models. *American association for cancer research.* 2006;66(13):6732-6740.
30. Martin F. J., Papahadjopoulos D. Irreversible coupling of Immunoglobulin Fragments to preformed Vesicles. *The journal of biological chemistry.* 1982;257(1):286-288.
31. Iden D. L., Allen T. M. In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach. 2001;1513:207-216.
32. Sao K. Murata M., Umezaki K. Molecular Design of protein-based nanocapsules for stimulus-responsive characteristics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2009;17:85-93.
33. Bao A., Phillips W., Goins B., et al. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. *International Journal of Pharmaceutics.* 2006;316:162-169.
34. Sapiro P. Allen T. Internalizing Antibodies are Necessary for improved Therapeutic Efficacy of Antibody-targeted Liposomal Drugs. *Cancer Research.* 2002;62:7190-7194.
35. Escobar-Chavez J., Lopez-Cervantes M., et al. Applications of thermoreversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm Pharmaceut. Sci.* 2006;9(3):339-358.
36. Zhang Y., Lam Y.M. Controlled synthesis and association behavior of graft Pluronic in aqueous solution. *Colloid and Int. Sci.* 2007;306:398-404.
37. [www.cellgro.com/shop/files/documents/HEPES\\_buffer.pdf](http://www.cellgro.com/shop/files/documents/HEPES_buffer.pdf) página consultada en Octubre de 2008.
38. Zhang S., Marini D. M., et al. Design of nanostructured biological materials through self-assembly peptides and proteins. *Current opinion in chemical biology.* 2002;6:865-71.
39. Lowe C. R. Nanobiotechnology: the fabrication and applications of chemical and biological nanostructures. *Current Opinion Struct. Biol.* 2000;10:428-34.
40. Gothelf K., LaBean T. DNA-programmed assembly of nanostructures. *Org. Biomol.Chem.* 2005;3:4023-37.
41. Spragg D., Alford D., et al. Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cell: A strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94:8795-8800.
42. Inssok H. Mee S., et al. Liposome formulations for effective administration of lipophilic malonateplatinum(II) Complexes. *Jpn. J. Cancer Res.* 2002;93:1244-49.

43. Wang S. X., Bao A., Herrera S., et al. Intraoperative  $^{186}\text{Re}$ -liposome Radionuclide Therapy in a Head and Neck Squamous cell Carcinoma Xenograft Positive Surgical Margin Model. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(12):3975-83.
44. Gigi N. C., Bally M., Mayer L. Targeting of antibody conjugated phosphatidylserine-containing liposomes to vascular cell adhesion molecule 1 for controlled thrombogenesis. *Bioch. Et Bioph. Acta*. 2003;1613:115-121.
45. Olson J., Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Current protocol in protein science*. 2007;9:3.4.1-3.4.2.
46. James Stewart. *Single Variable Calculus*. Brooks/Cole Publishing Company. Third edition. California, U.S.A. 1995. pp 484-493, 515-519.
47. Rosenberg M. *Protein Analysis and Purification*. Edition 2. U.S.A. 2005. pp 183-184.
48. Dominguez S. Javier. *Cromatografía en papel y en capa delgada*. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Edición 2. Washington D.C. 1982. pp 35-58.
49. Chung C., Mirakhur B., et al. Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- $\alpha$ -1,3-Galactose. *The new England Journal of Medicine*. 2008;358:1109-17.
50. Gao J., Zhong W., He J. et al. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes. *Int. Journal of Pharmaceutics*. 2009;374:145-152.
51. Kozlowzka D., Foran P. et al. Molecular and magnetic imaging: the value of immunoliposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61:1402-11.
52. Kim I., Kng Y., Lee D., et al. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immuniliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenogrft nude mice. *Journal of contrlled release*. 2009;140:55-60.
53. Simard P., Leroux J. pH sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;381:86-96.
54. Gao J., Sun J., Li H. et al. Lyophilized HER2-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA gene silencing. *Biomaterials*. 2010;31:2655-64.
55. Gunawan R., Auguste D. The role of antibody synergy and membrane fluidity in the vascular targeting of immunoliposomes. *Biomaterials*. 2010;31:900-907.

## Glosario de Abreviaturas

<i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II).
RI	Radiaciones ionizantes.
AcMo	Anticuerpo Monoclonal.
EGF-R	Siglas en inglés de la familia de Receptores del factor de crecimiento Epidérmico.
VEGF	Siglas en inglés del Factor de Crecimiento del Endotélio Vascular
HER	Siglas en inglés del Receptor Epidérmico Humano.
EGF	Siglas en inglés del factor de Crecimiento Epidermico.
PLGA	Siglas en inglés de Acido Poliláctico-Glicólico.
PSMA	Siglas en inglés del Antígeno Prostático de Membrana.
CL	Capa lipídica.
PEG	Polietilenglicol.
DTT	Ditiotreitol.
DTNB	Acido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico).
TNB	Acido 5-tio-2-nitrobenzoico.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
PEGMal	1,2-Distearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfoetanolamina-N-[Maleimido (Polietilen Glicol ) 2000 ] (sal de Amonio).
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
TEMED	Tetrametiletilendiamino.
HSPC	Siglas en Inglés de la Fosfatidil Colina de Soya Hidrogenada.
MetoxiPEG	1,2-Distearoil- <i>sn</i> -Glicero-3)Fosfoetanolamina-N-Metoxi(polietilenglicol) [-2000](sal de amonio).
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
PS	Ponceau S
ssi	Solución salina isotónica
T	Temperatura
t	tiempo

# **Anexo I**

## Soluciones y Reactivos

### A 1.1 Solución A:

Se pesa la cantidad deseada de DTT (99% de pureza, Sigma Alemania) y se coloca en un matraz aforado y es diluido con agua desionizada (previamente filtrada a través de filtros de tamaño de poro 0.22 $\mu$ m (Millipore, U.S.A.) y desgasificada) hasta aforar. La solución fue congelada hasta su empleo.

### A 1.2 Solución B:<sup>2</sup>

Para 200mL de una solución de HEPES 1X se deben pesar 1.6g de NaCl (Baker México), 0.074g de KCl (Grado biología molecular, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 0.027g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Grado analítico, Merck Alemania), 0.2g de Dextrosa (Sigma-Aldrich) y 1g de HEPES (Sigma-Aldrich Alemania), antes de aforar, la solución es ajustada a pH de 7.6 con NaOH 1M (96% de pureza, Técnica Química S.A. de C.V. México). Finalmente la solución es filtrada con filtros de 0.22 $\mu$ m de tamaño de poro (Millipore, U.S.A.) y es refrigerada a 4°C, a estas condiciones la solución puede ser viable durante 1 mes.

### A 1.3 Solución C:

Esta solución fue idéntica a la B, solo que el pH al que se ajustó ésta fue 7.05.

### A 1.4 Solución D:

Fueron pesados ácido bórico (Grado biología molecular, Promega Estados Unidos) y EDTA (Ultra puro, GIBCO BRL Estados Unidos), de modo que las concentraciones finales sean 100mM y 0.2mM respectivamente. Las sales fueron disueltas en agua desionizada y fue ajustado el pH hasta 8.2 con NaOH 1M (96% de pureza, Técnica Química S.A. de C.V. México).

### A 1.5 Solución E:<sup>22</sup>

Este reactivo comúnmente conocido como reactivo de Ellman, fue preparado pesando 77.1mg de DTNB (99% de pureza, Sigma Estados Unidos) y 56.3mg de Cistamina (Fluka Analytical China) (todo esto para un volumen de reactivo de 20mL), estas sustancias fueron disueltas en aproximadamente 20mL de solución AA (en agitación magnética y manteniendo el sistema a menos de 10°C) y es llevada hasta pH de 7 con NaOH 1M (96% de pureza, Técnica Química S.A. de C.V. México) para disolver todo el DTNB. Finalmente esta solución fue aforada a 25mL. Este reactivo siempre se mantuvo a menos de 10°C durante su empleo y fue almacenado en congelación.

### A 1.6 Solución F:

Esta solución de PBS fue preparada con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM (Grado analítico, Merck Alemania), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM (Grado analítico, Merck Alemania) y NaCl 137 mM (Baker México) y fue llevada a pH de 7.

### A 1.7 Solución G:

Fue preparada una solución de NaCl a 140mM (Baker México) en agua desionizada, ésta fue ajustada a pH = 6.6 con HCl 1M (Fermont México), posteriormente al ajuste, esta solución fue filtrada a través de filtros de tamaño de poro de 0.22µm. Esta solución fue desgasificada siempre antes de su empleo.

#### A 1.8 Solución H:

Esta solución de Acrilamida-bisacrilamida, fue preparada pesando las cantidades necesarias para que la Acrilamida quedara a una concentración final de 29% w/v (99% de pureza, Sigma China) y la bisacrilamida al 1% w/v (99.8% de pureza, Fluka Estados Unidos), todo fue disuelto en agua desionizada. El pesado fue realizado con guantes y cubrebocas, dadas las propiedades neurotóxicas de los reactivos.

#### A 1.9 Solución I:

El buffer a pH = 8.8, fue preparado con Tris (Grado biología molecular, Analytical México) y SDS (Grado biología molecular, Analytical México) en agua desionizada, de modo que las concentraciones finales respectivas fueran 1.5mM y 0.4% m/w. El valor de pH se ajustó hasta 8.8 con NaOH 0.5M (96% de pureza, Técnica Química S.A. de C.V. México).

#### A 1.10 Solución J:

Esta solución de SDS (Grado biología molecular, Analytical México), fue preparada al 10% w/v de concentración en agua desionizada.

#### A 1.11 Solución K:

Esta solución de persulfato de amonio (ultra puro, GIBCO BRL Estados Unidos), fue elaborada de modo que la concentración final de Persulfato fuera 10% w/v en agua desionizada. Esta solución siempre fue preparada minutos antes de su empleo, fue guardada en refrigeración y nunca se empleo con más de una semana de antigüedad.

#### A 1.12 Solución L:

El buffer a pH = 6.8, fue preparada idénticamente a la solución J, sólo que ésta fue ajustada a pH de 6.8 con HCl 0.5M (Fermont México).

#### A 1.13 Mezcla M:

Esta mezcla colorante de proteínas en la modalidad reductora, fue elaborada con cada uno de los reactivos que se muestra a continuación con la concentración que aparece: Tris 62 mM (Grado biología molecular, Analytical México), SDS al 23% (Grado biología molecular, Analytical México), glicerol al 10% (99% de pureza, Sigma Estados Unidos), β-mercaptoetanol al 5% (98% de pureza, Sigma Alemania) y azul de bromofenol al 0.1% (Sigma Alemania). Para el caso de la no reductora, la mezcla fue la misma, a excepción de β-mercaptoetanol

#### A 1.14 Solución N:

Esta solución para el corrimiento electroforético, fue preparada en volumen de 1L, para lo cuál se emplearon 5g de SDS (Grado biología molecular, Analytical México), 15g de Tris (Grado biología molecular, Analytical México) y 72g de glicina (Grado USP,

Research Organics, Estados Unidos), todo fue disuelto en agua desionizada, ésta solución fue filtrada por filtros de tamaño de poro de 0.22 $\mu$ m y refrigerada.

#### A 1.15 Solución O:

Esta solución de tñido, fue elaborada pesando la masa deseada de azul de coomasie, poniendo el volumen necesario de MeOH (Fermont México) y ácido acético (Petroquifin México), de tal suerte que las concentraciones finales respectivas fueran 0.1% w/v, 30% v/v y 7% v/v.

#### A 1.16 Solución P:

Esta solución, es idéntica a la solución O en cuanto a la composición de MeOH (Fermont México) y ácido acético (Petroquifin México), pero no tiene azul de coomasie (sigma Alemania).

#### A 1.17 Solución Q:

Esta solución fue preparada mezclando ssi y HEPES pH 7.05 (Sigma-Aldrich Alemania) en la proporción 1:9. Al término de su preparación, ésta fue refrigerada.

#### A 1.18 Solución R.

Esta solución es idéntica a la A (apartado A 1.1 de esta sección), sólo que su pH final se ajustó con HCl 0.5M hasta ser de 6.8 (Fermont México).

#### A 1.19 Solución S:

Esta mezcla, fue realizada poniendo 14 partes de Cloroformo (99.8% de pureza, HYCEL de México), 5 de Metanol (Fermont México) y 1 de agua desionizada.

#### A 1.20 Solución T:

Este revelador de proteínas, fue preparado al mezclar 0.5mL de solución de Ponceau S (Ponceau S solution, Sigma Alemania), 1mL de acetona (Fermont México) y 2.5mL de agua desionizada.

#### A 1.21 solución U:

Para la elaboración de ésta solución, fueron disueltos 27.03g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (Grado analítico, Sigma-Aldrich Alemania) y 30.4g de NH<sub>4</sub>SCN (Sigma-aldrich Alemania) en un litro de agua desionizada.

#### A 1.22 Reactivo V:

Este reactivo RIPA, fue preparado con NaCl (Baker México), Tris (Grado biología molecular, Analytical México) y Nonidet P-40 (Sigma Alemania), de modo que las concentraciones finales respectivas en agua desionizada fueran 150mM, 20mM y 1%v/v, al término de su elaboración, fue refrigerada.

#### A 1.23 solución W:

Este reactivo, fue preparado poniendo 2 partes de solución de CuSO<sub>4</sub> (Solución al 4%, Sigma Alemania) una junto con 100 partes de solución de ácido bicinónico (Sigma Alemania) una vez mezclados, la solución fue puesta en hielo y alejada de la luz blanca. Una vez elaborada, fue usada de inmediato.

#### A 1.24 Solución X:

Se disolvieron 0.378 g de KCl (Grado biología molecular, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en 0.5 L de agua desionizada (KCl 10mM) y fue filtrada 3 veces por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA). Esta solución siempre fue preparada en fresco.

#### A 1.25 Solución Y:

Se disolvieron 37.75 mg de KCl (Grado biología molecular, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en 0.5 L de agua desionizada (KCl 1M), la solución fue filtrada 3 veces por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA). Esta solución siempre fue preparada en fresco.

#### A 1.26 Solución Z:

Esta solución es idéntica a la B, sólo que el pH fue ajustado hasta 6.8.

#### A 1.27 Solución AA:

Esta solución fue preparada con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Grado analítico, Merck Alemania) y EDTA (Ultra puro, GIBCO BRL Estados Unidos), de tal suerte que las concentraciones finales de cada uno fué 100mM y 0.2mM respectivamente.



# Índice

RESUMEN.....	4
CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN .....	6
1.1 Cáncer-Generalidades .....	7
1.2 Tratamientos clínicos del cáncer.....	7
1.2.1 Quimioterapia .....	7
1.2.2 Radioterapia .....	8
1.2.3 Quimio-radioterapia.....	8
1.2.4 Inmunoterapia .....	8
1.3 Células cancerosas y sobre-expresión de receptores de membrana .....	10
1.3.1 Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R) .....	10
1.4 Blancos moleculares y terapias dirigidas contra el cáncer .....	12
1.5 Vehículos antineoplásicos específicos por células cancerosas .....	12
1.5.1 Aptámeros .....	12
1.5.2 Polímeros .....	12
1.5.3 Nanoestructuras .....	13
1.5.4 Liposomas .....	13
CAPÍTULO 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	18
Justificación.....	19
Objetivo General .....	19
Objetivos Específicos.....	19
CAPÍTULO 3.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
3.1 Tiolación del anticuerpo.....	21
3.2 Cuantificación de AcMo .....	23
3.3 Reacción PEGMal-AcMo .....	23
3.4 Comprobación de la unión PEGMal-AcMo.....	24
3.5 Preparación de Inmunoliposomas .....	25
3.6 Evaluaciones analíticas .....	27
CAPÍTULO 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
4.1 Tiempo y Temperatura de tiolación .....	31
4.2 Tiempo de retención de AcMo en cromatografía de exclusión de tamaño.....	32
4.3 Cuantificación de AcMo tiolado y eficiencia de tiolación.....	34

4.4 Reacción PEG-Mal-AcMo .....	36
4.5 Cromatografía de exclusión de tamaño de inmunoliposomas.....	37
4.6 Cromatografía en capa fina de Inmunoliposomas.....	38
4.7 Cuantificación de fosfolípidos y tamaño de partícula.....	40
4.8 Potencial zeta y carga superficial .....	41
CAPÍTULO 5.- CONCLUSIONES .....	43
Conclusion General .....	44
CAPÍTULO 6.- BIBLIOGRAFIA .....	47
Anexo I.....	49

# **RESUMEN**

## RESUMEN

La necesidad de desarrollar vehículos de agentes de quimio y/o radioterapia con capacidad de dirigir específicamente su carga terapéutica a marcadores moleculares asociados a células tumorales, es uno de los objetivos de la investigación científica en el área oncológica.

Este trabajo de investigación se centró en la elaboración de inmunoliposomas específicos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), el cual es un marcador tumoral específico en una gran cantidad de carcinomas. El trabajo consistió en elaborar una suspensión de liposomas unidos en su superficie con el anticuerpo monoclonal Cetuximab específico contra EGF-R. Con este fin se desarrollaron y adaptaron métodos analíticos, como la cromatografía en capa fina y la cuantificación de proteínas para determinar la presencia de los anticuerpos en la superficie liposomal, y la determinación de la cantidad de fosfolípidos en el sistema y tamaño de éstos. El resultado del trabajo fue una suspensión inmunoliposomal con potencial de reconocimiento por células tumorales que sobre expresan el receptor EGF-R.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Cáncer-Generalidades

El cáncer representa un problema importante de salud pública en todo el mundo, tan sólo en el campo de la ginecología, los cánceres cérvico-uterino y de mama, muestran una incidencia y mortalidad alta, particularmente en países en vías de desarrollo. Esto se acentúa cuando los tratamientos tradicionales de quimioterapia y radioterapia no presentan la eficacia esperada en los pacientes<sup>1-4</sup>. Diversos factores afectan la efectividad de los tratamientos antineoplásicos, destacando la localización de la masa tumoral en lugares de difícil acceso y/o estadios avanzados de estos, considerable toxicidad en tejido sano, así como el desarrollo de la enfermedad metastásica, lo que en la mayoría de los padecimientos resulta en los llamados cánceres recurrentes<sup>2,3,5-7</sup>.

## 1.2 Tratamientos clínicos del cáncer

El tratamiento clínico del cáncer puede ser a base de quimioterapia, radioterapia, cirugía o combinaciones de éstos<sup>3,4,9</sup>.

### 1.2.1 Quimioterapia

En general, la quimioterapia es cualquier tratamiento terapéutico basado en la administración de sustancias químicas (fármacos) al organismo, pero es común que el término se refiera a los tratamientos farmacológicos de enfermedades neoplásicas (Tabla 1)<sup>3,4,6</sup>.

Tabla 1. Quimioterapéuticos antineoplásicos más comunes

Clase	Nombre genérico	Enfermedad
Agentes de alquilación	Ciclofosfamida	Leucemia, cáncer de mama, ovarios, pulmones y testículo.
	Semustina	Tumores primarios de encéfalo, estómago y colon.
	Dacarbazina	Melanoma maligno y sarcoma de tejidos blandos.
Antimetabolitos	Metotrexato	Leucemias, cánceres de seno, cabeza y cuello.
	5-fluorouracilo	Cáncer de mama, colon, páncreas, ovario, cabeza y cuello.
	Mercaptopurina	Leucemias
Productos naturales	Etopósido	Cáncer de testículo, pulmón, mama y leucemia.
	Doxorrubicina	Leucemias, tumores de mama, tiroides, pulmones y estómago.
	Mitomicina	Cáncer de estómago, cuello uterino, colon, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello
Agentes diversos	Cis-platino Carboplatino	Cáncer de testículo, ovario, cervix, cabeza, cuello, vejiga, pulmón, uterino, endometrio y esófago.

Los fármacos empleados en el tratamiento del cáncer, interfieren en la reproducción de las células cancerosas, al producir alteraciones en la síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas. Debido a su inespecificidad, las células y tejidos sanos se ven afectados, sobre todo aquellos que de manera natural presentan una división celular constante, éste fenómeno trae como consecuencia graves efectos tóxicos en los pacientes tratados<sup>3-8</sup>.

### 1.2.2 Radioterapia

La radioterapia es una forma de tratamiento basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gama, haz de electrones, etc). La radioterapia puede ser dividida en tres modalidades: Radioterapia externa o teleterapia (un haz de RI se hace incidir sobre cierta parte del cuerpo)<sup>2,3</sup>, Radioterapia interna y Radioterapia con radionúclidos<sup>3,4</sup>.

#### *Radioterapia interna o braquiterapia:*

Esta modalidad es muy empleada en el tratamiento de cáncer de útero y cérvix, consiste en aplicar radiación  $\gamma$  en pequeñas áreas del cuerpo. En la modalidad intracavital, se insertan pequeñas fuentes radioactivas selladas cerca del tumor, las fuentes más empleadas en esta modalidad son  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{192}\text{Ir}$ ,  $^{125}\text{I}$  y  $^{103}\text{Pd}$ . En la braquiterapia intersticial se colocan las fuentes radioactivas dentro del tumor mediante cirugía<sup>3,4</sup>.

#### *Radioterapia con radionúclidos:*

En la radioterapia con radionúclidos, se administran iones radioactivos al interior del organismo, ofreciéndose así dosis de radiación mejor localizadas. En la radiofarmacia, se emplean éstos iones unidos a “vehículos moleculares”, tal es el caso de los complejos  $^{131}\text{I}$ -metaiodobencilguanidina,  $^{111}\text{In}$ -Somatostatina,  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP y  $^{186}\text{Re}$ -HEDP<sup>3,4</sup>.

### 1.2.3 Quimio-radioterapia

La combinación de radioterapia con quimioterapia se emplea desde hace 15 años en tratamiento de cáncer Cerviño-uterino en etapas tempranas y ha aumentado la esperanza de vida en hasta 60% de las pacientes vs el 30% que se tiene solo con la radioterapia<sup>3,4</sup>.

### 1.2.4 Inmunoterapia

Dadas las propiedades de reconocimiento y especificidad que presentan las inmunoglobulinas IgG (Figura 1)<sup>10-12</sup>, en el área inmunológica, se han elaborado diversos anticuerpos monoclonales (AcMo) contra diversas moléculas superficiales de células tumorales, varios de ellos han sido evaluados en la clínica con buenos resultados, la eficacia estriba en el bloqueo de diversas moléculas receptoras o mensajeras de células tumorales por parte de los AcMo y la consecuente detención de varias señalizaciones bioquímicas<sup>13,16</sup>.

#### 1.2.4.1 Matuzumab.

Recientemente ha sido reportada la eficacia del empleo del AcMo Matuzumab en tratamiento de Cáncer cérvico-uterino antes de la administración tradicional de cisplatino<sup>9</sup>, dado que diversos trabajos han mostrado una similitud entre las afinidades del

Matuzumab y Cetuximab, se estudian las mismas combinaciones pero empleando ahora Matuzumab<sup>9,16</sup>.

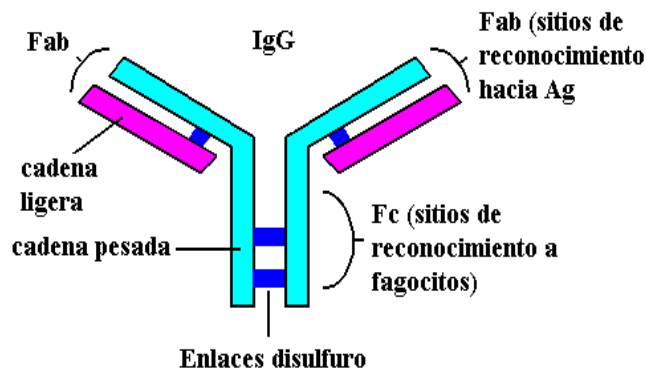


Figura 1. La imagen corresponde a la representación esquemática de una inmunoglobulina IgG, se observa la forma de Y característica.

#### 1.2.4.2 Bevacizumab.

Bevacizumab es un AcMo contra el VEGF. En pacientes con cánceres colorectales y de hígado ha sido exitoso su tratamiento con quimioterapia junto con bevacizumab, así mismo, en casos de cánceres recurrentes de cérvix, se ha incrementado el índice de respuesta con la administración de 5-fluorouracilo/AcMo, así mismo, están por terminar las evaluaciones clínicas que buscan establecer la combinación cisplatino/Bevacizumab como tratamiento de primera línea en éste tipo de recurrencia<sup>9</sup>, y han iniciado estudios clínicos cuyo fin es evaluar la monoterapia con el AcMo en CaCu de tipo escamoso<sup>9</sup>.

#### 1.2.4.3 Trastuzumab.

El empleo de Trastuzumab (Herceptin) en cánceres de mama altamente agresivos (que son generalmente HER-2 positivos), ha representado una recesión del tamaño tumoral en alrededor del 20% de los pacientes e incrementa los beneficios de los tratamientos quimioterapéuticos, esta IgG reconoce la región IV del receptor contigua a membrana celular (Figuras 1 y 2)<sup>7,9,16-18</sup>.

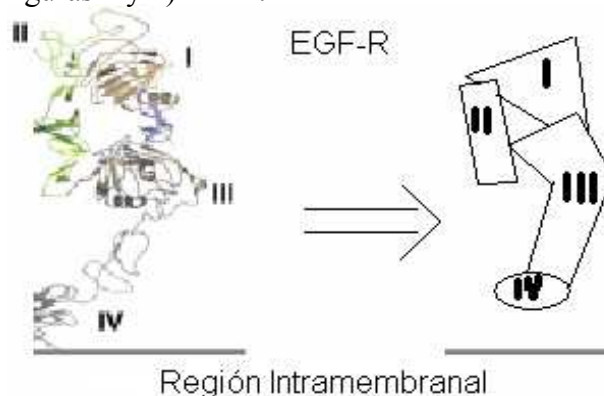


Figura 2. La imagen mostrada corresponde a la forma proteinica del EGF-R y a su esquema gráfico, en ambas se puede contemplar las cuatro regiones que lo componen.

#### 1.2.4.4 Cetuximab

Cetuximab (Erbix), es una inmunoglobulina quimérica, compuesta por 2 estructuras: la primera de ellas corresponde a las regiones de reconocimiento (Fab) o regiones variables del AcMo murino C225, las cuales reconocen la región terminal del



EGF-R (HER) y la segunda es la cadena pesada junto con la cadena ligera constante “kappa” de una IgG humana (Figuras 1 y 3)<sup>9,13,16,19,20</sup>. Esta IgG ha sido empleada con éxito en combinación con radioterapia en tratamientos para cánceres de cabeza y cuello. La FDA ya lo aprobó en el tratamiento de carcinomas colorectales<sup>5,13,21,49</sup>.

Buenos resultados han sido obtenidos en el tratamiento de adenocarcinoma colorectal con el binomio Cetuximab/irinotecan, en los pacientes tratados se ha logrado un incremento considerable en su índice de supervivencia<sup>9</sup>. En cuanto al Cáncer cérvico-uterino, diversos trabajos han mostrado una especial sensibilidad citotóxica de éste tipo de cáncer cuando se trata con cetuximab junto con cisplatino. La eficacia de la monoterapia a base de cetuximab para éste padecimiento se comienza a evaluar<sup>9</sup>.

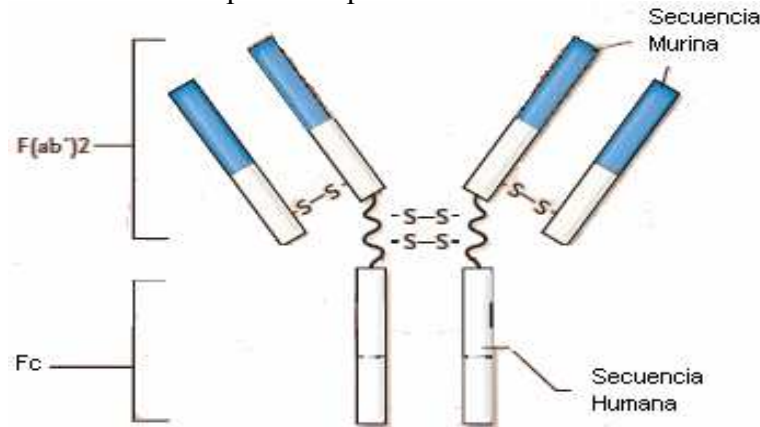


Figura 3. Esquema correspondiente a la estructura del Cetuximab.

### 1.3 Células cancerosas y sobre-expresión de receptores de membrana

Debido a los desórdenes genéticos que presenta una célula cancerosa, diversas actividades bioquímicas se ven afectadas, toda esta cascada de eventos alterados son reguladores fundamentales de procesos celulares importantes como la proliferación, la metástasis y la angiogénesis<sup>2,22</sup>, estos representan un amplio campo de investigación en oncología; el conocimiento de la sobre-expresión de diversos “blancos” moleculares ubicados en las membranas de las células cancerosas ha incentivado el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y de nuevas estrategias de tratamiento para la enfermedad<sup>9,13,14</sup>.

Diversos marcadores superficiales de células tumorales son blancos contra los cuales se pueden dirigir y diseñar tratamientos con un elevado grado de especificidad<sup>14-16,23</sup>. El EGF-R, es uno de los blancos terapéuticos más estudiado, dado que se sobre-expresa en los cánceres más agresivos de pulmón, mama, ovario, vulva, colon, páncreas<sup>9,13,21,52</sup>, próstata, tiroides, algunos cánceres renales, cánceres de cabeza y cuello<sup>9</sup>. Se sabe además que está presente también en el 85% de los cánceres escamosos de cérvix (destacando que el HER-2 solo esta presente en el 3-9 % de las pacientes con este padecimiento)<sup>9</sup>.

#### 1.3.1 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R)

El EGF-R pertenece a una familia de cuatro receptores del tipo Tirosin-cinasa: HER-1, HER-2, HER-3 y HER-4, todos estos receptores presentan tres dominios: el extracelular, el cual es el sitio de reconocimiento a su ligando, un dominio transmembranal hidrofóbico y un dominio intracelular con la actividad de tirosin-cinasa<sup>7,9,13,16,17,19,24-26,54</sup>, que en el caso del HER-3 no es funcional<sup>7</sup>. La estructura

cuaternaria del dominio extracelular del receptor se divide en cuatro regiones (I-IV, Figura II), de las cuales la región II, juega un papel importante durante la activación del receptor<sup>16</sup>. En general, la unión del factor de crecimiento epidermoide (EGF) en la región extracelular del EGF-R (excepto para HER-2), provoca un cambio conformacional seguido de una dimerización de éste con otro receptor de la misma clase (homodimerización) o con uno de clase diferente (heterodimerización), es muy común que el EGF-R activado se asocie con HER-2, ésta dimerización se da mediante la región II (del dominio extracelular) que queda expuesta posterior al cambio conformacional. Después de la dimerización se activa el dominio intracelular de actividad tirosin-cinasa que activara vías de señalización para promover diferenciación<sup>13</sup>, proliferación, motilidad, invasión y carcinogénesis<sup>5,7,9,13,16,17,21,24-27</sup>. Importante ha sido el hecho de que como consecuencia de la regulación positiva del EGF-R, se desencadene la expresión de las vías de señalización del VEGF, un fenómeno asociado al proceso angiogénico<sup>9</sup>.

#### *HER-1:*

En estudios *in vitro* con células malignas, se ha observado una sobre-expresión del HER-1 en presencia de su ligando (EGF). Se sabe que en tumores de cerebro es común su sobre-expresión y las células cancerosas de diversas estirpes que lo sobre-expresan presentan un alto índice de proliferación; pero además, de sobre-expresión del VEGF<sup>5,9,17</sup>.

#### *HER-2:*

De todos los miembros de la familia del EGF-R, el HER-2 es el receptor mas estudiado, sobre todo porque los tumores más agresivos presentan una considerable sobre-expresión, como en el caso del cáncer de mama<sup>7,9,17</sup>; en este tipo de células malignas, ha sido reportada la actividad autoconstitutiva del HER-2, es decir, que su actividad de tirosin-cinasa intracelular puede funcionar sin necesidad de ser activada por el ligando<sup>7,17</sup>. Recientes trabajos han mostrado también, que se puede presentar una homodimerización espontánea del receptor. Así mismo, el heterodimero HER-2/HER-3 ha sido identificado como el complejo de mayor potencial mitogénico, proliferativo y de motilidad celular; por ejemplo en cánceres de mama altamente agresivos y con elevados índices de metástasis, hay una sobre-expresion notoria del HER-2<sup>7,9,16,17,28</sup>. Derivado de lo anterior, y aunado a que el HER-2 es el receptor ubicuo en la heterodimerización, es considerado como una de las oncoproteínas más potentes y su bloqueo podría detener la actividad mitogénica de la célula que lo sobre-exprese<sup>17</sup>. Se sabe también que la quimiosensibilidad y radiosensibilidad que las células cancerosas presentan esta mediada por la sobre-expresión del EGF-R, se ha observado su incremento en células tumorales después de ser irradiadas, de modo que un bloqueo de este receptor, sensibilizaría a las células a la radiación<sup>7,9,17,28</sup>. Al día de hoy, no se esta bien caracterizada la presencia del HER-2 en tumores cervicales, algunos trabajos indican que sólo menos del 9% de los casos lo presentan, mientras que otros equiparan su presencia a los padecimientos de mama<sup>9</sup>.

Dadas las graves implicaciones que tiene la sobre-expresión del EGF-R para los pacientes, se abre la posibilidad de considerar al EGF-R como un blanco molecular. El bloqueo molecular del receptor, significaría una disminución en la proliferación y por lo tanto en la agresividad de los tumores de células EGF-R positivas<sup>7,9,13,16-18,24-26,28,29,52</sup>.

## 1.4 Blancos moleculares y terapias dirigidas contra el cáncer

La elevada toxicidad que presentan todos los antineoplásicos en tejido sano es en parte consecuencia de su escasa especificidad. Esto ha dado como resultado el desarrollo de diversos “vehículos” de transporte como medida para disminuir la toxicidad inherente al fármaco; el desarrollo exitoso de estos acarreadores servirá de cimiento para el futuro desarrollo del vector con especificidad por células malignas<sup>2,21,23</sup>. El desarrollo y/o diseño de las terapias que hoy en día pretenden rebasar los efectos terapéuticos obtenidos con las terapias tradicionales del cáncer y la unión de un AcMo o cualquier otro agente con especificidad por las células tumorales en los vehículos de transporte de quimioterapéuticos y/o radioterapéuticos, puede proveer una nueva forma de tratar la enfermedad<sup>8,21,30,51</sup>.

La sobre-expresión de HER-2 en cánceres agresivos ha provocado que diversas estrategias terapéuticas lo consideren como un blanco atractivo. En la clínica, se han desarrollado básicamente dos estrategias terapéuticas dirigidas contra el EGF-R, la primera es el empleo de AcMo dirigidos hacia el dominio extracelular de los receptores de la familia EGF-R, ya que su bloqueo implica una disminución en la capacidad de supervivencia de la célula<sup>13</sup>. La segunda es el uso de moléculas inhibitoras de la actividad tirosin-cinasa como Gefitinib, Erlotinib y Lapatinib<sup>9</sup>, estos han sido evaluados en CaCu, obteniéndose desafortunadamente resultados poco alentadores<sup>9</sup>.

## 1.5 Vehículos antineoplásicos específicos por células cancerosas

La elaboración de vehículos de fármacos dirigidos hacia células tumorales de diversas estirpes, implica la elección del más adecuado (según datos de biocompatibilidad y estabilidad previos) y la elección de aquellas moléculas que les permitirán sólo actuar sobre células malignas<sup>21,31</sup>. Diversas moléculas con capacidad de reconocimiento de algún “marcador” celular tumoral han despertado interés y hasta el momento destacan los aptámeros, folato y los AcMo<sup>15,21,30-34</sup>.

### 1.5.1 Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN que a través de interacciones intramoleculares (derivadas de la secuencia nucleotídica del aptámero), adquieren una estructura tridimensional única con capacidad de reconocimiento y elevada especificidad (análogas a las propiedades que presentan los AcMo) por diversas moléculas orgánicas, entre ellas diversos antígenos tumorales<sup>23</sup>. Un aptámero acoplado a un liposoma, le proveería capacidad de reconocimiento por algún marcador superficial tumoral. No obstante la producción de aptámeros adecuados se ve limitada debido a la extrema sensibilidad de estos frente a diversas condiciones químicas y ambientales.

### 1.5.2 Polímeros

En diversos trabajos experimentales, se han elaborado diversas formulaciones de nano-estructuras poliméricas como posibles acarreadores terapéuticos<sup>2,32,35,36,50,51</sup>. Estructuras a base de PLGA aprobado ya por la FDA, han sido elaboradas para la liberación de inhibidores de la vía de señalización MAPK (vía de señalización celular desregulada, que en tumores humanos esta asociada a una proliferación y crecimiento tumoral importante) y la internalización observada del vector en ensayos *in vitro* ha sido

aceptable<sup>2,23</sup>. Así mismo, diversos trabajos han mostrado la elaboración de vectores a base de PLGA PEGilados que dada ésta característica, presentan tiempos elevados en la circulación en estudios *in vivo*<sup>23,50</sup>, de hecho estudios *in vitro* han mostrado la elevada captación de estos vectores marcados con un aptámero que reconoce la proteína PSMA de células de próstata<sup>23</sup>. Dadas las propiedades termosensibles del polímero plurónico F-127, diversos trabajos están enfocándose en la elaboración de micelas a base de éste material, con lo que se busca el transporte de diversos agentes terapéuticos en su interior<sup>35,36</sup>.

### 1.5.3 Nanoestructuras

El reconocimiento inmunológico de cualquier sustancia exógena a un organismo, esta en función del tamaño molecular, es decir, entre más grande sea la molécula, más inmunogénica será, por ello diversas estructuras netamente nanométricas comienzan a ser desarrolladas con el fin de ser empleadas como acarreadores de principios activos y/o radionúclidos de interés terapéutico<sup>32,38,51</sup>. En la actualidad, la ingeniería de nanoestructura esta buscando el desarrollo de síntesis de nano-acarreadores a base de moléculas biológicas (como péptidos y ADN, véase Figura 4), con lo que la inmunogenicidad de estos agentes sería prácticamente nula<sup>32,38-40</sup>.

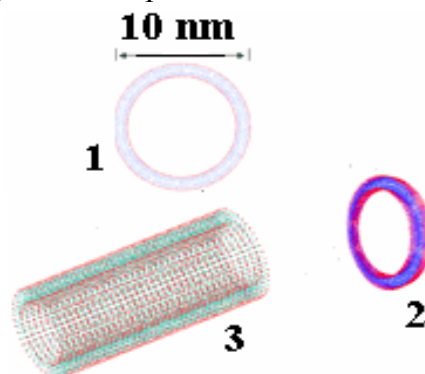


Figura 4: La imagen corresponde a la estructura supramolecular de un nanotubo peptídico. 1 corresponde a la vista frontal, 2 a la vista de un plano en perfil, mientras que 3 es una sección longitudinal. Es importante destacar la dimensión diametral tan pequeña del nanotubo.

### 1.5.4 Liposomas.

De entre los diversos vehículos de transporte, destacan aquellos que por su naturaleza y/o composición resultan ser inocuos y por lo tanto representen seguridad para el organismo; al respecto las formulaciones liposomales cumplen con estos requerimientos<sup>33,34,41,42,51</sup>, estas han mostrado gran potencial terapéutico en el transporte de diversos fármacos, ya que se reduce su toxicidad inherente y mejora su farmacocinética<sup>3,8,21,23,52,53</sup>. Actualmente en el mercado existen ya diversas formulaciones de diversos agentes terapéuticos, tal es el caso de Ambiosome<sup>®</sup> y Amphotec<sup>™</sup>, ambos para la administración de Anfotericina B<sup>3</sup>; de Caelix para la administración de Doxorubicina; Mikasome<sup>®</sup> para Amikacina<sup>3</sup>. Así mismo, se han venido utilizando estas suspensiones para el transporte de diversos radionúclidos para estudios de imagenología nuclear<sup>3,4,51</sup>.

### Formulaciones liposomales:

Las suspensiones liposomales han sido de gran interés para el desarrollo de vectores anclados a AcMo de varios tipos, debido a que su composición presenta diversos grupos químicos susceptibles de funcionalización (modificación previa para la formación posterior de un enlace químico) para entablar después un enlace covalente con el AcMo<sup>21,30,31,51</sup>. La elaboración de “inmunoliposomas” básicamente se agrupa en tres vertientes: 1) la síntesis de los liposomas pre-sintetizados con un fosfolípido funcionalizado<sup>21,30,34,51</sup>, 2) el anclaje de los AcMo por co-incubación de estos con la suspensión liposomal<sup>21,31</sup>, y 3) el anclaje mediante una molécula “intermediaria” previamente unida a la superficie del liposoma y que se une al Ac, tal es el caso de las vías avidina-biotina o de la FBP-Folato<sup>21</sup>. Una forma de unión de Ac a la superficie de liposomas, contempla la unión mediante los enlaces disulfuro que presenta la molécula protéica, al reducir estos enlaces a sus respectivos tioles; de un enlace S-S (Figuras 1 y 3), se producen dos “ganchos” –SH con los que se puede establecer un enlace covalente con cualquier molécula electrofílica<sup>30</sup>.

### Fisicoquímica General:

En general, los liposomas son partículas coloidales suspendidas en un medio acuoso; cada vesícula liposomal esta formada por fosfolípidos de una cabeza polar y doble cadena hidrofóbica, arreglados en bicapas lipídicas similares a las membranas celulares<sup>3,4,51</sup>, éste arreglo se debe a la configuración espacial cilíndrica propia de los fosfolípidos de doble cadena, esto en contraposición a la estructura micelar que se forma con fosfolípidos de una sola cadena de configuración espacial cónica (Figura. 5)<sup>3,4</sup>.

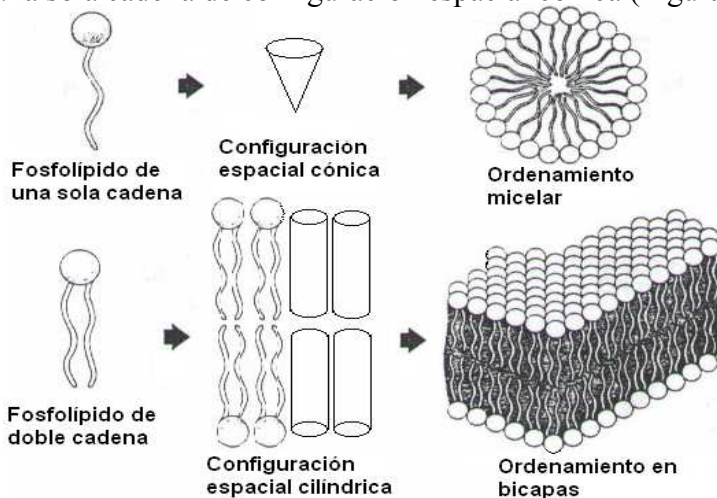


Figura 5: Debido a la configuración de los fosfolípidos de doble cadena, el arreglo espacial que se forma en medio acuoso es el de bicapas lipídicas.

La formación de liposomas se da espontáneamente cuando el agua entra en contacto con una mezcla anfifílica; para estabilizarse el sistema, las porciones hidrofílicas (cabezas polares) quedan en contacto con la fase acuosa, mientras que las hidrofóbicas quedan en contacto entre si, formándose finalmente vesículas esféricas.

### Estabilidad coloidal.

En general, una suspensión de partículas coloidales cargadas es estable cuando la fuerza de repulsión electrostática es más grande que las atractivas de van der Waals. En el medio dispersor, juega un papel importante la composición iónica de éste, ya que puede contribuir en la disminución de las fuerzas repulsivas entre partículas favoreciendo su acercamiento y la consecuente aparición de un flóculo<sup>3,4</sup>. Cualquier partícula coloidal cargada, es capaz de generar una diferencia de potencial entre la doble capa de Helmholtz

y la capa difusa que forma en la suspensión, conocida como potencial  $\zeta$  (Figura. 6). Entre mayor sea el valor de potencial zeta, mayor será la repulsión entre las partículas coloidales y mayor será la estabilidad de la suspensión, el valor de potencial zeta puede modificarse añadiendo iones adecuados al medio para incrementar o disminuir su valor<sup>3,4</sup>.

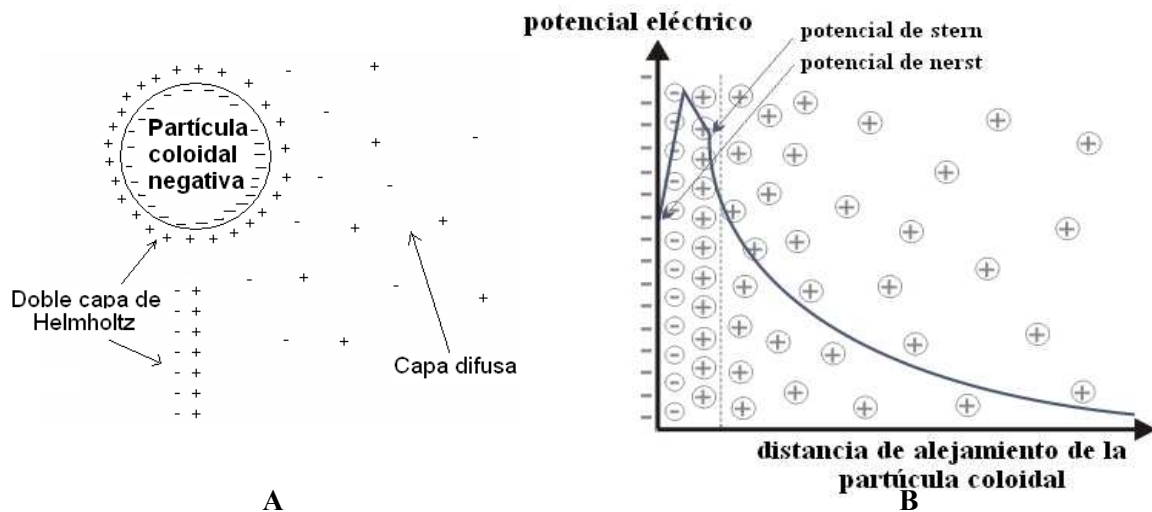


Figura 6: A.- Esquema representativo de la distribución de cargas en un sistema coloidal de partículas negativas, se observa como se obliga a la formación de la doble capa de Helmholtz y la capa difusa. B.- la caída de potencial entre estas dos capas es conocida como potencial zeta ( $\zeta$ ) o de stern.

#### Métodos de preparación de liposomas:

- Hidratación de lípidos:

Para esta técnica de elaboración de liposomas, es necesario realizar previamente una mezcla de los componentes lipídicos en un disolvente orgánico como cloroformo o la mezcla cloroformo/metanol 3:1 (para lípidos de polaridad baja). La mezcla es preparada en un matraz hasta garantizar su homogeneidad<sup>3,4</sup>. El disolvente orgánico es entonces evaporado a presión reducida vía rotavapor para obtener una capa lipídica adherida al interior del matraz (CL). Para garantizar el secado completo de esta capa, suele someterse a vacío por unas horas. Seca la CL es hidratada con la solución acuosa de elección, la cual tendrá disuelto al agente que se desea encapsular y se agita moderadamente<sup>3,4</sup>. Un método alternativo de hidratación describe la disolución de los lípidos en etanol caliente, esta solución etanólica es goteada directamente en la fase acuosa de elección y en agitación moderada. La suspensión formada se mantiene a una temperatura que permita que el disolvente orgánico se evapore por completo<sup>3,4</sup>.

- Vesículas por sonicación:

Esta técnica emplea energía sonora para la producción de nanoesferas, para tal fin es necesario preparar una dispersión de fosfolípidos en agua, la muestra es entonces sometida a sonicación por 10-15 minutos. Esta técnica permite la elaboración de liposomas unilaminales pequeñas<sup>3,4</sup>.

- Evaporación de fase reversa:

En ésta técnica la CL preparada según hidratación lipídica, es nuevamente disuelta en dietil éter o metanol y se adiciona la fase acuosa a 1/3 del volumen de la fase orgánica, este sistema bi-fásico es sonicado para formar micelas reversas en la fase acuosa. A la mezcla obtenida le es retirada la fase orgánica vía rotavapor hasta garantizar la efectiva eliminación de la fase orgánica<sup>3,4</sup>.

- Eliminación de Tensoactivo:

En esta técnica se prepara una mezcla CL/tensoactivo 10:2, al evaporar la mezcla cloroformo/metanol 1:1 vía rotavapor. La capa seca es hidratada con la solución de elección y agitada moderadamente, la suspensión micelar obtenida es sometida a un método de purificación del tensoactivo como cromatografía de filtración en gel, al disminuir gradualmente la cantidad de tensoactivo, se van formando los liposomas<sup>3,4</sup>.

*Caracterización y controles de calidad:*

Para el empleo clínico de suspensiones liposomales, es imprescindible el desarrollo de controles de calidad (Tabla 2). Un parámetro crítico es el nivel de esterilidad<sup>3,4</sup>.

Tabla 2. Parámetros de control de calidad

Estudios generales	Equipo
pH	pH-ímetro
Conductividad	Conductímetro
Concentración de fosfolípidos	Ensayo Barlett o Stewart
Concentración de colesterol	Ensayo del colesterol oxidasa, HPLC fase normal y fase reversa
Cantidad de agente encapsulado	Espectrofotometría, HPLC,
Solventes orgánicos residuales	NMR
Caracterización física	
Distribución del tamaño de partícula	Dispersión dinámica de luz, cromatografía de Exclusión de tamaño, microscopía electrónica.
Estabilidad Química	
Oxidación de fosfolípidos	Peroxidación lipídica, composición lipídica
Hidrólisis de Fosfolípidos	Composición lipídica
Esterilidad	Cultivos en medio aeróbico y anaeróbico
Pirogenicidad y endotoxinas	Ensayo de lisado de limulus del amebocito

*Modificación superficial y Farmacología general:*

Los primeros estudios *in vitro* realizados en la evaluación de las primera formulaciones liposomales, mostraron que había una eliminación considerable de los liposomas administrados, fenómeno que se acentuaba en liposomas elaborados con elevadas cantidades de colesterol. Se sabe que el plasma que ha estado en contacto con liposomas muestra una disminución en la cantidad de proteínas, esto hace suponer que son captadas por la superficie liposomal mediante interacciones electrostáticas, posiblemente el exceso de cargas negativas superficiales posiblemente favorece el reconocimiento por receptores membranales de los macrófagos<sup>3,4</sup>. En experimentos con liposomas de carga superficial neutra, se presentó el mismo fenómeno de remoción, en este caso participando activamente factores de la vía del complemento y opsoninas, de aquí que se pensara en la necesidad de poner superficialmente algún agente que interfiriera en la unión de proteínas plasmáticas y/o del complemento en la superficie liposomal. Estudios en ratones, mostraron posteriormente que la incorporación de pequeñas cantidades de glucolípidos elevaban de manera considerable el tiempo de circulación en sangre y por lo tanto aumentaba la probabilidad de captación de liposomas por el tejido, esos liposomas fueron llamados “stealth liposomes”, que años después derivó en el concepto de “Liposomas estéricamente estables” (Sterically Stabilized liposomes); fue así como se comenzó a evaluar la posibilidad de probar con polímeros sujetos a la superficie, se probó con derivados de dextrano y con el poli(etilenglicol) de



cadena lineal (PEG), éste ultimo extendió el tiempo de circulación de manera considerable, así como de su captación por células tumorales<sup>3,4,15,50-53</sup>. Estos liposomas fueron conocidas como “PEGilados” (PEGylated liposomes), es posible que este poli-alcohol, establezca una capa de hidratación (enlaces de hidrógeno entre los -OH del PEG y el H del agua) que es la que interfiere en la unión de cualquier proteína a la superficie<sup>3,4</sup>. En la administración de liposomas, se ha observado que su distribución depende primeramente del sitio de inyección, se sabe por ejemplo que en la administración intraperitoneal de liposomas de 100nm de diámetro, son absorbidos en 1 hora hacia la circulación con una eficiencia del 30-40% de la dosis inicial y con un  $T_{1/2}$  = 11 horas, migrando pequeños liposomas hacia los nódulos linfáticos cercanos al sitio de administración<sup>3,4</sup>. Una hipótesis plantea que una vez que los liposomas estan en el torrente circulatorio, se acumulan en la periferia tumoral por extravasación de estos a través de lesiones porosas presentes en los vasos sanguíneos (endotelio fenestrado) que alimentan al tumor<sup>3,26</sup>, las cuales van desde 100 hasta 700 nm de diámetro vs los 6 nm en promedio que presenta el endotelio de los vasos de tejidos sanos<sup>3,26,44,51</sup>; una vez allí, comienza la interacción liposoma-tejido blanco (Figura. 7).

*Liposomas como vectores con especificidad por células tumorales:*

Debido a los resultados prometedores que ha mostrado la nanotecnología en relación al tratamiento terapéutico contra el cáncer, una estrategia novedosa actualmente es el desarrollo de formulaciones liposomales que sean acarreadores de fármacos terapéuticos y que además sean específicos por células tumorales, uno de los blancos que se sobre-expresa en muchos tumores de origen epitelial es el EGF-R. Es interés de nuestro trabajo obtener una formulación liposomal que lleve unido a su superficie un AcMo dirigido contra el EGF-R, de manera que en un futuro pueda servir como un vector para el depósito de antineoplásicos en la célula tumoral; lo cual disminuirá considerablemente los efectos tóxicos de la quimioterapia.

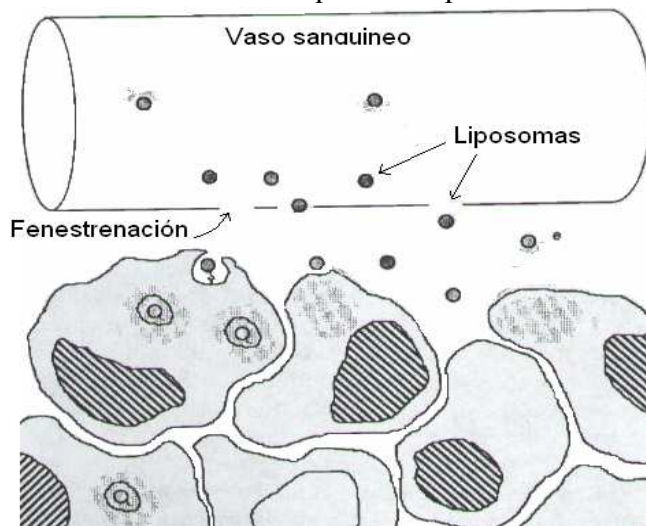


Figura 7: El esquema muestra la acumulación de liposomas en la periferia de células tumorales a causa de la fenestración (porosidad vascular) importante que presentan los vasos sanguíneos que lo irrigan.



# **CAPÍTULO 2**

## ***JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS***

# JUSTIFICACIÓN

El empleo de vehículos de transporte de fármacos y/o radionúclidos a la periferia tumoral o al interior de células cancerosas, permitiría una disminución en los efectos tóxicos adversos inherentes al empleo de dichos agentes. Este transporte puede incrementarse y hacerse más eficiente con el empleo de moléculas con capacidad de reconocimiento por algún marcador tumoral, debido a que la ubicación del vehículo terapéutico en las células blanco estaría regido precisamente por la especificidad de la molécula anclada al transportador. De este modo, habría un incremento en el índice terapéutico de los agentes encapsulados en los vectores de transporte, con la consecuente disminución de efectos adversos en células sanas, permitiendo una liberación más específica del agente terapéutico en células tumorales.

## OBJETIVO GENERAL

Elaboración y caracterización fisicoquímica de una formulación liposomal acoplada con el anticuerpo monoclonal Cetuximab.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar una técnica de acoplamiento del AcMo Cetuximab a la superficie de liposomas pegilados.
- Evaluar la unión del AcMo Cetuximab con el PEGMal mediante electroforesis.
- Comprobar la presencia del AcMo en la superficie del liposoma pegilado mediante cromatografía en capa fina y su cuantificación *in situ*.
- Realizar pruebas analíticas de la suspensión inmunoliposomal (Cuantificación de lípidos, Tamaño de partícula, potencial zeta y carga superficial).

# **CAPÍTULO 3**

***MATERIALES Y MÉTODOS***

## 3.1 Tiolación del anticuerpo

### 3.1.1 Tiempo de reacción de tiolación a temperatura constante:

En un matraz de reacción de tres bocas de 100 mL previamente esterilizado, se adicionaron 2.36mL de una solución de DTT 12.3mM (solución A, Anexo I) junto con 1.64mL de una solución de HEPES pH 7.6 (solución B, anexo I)<sup>12,37</sup>. La mezcla se colocó en baño María con agitación magnética a temperatura de 30°C bajo una atmósfera inerte de N<sub>2</sub>, y posteriormente se le agregaron 2mL de una solución del AcMo (2mg/mL) manteniendo ahora una temperatura a 35°C. De la mezcla de reacción se tomaron muestras de 800μL, tomadas en 6 tiempos diferentes, que fueron depositados en columnas para cromatografía de exclusión de tamaño PD-10 (GE Healthcare, Suecia)<sup>12,30,34,44</sup> que previamente fueron lavadas (2 veces) con 2 mL de solución eluyente de HEPES (solución C, anexo I). A cada volumen recolectado se le agregaron 200μL de solución catalizadora (solución D, anexo I) y 20μL del reactivo de Ellman (solución E, anexo I) y se determinó la absorbancia a 412nm. Finalmente se construyó la curva  $t(h)$  vs  $Abs_{412nm}$  para determinar el tiempo óptimo de reacción.

### 3.1.2 Temperatura de reacción de tiolación a tiempo constante.

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior, se realizó la tiolación de una solución de AcMo, pero esta vez la reacción se realizó a seis temperaturas diferentes. Se tomaron muestras de 800μL, para cada temperatura, y se procedió a realizar la separación cromatográfica en columnas PD-10 para posteriormente medir la absorbancia y construir la curva  $T(^{\circ}C)$  vs  $Abs_{412nm}$ , con el fin de determinar la temperatura óptima de reacción.

### 3.1.3 Tiempo de elución del AcMo en columnas de filtración en gel PD-10

Se realizaron barridos de absorción (200 – 300 nm) (DU<sup>®</sup> 530, Beckman coulter TM. U.S.A.) de las soluciones DTT (27mM), HEPES (pH 7.05) y DTT/HEPES (1:9), para verificar que sus espectros de absorción no interfieran con el pico de absorción del AcMo (280 nm) y fuera posible su detección en un medio con los componentes DTT/HEPES.

#### *Determinación del tiempo de retención de AcMo y de DTT en columnas PD-10:*

Dos mililitros de una solución de AcMo tiolados (1mg/ml) se colocaron en columnas PD-10, previamente lavadas con HEPES pH 7.05. Se realizó la elución con HEPES (solución C, anexo I) colectando muestras cada 0.5 min (contados a partir de un minuto posterior al cargado de la muestra) y posteriormente se leyó la absorbancia para obtener la curva  $t$  vs  $Abs_{280}$ . La medición se realizó por duplicado.

Para el caso del DTT se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizando una solución de 2mL de DTT 10mM y recolectando las fracciones cada 0.5 minutos (contados a partir de los 2.5 minutos posteriores al cargado de la muestra). Se tomaron 200μL de estas fracciones y fueron leídas mediante reactivo de Ellman's (para la detección del DTT mediante sus tioles) y se obtuvo la curva  $t$  vs  $Abs_{Ellman}$ .

### 3.1.4 Reacción de tiolación del anticuerpo:

Con base en los experimentos previos de tiolación (apartados 3.1.1 y 3.1.2)<sup>12,30,37</sup>, se llevó a cabo la reacción empleando una solución de DTT 10mM junto con una solución de HEPES pH 7.6 y una solución de AcMo (0.5mg/ml), con una temperatura de reacción de 35°C durante 6 horas. Posteriormente el total del volumen de reacción (1 - 2 mL) fue depositado en columnas para cromatografía de exclusión de tamaño PD-10<sup>12,30,34,44</sup>. Se recolectó la fracción de muestra (D1) correspondiente al periodo de tiempo que cubría de los 2.5 a los 4 min.

### 3.1.5 Determinación del índice de tiolación de Ac:

Se tomaron 200µL de la solución D1, y se colocó en tubos eppendorf con 450µL de agua desionizada, 150µL de una solución catalizadora (solución D, anexo I) y 20µL del reactivo de Ellman. La mezcla fue agitada 30 segundos en vortex y la reacción se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se determinó su Abs<sub>412nm</sub> contra un blanco de agua desionizada (D.O. 1). Por otra parte, 200µL de PBS (Solución F, anexo I) y 200µL de muestra de AcMo tiolados (muestra D1) fueron colocados en dos tubos eppendorf de 1mL y a cada tubo se agregaron 150µL de la solución D y 450µL de agua desionizada; finalmente al tubo con solución F se le adicionaron 20µL de reactivo de Ellman y al otro 20µL de agua desionizada. Los tubos fueron agitados 30 seg. en vortex y se dejaron reposar por 5 minutos a T ambiente para posteriormente medir sus absorbancias a 412nm (D.O. 2 y D.O. 3 respectivamente). El índice de tiolación (*n*) del AcMo fue estimado mediante la siguiente ecuación<sup>12,30</sup>:

$$n = V \times (DO_1 - DO_2 - DO_3) \div (\epsilon_{412})$$

Donde *n* = mol de -SH (tioles), V = volumen de la reacción (0.82 mL), DO<sub>*i*</sub> (*i*=1,2,3) son los valores de absorbancia de cada reacción mencionada anteriormente y  $\epsilon_{412}$  es el coeficiente de extinción molar del TNB<sup>2-</sup> a 412nm (Figura 8).

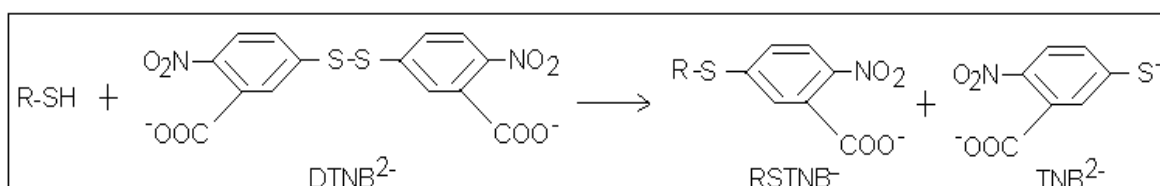


Figura 8. Esquema representativo de la reacción entre un compuesto tiolado y el reactivo de Ellman (DTNB<sup>2-</sup>), el TNB<sup>2-</sup> absorbe a 412nm con un valor de  $\epsilon = 14150M^{-1}cm^{-1}$ .

Con el índice de tiolación *n* (mol de -SH), se obtuvo el índice de tiolación de la reacción total (-*n<sub>final</sub>*, matemáticamente esto se expresa:

$$-n_{final} = n \times V_T(\mu L) \div 200(\mu L)$$

Donde V<sub>T</sub> = volumen total obtenido de la reacción de tiolación. Finalmente, el índice de tiolación será expresado por unidad de masa de AcMo, según la siguiente ecuación:

$$-n_{final} / \text{AcMo}(\text{mg}) = n_{final} \div m_{\text{AcMo}}(\text{mg})$$

Donde m<sub>AcMo</sub> = masa empleada de AcMo (véase apartado 3.2) dados para el mismo volumen para el cuál fue determinado -SH. La cantidad anterior, puede ser

expresada también como  $n_{final}/n_{AcMo}$  empleando el valor de masa molecular del AcMo (145781.6g/mol ó Da) y evaluar así la eficiencia de formación de tioles, dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = n_{final}/n_{AcMo} \times 100/8$$

## 3.2 Cuantificación de AcMo

### 3.2.1 Curva patrón

Se utilizó un kit de cuantificación de proteínas con base en la reacción de Bradford<sup>45,48</sup> (Quick start<sup>TM</sup> Bradford Protein Assay, BioRad. U.S.A.) en placa de 96 pozos, empleando como solución patrón BSA. El límite superior de concentración para la curva patrón fue 0.009µg/µL de BSA, cada punto de la curva, fue preparado por triplicado. La placa fue leída en un espectrofotómetro (MultiScan. U.S.A.) a 495nm.

### 3.2.2 Lectura de muestras

Las muestras de AcMo tiolado fueron preparadas (por triplicado) y leídas en la misma caja de 96 pozos que se empleó en la curva patrón, adicionando el mismo volumen de reactivo de Bradford para que fuera el mismo volumen final de la reacción.

### 3.2.3 Propagación de errores mediante el método de derivación

El cálculo de la propagación de errores para mediciones indirectas de concentraciones (corrección de concentración), fue determinado mediante la fórmula general de propagación de errores, según la siguiente ecuación:<sup>46</sup>

$$\delta Z^2 = \sum_{i=1}^{i=n} \left( \frac{\partial Z}{\partial x_i} \right)^2 (\delta x_i)^2$$

Donde  $\delta Z$  es el error neto de la medida resultante y  $\delta X$  es el error asociado a cada parámetro X de medición.

## 3.3 Reacción PEGMal -AcMo

### 3.3.1 Preparación de la solución del polímero PEGMal:

Se utilizó una proporción 4:1 de la cantidad en mol de PEGMal respecto a los mol de -SH, cuyo equivalente en masa se obtuvo al multiplicar los mol de PEGMal por el valor de su masa molecular (2941.64g/mol). Esta cantidad de PEGMal se colocó en un tubo eppendorf estéril, al que se agregó 200µL de volumen de solución salina (solución G, anexo I)<sup>30</sup>, y se agitó durante 30 seg. en vortex. Finalmente se ajustó esta solución a una concentración fija, adicionando volumen de solución G.

### 3.3.2 Reacción PEGMal-AcMo:

En un matraz de reacción de tres bocas de 100mL previamente esterilizado, fueron depositados los volúmenes de AcMo tiolados, el volumen de la solución de PEGMal y un volumen de solución G en cantidad necesaria para llevar el volumen de

reacción hasta 2mL<sup>30</sup>, bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> en agitación moderada durante 12 horas y a una temperatura de 20°C.

### 3.4 Comprobación de la unión PEGMal-AcMo

#### 3.4.1 Electroforesis

##### *Gel SDS-PAGE al 15%:*

El gel fue preparado en un volumen de 5mL, éste se obtuvo de mezclar 2.5mL de Acrilamida bisacrilamida (solución H, anexo I), 1.3mL de buffer pH 8.8 (solución I, anexo I) y 1.2mL de agua desionizada. Esta mezcla fue agitada en una parrilla con agitación magnética durante 5 minutos y en seguida se adicionaron las siguientes soluciones: 50µL de solución de SDS (solución J, anexo I), 10µL de solución de persulfato de amonio (solución K, anexo I) y 5µL de TEMED (Sigma U.S.A.). La mezcla fue colocada en el molde para gel del equipo de electroforesis y se dejó gelificar durante 15 minutos. Posteriormente se preparó un gel concentrador en un volumen de 3mL, el cual se obtuvo de mezclar 400µL de Acrilamida-bisacrilamida (solución H, anexo I), 370µL de buffer pH 6.8 (solución L, anexo I) y 2.1mL de agua desionizada. La mezcla fue agitada en una parrilla con agitación magnética durante 5 minutos y en seguida se adicionaron las siguientes soluciones: 30µL de solución J, 15µL de solución K y 5µL de TEMED. La mezcla fue vaciada en la cámara de electroforesis, justo encima del gel separador, y se le colocó un peine para crear los canales de depósito de muestra, posteriormente se dejó gelificar por alrededor de 15 minutos.

##### *Preparación de las muestras*

Las muestras se prepararon a una concentración de 3-5µg/µL de AcMo y a cada muestra se le adicionó colorante de Leammli reductor o no reductor (mezcla M, anexo I). Si la muestra era de menos de 5µL, se completaba hasta este volumen con colorante, si era de menos de 10µL, se agregaba colorante para completar 11µL; y para muestras mayores a 10µL se agregaba colorante para completar 16µL (procurando que para estos casos el volumen de colorante no fuera menos de 4µL). La utilización de Leammli reductor o no reductor, se determinó en función de mantener intacta la estructura terciaria del AcMo y sus enlaces disulfuro (no reducción) o si se deseaba desnaturalizar el AcMo mediante el corte de los enlaces disulfuro (reducción). Para desnaturalizar los AcMo con el buffer Leammli reductor, las mezclas fueron incubadas en agua a 95°C por 5 minutos, y al término, cada mezcla fue depositada en hielo hasta el momento de ser colocada en el gel concentrador (véase “*Condiciones de corrimiento electroforético*” de éste capítulo). Para el no reductor, una vez obtenida la mezcla AcMo-colorante, ésta fue cargada en el gel concentrador.

##### *Condiciones de corrimiento electroforético*

Una cámara de electroforesis (Amersham, Estados Unidos) fue llenada con buffer de corrimiento (solución N, anexo I). Las muestras se cargaron en los pozos del gel concentrador (una muestra por canal) junto con 10 µl de marcadores de peso molecular (Prestained protein ladder, Invitrogen, Estados Unidos). La electroforesis fue realizada a 89V durante 2h.

##### *Tinción de proteína en el gel de electroforesis*

Después de la electroforesis, el gel fue retirado de la cámara y fue teñido con una solución de tinción con azul de Coomasie (solución O, anexo I) durante 3 horas. Al

término, el gel fue colocado en una solución para desteñir (solución P, anexo I) durante 12 horas o hasta que el gel quedó completamente transparente de las zonas libres de proteína. Finalmente, el gel fue visualizado con una lámpara de luz blanca y se tomaron fotografías.

### 3.5 Preparación de Inmunoliposomas

#### 3.5.1 Preparación de la capa lipídica.

En un vaso de precipitados de 10mL, se colocaron cantidades de HSPC (Northern Lipids, Canada) / Colesterol(Calbiochem, Canada) / MetoxiPEG(Avanti Polar Lipids, Estados Unidos) / PEGMal (Avanti Polar Lipids, Estados Unidos) / Vitamina-E (Biochemika, Suiza), en la proporción molar de 51:42:3:3:1. Estos compuestos fueron disueltos en 10 mL de cloroformo y esta solución fue vertida en un matraz estéril de bola (100mL) con el fin de integrar todos los compuestos hidrofóbicos. La mezcla se agitó en rotavapor (Laborota 400, Heidolph, Alemania) a 90 rpm por 10 minutos sin calentamiento. Posteriormente, el disolvente orgánico se retiró a presión reducida manteniendo el sistema a 240 rpm y 40°C de temperatura. Al final de la evaporación se obtiene una capa lipídica (CL) la cual se introduce en una campana de vacío durante 5 horas<sup>3,4,34</sup>.

#### 3.5.2 Hidratación lipídica.

La CL fue hidratada con 10mL de solución de ssi/HEPES (solución Q, anexo I)<sup>37</sup> y se colocó en el rotavapor a 60 rpm por 1 hora a presión atmosférica normal. La suspensión liposomal formada se dejó reposar a temperatura ambiente y finalmente se almacenó en tubos cónicos de 15mL (Falcon U.S.A).

#### 3.5.3 Homogenización del tamaño liposomal.

La suspensión liposomal fue sonicada (Ultrasonic clear D-150H) por 5 minutos a 40°C, se dejó reposar por 5 minutos y nuevamente fue sonicada bajo las mismas condiciones. Posteriormente la suspensión se llevó a extrusión (Lipex<sup>TM</sup> extruder, Northern Lipids, Canada), con una temperatura de 61°C, utilizando filtros de policarbonato (Whatman Nucleopore, Northern lipids, Canada) de 400 nm (2x), 200 nm (2x) y 100 nm (4x). Al término de la extrusión, la suspensión fue colectada en tubos cónicos de 15mL.

#### 3.5.4 Unión Liposomas-AcMo

*Unión liposomas-AcMo tiolados*<sup>20,30</sup>:

Para la elaboración de la suspensión de inmunoliposomas se emplearon 3mL de liposomas con una concentración de fosfolípidos de 8.15 mg/mL (apartado 3.6.1 de este capítulo), debido a la proporción molar de la formulación liposomal, para mantener una proporción 1:1 entre el -SH y el PEGMal, en esa concentración de fosfolípidos se debe hacer reaccionar  $3.36 \times 10^{-7}$  mol de -SH. Según el índice de tiolación (Tabla I del capítulo de resultados), los 3 mL de liposomas se deben mezclar con 28mL de AcMo tiolados para obtener una reacción de acoplamiento del 100%. Al no contar con ese volumen de AcMo tiolados, se decidió utilizar un volumen de 2.6mL (con  $1.19 \times 10^{-8}$  mol de -SH) y 0.4 mL de solución HEPES (pH 6.8) (solución Z, anexo I). La



suspensión liposomal fue depositada en un matraz de tres bocas estéril junto con la solución de AcMo tiolados y se llevó a un volumen final con solución Z. Esta mezcla fue colocada en agitación magnética moderada y a una temperatura de 20°C por 12 horas en atmósfera inerte de N<sub>2</sub>. Al término de la reacción, la mezcla fue almacenada en tubos eppendorf.

### 3.5.5 Cromatografía de exclusión de tamaño y comprobación de la unión AcMo-liposoma.

Con el fin de evaluar la unión de liposomas con el AcMo tiolado se utilizó esta técnica de cromatografía con columnas de exclusión de tamaño. Se utilizó una bureta de 25mL, previamente lavada con EtOH al 70% v/v, la cual se llenó al tope con la misma solución de EtOH, manteniéndose así durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el EtOH y se sustituyó con 14 mL de Cefarosa CL-4B<sup>14,41</sup> (GE, U.S.A.). La columna se lavó primero con EtOH al 30%, y con agua desionizada estéril. Finalmente la columna fue equilibrada con solución ssi/HEPES<sup>14</sup> (solución Q, anexo I).

#### *Separación cromatográfica*

Se procedió a obtener los perfiles de elusión de inmunoliposomas, liposomas (sin AcMo), AcMo tiolados y de una mezcla de liposomas (sin PEGMal) con AcMo tiolados, y determinar para cada caso el tiempo de retención de cada analito. Cada suspensión fue depositada en la columna de separación cromatográfica, en volúmenes de 2mL, y eluidos con fracciones de 2mL de solución Q. La elusión se recolectó en fracciones cada 5 minutos en tubos eppendorf de 2mL, los cuales se almacenaron en refrigeración para su posterior cuantificación de fosfolípidos y AcMo.

La cantidad (µg) de AcMo en la elusión de inmunoliposomas y de la mezcla física liposomas/AcMo fue determinada mediante cuantificación con ácido bisinconínico<sup>45</sup>; se utilizó una curva de calibración con 6 concentraciones de BSA en placas de 96 pozos; cada fracción de la elusión fue concentrada hasta el 50% de su volumen original (SpeedVac Concentrator, Thermo), y posteriormente cada muestra fue alícuotada (250µL) en tubos eppendorf de 1mL. Las alícuotas fueron secadas nuevamente mediante centrifugación al vacío para posteriormente cuantificar la cantidad de AcMo (véase apartado 3.6.2 de éste capítulo). Finalmente, con estos datos se obtuvo una curva de *t de elusión vs µg de AcMo*. Para el caso de los AcMo tiolados, estos se cuantificaron siguiendo el método de Bradford descrito anteriormente. La cantidad de inmunoliposomas en cada fracción se determinó de forma análoga mediante la cuantificación de fosfolípidos de cada muestra utilizando el método de Stewart (apartado 3.6.1 de este capítulo), para lo cuál, se emplearon 25µL de muestra concentrada hasta el 50% de su volumen. Con estos datos se obtuvo una curva de *t de elusión vs concentración de fosfolípidos*.

### 3.5.6 Cromatografía en capa fina.<sup>48</sup>

#### *Condiciones de la placa de cromatografía*

Una placa para cromatografía en gel de sílice de 10x15 cm (Flexible Plates for Silica Gel, Whatman) fue eluída (solución S, anexo I) en una cámara de elusión de vidrio provista de una placa de papel absorbente de 20x20 cm. Una vez que se eluyó por completo la placa hasta la parte superior, ésta fue retirada de la cámara para la posterior adición de las muestras.

### *Separación cromatográfica de muestras*

Para el estudio cromatográfico de la presencia de AcMo en los inmunoliposomas, fueron depositadas en la placa liposomas sin AcMo, AcMo tiolados, AcMo de referencia, una solución de PEGMal en MeOH y otra de MPEG en MeOH, así como de una muestra de inmunoliposomas. Las muestras de liposomas (con AcMo y sin AcMo), antes de ser depositadas en la placa, fueron desmembradas adicionando 3 veces su volumen de solución de ruptura (solución S, anexo I); finalmente, todo el volumen de estos liposomas en solución fue depositado en la placa. Una vez que la placa cromatográfica estuvo completamente seca de solución S, se colocó una muestra por carril a 1.5cm de distancia de la parte inferior de la placa, éstas se dejaron secar completamente y la placa fue introducida en la cámara para ser eluidas con la solución S hasta 1cm de distancia de la parte superior de la placa, posteriormente se retiró de la cámara y se dejó secar por 24 horas.

### *Revelado de las muestras de cromatografía*

La placa de cromatografía fue revelada con una solución para proteínas (solución T, anexo I), mediante un aspersor de vidrio, posteriormente la placa se secó por 24 horas y fue evaluada con luz blanca.

## 3.6 Evaluaciones analíticas

### 3.6.1 Cuantificación de lípidos (reacción de Stewart).

#### *Curva patrón:*

Una solución de HSPC fue preparada a una concentración de 0.12mg/mL en cloroformo, de la cual fueron preparadas por triplicado diluciones para la curva patrón, de ésta fueron tomados 2 mL y se mezclaron mediante agitación en vórtex, con 2mL del reactivo colorimétrico (solución U, anexo I) por 2 minutos. Al término cada muestra se centrifugó a 500 rpm (centrifuge 5702 R, Eppendorf, U.S.A.) durante tres minutos. La fase orgánica fue leída a 488nm en un espectrofotómetro (DU 530, Beckman coulter TM, U.S.A.) en celdas de cuarzo de 1mL de capacidad y 1cm de longitud de paso óptico<sup>3,4</sup>.

#### *Muestras.*

Se utilizaron muestras de 25µL de cada fracción eluida (véase apartado 3.5.5, de la sección “*Separación cromatográfica*”) y 25µL de liposomas previa unión del AcMo (véase apartado 3.5.4), los cuáles fueron depositado en tubos de ensayo con tapón junto con 50 µL de mezcla S (por triplicado). Los tubos fueron agitados moderadamente en vortex y posteriormente se agregaron 2mL de cloroformo y 2mL de solución colorimétrica U y la mezcla fue agitada en vórtex por dos minutos para finalmente ser centrifugadas a 500 rpm por 3 minutos. La fase orgánica fue leída a 488nm.

### 3.6.2 Cuantificación de AcMo mediante el método del ácido bisinconínico<sup>47</sup>.

#### *Curva patrón:*

Se hizo una curva patrón con un “stock” de 2µg/µL de BSA con una cantidad máxima de 20 µg, a estos volúmenes les fue agregado 10 µL del reactivo RIPA (solución V, anexo I) y agua desionizada de modo que el volumen total fuera de 30 µL. Posteriormente a cada muestra se le agregaron 300 µL de reactivo de ácido

bicinconínico (solución W, anexo I), la reacción se dejó reposar por 20 minutos y finalmente se determinó su absorbancia a 270nm.

#### *Muestras.*

Las muestras de inmunoliposomas (véase apartado 3.5.5 de la sección “*separación cromatográfica*”) fueron concentradas hasta aproximadamente 50% de su volumen original, de éste concentrado se tomaron 250 $\mu$ L que fueron secados totalmente, y se agregaron 200 $\mu$ L del buffer RIPA (reactivo V, véase anexo I). Cada tubo fue agitado moderadamente en vortex, y se incubaron a 4°C por 15 minutos. Posteriormente cada tubo se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron 25 $\mu$ L por el método del ácido bisinconínico (empleando 300 $\mu$ L de solución W) para obtener la concentración de AcMo.

### 3.6.3 Tamaño de partícula

#### *Determinación del tamaño de partícula*

La determinación del tamaño de partícula se llevó a cabo mediante dispersión dinámica de luz a 90° (Submicron Particle Sizer, Brookhaven Instruments. U.S.A.), con un índice de refracción de 1.33<sup>3,4</sup>, un valor de viscosidad de 0.890cP y una temperatura de 25°C.

#### *Estándar de tamaño de partícula*

En una celda de plástico de 2mL de capacidad y de 1cm de longitud de paso óptico, se colocaron 2 mL de solución de KCl (solución X, anexo I) y de inmediato se agregaron 5  $\mu$ L de un estándar de tamaño de partícula (Brookhaven Instruments. U.S.A.). El diámetro del estándar (partículas de latex) debe ser de  $92 \pm 3.7$  nm para garantizar el buen funcionamiento del equipo.

#### *Muestra*

En una celda de plástico de 2mL de capacidad y de 1cm de longitud de paso óptico, se colocaron 2 mL de la solución X (véase anexo I) y de inmediato se agregaron 10  $\mu$ L de muestra de la suspensión de liposomas antes de ser acoplados al AcMo y después de la unión.

### 3.6.4 Potencial zeta

#### *Determinación del valor de constante dieléctrica del medio de suspensión liposomal*

Se utilizó un volumen de la solución de ssi/HEPES (solución Q, anexo I) en la determinación de su valor de constante dieléctrica (870 liquid dielectric constant meter, BIC corporation USA).

La determinación del potencial zeta se llevó a cabo indirectamente mediante el conocimiento de la movilidad electroforética de partículas en suspensión, detectada por un electrodo de Pd con soporte de acrílico (Zeta Potencial Analyzer, Brookhaven Instruments. U.S.A), con un valor de constante dieléctrica de 78.54 (agua a 25°C).

#### *Estándar de potencial zeta*

En un tubo cónico fueron colocados 5 mL de solución de KCl (solución Y, anexo I) e inmediatamente fueron depositados 10 mg del estándar de potencial Z (BI-ZR3, Brookhaven Instruments. U.S.A.). En una celda óptica de plástico de 2mL de capacidad y de 1cm de longitud de paso óptico, se agregó 1.8 mL del estándar preparado y se sumergió en ella el electrodo del equipo, cuidando de no dejar ninguna burbuja de aire sobre el electrodo. La medición del estándar se debe encontrar entre  $53 \pm 4$  mV.

#### *Muestra*

En una celda de plástico se colocaron 1.8 mL de la solución de KCl (solución Y anexo I) se agregaron 10  $\mu$ L de muestra de la suspensión de inmunoliposomas, se homogenizo perfectamente y se sumergió en la celda el electrodo para evaluar el valor de potencial zeta.

#### 3.6.5 Carga superficial

Una dilución de liposomas 1:5 en ssi/HEPES (solución Q, anexo I), fue utilizada en la determinación del valor de carga superficial (m $\mu$ Tek PCD03 particle charge detector, USA).



# **CAPÍTULO 4**

## ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

## 4.1 Tiempo y temperatura de tiolación

La Figura I muestra los datos obtenidos para la determinación del tiempo de tiolación.

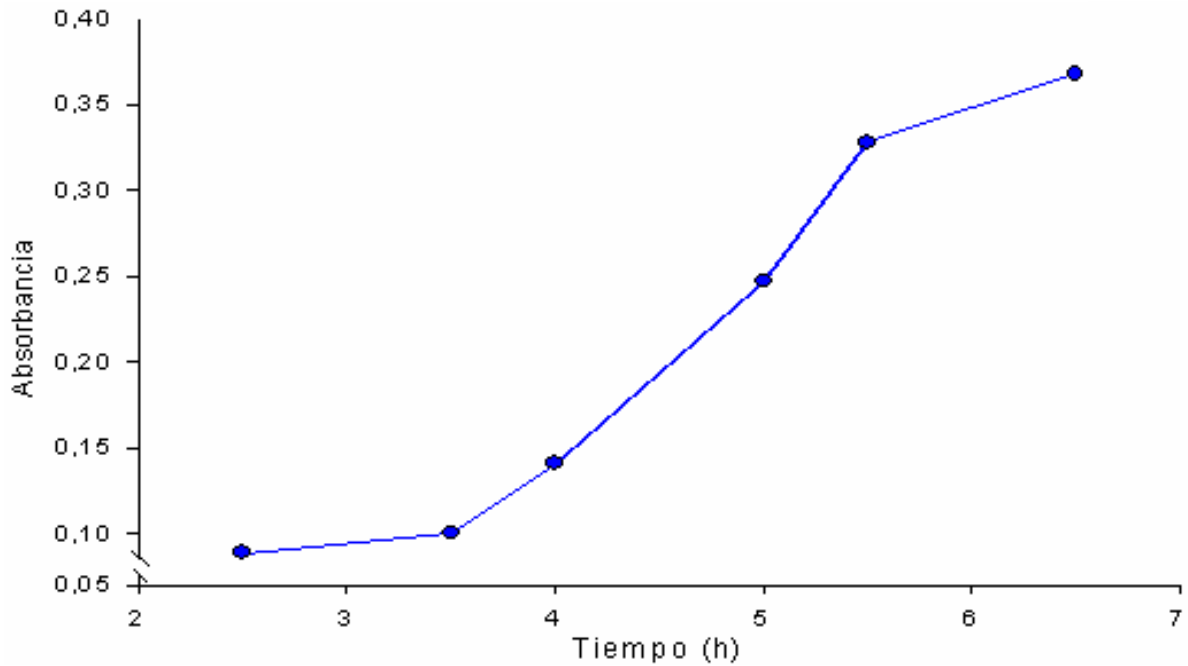


Figura I. Curva de t de tiolación vs Abs<sub>480nm</sub>

Con la gráfica obtenida, se determinó un tiempo de reacción necesario de 6h para la obtención de un índice alto de tiolación a 20°C.

La Figura II muestra los datos obtenidos para la obtención de la Temperatura de tiolación.

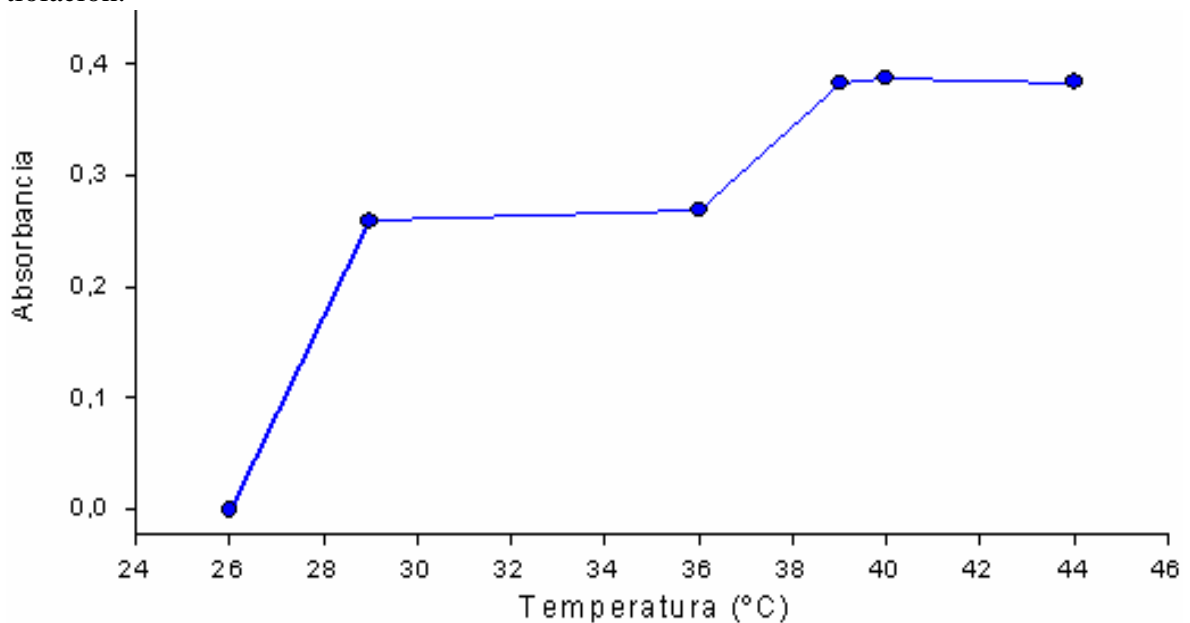


Figura II. Curva de T tiolación vs Abs<sub>480nm</sub>

La curva muestra que a mayores temperaturas, el índice de tiolación se incrementa, no obstante, los valores más elevados corresponden a temperaturas (58-62°C) para las cuáles un AcMo pierde su estructura terciaria y funcionalidad<sup>10</sup>. Dado que la temperatura fisiológica es 37°C, se decidió que ésta fuera la temperatura límite de tiolación de los AcMo. Con las curvas I y II, se estableció que la tiolación de AcMo se llevaría a cabo durante 6h a 35°C.

## 4.2 Tiempo de retención de AcMo en cromatografía de exclusión de tamaño

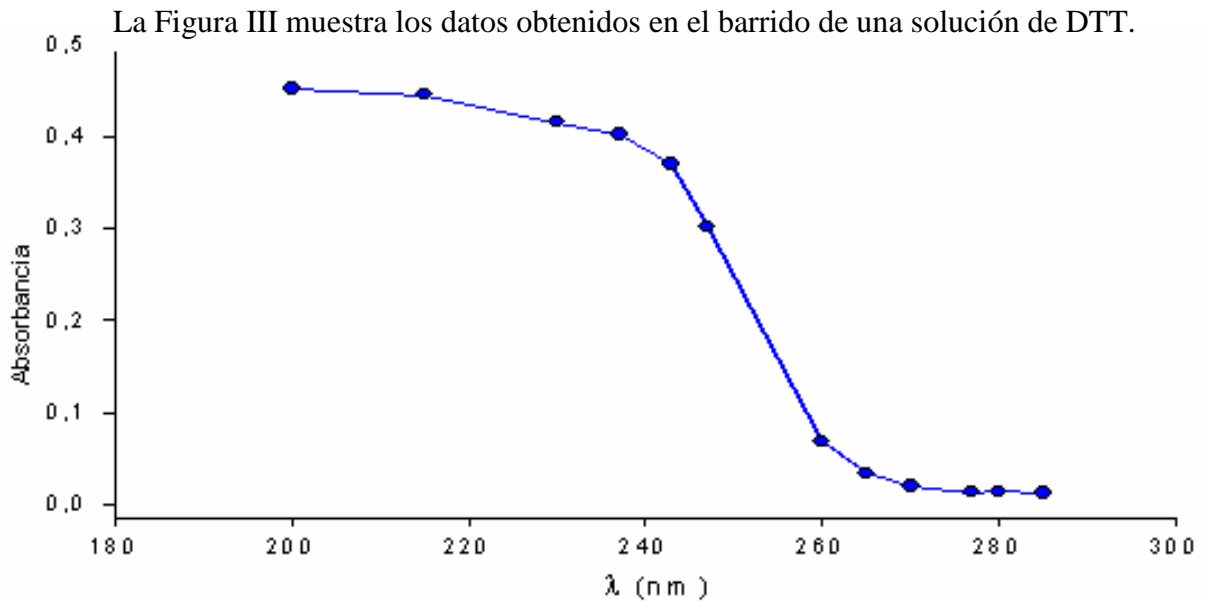


Figura III. Barrido de absorción de una solución de DTT 27mM

La curva anterior, muestra que una solución de DTT, prácticamente no absorbe a 280nm y por lo tanto, es factible detectar AcMo a ésta longitud de onda con DTT en el medio.

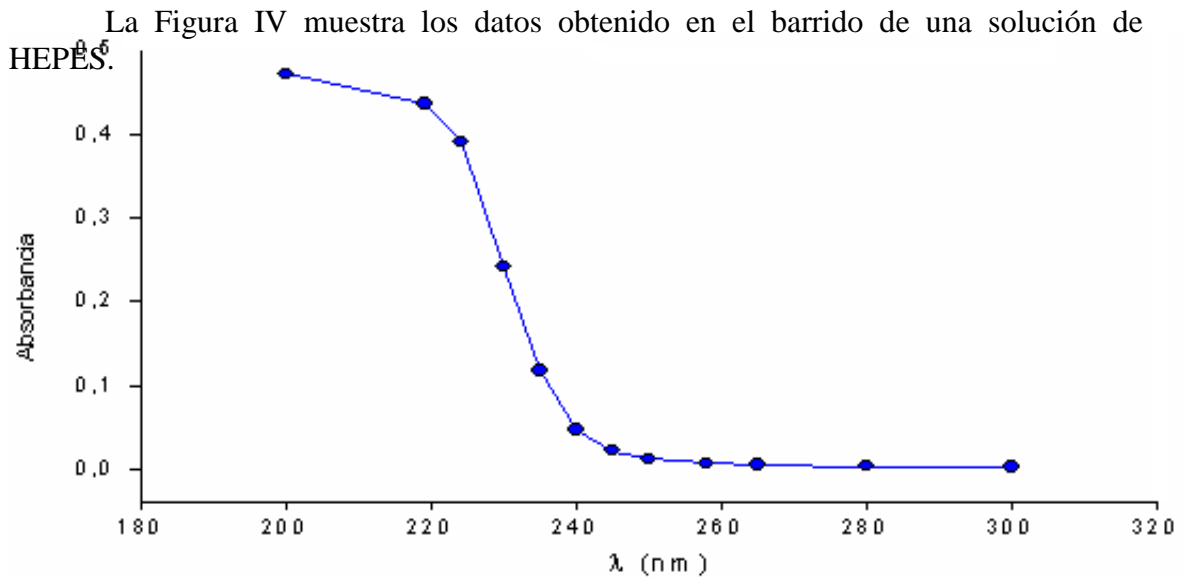


Figura IV. Barrido de absorción de una solución de HEPES pH = 7.05



La curva anterior, muestra que una solución de HEPES pH = 7.05, prácticamente no absorbe a 280nm y por lo tanto es factible detectar AcMo a ésta longitud de onda habiendo HEPES en el medio. Dados éstos resultados, fue realizada una mezcla DTT 27mM/HEPES pH = 7.05.

La Figura V muestra los datos obtenido en el barrido realizado a una solución de DTT/HEPES.

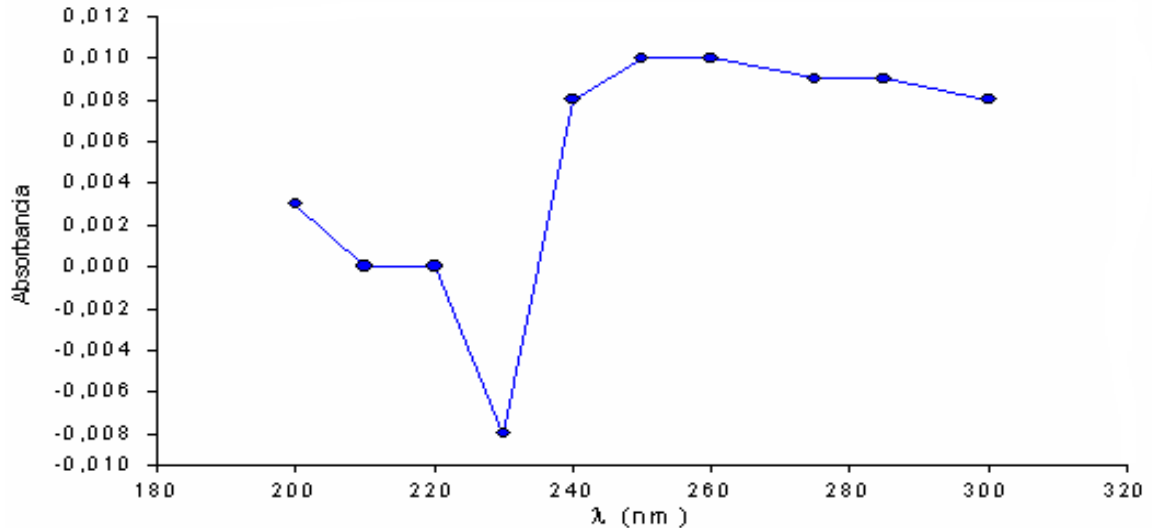


Figura V. Barrido de absorción de una solución de DTT 27mM/HEPES pH = 7.

Esta última curva, muestra que la mezcla DTT 27mM/HEPES pH = 7.05 en proporción respectiva de 1:9, tampoco presentó una absorción considerable a 280nm, por lo que es factible la determinación de AcMo a 280nm, en la evaluación del rango de tiempo de salida de estos de la columna de cromatografía habiendo en el medio DTT/HEPES.

La figura VI muestra los datos obtenidos en la determinación del tiempo de retención de AcMo en columna PD-10.

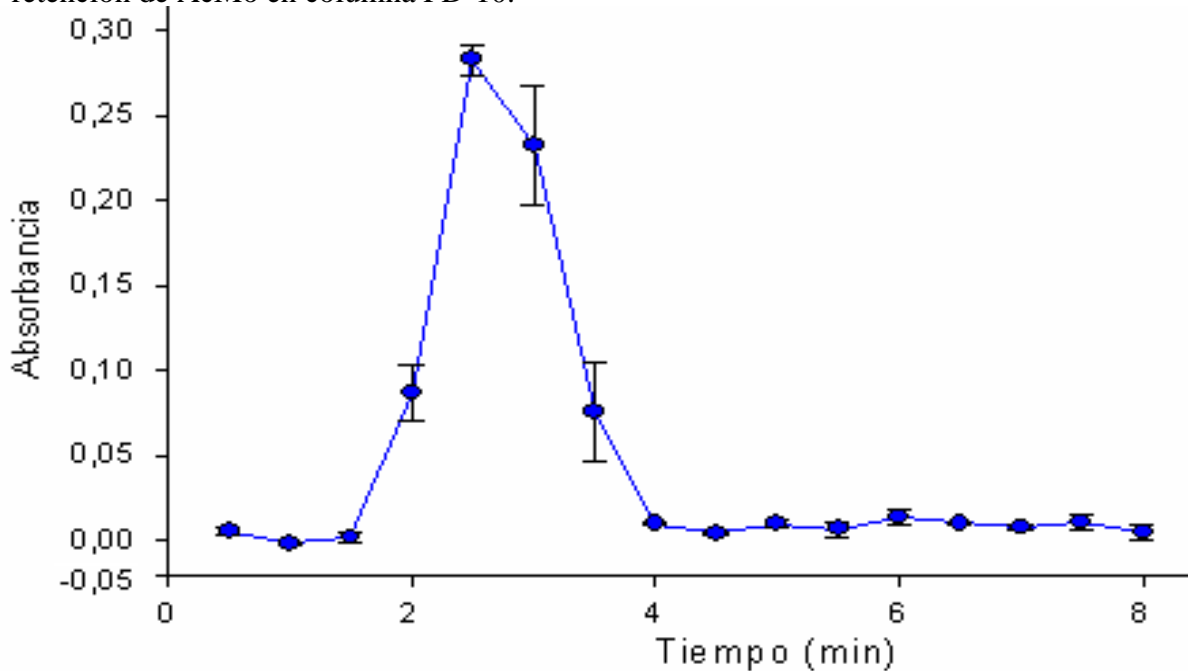


Figura VI. Perfil de elución de Ac en columna PD-10.

Como se observa, el tiempo de retención de los Ac es de alrededor de 3 minutos y el intervalo de salida de éstos es de los 2.5-4 minutos posteriores al cargado de la muestra.

La Figura VII muestra los datos obtenidos en la determinación del tiempo de retención de DTT en columna PD-10.

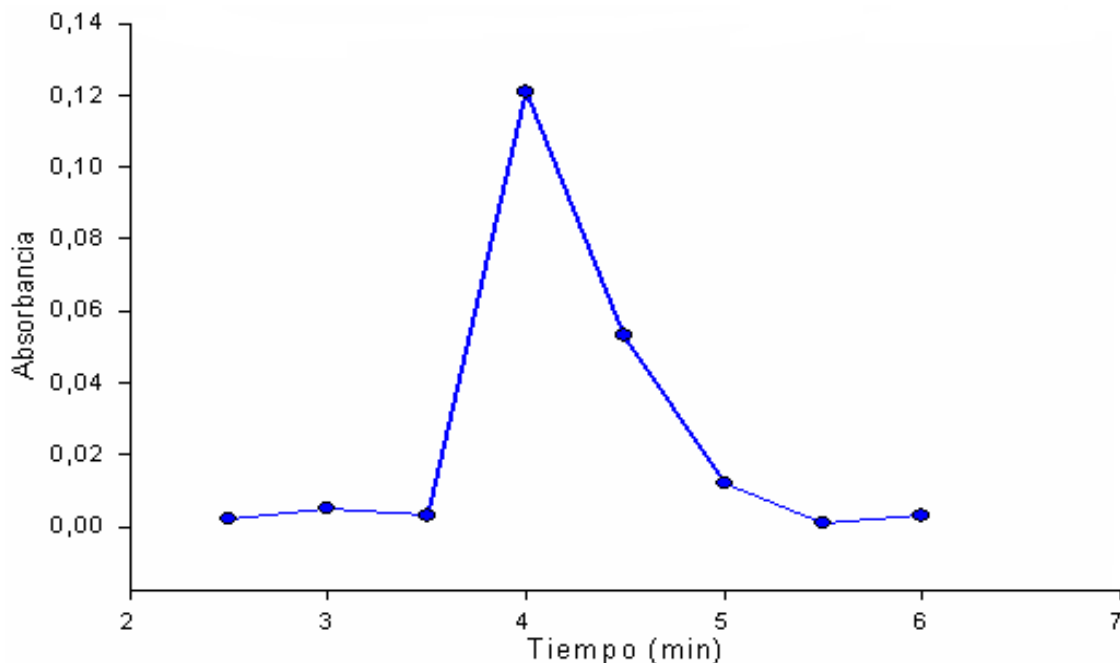


Figura VII. curva de elución de DTT en columnas PD-10

Tal y como lo muestra las Figuras III-VII, es factible la purificación de AcMo tiolados del DTT (utilizando como agente reductor) mediante cromatografía de exclusión de tamaño. El DTT comienza a salir justo en el tiempo al que terminan de salir los Ac (Figura VI), por lo tanto, al hacer la purificación de AcMo la recolección de muestra deberá realizarse hasta los 4 minutos. Así mismo, el eluyente (DTT/HEPES 1:9) no interfiere en la detección de AcMo a 280nm.

### 4.3 Cuantificación de AcMo tiolado y eficiencia de tiolación

La tabla I, muestra los parámetros utilizados en el cálculo del índice de tiolación del AcMo. El valor del nSH indica la cantidad de mol de -SH producidos por reducción de los enlaces disulfuro de los AcMo por mL.

Tabla I

Vol. Reacción (mL)	Vol. de AcMo (mL)	Vol. DTT 195.5mM (mL)	Vol. HEPES pH = 7.05 (mL)	t de reacción (h)	T de reacción (°C)	Índice de tiolación (nSH/mL)
7	4	0.9	2.1	6	35	$1.19 \times 10^{-8}$

La Figura VIII muestra la curva patrón utilizada en la cuantificación del AcMo empleando la técnica de Bradford.

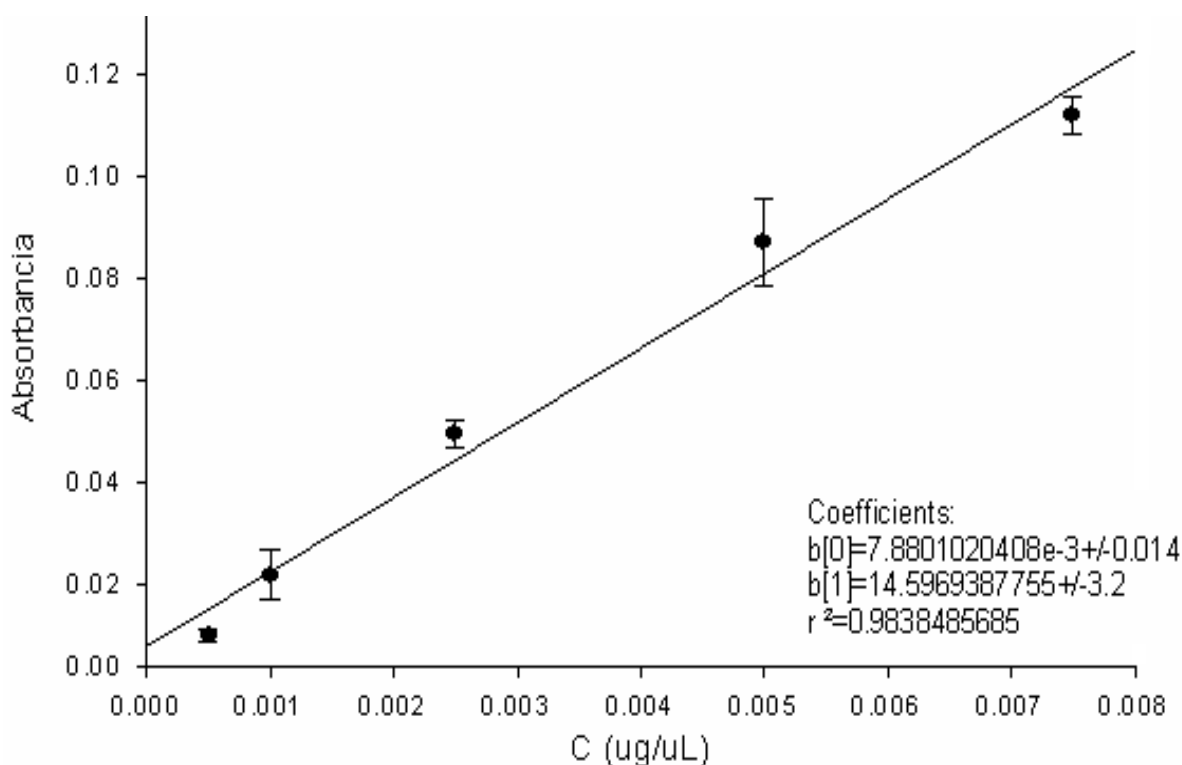


Figura VIII. Curva de calibración en la cuantificación de AcMo

Con base en la curva patrón se determinó una concentración de AcMo tiolados de  $0.7 \pm 0.37 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (donde la concentración teórica era  $1 \text{ mg}/\text{mL}$ ). Se puede mencionar que esta técnica de cuantificación de proteínas contempla la unión del reactivo colorimétrico a los aminoácidos Triptofano, Tirosina, Arginina e Histidina, y es posible que la diferencia del 25% se deba a que la cantidad de estos aminoácidos en el AcMo sea mínima, en comparación con la BSA (usada como solución patrón). Otra explicación podría ser que la estructura terciaria del AcMo impide la unión efectiva del reactivo colorimétrico a los aminoácidos, por lo que se tendría que romper ésta justo antes de la cuantificación con una curva patrón de BSA.

A partir de la masa de AcMo ( $0.7 \pm 0.375$ ) y el índice de tiolación ( $1.19 \times 10^{-8}$ ), se calculó la cantidad de  $-\text{SH}$  presentes por molécula de AcMo:  $1.6 \times 10^{-8} \pm 7.96 \times 10^{-9}$ ;  $n\text{SH}/\mu\text{gAcMo} = 2.48 \text{ nSH}/\text{nAcMo}$ . El resultado implica la formación de 2.5 mol de SH por cada mol de AcMo, o dicho de otra manera, se produjeron 5 mol de  $-\text{SH}$ , por cada 2 mol de AcMo tiolado (que puede ser traducido como la ubicación de 5 sitios de unión a PEGMal por cada dos moléculas de AcMo). De manera teórica, cada mol de AcMo, debe producir 8 mol de  $-\text{SH}$ , de modo que la eficiencia de tiolación fue de 31.25%, es decir, alrededor del 70% de los enlaces disulfuro presentes en cada AcMo no fue reducido, sugiriendo que la estructura terciaria del AcMo puede estar conservada. Si el proceso se realiza a temperaturas mayores de la fisiológica ( $37^\circ\text{C}$ ), el índice de tiolación se incrementa y la estructura terciaria se perderá. La temperatura utilizada en este trabajo ( $35^\circ\text{C}$ ) fue adecuada para realizar la tiolación del AcMo permitiendo conservar su estructura, y por lo tanto la funcionalidad biológica del anticuerpo. Es importante destacar que el acoplamiento de AcMo a la superficie liposomal mediante la previa

producción de tioles en el anticuerpo es una de las más empleadas y diversos trabajos lo muestran<sup>50,51</sup>, no obstante, hay que destacar que hasta el momento no se ha mostrado algo sobre la eficiencia del proceso ni se ha planteado alguna ecuación que auxilie al respecto como la planteada en este trabajo.

## 4.4 Reacción PEGMal-AcMo

### 4.4.1 Electroforesis

La reacción de PEGMal-AcMo, fue evaluada mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. Con esta técnica se esperaba observar un retraso en el corrimiento electroforético de los PEGMal-AcMo, dado que la diferencia en masa del AcMo, en comparación con la del PEGMal-AcMo, es de aproximadamente 2kDa. La Figura IX muestra el patrón de migración del corrimiento electroforético del AcMo de referencia (AcMo sin tiolar), del AcMo tiolado (AcMo-R), y del PEGMal-AcMo reducido y sin reducir. Se observa un ligero retraso de estos últimos con respecto a la migración del AcMo-R, y se infiere que el PEGMal-AcMo migra de esta manera por haber una unión covalente entre ambos.

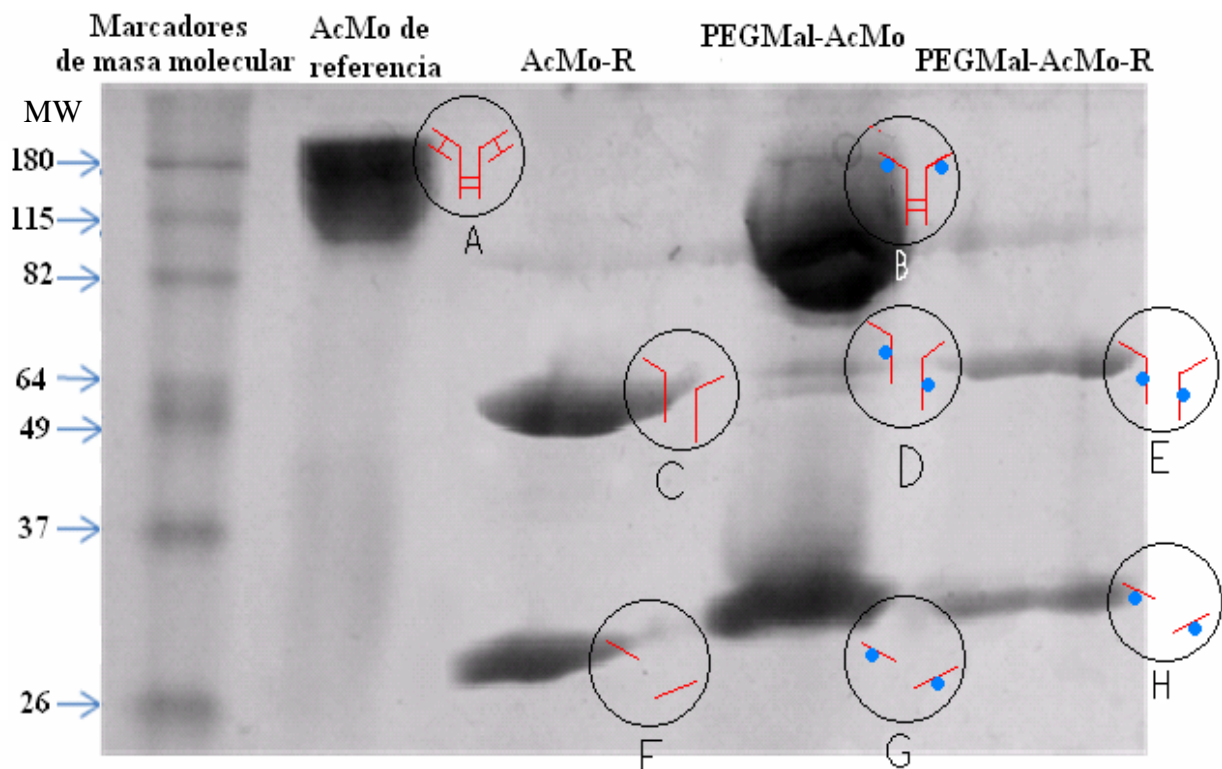


Figura IX, Evaluación electroforética de los PEGMal-AcMo vs AcMo de referencia en un gel SDS-PAGE al 15%. Las figuras que se aprecian al interior de los círculos, corresponden a la representación esquemática del AcMo unido (líneas rojas) al PEGMal (puntos azules) y que explica el patrón de manchas obtenido en el gel.

En el gel se observa la presencia de 3 bandas en el carril que corresponde al PEGMal-AcMo. La banda más gruesa (82 – 180 kDa) en el carril PEGMal-AcMo podría corresponder a la unión del PEGMal con las cadenas pesadas del AcMo (separadas de sus cadenas ligeras, círculo B de la Figura IX), y por esa razón la migración se da a una altura distinta a la del AcMo de referencia. La banda que apenas es visible, y cuya masa es de alrededor de 65kDa, podría deberse a la presencia de las cadenas pesadas, separadas entre sí y de su cadena ligera, y posiblemente unidas al PEGMal (véase círculo D de la figura IX). Por último, la banda correspondiente a las proteínas menos pesadas (26 - 37 kDa), deben ser las cadenas ligeras, las cuales al estar ligeramente retrasadas (respecto al AcMo-R) también podrían estar unidas al PEGMal (véase círculo G de la Figura IX).

El patrón de migración también puso de manifiesto que el proceso de tiolación no afecta en medida importante la unión cadena pesada-cadena ligera, ya que en las bandas correspondiente a esta unión (115 – 180 kDa, véase círculo A de la Figura IX) se observa con una gran cantidad de AcMo, similar al que se observa en el carril del AcMo de referencia. El carril de PEGMal-AcMo-R, muestra que si se reduce el AcMo unido al PEGMal, entonces se rompen por completo todos los disulfuros y se producen dos bandas, una de las cadenas pesadas (~ 64 kDa, véase círculo E de la Figura IX) y otra de las cadenas ligeras (entre 26 - 37 kDa, véase círculo H de la Figura IX). El retraso en el carril, con respecto a la posición del AcMo-R (véase círculos C y F de la figura IX), permite inferir que dichas cadenas están unidas a PEGMal y por ello son más pesadas. La intensidad de las bandas más gruesas en el carril PEGMal-AcMo, ubicadas entre 26 – 37 kDa y 82 – 180 kDa, sugiere que el PEGMal se une mayoritariamente con las cadenas ligeras (26 – 37 kDa, véase círculo G de la Figura IX) y por las cadena pesada (unidas entre si, véase círculo B de la Figura IX). Por todo lo anterior, habría una población importante de inmunoliposomas cuyo AcMo se encuentra conservado en cuanto a su estructura terciaria, y consecuentemente su capacidad de reconocimiento podría no verse afectada.

El patrón de AcMo mostrado en el gel de SDS-PAGE, se corresponde con los diversos trabajos que al respecto han empleado esta herramienta de electroforesis para visualizar AcMo unido y sin unir a cualquier otro compuesto químico que incremente su valor de masa molecular<sup>50,51</sup>.

#### **4.5 Cromatografía de exclusión de tamaño de inmunoliposomas**

La Figura X, muestra los perfiles de elución de inmunoliposomas, liposomas, el AcMo y la mezcla física de liposomas con AcMo. La gráfica indica la cantidad de Masa del analito (AcMo/Fosfolípidos) vs. Tiempo de elución. La cantidad de masa de AcMo que se presenta en la gráfica es 100 veces el valor obtenido, la modificación fue realizada con el fin de que fuera visible la cantidad de Ac en la curva.

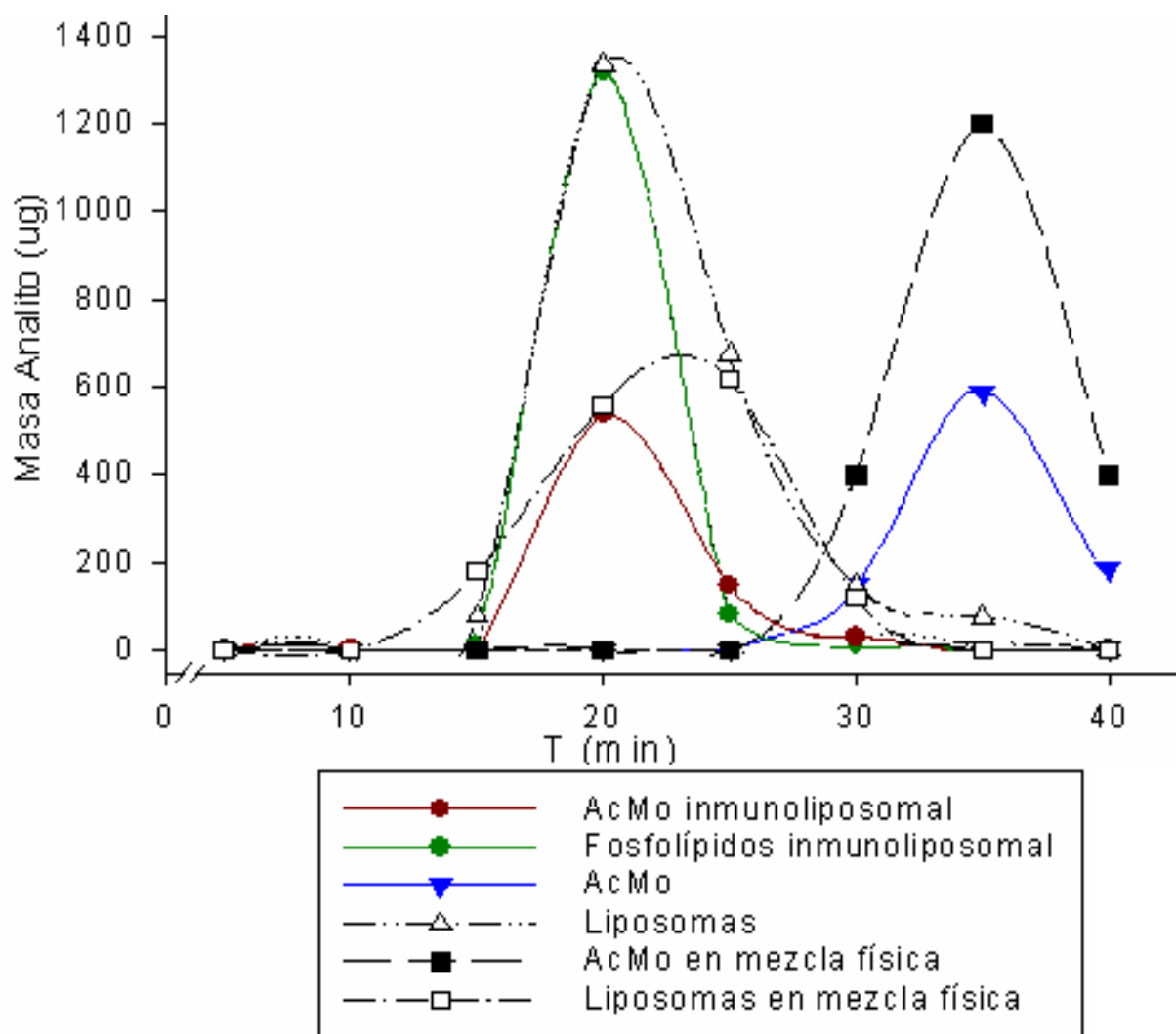


Figura X. Perfiles de elusión de AcMo y liposomas.

La curva muestra que los tiempos de elusión de los AcMo (ya sea en la mezcla física o por separado) es diferente (su detección comienza a partir del min 30), respecto al AcMo inmunoliposomal (15-25 min), este resultado indica que el AcMo estaba unido al liposoma. Así mismo, la elusión de liposomas (ya sea en la mezcla física o por separado) se da prácticamente en el mismo tiempo que los inmunoliposomas.

#### 4.6 Cromatografía en capa fina de inmunoliposomas.

La Figura XI, muestra una placa de cromatografía en capa fina realizada para la visualización de AcMo presente en la suspensión liposomal. La figura XII corresponde a la misma placa de la figura XI, pero muestra en retoque en la primera mitad de la placa con el fin de resaltar las zonas rojas donde se ubica el AcMo.

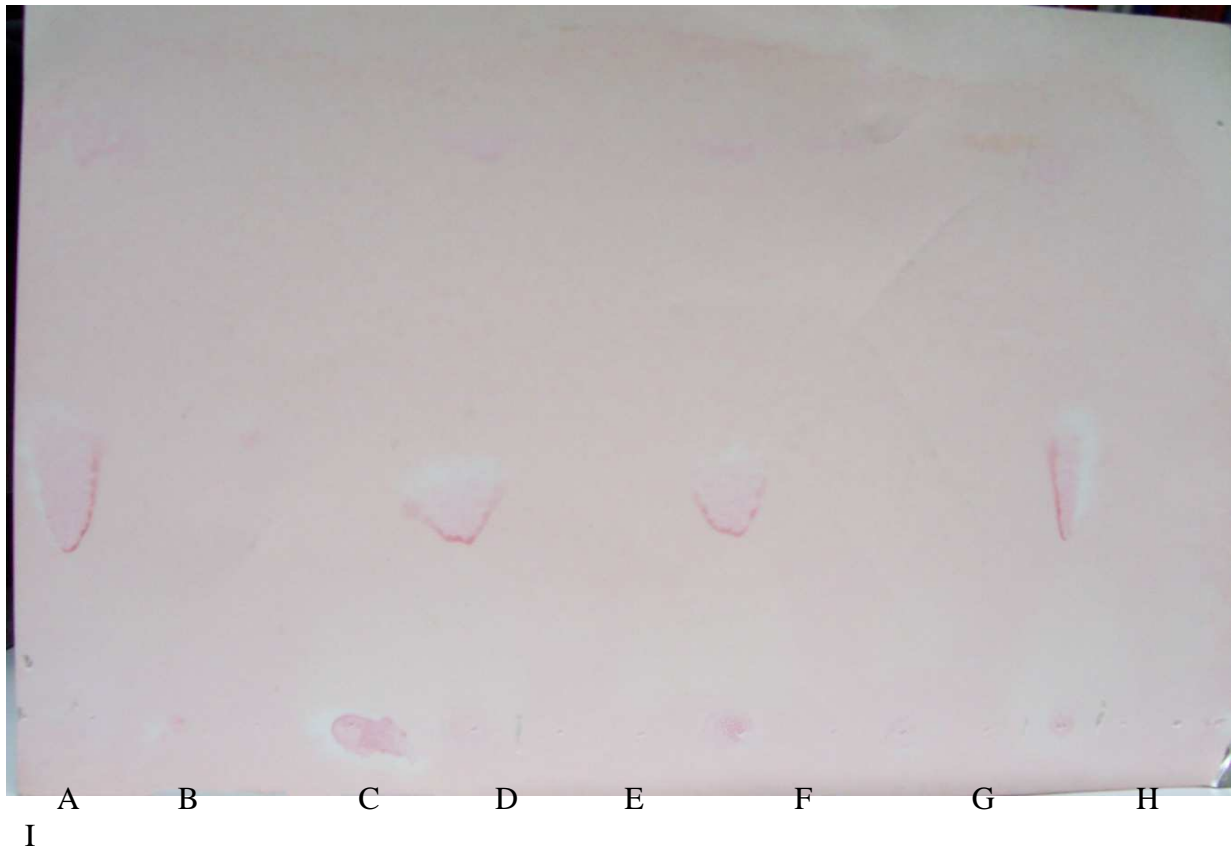


Figura XI, Placa cromatográfica de Inmunoliposomas

Donde A = Liposomas sin AcMo; B = AcMo tiolados; C = AcMo tiolados con 5 veces la concentración de B; D = Inmunoliposomas; E = Pegual; F = Inmunoliposomas a 4 veces la cantidad de D; G = AcMo de referencia; H = Inmunoliposomas al doble de cantidad que D; I = MetoxiPEG. La placa permite identificar la presencia de AcMo en la suspensión de inmunoliposomas. Los carriles B y C comparados con los carriles D, F y H sugieren la presencia de Ac unidos a la superficie liposomal. Las manchas presentes en los carriles A, D, F y H, ubicadas a 4cm aproximadamente del punto donde las muestras fueron depositadas, pueden deberse a un componente lipídico de los liposomas, es decir que esta mancha es una señal inespecífica. La cromatografía en capa fina, mostró ser un método fácil e inmediato para la visualización de AcMo presentes en la suspensión.



Figura XII, Placa cromatográfica resaltando en rojo las zonas donde se ubica el AcMo

Es importante mencionar que hasta el momento, ningún trabajo ha mostrado forma igual o similar de corroborar visualmente la presencia de AcMo presentes en una suspensión inmunoliposomal.

#### 4.7 Cuantificación de Fosfolípidos y tamaño de partícula

La Tabla II, muestra los valores de cantidad de fosfolípidos y tamaño de partícula del sistema. Las Figuras XIII y XIV corresponden al tamaño de partícula.

Tabla II

Cantidad de fosfolípidos del sistema (mg/mL)	Tamaño de partícula sin AcMo (nm)	Tamaño de partícula con AcMo (nm)
8.15 +/- 0.423	125.3 +/- 1.2	130.8 +/- 1.4

La distribución del tamaño de los liposomas fue homogéneo (125 nm, con Índice de Polidispersión de 0.071), y para el caso de los inmunoliposomas, presenta un ligero incremento de 5nm. Aparentemente, la presencia del AcMo en la superficie del liposoma no se ve reflejada en la medición del tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión dinámica de luz. Otro autores han reportado tamaños de inmunoliposomas del orden de 140 – 160 nm<sup>50,51,53-55</sup>.

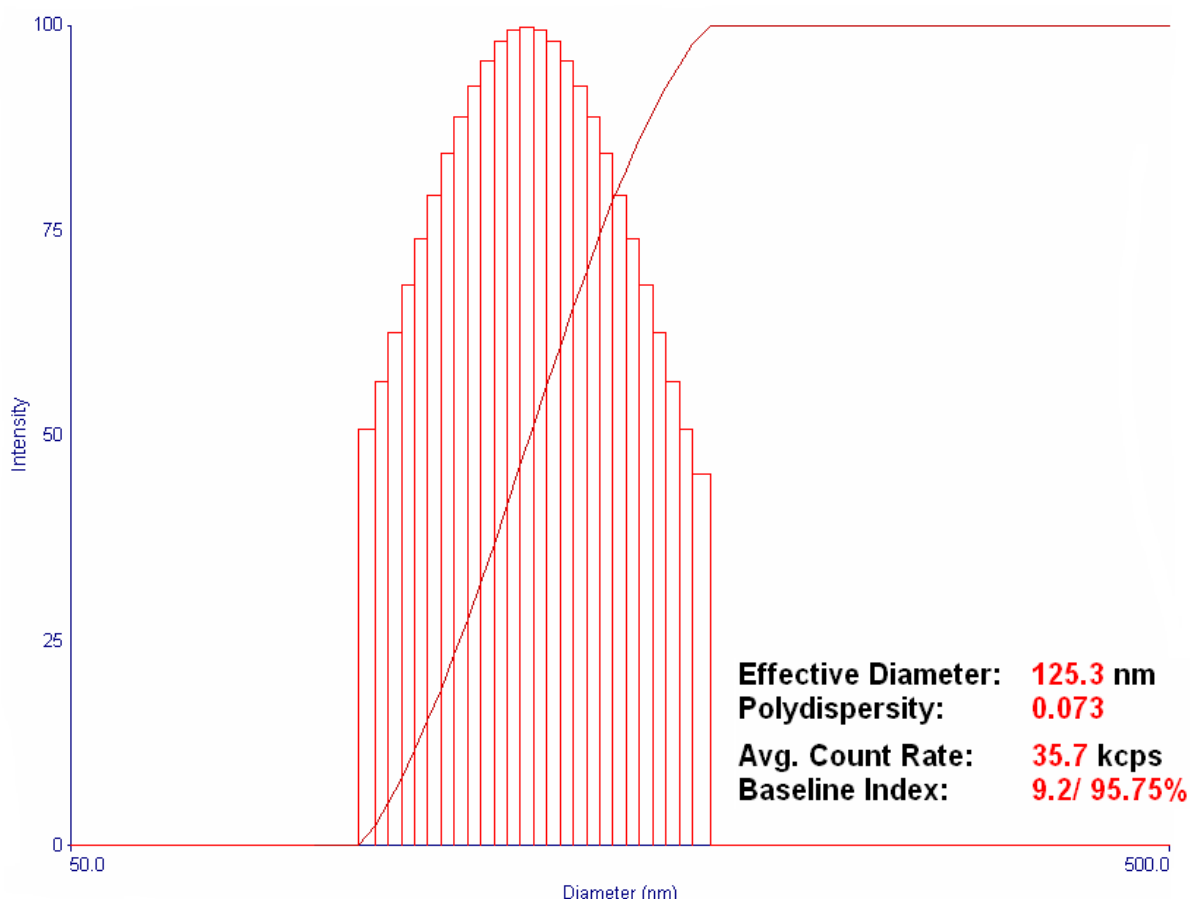


Figura XIII, distribución de tamaño de liposomas sin AcMo



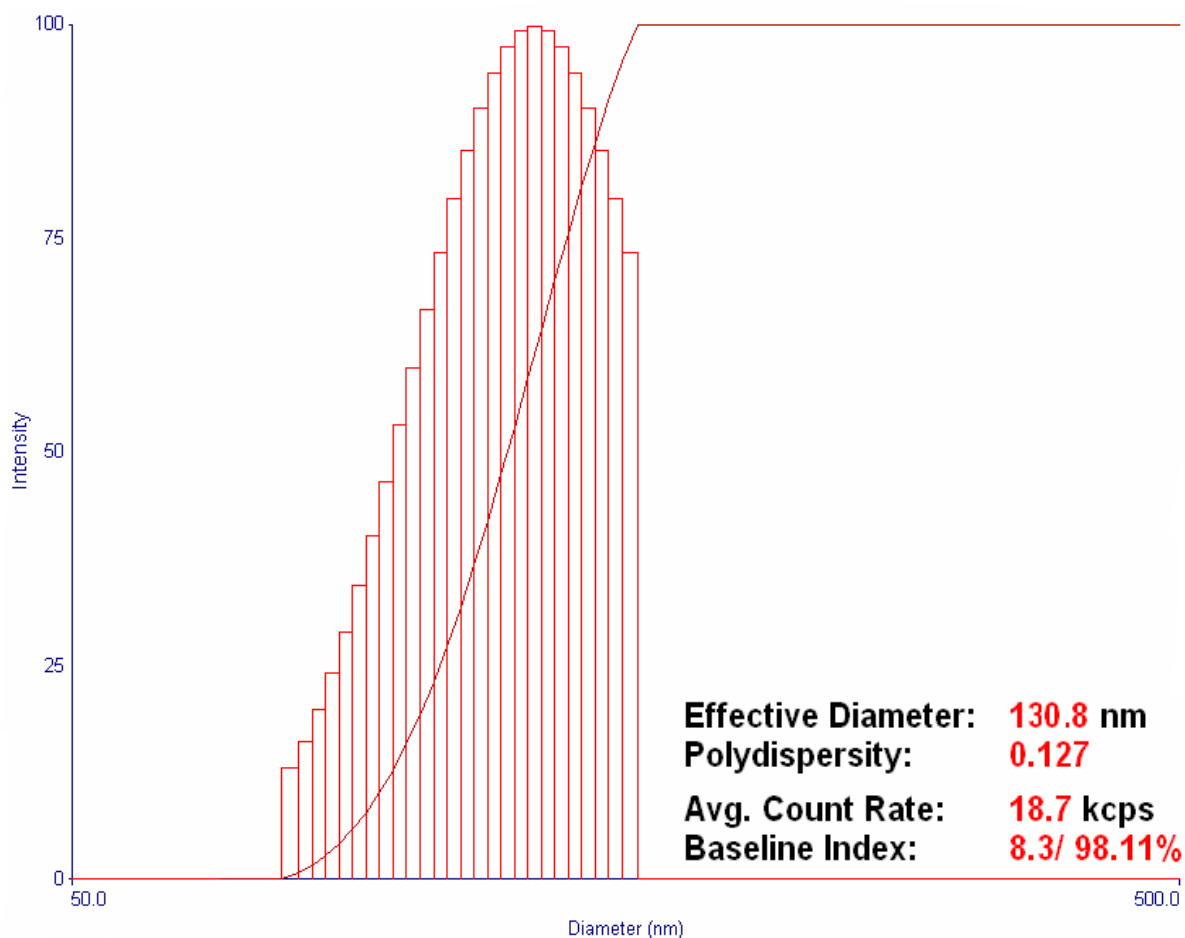


Figura XIV. Distribución de tamaño de liposomas AcMo

#### 4.8 potencial zeta y carga superficial

La Tabla III, muestra los valores obtenidos de constante dieléctrica, potencial zeta y carga superficial. La Figura XV muestra la curva obtenida para el valor de potencial  $\zeta$ .

Tabla III

Constante dieléctrica	Potencial $\zeta$ con AcMo (mV)	Carga superficial con AcMo (mV)
-----	-19.99+/-5.56	-18

Como se puede observar, no fue posible determinar el valor de constante dieléctrica de la solución con la que se elaboraron los inmunoliposomas, de hecho este parámetro es determinado para disolventes sin solutos disueltos, dado este resultado, se decidió emplear el valor de constante dieléctrica del agua a  $25^{\circ}\text{C} = 78.54$  para la evaluación del potencial zeta

Como se puede observar también en la Tabla III, los valores obtenidos de potencial zeta y carga superficial son muy similares, no obstante hay que tener presente

que el potencial zeta es un valor de diferencia de potencial y que el da carga superficial es el valor directo de carga sobre el liposoma, con esto se evidencia la naturaleza del signo de carga eléctrica del liposoma.

El valor de potencial zeta que provee de estabilidad coloidal a una suspensión de este naturaleza<sup>50</sup>, es de valores negativos y es mejor cuando este es menor los -30mV pues allí prácticamente el riesgo de floculación se nulifica; así mismo, este trabajo resultó ser mas grande que los -30mV, y que está en el orden de magnitud reportado por otros autores<sup>50,51</sup>.

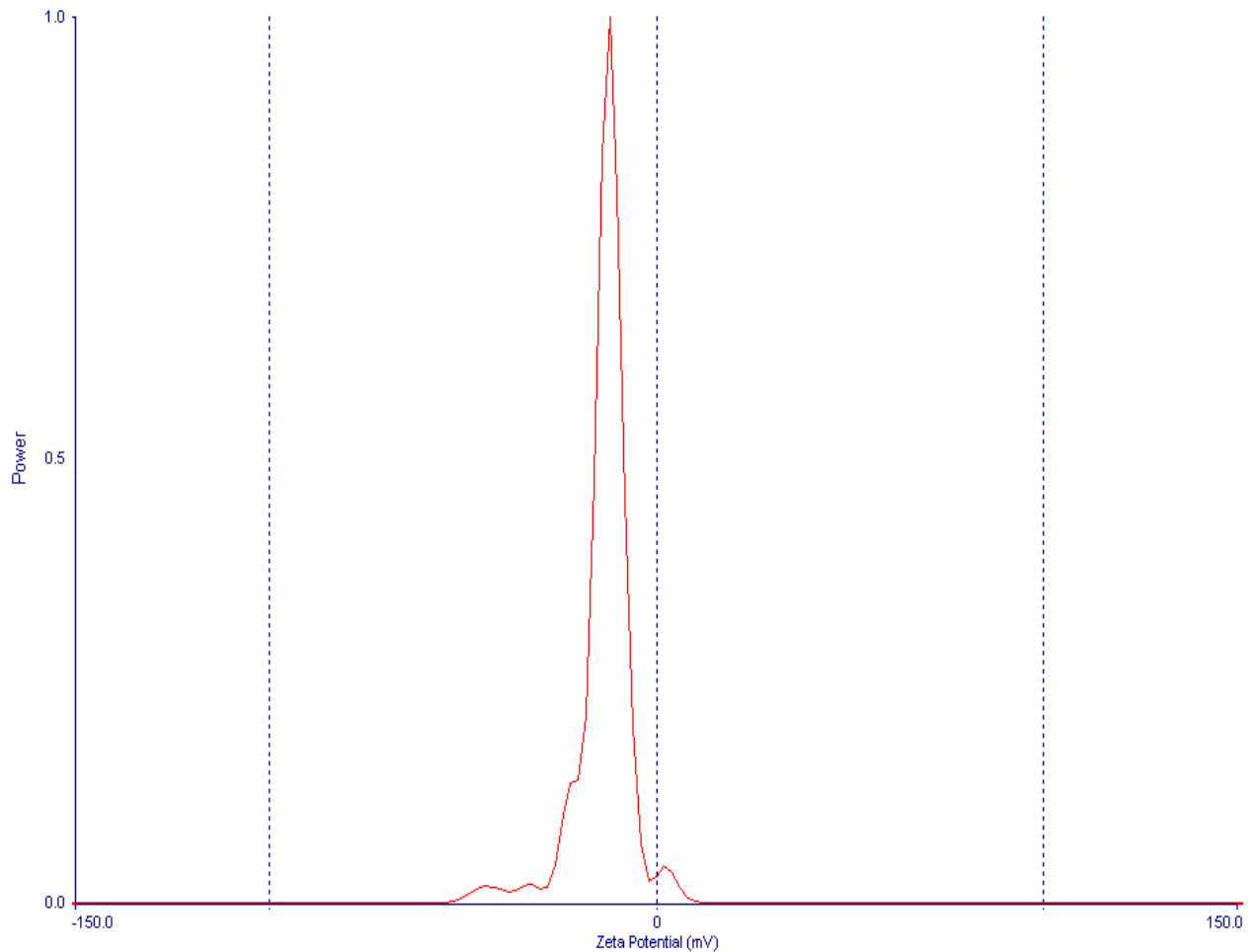


Figura XV. Valor de potencial Zeta de la suspensión inmunoliposomal.

# **Capítulo 5**

*CONCLUSIONES*

## Conclusión General

Se estableció un método para el acoplamiento del AcMo Cetuximan en la superficie de liposomas pegilados (immunoliposomas dirigidos contra el EGF-R). En el estudio se desarrollaron métodos analíticos para la cuantificación del AcMo unido al PEGMal y a la superficie de los liposomas pegilados mediante una reacción colorimétrica. También se desarrolló una metodología de cromatografía en capa fina para la visualización de AcMo presente en la suspensión.

La formación de tioles en AcMo a temperaturas menores a la temperatura fisiológica, muestra rendimientos menores al 50%, es necesario incrementar este rendimiento para obtener mejores resultados experimentales, es por ello que en el trabajo no fue posible determinar un rendimiento o eficiencia de unión de AcMo tiolados a la superficie de los liposomas elaborados.

# Capítulo 6

*BIBLIOGRAFIA*

## Bibliografía:

1. Green J. Rudel L. Environmental Pullulants and Breast Cancer. Environmental Health Perspectives. 2003(11)8:1007-19.
2. Basu S. Harfouche R., et al. Nanoparticle-mediated targeting of MAPK signaling predisposes tumor to chemotherapy. PNAS. 2008;16:7957-61
3. Juárez Osornio C. Elaboración y caracterización de nanoesferas lipídicas cargadas con *cis*-diaminodichloroplatino(II) y marcadas con núcleos radioactivos de In-111 con potencial como sistema de quimiorradiación en tratamiento de cancer. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México 2006.
4. López Rodríguez V. Estudio de biodistribución y farmacocinética de nanoesferas lipídicas cargadas con *cis*-Diaminodichloroplatino(II) y marcadas con núcleos radioactivos de Indio-111 en un modelo tumoral de cancer cérvico uterino en roedores. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México 2008.
5. [www.lifescience-online.com/CETUXIMAB.3922.html?portalPage=Drugs](http://www.lifescience-online.com/CETUXIMAB.3922.html?portalPage=Drugs). Página consultada en Septiembre de 2008.
6. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo II. Edición 9. México 1996. pp 1301-1308, 1348-1350.
7. Arteaga L. C., Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Breast Cancer Res. 2003;5(2):96-100.
8. Park J. W., Kirpotin D., Hong K., et al. Anti-HER2 Immuniliposomes: Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery. Clinical Cancer Research. 2002;8:1172-1181.
9. Maria del Campo J., Prat A. Gil-Moreno A. et al. Update on novel therapeutic agents for cervical cancer. Gynecologic Oncology. 2008(110):S72-S76.
10. Arnoldus W., Norde W., et al. The unfolding/Denaturation of Immunogammaglobulin of Isotype 2b and its F<sub>ab</sub> and F<sub>c</sub> Fragments. Biophysical Journal. 2000;79:2150-54.
11. Vermeer A., Norde W. th The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. Biophys. J. 2000;78:394-404.
12. Lilie H., Jaenicke R. Characterization od a quaternary-structured folding intermediate of an antibody Fab fragment. 1995;4:917-924.
13. Kirpotin D. Drummond D. Shao Y., et al. Antibody Targeting of Long-circulating Lipidic Nanoparticles Does Not increase Tumor localization but Does Increase Internalization in Animals models. American association for cancer research. 2006;66(13):6732-6740.
14. Lopes de Mendez D., Pilarski L.M. In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal Doxorubicin to Human B-Cell Lymphoma. Cancer Research. 1998;58:3320-30.
15. Gigi N.C., Lincoln A. E. et al. Modulation of cáncer cell survival pathways using multivalent liposomal therapeutico antibody constructs. Mol Cancer Ther. 2007;6(3):845-855.
16. Schmiedel J., Blaukat A., Li S. Matuzumab Binding to EGFR Prevents the Conformational Rearrangement Required for dimerization. Cancer Cell. 2008;13:365-373.
17. Yarden Y. Sliwkowski. Untangling the ErbB network. Molecular cell biology. 2001;2:127-137.
18. Slamon D., Leyland-Jones B., Shack S., et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 . N. Engl. J. Med. 2001;344(11):783-92.
19. Agarwal A., Saraf S., Asthana A. Ligand based dendritic systems for tumor targeting. International Journal of Pharmaceutics. 2008;350:3-13
20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Details-Search&Term=cetuximab+og> Página consultada en Noviembre de 2008.
21. Pan X., Lee R. J. Construction of anti-EGFR immunoliposomes via folate-folate binding protein affinity. International Journal of Pharmaceutics. 2007;336:276-83.

22. Erenpeisa J., Cragg M. Cancer: A matter of life cycle?. *Cell Biol. Int.* 2007;31:1507-1510.
23. Farohkzad O., Cheng J., et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. 2006;103(16):6315-20.
24. Arteaga L. C., Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003;5(2):96-100.
25. Lu Z., Jiang G., Blume-Jensen P. Epidermal Growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Molecular and Cell Biol.* 2001;21(12):4016-4031.
26. Lee C., Shrieve D. Zempolich K. Correlation Between Human epidermal Growth Factor receptor family (EGF-R, HER-2, HER-3, HER-4) phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology.* 2005;99:415-421.
27. Vilorio A., Rak J. Rockwell P., et al. Neutralizing Antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor Tyrosine Kinases Down-regulate vascular Endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo. *American Journal of Pathology.* 1997;151(6):1523-1530.
28. Mendelshon J. Blockade of receptors for Growth Factors: An anticancer Therapy. *Clinical Cancer Research.* 2000;6:747-753.
29. Kirpotin D. Drummond D. Shao Y., et al. Antibody Targeting of Long-circulating Lipidic Nanoparticles Does Not increase Tumor localization but Does Increase Internalization in Animals models. *American association for cancer research.* 2006;66(13):6732-6740.
30. Martin F. J., Papahadjopoulos D. Irreversible coupling of Immunoglobulin Fragments to preformed Vesicles. *The journal of biological chemistry.* 1982;257(1):286-288.
31. Iden D. L., Allen T. M. In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach. 2001;1513:207-216.
32. Sao K. Murata M., Umezaki K. Molecular Design of protein-based nanocapsules for stimulus-responsive characteristics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2009;17:85-93.
33. Bao A., Phillips W., Goins B., et al. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. *International Journal of Pharmaceutics.* 2006;316:162-169.
34. Sapiro P. Allen T. Internalizing Antibodies are Necessary for improved Therapeutic Efficacy of Antibody-targeted Liposomal Drugs. *Cancer Research.* 2002;62:7190-7194.
35. Escobar-Chavez J., Lopez-Cervantes M., et al. Applications of thermoreversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm Pharmaceut. Sci.* 2006;9(3):339-358.
36. Zhang Y., Lam Y.M. Controlled synthesis and association behavior of graft Pluronic in aqueous solution. *Colloid and Int. Sci.* 2007;306:398-404.
37. [www.cellgro.com/shop/files/documents/HEPES\\_buffer.pdf](http://www.cellgro.com/shop/files/documents/HEPES_buffer.pdf) página consultada en Octubre de 2008.
38. Zhang S., Marini D. M., et al. Design of nanostructured biological materials through self-assembly peptides and proteins. *Current opinion in chemical biology.* 2002;6:865-71.
39. Lowe C. R. Nanobiotechnology: the fabrication and applications of chemical and biological nanostructures. *Current Opinion Struct. Biol.* 2000;10:428-34.
40. Gothelf K., LaBean T. DNA-programmed assembly of nanostructures. *Org. Biomol.Chem.* 2005;3:4023-37.
41. Spragg D., Alford D., et al. Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cell: A strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94:8795-8800.
42. Inssok H. Mee S., et al. Liposome formulations for effective administration of lipophilic malonateplatinum(II) Complexes. *Jpn. J. Cancer Res.* 2002;93:1244-49.

43. Wang S. X., Bao A., Herrera S., et al. Intraoperative  $^{186}\text{Re}$ -liposome Radionuclide Therapy in a Head and Neck Squamous cell Carcinoma Xenograft Positive Surgical Margin Model. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(12):3975-83.
44. Gigi N. C., Bally M., Mayer L. Targeting of antibody conjugated phosphatidylserine-containing liposomes to vascular cell adhesion molecule 1 for controlled thrombogenesis. *Bioch. Et Bioph. Acta*. 2003;1613:115-121.
45. Olson J., Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Current protocol in protein science*. 2007;9:3.4.1-3.4.2.
46. James Stewart. *Single Variable Calculus*. Brooks/Cole Publishing Company. Third edition. California, U.S.A. 1995. pp 484-493, 515-519.
47. Rosenberg M. *Protein Analysis and Purification*. Edition 2. U.S.A. 2005. pp 183-184.
48. Dominguez S. Javier. *Cromatografía en papel y en capa delgada*. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Edición 2. Washington D.C. 1982. pp 35-58.
49. Chung C., Mirakhur B., et al. Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- $\alpha$ -1,3-Galactose. *The new England Journal of Medicine*. 2008;358:1109-17.
50. Gao J., Zhong W., He J. et al. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes. *Int. Journal of Pharmaceutics*. 2009;374:145-152.
51. Kozlowzka D., Foran P. et al. Molecular and magnetic imaging: the value of immunoliposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61:1402-11.
52. Kim I., Kng Y., Lee D., et al. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immuniliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenogrft nude mice. *Journal of contrlled release*. 2009;140:55-60.
53. Simard P., Leroux J. pH sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;381:86-96.
54. Gao J., Sun J., Li H. et al. Lyophilized HER2-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA gene silencing. *Biomaterials*. 2010;31:2655-64.
55. Gunawan R., Auguste D. The role of antibody synergy and membrane fluidity in the vascular targeting of immunoliposomes. *Biomaterials*. 2010;31:900-907.



## Glosario de Abreviaturas

<i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II).
RI	Radiaciones ionizantes.
AcMo	Anticuerpo Monoclonal.
EGF-R	Siglas en inglés de la familia de Receptores del factor de crecimiento Epidérmico.
VEGF	Siglas en inglés del Factor de Crecimiento del Endotélio Vascular
HER	Siglas en inglés del Receptor Epidérmico Humano.
EGF	Siglas en inglés del factor de Crecimiento Epidermico.
PLGA	Siglas en inglés de Acido Poliláctico-Glicólico.
PSMA	Siglas en inglés del Antígeno Prostático de Membrana.
CL	Capa lipídica.
PEG	Polietilenglicol.
DTT	Ditiotreitol.
DTNB	Acido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico).
TNB	Acido 5-tio-2-nitrobenzoico.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
PEGMal	1,2-Distearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfoetanolamina-N-[Maleimido (Polietilen Glicol ) 2000 ] (sal de Amonio).
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
TEMED	Tetrametiletilendiamino.
HSPC	Siglas en Inglés de la Fosfatidil Colina de Soya Hidrogenada.
MetoxiPEG	1,2-Distearoil- <i>sn</i> -Glicero-3)Fosfoetanolamina-N-Metoxi(polietilenglicol) [-2000](sal de amonio).
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
PS	Ponceau S
ssi	Solución salina isotónica
T	Temperatura
t	tiempo

# **Anexo I**

## Soluciones y Reactivos

### A 1.1 Solución A:

Se pesa la cantidad deseada de DTT (99% de pureza, Sigma Alemania) y se coloca en un matraz aforado y es diluido con agua desionizada (previamente filtrada a través de filtros de tamaño de poro 0.22 $\mu$ m (Millipore, U.S.A.) y desgasificada) hasta aforar. La solución fue congelada hasta su empleo.

### A 1.2 Solución B:<sup>2</sup>

Para 200mL de una solución de HEPES 1X se deben pesar 1.6g de NaCl (Baker México), 0.074g de KCl (Grado biología molecular, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 0.027g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Grado analítico, Merck Alemania), 0.2g de Dextrosa (Sigma-Aldrich) y 1g de HEPES (Sigma-Aldrich Alemania), antes de aforar, la solución es ajustada a pH de 7.6 con NaOH 1M (96% de pureza, Técnica Química S.A. de C.V. México). Finalmente la solución es filtrada con filtros de 0.22 $\mu$ m de tamaño de poro (Millipore, U.S.A.) y es refrigerada a 4°C, a estas condiciones la solución puede ser viable durante 1 mes.

### A 1.3 Solución C:

Esta solución fue idéntica a la B, solo que el pH al que se ajustó ésta fue 7.05.

### A 1.4 Solución D:

Fueron pesados ácido bórico (Grado biología molecular, Promega Estados Unidos) y EDTA (Ultra puro, GIBCO BRL Estados Unidos), de modo que las concentraciones finales sean 100mM y 0.2mM respectivamente. Las sales fueron disueltas en agua desionizada y fue ajustado el pH hasta 8.2 con NaOH 1M (96% de pureza, Técnica Química S.A. de C.V. México).

### A 1.5 Solución E:<sup>22</sup>

Este reactivo comúnmente conocido como reactivo de Ellman, fue preparado pesando 77.1mg de DTNB (99% de pureza, Sigma Estados Unidos) y 56.3mg de Cistamina (Fluka Analytical China) (todo esto para un volumen de reactivo de 20mL), estas sustancias fueron disueltas en aproximadamente 20mL de solución AA (en agitación magnética y manteniendo el sistema a menos de 10°C) y es llevada hasta pH de 7 con NaOH 1M (96% de pureza, Técnica Química S.A. de C.V. México) para disolver todo el DTNB. Finalmente esta solución fue aforada a 25mL. Este reactivo siempre se mantuvo a menos de 10°C durante su empleo y fue almacenado en congelación.

### A 1.6 Solución F:

Esta solución de PBS fue preparada con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM (Grado analítico, Merck Alemania), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM (Grado analítico, Merck Alemania) y NaCl 137 mM (Baker México) y fue llevada a pH de 7.

### A 1.7 Solución G:

Fue preparada una solución de NaCl a 140mM (Baker México) en agua desionizada, ésta fue ajustada a pH = 6.6 con HCl 1M (Fermont México), posteriormente al ajuste, esta solución fue filtrada a través de filtros de tamaño de poro de 0.22µm. Esta solución fue desgasificada siempre antes de su empleo.

#### A 1.8 Solución H:

Esta solución de Acrilamida-bisacrilamida, fue preparada pesando las cantidades necesarias para que la Acrilamida quedara a una concentración final de 29% w/v (99% de pureza, Sigma China) y la bisacrilamida al 1% w/v (99.8% de pureza, Fluka Estados Unidos), todo fue disuelto en agua desionizada. El pesado fue realizado con guantes y cubrebocas, dadas las propiedades neurotóxicas de los reactivos.

#### A 1.9 Solución I:

El buffer a pH = 8.8, fue preparado con Tris (Grado biología molecular, Analytical México) y SDS (Grado biología molecular, Analytical México) en agua desionizada, de modo que las concentraciones finales respectivas fueran 1.5mM y 0.4% m/w. El valor de pH se ajustó hasta 8.8 con NaOH 0.5M (96% de pureza, Técnica Química S.A. de C.V. México).

#### A 1.10 Solución J:

Esta solución de SDS (Grado biología molecular, Analytical México), fue preparada al 10% w/v de concentración en agua desionizada.

#### A 1.11 Solución K:

Esta solución de persulfato de amonio (ultra puro, GIBCO BRL Estados Unidos), fue elaborada de modo que la concentración final de Persulfato fuera 10% w/v en agua desionizada. Esta solución siempre fue preparada minutos antes de su empleo, fue guardada en refrigeración y nunca se empleo con más de una semana de antigüedad.

#### A 1.12 Solución L:

El buffer a pH = 6.8, fue preparada idénticamente a la solución J, sólo que ésta fue ajustada a pH de 6.8 con HCl 0.5M (Fermont México).

#### A 1.13 Mezcla M:

Esta mezcla colorante de proteínas en la modalidad reductora, fue elaborada con cada uno de los reactivos que se muestra a continuación con la concentración que aparece: Tris 62 mM (Grado biología molecular, Analytical México), SDS al 23% (Grado biología molecular, Analytical México), glicerol al 10% (99% de pureza, Sigma Estados Unidos), β-mercaptoetanol al 5% (98% de pureza, Sigma Alemania) y azul de bromofenol al 0.1% (Sigma Alemania). Para el caso de la no reductora, la mezcla fue la misma, a excepción de β-mercaptoetanol

#### A 1.14 Solución N:

Esta solución para el corrimiento electroforético, fue preparada en volumen de 1L, para lo cuál se emplearon 5g de SDS (Grado biología molecular, Analytical México), 15g de Tris (Grado biología molecular, Analytical México) y 72g de glicina (Grado USP,

Research Organics, Estados Unidos), todo fue disuelto en agua desionizada, ésta solución fue filtrada por filtros de tamaño de poro de 0.22 $\mu$ m y refrigerada.

#### A 1.15 Solución O:

Esta solución de tñido, fue elaborada pesando la masa deseada de azul de coomasie, poniendo el volumen necesario de MeOH (Fermont México) y ácido acético (Petroquifin México), de tal suerte que las concentraciones finales respectivas fueran 0.1% w/v, 30% v/v y 7% v/v.

#### A 1.16 Solución P:

Esta solución, es idéntica a la solución O en cuanto a la composición de MeOH (Fermont México) y ácido acético (Petroquifin México), pero no tiene azul de coomasie (sigma Alemania).

#### A 1.17 Solución Q:

Esta solución fue preparada mezclando ssi y HEPES pH 7.05 (Sigma-Aldrich Alemania) en la proporción 1:9. Al término de su preparación, ésta fue refrigerada.

#### A 1.18 Solución R.

Esta solución es idéntica a la A (apartado A 1.1 de esta sección), sólo que su pH final se ajustó con HCl 0.5M hasta ser de 6.8 (Fermont México).

#### A 1.19 Solución S:

Esta mezcla, fue realizada poniendo 14 partes de Cloroformo (99.8% de pureza, HYCEL de México), 5 de Metanol (Fermont México) y 1 de agua desionizada.

#### A 1.20 Solución T:

Este revelador de proteínas, fue preparado al mezclar 0.5mL de solución de Ponceau S (Ponceau S solution, Sigma Alemania), 1mL de acetona (Fermont México) y 2.5mL de agua desionizada.

#### A 1.21 solución U:

Para la elaboración de ésta solución, fueron disueltos 27.03g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (Grado analítico, Sigma-Aldrich Alemania) y 30.4g de NH<sub>4</sub>SCN (Sigma-aldrich Alemania) en un litro de agua desionizada.

#### A 1.22 Reactivo V:

Este reactivo RIPA, fue preparado con NaCl (Baker México), Tris (Grado biología molecular, Analytical México) y Nonidet P-40 (Sigma Alemania), de modo que las concentraciones finales respectivas en agua desionizada fueran 150mM, 20mM y 1%v/v, al término de su elaboración, fue refrigerada.

#### A 1.23 solución W:

Este reactivo, fue preparado poniendo 2 partes de solución de CuSO<sub>4</sub> (Solución al 4%, Sigma Alemania) una junto con 100 partes de solución de ácido bicinónico (Sigma Alemania) una vez mezclados, la solución fue puesta en hielo y alejada de la luz blanca. Una vez elaborada, fue usada de inmediato.

#### A 1.24 Solución X:

Se disolvieron 0.378 g de KCl (Grado biología molecular, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en 0.5 L de agua desionizada (KCl 10mM) y fue filtrada 3 veces por una membrana de 0.22  $\mu$ m (Millipore, USA). Esta solución siempre fue preparada en fresco.

#### A 1.25 Solución Y:

Se disolvieron 37.75 mg de KCl (Grado biología molecular, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en 0.5 L de agua desionizada (KCl 1M), la solución fue filtrada 3 veces por una membrana de 0.22  $\mu$ m (Millipore, USA). Esta solución siempre fue preparada en fresco.

#### A 1.26 Solución Z:

Esta solución es idéntica a la B, sólo que el pH fue ajustado hasta 6.8.

#### A 1.27 Solución AA:

Esta solución fue preparada con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Grado analítico, Merck Alemania) y EDTA (Ultra puro, GIBCO BRL Estados Unidos), de tal suerte que las concentraciones finales de cada uno fué 100mM y 0.2mM respectivamente.