



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Diseño de un bioensayo para la cuantificación de interleucina 2 (IL-2)
contenida en un sistema nanoacarreador”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

IVAN MANUEL VELASCO LOMAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA TERESA CORONA ORTEGA

México, D.F. 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



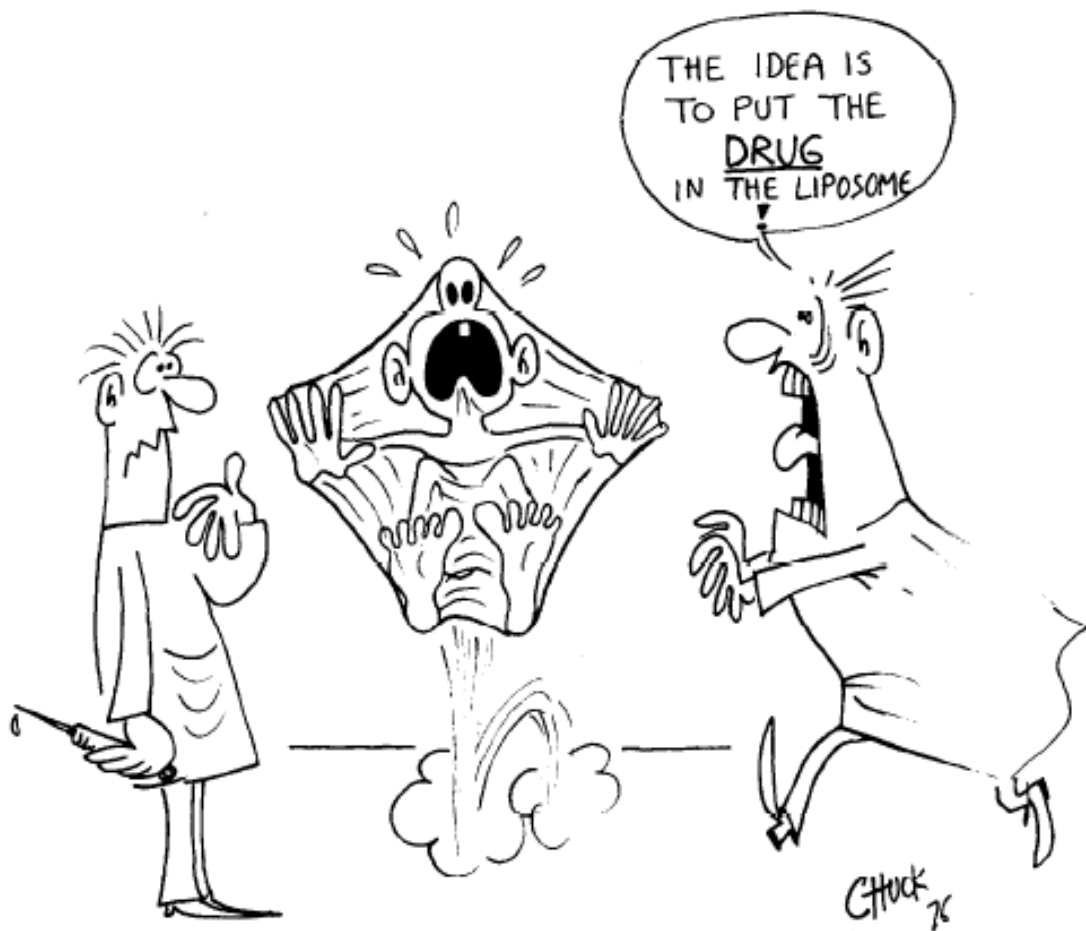
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la Dra. María Teresa Corona Ortega y la asesoría del Dr. Ramón Soto Vázquez. El trabajo fue financiado por los proyectos ICyT PIUTE 10-100 y DGAPA-PAPIIT IN228111.



1

¹ Tomada de Colley C., Ryman B., The Liposome: from Membrane Model to Therapeutic Agent, TIBS, 1997.

AGRADECIMIENTOS

A la FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México

Por brindarme la oportunidad de pertenecer a ella, por abrirme las puertas hacia su sabiduría y conocimiento, por hacer de sus aulas un segundo hogar para mí. Gracias a todas las personas pertenecientes a ella, de corazón, vocación y espíritu, que han hecho posible que en esta institución broten profesionistas excepcionales, pero sobre todo, excelentes compañeros y amigos.

Gracias por hacer de la UNAM una filosofía de vida, en la cual, la excelencia, calidez, compañerismo y fraternidad son la piedra angular con la cual podemos decir orgullosamente que somos zaragozanos.

A la Dra. Tere Corona

Por su paciencia, confianza, apoyo, comprensión y calidez durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por hacer posible que una idea se transformara en un sueño y que ese sueño, al fin, se transforme en una realidad.

Por todos los conocimientos, consejos y regaños que me brindo durante el tiempo que pertencí a su laboratorio.

Gracias por hacer de mí un mejor profesionista. Por todo, mi más grande admiración y respeto.....

Al Dr. Ramón Soto Vázquez

Por depositar su confianza en mí para realizar este pequeño sueño. Gracias por inspirarme motivación, superación y respeto. Por ser un profesor desalineado, extrovertido y poco convencional, ya que gracias a ello, logró ser una fuente de inspiración.

Por lograr que superaré mis propios obstáculos.....gracias.

A la M. en C, Araceli García del Valle

Por su paciencia, disponibilidad y entusiasmo con los cual hizo posible que este proyecto concluyera con calidad.

Por ser una profesora dedicada y comprensiva con todos sus alumnos y compartir un interés en común.....el conocimiento.

Por ser una persona alegre, sincera y sobre todo, por sus comentarios y observaciones que hicieron posible mejorar en amplios aspectos la calidad de este trabajo.

A mis Sinodales M. C. Maurilio Flores Pimentel y M. en C. Losé Luis Trejo Miranda, ya que gracias a su dedicación y compromiso con la comunidad universitaria, hicieron posible la culminación de esta profesión.....muchas gracias

Al Q.F.B. Enrique Escalera Zuñiga.

Por su infinita ayuda, por ser un excelente profesionista, pero sobre todo por ser un excelso amigo.....

Gracias por ser un “motor” que impulso mis deseos de superación en diversos ámbitos de mi vida, por compartir su conocimiento y sabiduría, por ser una persona admirable y hacer de la FES un lugar cálido y placentero.

Gracias a todos por hacer que la UNAM sea sinónimo de lucha, dedicación, entrega, orgullo y ADMIRACIÓN.....

**Dedicada a mis padres Candelaria Ramírez González,
Jesús Lomas Contreras, Martha Lomas Ramírez
y Agustín Velázquez Linares.**

ÍNDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	12
Liposomas	12
Tipos de liposomas	12
Propiedades biológicas atractivas de un liposoma	13
Aplicaciones de liposomas en la ciencia	15
Liposomas en la terapia antineoplásica	16
Interleucina-2 (IL-2)	17
Descripción y propiedades.....	17
Acción farmacológica.....	17
Toxicidad.....	18
Inmunoensayos	18
Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA).....	19
Desarrollo del método.....	24
Validación de Métodos Analíticos/Bioanalíticos	25
Definiciones y parámetros de desempeño.....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
OBJETIVOS	34
HIPOTESIS	35
DISEÑO EXPERIMENTAL	36
METODOLOGÍA	37
Preparación de reactivos	37
Materiales	38
Desarrollo de técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador	40
Optimización y estandarización de técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador	42

Validación de técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador.....	44
Especificidad.	44
Linealidad y curva estándar.	44
Límite de Cuantificación y límite de detección.	45
Intervalo de concentración.....	46
Exactitud.	46
Repetibilidad.....	47
Precisión intermedia.	47
Estabilidad analítica de la muestra.	48
Robustez.....	48
Fabricación de suspensión inyectable de nanoacarreadores con IL-2.....	49
Cuantificación de IL-2, total y expuesta, en el sistema nanoacarreador mediante técnica de ELISA (técnica estandarizada).....	50
DIAGRAMA DE FLUJO	52
RESULTADOS.....	53
Validacion de la tecnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador....	53
Especificidad.	53
Linealidad/Intervalo de concentración.	54
Exactitud y repetibilidad.	56
Precisión intermedia.	57
Estabilidad analítica de la muestra.	58
Limite de cuantificación y limite de detección.	58
Robustez.....	60
Determinación de la potencia de IL-2, expuesta y total.	61
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
CONCLUSIONES.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
ANEXO. FORMULARIO.....	70

RESUMEN

El cáncer cérvico uterino representa un alto índice de mortalidad, especialmente en la población mexicana y aunado a los vertiginosos cambios tecnológicos es necesario dar pauta al desarrollo de productos biotecnológicos como nueva alternativa para combatir este padecimiento.

Los liposomas como sistemas acarreadores son ampliamente utilizados debido a sus características de biocompatibilidad, protección, tamaño, carga, propiedades superficiales y principalmente por poseer un alto potencial como transportador de fármacos, siendo esta última, la que influye directamente en la farmacocinética y biodisponibilidad del fármaco, lo que conlleva a disminuir la toxicidad y prolongar el efecto terapéutico.

La Interleucina 2 (IL-2) al promover la activación y proliferación de los linfocitos T, ha cobrado gran interés como alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cáncer. Su actividad biológica ha sido probada, tanto en animales como en humanos, provocando una regresión de tumores en estados avanzados; con lo cual se ha demostrado su efecto antitumoral. Sin embargo, una administración sistémica puede provocar severos efectos secundarios limitando así su uso.

Para resolver este problema, la IL-2 ha sido encapsulada en un sistema nanoacarreador conformado por liposomas, por lo que en el presente trabajo se desarrollo y valido un bioensayo para cuantificar la IL-2 presente en un sistema nanoacarreador formulado en una suspensión inyectable. Los resultados indicaron que el método propuesto cumple con los parámetros establecidos en la validación de métodos bioanalíticos, por lo que se evaluó de manera confiable y reproducible la potencia de la IL-2 en dicho sistema. Nuestros resultados nos ponen en la posibilidad de ofrecer una composición farmacéutica segura y eficaz para el tratamiento del cáncer cérvico uterino, que cumpla con las recomendaciones de la normatividad tanto nacional como internacional vigentes.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), en México muere una mujer cada 2 horas a causa de cáncer cérvico uterino. Este evento se presenta con más frecuencia en mujeres con bajos recursos, que habitan en una zona rural indígena y que cuentan con poco o ningún acceso a los servicios de salud. En América Latina y el Caribe mueren 33, 000 mujeres al año por esta afección.¹

En los países con programas bien organizados para detectar y tratar las lesiones precancerosas y el cáncer cérvico uterino en estadio temprano, es posible prevenir hasta el 80% de estos cánceres. Sin embargo, en los países de ingresos bajos y medianos ha sido difícil aplicar programas eficaces de cribado sistemático y seguimiento de las mujeres con resultados anormales en las pruebas citológicas. En consecuencia, las tasas de mortalidad por cáncer cérvico uterino son mucho más altas en el mundo en desarrollo.²

Hoy en día, debido a una confluencia de factores, es posible reducir a la mitad el número de muertes por cáncer cérvico uterino. Gracias al conocimiento de la asociación del virus del papiloma humano (VPH) a este tipo de cáncer, la nueva vacuna contra el VPH es 100% eficaz contra 70% de los virus que se asocian como causa de este tipo de cáncer. Además, los nuevos métodos para el tamizaje permiten diagnosticar más rápido y con mayor precisión las lesiones precancerosas. Si se pusiera de forma inmediata una estrategia eficaz en toda la región, podría impedirse que la carga de muerte ascienda a 77,000 en el año 2030. El mayor obstáculo para aplicar esta estrategia es el alto costo de la vacuna. Glaxo-SmithKline y Merck Inc., fabricantes de las vacunas, venden cada dosis en 120 dólares y se requieren tres dosis para la inmunización. Por ende, la vacuna está fuera del alcance de la mayoría de las mujeres en las Américas.¹

En otro orden de ideas existen diversos fármacos que podrían ser útiles en el tratamiento de esta patología; sin embargo, existen desventajas asociadas a su empleo, como la distribución en el organismo según sus propiedades físicas, tales como la solubilidad, coeficiente de partición y carga. En consecuencia, los fármacos pueden alcanzar gran variedad de órganos en los cuales puede que se encuentren fuera de su intervalo terapéutico, que sean inactivos, o que su acción sea indeseada o nociva, y por tanto, con efectos secundarios negativos.³

La biotecnología abre la posibilidad de suministrar dosis de medicamentos más bajas al paciente para conseguir los mismos efectos, al mejorarse la termoestabilidad, el tiempo de vida y la protección de estos medicamentos

frente a los tradicionales. La formulación de fármacos en forma nanoestructurada aumenta su solubilidad y eficacia, por lo que ya existen en el mercado más de cien fármacos de este tipo y muchos otros están en desarrollo. Además, este tipo de formulación permite utilizar rutas de administración más efectivas (oral, transcutánea y pulmonar) y alcanzar localizaciones en el cuerpo que tradicionalmente han sido difíciles, tales como el cerebro.³

Pueden emplearse diversos tipos de nanoestructuras como vehículos para la administración de fármacos, tanto enteral como parenteralmente. Entre ellas, cabe destacar la utilización de nanopartículas de material cerámico, nano cápsulas, dendrímeros, liposomas y micelas. Estos transportadores están jugando un papel crucial en el desarrollo de tecnologías de liberación de fármacos específicamente en el lugar dañado o enfermo, permitiendo transportar fármacos, vacunas y ADN a las células y tejidos afectados, pero sin interferir negativamente en otras zonas del cuerpo. Por ejemplo, en el caso de los fármacos antineoplásicos, el uso de nanoestructuras conduce a dosis administradas menores a las que típicamente son aplicadas en quimioterapia y, si la sustancia se dirige de modo directo al tumor, las cantidades efectivas allí aplicadas pueden ser entre diez y mil veces mayores que las que llegan a destino por las vías habituales. Se evitan de este modo los efectos secundarios no deseados típicos de la quimioterapia.³

Las nanopartículas que se utilizan para este propósito son sintetizadas a partir de materiales orgánicos (lípidos o polímeros), pero ya se están desarrollando nano-transportadores inorgánicos (partículas magnéticas, puntos cuánticos de semiconductor, oro coloidal y nanopartículas de fosfato cálcico).³

En el presente trabajo se pretende desarrollar y validar un bioensayo que permita cuantificar de forma confiable la potencia de la Interleucina 2 (IL-2), encapsulada y expuesta en un sistema que consiste en nanoliposomas de 50 nm de diámetro promedio, ya que ha demostrado tener una fuerte actividad inmunorreguladora y antitumoral; evitando los efectos adversos asociados a la IL-2 libre que pueden resultar muy graves. Por tanto, se propone el uso de este bioensayo para evaluar la estabilidad química y así en un futuro proveer una alternativa segura y eficaz para el tratamiento del cáncer cérvico uterino.

MARCO TEÓRICO

Liposomas

Los liposomas son vesículas concéntricas compuestas por una o varias bicapas de lípidos anfipáticos, los cuales delimitan uno o varios compartimentos acuosos, otra definición los cita como, estructuras esféricas cerradas, formadas por uno o varios lípidos anfipáticos concéntricos que contienen una fase acuosa.⁴

Los liposomas o vesículas lipídicas son estructuras esféricas compuestas por una bicapa lipídica curva cerrada que encapsulan líquidos o gases. Su tamaño oscila entre los nanómetros a los micrómetros y el espesor de la membrana se encuentra dentro del orden de los nanómetros.⁵

Son estructuras huecas que presentan dimensiones entre 0,005 y 100 μm , formados por lípidos anfipáticos, cuya estructura es similar a la membrana biológica. Esta estructura en un medio acuoso forma una bicapa lipídica en la que los grupos fosfato hidrofílicos forman la superficie de un sándwich y las colas hidrofóbicas no polares de los ácidos grasos se acomodan dentro de la estructura del sándwich, protegidos del agua. La estructura se estabiliza al envolverse en una esfera.⁶ Este comportamiento permite que los liposomas puedan transportar fármacos solubles en agua en su compartimento interno o fármacos insolubles en agua en la membrana.⁷ (Ver figura 1)

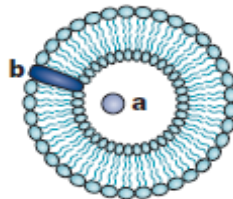


Figura 1. Liposoma convencional de fosfolípidos con fármaco soluble en agua (a) atrapado en el interior acuoso del liposoma y el fármaco insoluble en agua (b) incorporado en la membrana liposomal.⁷

Tipos de liposomas

Pueden ser clasificados de acuerdo a su tamaño o a sus características como:

- Vesículas multilaminares: estructuras que varían en tamaño desde 500 a 5000 nm y se componen de varias capas concéntricas.
- Vesículas unilaminares pequeñas: su tamaño oscila alrededor de los 100 nm y están formados por un sola bicapa.

- Vesículas unilaminares grandes: su tamaño varía de 200 a 800 nm.
- Liposomas de circulación prolongada: liposomas modificados de tal forma (por lo general mediante la inserción de polímeros) que pueden permanecer en la sangre durante más tiempo (por hora) que los liposomas no modificados.³ (Ver figura 2)
- Inmunoliposomas: liposomas que poseen anticuerpos unidos a su superficie y son capaces de acumularse dentro del organismo en la zona donde el anticuerpo reconoce y se une a su antígeno.
- Liposomas pH sensibles: estos liposomas se construyen con materiales sensibles al pH, lípidos o polímeros, lo que les confiere la propiedad de liberar su contenido en el citoplasma después de haber sido endocitados.⁷



Figura 2. Nanosistema (liposomas) empleado para la liberación controlada de medicamentos.³

Propiedades biológicas atractivas de un liposoma

Entre las ventajas más importantes que ofrecen estos sistemas encontramos que:

- Son biocompatibles con la membrana celular. Pueden penetrar en las células con eficacia.
- Pueden contener fármacos hidrofílicos o fármacos hidrofóbicos.
- Pueden contener sustancias tales como péptidos y proteínas, hormonas, enzimas, antibióticos y antifúngicos, agentes anticancerígenos, ADN y virus.
- Protegen al fármaco de inactivación en condiciones extremas.
- Evitan reacciones no deseadas.

- Baja antigenicidad.
- Proveen la única posibilidad de liberar el fármaco dentro de la célula/ componentes internos.
- Su tamaño, carga y propiedades superficiales, ofrecen versatilidad.^{5,6,7}
- Las propiedades de carga, tamaño y superficie se pueden modificar fácilmente, simplemente al añadir nuevos componentes y/o modificando su método de preparación.⁷ (Ver figura 3)

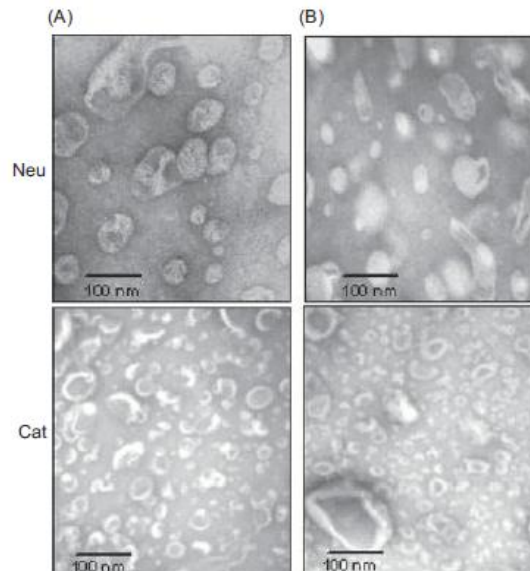


Figura 3. Microscopía de transmisión electrónica de liposomas neutros y catiónicos (75,000x). (A) Liposomas vacíos y (B) liposomas con IL-2.⁸

Los liposomas han sido ampliamente evaluados como potenciales sistemas de transporte de fármacos para aplicaciones terapéuticas debido a su capacidad de alterar la farmacocinética y reducir la toxicidad asociada a los fármacos. Fármacos inyectados en el torrente sanguíneo por lo general alcanzan una concentración terapéutica de corta duración, debido al metabolismo y excreción. Fármacos encapsulados en liposomas pueden alcanzar un índice terapéutico de mayor duración, ya que el fármaco debe ser liberado del liposoma antes de ser metabolizado o excretado. Cabe mencionar que los liposomas administrados por vía intravenosa encuentran una rápida aceptación por las células fagocíticas del sistema inmune, principalmente en el hígado y bazo,^{6,9} por lo que se formulan de tal forma que puedan ser bien direccionados a sus células blanco, ya sea por estabilización, unión a anticuerpos o por sus características físicas, como tamaño y carga, o químicas, como su composición.⁷ Además de transportadores de fármacos son utilizados en la cosmética, diagnóstico, industria agroquímica y otras aplicaciones.⁶

Aplicaciones de liposomas en la ciencia

Aplicando los conocimientos del acomodo espacial, elasticidad/flexibilidad y su comportamiento conformacional, los liposomas se utilizan como modelo para entender la topología, fluctuaciones en forma, permeabilidad, fusión y fisión de las membranas biológicas. Además, pueden servir como modelo para estudiar como se formaron las primeras células, vesículas, descamación vesicular, endo y exocitosis, así como liberación de neurotransmisores, entre otros.

La estructura de los liposomas también pueden ofrecer un sistema para llevar a cabo reacciones químicas. Esto puede ser utilizado en catálisis, en estudios de biomineralización o en síntesis de partículas coloidales.

Una de las áreas más socorridas de las aplicaciones de los liposomas es la investigación bioquímica de conformación y función de las proteínas de la membrana.

La aplicación de los liposomas en la farmacología y en la medicina se puede dividir en el diagnóstico y en la terapéutica, mediante la aplicación de liposomas con marcadores o fármacos, así como en su aplicación como modelo, herramienta o reactivo en estudios de interacción celular, procesos de reconocimiento y modo de acción de ciertas sustancias.¹⁰ (Ver Tabla 1)

Tabla 1. Aplicaciones de los liposomas en las ciencias.⁶

Disciplina	Aplicación
Matemáticas	Topología de superficies en dos dimensiones en un espacio tridimensional gobernado sólo por la elasticidad de la bicapa
Física	Comportamiento de agregación, fragilidad, alta y baja resistencia de materiales.
Biofísica	Permeabilidad, fases de transición en dos dimensiones, fotofísica.
Química	Fotoquímica, fotosíntesis artificial, catálisis microcompartimentos.
Bioquímica	Reconstitución de proteínas de membrana por membranas artificiales.
Biología	Modelos de membranas biológicas, funciones celulares, reconocimiento y fusión celular.
Farmacéutica	Estudios de acción de fármacos.
Medicina	Liberación de fármacos, diagnostico médico, terapia génica

Liposomas en la terapia antineoplásica

Muchos fármacos presentan una ventana terapéutica muy estrecha, lo que significa que la concentración terapéutica no es mucho menor a una concentración tóxica. En varios casos se puede reducir la toxicidad o mejorar la eficacia mediante el uso de un transportador apropiado el cual modificaría la distribución temporal y espacial del fármaco, es decir, su farmacocinética y biodistribución.

Los beneficios y limitaciones del uso de liposomas como acarreadores dependen críticamente de la interacción del liposoma con la célula y de su destino después de una administración *in vivo*. Estudios *in vivo* e *in vitro* de interacciones con la célula, han demostrado que la interacción del liposoma con la célula es predominantemente por simple absorción o por subsecuente endocitosis. La fusión con la membrana celular es menos frecuente. Una cuarta interacción sugiere que existe un intercambio de los constituyentes de la membrana liposomal, con los componentes de la membrana celular.

Se ha demostrado en diferentes formulaciones de liposomas con diversos agentes contra el cáncer que la toxicidad del fármaco es menor con respecto al fármaco sólo. Por ejemplo, las antraciclinas son fármacos que detienen la división celular al intercalarse dentro del ADN y por tanto matan rápidamente las células que se encuentran proliferando; sin embargo, estas células no solo se encuentran en los tumores, sino también en la mucosa gastrointestinal, el cabello y en la sangre, por lo que esta clase de fármacos son muy tóxicos. El más utilizado y estudiado es la Adriamicina (nombre comercial Doxorubicin HCl® además, de sus efectos tóxicos mencionados su dosis está limitada por su cardiotoxicidad acumulada. Se han estudiado diferentes formulaciones liposomales y en la mayoría de los casos la toxicidad se reduce alrededor del 50% incluyendo tanto, toxicidad a corto plazo como toxicidad crónica debido a que la encapsulación en liposomas reduce la distribución de las moléculas del fármaco hacia los tejidos. Por la misma razón, y por otra parte, en muchos casos la eficacia se ve comprometida debido a la disminución de la biodisponibilidad del fármaco, especialmente si el tumor no fagocita al liposoma o si se encuentra en órganos del sistema fagocítico mononuclear. En algunos casos, como el linfoma sistémico, el efecto de encapsulación en liposomas ha mostrado una eficacia mejorada debido al efecto de liberación sostenida, es decir, la presencia prolongada de una concentración terapéutica en la circulación.¹⁰

Existe una variada gama de aplicaciones de liposomas en la terapéutica tanto en cáncer como otras enfermedades como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Liposomas en la industria farmacéutica.⁶

Utilidad de los liposomas	Aplicaciones actuales	Tratamiento de enfermedades
Solubilización	Anfotericina B, Minoxidil®	Infecciones fúngicas
Liberación sostenida	Sistema de fármacos antineoplásicos, fármacos con acción pulmonar	Cáncer
Protección de fármacos	Interleucinas	Cáncer
Blancos específicos	Células portadoras de antígenos específicos	Aplicaciones terapéuticas estrechas
Extravasación	Vascularización de tumores, procesos de inflamación	Infecciones bacterianas, cáncer
Acumulación	Prostaglandinas	Enfermedades cardiovasculares

Interleucina-2 (IL-2)

Descripción y propiedades.

- Nombre del principio activo: Interleucina-2 (IL-2).
- Fórmula condensada: C₆₉₃ H₁₁₁₈ N₁₇₈ O₂₀₃ S₇.
- Peso molecular: 15415.9 Da.
- Propiedades químicas: Sensible a tripsinas, quimiotripsina. Estable en 2-mercaptoetanol, urea (2-4 mol/L).
- Propiedades fisicoquímicas: Estable a pH 3-10; a 56 °C por 60 min. Inestable después de 30 min a 70 °C.¹¹

Acción farmacológica

La interleucina-2 (IL-2) es una de las principales citocinas del sistema inmunológico, está encargada entre otras funciones de la activación y proliferación de los linfocitos T.¹²

- Factor de crecimiento de células T citotóxicas.
- Activación de linfocitos y células NK (Natural Killers).

- Potencializa la liberación de interferón gama, IL-1 y factores de necrosis tumoral.
- Promueve secreción de inmunoglobulinas.
- Aumenta la actividad antitumoral de macrófagos.¹³

Toxicidad

La IL-2 ha sido utilizada sola o en combinación con otros fármacos en la inmunoterapia adoptiva, tanto en animales como en humanos, para producir regresión de tumores en estados avanzados; donde se ha demostrado que tiene una respuesta antitumoral; no obstante que su aplicación por vía sistémica perturba las rutas de regulación hematopoyética y puede provocar serios efectos secundarios, como: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, edema, oliguria e hipotensión entre otros; por lo cual su uso es limitado.¹²

- Dosis mayores a 100,000 U/kg cada 8 h están asociados a efectos adversos.
-
- Hipotensión, edema periférico y fallo renal.
-
- Las dosis mayores a 600,000 U/kg cada 8 h requiere la administración de agonistas β -adrenérgicos.
-
- Provocan daño hepático, fallo renal (insuficiencia renal) y cuando no se tratan estos efectos adversos pueden provocar una congestión pulmonar e incluso la insuficiencia cardíaca congestiva.¹³

Inmunoensayos

El desarrollo de la técnica del inmunoensayo o inmunoanálisis ha tenido un inmenso impacto en muchas áreas de la medicina, ya que su sensibilidad y especificidad permiten la cuantificación exacta de una gran variedad de compuestos biológicamente importantes, tales como los péptidos, hormonas, vitaminas y fármacos, posiblemente presentes en líquidos o tejidos biológicos a concentraciones reducidas. La técnica o sus variaciones basadas en los mismos principios se han utilizado para determinar centenares de sustancias diferentes, algunas de las cuales están presentes en la sangre en cantidades del orden de ng/mL o pg/mL. Antes del desarrollo del inmunoensayo, muchas de estas sustancias sólo podían valorarse con gran dificultad y en algunos casos, no se disponía de ningún método práctico de valoración.

La diversidad de la terminología utilizada para describir estos métodos puede conducir a confusiones; algunas de las expresiones tales como análisis de saturación o análisis por desplazamiento se relacionan con el principio general, mientras que otros términos tales como radioinmunoensayo, radioensayo, ensayo radioligando, ensayo de radiorreceptor, fluoroinmunoensayo y el inmunoensayo enzimático se refieren a los reactivos específicos que se utilizan en un determinado sistema de valoración.¹⁴

Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA)

Los enzimoanálisis (EIA) o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), descritos hace 25 años, involucran el uso de anticuerpos como reactivos. Las enzimas se unen a los reactivos presentes para permitir su cuantificación a través del desarrollo de color después de la adición de un sustrato/cromóforo. Los ELISA se basan en dos fenómenos biológicos importantes:

1. La elevada especificidad de los anticuerpos (Ac);
2. La alta actividad de algunas enzimas usadas en este tipo de ensayos, lo que permite la amplificación de la señal generada por la muestra.^{14,15,16}

Independientemente de los esquemas experimentales empleados, los ELISA comprenden dos etapas generales:

1. La reacción de un inmunorreactante con un antígeno (Ag) o anticuerpo (AC);
2. La detección de ese inmunorreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático.

La sencillez de los ELISA, sumada a la potenciabilidad de los anticuerpos monoclonales (AcMo), hace que día a día se vayan imponiendo sobre métodos tales como aquellos basados en la utilización de un trazador radioactivo (radioinmunoanálisis, RIA), un trazador emisor de luz (quimioluminiscencia) o un trazador fluorescente (fluorografía). La gran ventaja del ELISA sobre otros métodos reside en que no requiere un equipamiento demasiado sofisticado para su implementación en el laboratorio. Además, los reactivos empleados son de una vida media muy alta (un conjugado enzimático puede conservarse en buen estado durante años) y no se corre el riesgo de contaminación producida por la manipulación de isótopos radioactivos.¹⁴ Los sistemas inmunoenzimáticos constituyen una alternativa útil, con mejores posibilidades de extensión y por tanto una mayor aplicabilidad.¹⁷ Debido a su heterogeneidad se reconocen cuatro ventajas principales, lo cual ha propiciado que la ELISA se imponga sobre otras técnicas.^{15, 16} (Ver figura 4)

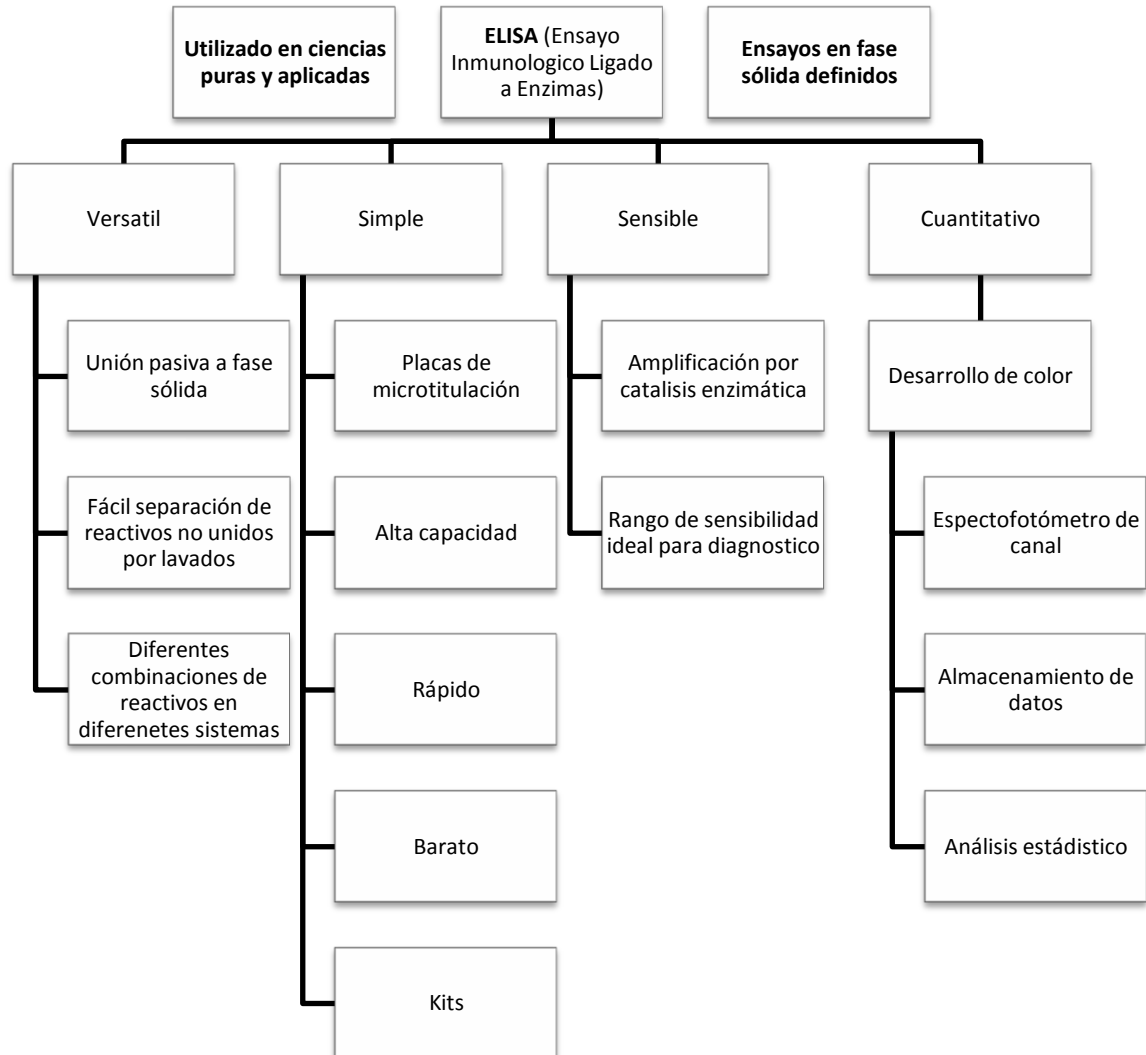


Figura 4. Características de ELISA que hacen que su uso sea ventajoso para una amplia gama de aplicaciones.^{15,16}

Clasificación de enzimoimmunoanálisis:

- EIA homogéneos;
- EIA heterogéneos.

Los primeros se realizan exclusivamente en fase líquida, mientras que en los segundos se emplea un soporte sólido para inmovilizar a uno de los inmunorreactantes.

Los EIA heterogéneos puede clasificarse en dos tipos

1. Enzimoimmunoanálisis de amplificación de actividad y:
2. Enzimoimmunoanálisis de modulación de actividad.

En los inmunoanálisis de amplificación de actividad o no competitivos, se emplea un gran exceso del inmunorreactante con el objeto de obtener una señal máxima debida a la presencia del compuesto a ser dosificado. De acuerdo a la ley de acción de masas un exceso de inmunorreactante permite detectar niveles muy bajos del analito que se quiere determinar. Estos ELISA se subdividen de acuerdo a la molécula inmovilizada en la fase sólida. La inmovilización del Ag para detectar Ac es un sistema que tiene una alta detectabilidad debido a que varias moléculas del conjugado enzimático, que en este caso son AC anti-Ig marcados con enzima, pueden unirse a cada molécula de Ac que reaccionó con el Ag inmovilizado. Este efecto se traduce en una gran amplificación de la señal. Mediante la utilización de métodos de puenteo inmunológico (con Ac anti-Ig) o no inmunológico (con el sistema avidina-biotina o proteína A) es posible aumentar la detectabilidad. En general estos sistemas se denominan ELISA de amplificación.¹⁴

Otro sistema de amplificación de actividad es el ELISA de captura, en el que se inmoviliza un Ac (Ac de captura), se captura Ag y se revela su presencia con un conjugado enzimático anti-Ag. Este sistema se emplea para la cuantificación de Ag o para la detección de Ac contra el Ag capturado. En general, es deseable que el conjugado enzimático y el Ac inmovilizado provengan de la misma especie para evitar interferencias en el sistema originadas por reacción cruzada del conjugado con el Ac de captura.

En enzimoimmunoanálisis de modulación de actividad o competitivos se modula la actividad del conjugado enzimático por competición con el analito. Menores cantidades del conjugado enzimático permiten obtener una detectabilidad mayor, ya que pequeñas cantidades del competidor tienen un gran impacto sobre la actividad enzimática detectada en la fase sólida. Existen dos diseños generales de ensayos de modulación de actividad: en uno de ellos, el ligando marcado con enzima y el ligando sin marcar que se quiere dosificar se incuban simultáneamente en el sistema; en el otro diseño, el ligando no marcado a ser dosado se incuba en una primera etapa y en una segunda etapa se incuba con el ligando marcado enzimáticamente, el que reaccionará con los sitios no ocupados por el ligando que reaccionó en la primera etapa.

Independientemente de estos dos diseños generales, en ELISA de modulación de actividad se puede inmovilizar el Ac en la fase sólida y agregar el Ag marcado con la enzima. Se observará una disminución de la actividad enzimática a medida que se compete con cantidades creciente de Ag libre presente en una solución patrón de Ag o en una muestra problema, siendo la

concentración de producto coloreado formado inversamente proporcional a la concentración de Ag libre.¹⁴

Alternativamente es posible inmovilizar el Ag y usar Ac anti Ag marcados con enzima. En este caso se realiza una competición de la unión de estos Ac al Ag inmovilizado, por medio de Ag libre en una solución patrón o una muestra problema. Como consecuencia de esta competición, la actividad enzimática detectable disminuye a medida que se emplean concentraciones crecientes de Ag libre.

Una tercera variante es usar el sistema descrito en el párrafo anterior con la diferencia de que se emplea un Ac anti-Ag sin marca enzimática y una etapa siguiente agregar un conjugado anti-Ig marcado con la enzima. Este ensayo es de modulación y amplificación de actividad y tiene la ventaja de que permite aumentar la detectabilidad del sistema.

En todos los ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida, independiente de las numerosas estrategias existentes se pueden distinguir dos etapas.

1. Inmovilización del inmunorreactante (Ac o Ag) en la fase sólida;
2. Incubación con la muestra de modo que ésta reaccione con el inmunorreactante inmovilizado;

Amplificación o modulación por medio de la utilización de un conjugado enzimático (esta etapa puede en realidad ser de más de un paso).¹⁴

En la técnica de ELISA conocida como sándwich, como primer paso un anticuerpo de captura específico para el analito de interés se une a una placa de microtitulación formando la fase sólida. El anticuerpo no unido se elimina mediante lavado de la placa, después se adiciona un agente bloqueador. Después de un lavado, la muestra, estándar y/o control se incuban con el anticuerpo en fase sólida, para de esta forma capturar al analito. Después de eliminar el analito no unido mediante un lavado, se añade un anticuerpo de detección conjugado a una enzima (biotina conjugada). Este último se une a un epítipo diferente del analito, completando el sándwich. Una vez eliminado el anticuerpo de detección, se adiciona a la placa un reactivo de detección asociado a la enzima peroxidasa (HRP) (estreptavidina-HRP). Se realiza un lavado y se añade una solución de sustrato con cromóforo (tetrametilbenzidina, TMB) (TMB/peróxido de hidrógeno) y se desarrolla color en proporción a la cantidad de analito presente. El desarrollo de color se detiene con la adición de ácido sulfúrico 1M (solución stop) y se mide la intensidad de color.^{18, 19} (Ver figura 5)

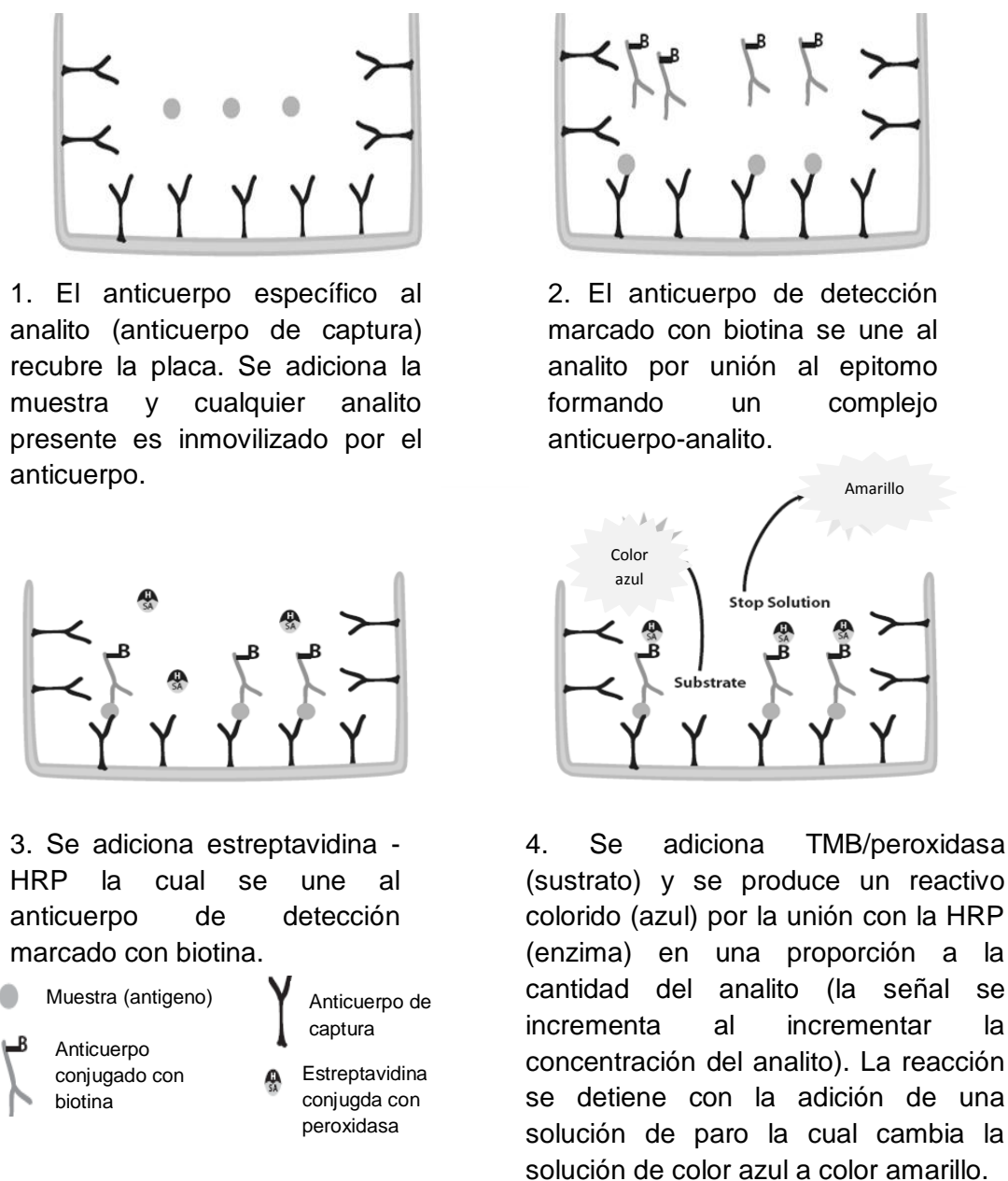


Figura 5. Esquema de técnica de ELISA por método de sándwich.¹⁵

En los ELISA, es de importancia definir dos parámetros ampliamente usados:

- Sensibilidad. Es el cambio en la respuesta (dR) por cada cambio en la cantidad de reactante (dC). En un gráfico de dosis-respuesta en ELISA, la sensibilidad es la pendiente de la curva en un punto determinado. Debido a que las curvas dosis-respuesta de los inmunoensayos en general son sigmoideas, la sensibilidad (dR/dC) no es constante.
- Límite de detección. Es la mínima cantidad de inmunorreactante que puede detectar el sistema.¹⁴

Desarrollo del método

Para muchos laboratorios clínicos es más eficaz comprar los reactivos en forma de lotes o por componentes que mantener una infraestructura para la elaboración y evaluación de los reactivos y de los marcadores de fijación. Al seleccionar un lote de ensayo hay que considerar muchos aspectos: el costo, la técnica de separación, el tipo de marcador y las sustancias de reacción cruzada.

Después de la preparación correcta de los reactivos según las instrucciones del fabricante, el ensayo puede realizarse según las instrucciones indicadas. Sin embargo, antes de utilizarse de forma habitual, hay que proceder a evaluar los resultados obtenidos con el lote. Aunque, en general, los principios de desarrollo del ensayo, validación y control de calidad son los mismos que para otros tipos de determinaciones, existen ciertos aspectos que justifican un énfasis especial.²⁰

Cuando un análisis puede ser de utilidad para un amplio número de científicos, las condiciones posibles (instalaciones de laboratorio, conocimientos, equipos, etc.) deben ser considerados en el desarrollo de los ensayos. Estos factores de transferencia de tecnología son de suma importancia, sobre todo en países en desarrollo.

El conocimiento y las habilidades requeridas para realizar un ELISA y hacer uso de los datos deben ser adquiridos a través de una amplia gama de fuentes. Como con otras técnicas, el beneficio final no es la técnica en sí, sino la recopilación significativa y análisis de los datos. Por lo tanto, la persona que va a desarrollar el método deberá obtener los conocimientos y equipo necesarios para realizar la prueba, ya que el 90% de los problemas sin resolver relacionados a esta prueba se deben a la falta de experiencia y sentido común del operador.^{15,18}

En el desarrollo del método se debe de tener presente la sensibilidad, que es la cantidad de antígeno mínima que puede medirse con precisión aceptable. Los límites de sensibilidad quedan definidos por la afinidad del reactivo de fijación específica usado. La dilución del anticuerpo se selecciona normalmente de forma que entre 20 y 70 % del marcador esté unido al anticuerpo en ausencia del antígeno no marcado. Con exceso de anticuerpo se produce una pérdida de sensibilidad.

Otras medidas diseñadas para incrementar la sensibilidad incluyen la prolongación del período de incubación, el empleo de pequeñas cantidades del marcador y la adición retrasada del marcador. Aunque la sensibilidad puede incrementarse por adición retrasada del marcador, o sea, con ensayos de desequilibrio, el no alcanzar el equilibrio puede conducir a una pérdida de precisión. Si la afinidad del marcador difiere del material no marcado, no es posible alcanzar en este caso la sensibilidad total del ensayo. Otra estrategia consiste en extraer y concentrar la muestra. Por lo general, los intentos para utilizar ensayos en los límites extremos de sensibilidad pueden introducir problemas.

Los parámetros de la validez del ensayo incluyen la recuperación cuantitativa del antígeno añadido y la demostración de que en ausencia del antígeno se obtiene una respuesta apropiada. Es esencial demostrar que el contenido aparente de antígeno en el problema es independiente de la dilución a la que se ensaya. Esto requiere que la concentración del problema disminuya linealmente con la dilución o que superponga una curva de dilución de la muestra problema sobre una curva de dilución estándar.

Como sugerencia, en cada ensayo deben incluirse dos tipos de blancos, uno que contenga antígeno marcado, anticuerpo y suero o plasma libre de antígenos; el otro, con antígeno marcado y suero o plasma libres de antígenos, pero sin anticuerpos. La primera comprobación proporciona información sobre la reacción del marcador y anticuerpo y acerca de la totalidad del paso de separación. La segunda informa respecto a la fijación no específica del marcador.

Para obtener un ensayo válido deberían realizarse estudios de reactividad cruzada mediante sustancias apropiadas y controlando factores inespecíficos, tales como el pH y el contenido proteico de los medios. Por su variabilidad es necesario proceder a la caracterización individual de cada anticuerpo policlonal. Cuando se cambia un determinado lote de anticuerpo en un ensayo, es importante recharacterizar dicho anticuerpo. Los valores del ensayo deben mostrar una respuesta apropiada en diversas condiciones fisiológicas, lo cual es particularmente importante demostrar cuando se utiliza anticuerpo como reactivo de fijación específico.

Puesto que el anticuerpo mide la actividad inmunológica más que la biológica, deberá tenerse presente que las mediciones efectuadas por inmunoensayo no siempre reflejan la verdadera actividad *in vivo*.²⁰

Validación de Métodos Analíticos/Bioanalíticos

En ocasiones en que se tiene interés por medir un componente presente en una muestra, es necesario contar con un método analítico. El desarrollo de métodos de análisis desempeña un papel importante en el descubrimiento, desarrollo y fabricación de productos farmacéuticos. Dicho esto, la industria farmacéutica debe hacer uso de metodologías confiables que nos den razón de que un producto farmacéutico reúne atributos de identidad, pureza, potencia e inocuidad. Por tal razón, es necesario llevar a cabo estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir este fin, es la validación.^{21, 22}

La validación se define como el establecimiento de pruebas documentadas que proporcionan un alto grado de certeza de que un proceso planificado sistemáticamente se llevará a cabo de acuerdo a los resultados específicos previstos.

Es el proceso por el cual se establece y confirma, por estudios de laboratorio, que las características de rendimiento del método satisfacen los requisitos para las aplicaciones analíticas destinadas.^{23, 24}

La validación de métodos analíticos/procesos/sistemas puede ser en prospectiva o retrospectiva mediante estudios concurrentes. La validación prospectiva se basa en los datos recopilados con base a un protocolo previamente planificado.²⁵

El objetivo de la validación de un método analítico es demostrar que es adecuado para su propósito previsto.²⁵ Los pasos para desarrollar y validar un método analítico depende del tipo del mismo. Por tanto, un método bien desarrollado debe ser fácil de validar.

La validación de un método analítico/bioanalítico incluye todos los procedimientos recomendados para demostrar que un determinado método para cuantificar un analito en una matriz biológica, tales como la sangre, plasma, suero u orina, es confiable y reproducible. Los parámetros esenciales de la validación incluyen (1) exactitud, (2) precisión, (3) sensibilidad, (4) especificidad, (5) linealidad y (6) reproducibilidad. Además, se debe de determinar la estabilidad del analito en la matriz en condiciones de almacenamiento del estudio. Para los bioensayos se sugiere desarrollar otros parámetros, debido a su duración, complejidad y al almacenaje de muestras biológicas y de referencia.²⁶

Los métodos analíticos se clasifican generalmente en 5 tipos:

- Pruebas de identificación.
- Ensayos de potencia.
- Pruebas cuantitativas de impurezas.
- Pruebas de límite de impurezas.
- Pruebas específicas.

Las 4 primeras pruebas son universales, pero las pruebas específicas, tales como tamaño de partícula y/o difracción de rayos X se utilizan para evaluar propiedades específicas de un producto farmacéutico.²⁷

La validación debe realizarse de acuerdo al protocolo de validación, donde se establecen los criterios de aceptación que el método debe satisfacer. Cualquier incumplimiento de los criterios requiere que se lleve a cabo una investigación. Los parámetros de validación requeridos dependerán exclusivamente del tipo de método analítico.²⁷ Las características típicas que deben considerarse se enlistan a continuación (ver tabla 3). Los resultados deben ser documentados en el informe de validación.²⁵

Tabla 3. Parámetros de desempeño a estudiar en la validación de un método analítico/bioanalítico.^{21,22, 25, 26, 28, 29}

Parámetro de desempeño	Contenido/ Potencia/ Valoración	Pruebas de impurezas		Identificación
		Contenido/ Valoración	Límite	
Exactitud	+	+	---	---
Precisión				
Repetibilidad (intra-ensayo)	+	+	---	---
Precisión intermedia (inter-ensayo)	+(1)	+(1)	---	---
Linealidad	+	+	---	---
Especificidad (2)	+	+	+	+
Límite de detección	---	---(3)	+	---
Límite de cuantificación	---	+	---	---
Intervalo de concentración	+	+	---	---
Robustez	+*	+*	---	---

--- Significa que esta característica no se evalúa normalmente.

+ Significa que esta característica se evalúa normalmente.

(1) En los casos en que ha realizado reproducibilidad, la precisión intermedia no es necesaria.

(2) La falta de especificidad de un procedimiento analítico podría ser compensado por otros procedimientos analíticos de apoyo.

(3) Puede ser necesaria en algunos casos.^{22, 25}

*En la fase de desarrollo de un método analítico debe de considerarse la robustez.^{25, 28, 29}

Definiciones y parámetros de desempeño

Analito

Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.²¹

Placebo analítico

Muestra que contienen todos los componentes de un producto a excepción del analito.²¹

Placebo adicionado

Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.²¹

Criterio de aceptación

Límites numéricos, rangos u otras medidas apropiadas para la aceptación de los resultados de los métodos analíticos.²⁸

Placebo (Blanco)

Forma de dosificación idéntica al medicamento, excepto en que el fármaco está ausente o es sustituido por una sustancia inerte o por una mezcla de excipientes cuantitativamente equivalentes a los que se encuentran en el medicamento.²⁸

Especificidad

Es la capacidad de analizar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes en una mezcla compleja.^{26, 27} Normalmente estos pueden incluir impurezas, productos de degradación, matriz, etc.^{22, 23, 30}

Esta definición tiene las siguientes aplicaciones:

- Identificación: para garantizar la identidad de un analito.
- Prueba de pureza: para garantizar que todos los procedimientos analíticos realizados permiten una declaración precisa del contenido de impurezas de un analito, es decir, prueba de sustancias relacionadas, metales pesados, contenido de solventes residuales, etc.
- Valoración (contenido o potencia): para proporcionar un resultado exacto que permita una declaración exacta sobre el contenido o potencia de un analito en una muestra.²²

Se debe de determinar la interferencia propiciada por la muestra sin analito (placebo) bajo las mismas condiciones.²²

Estabilidad analítica de la muestra

Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.²¹

La estabilidad de un fármaco en un fluido biológico está en función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del fármaco, de la matriz y del sistema de contenedores.³⁰

La prueba de estabilidad es importante para estimar el intervalo de tiempo permitido entre la toma de muestras y el análisis de las mismas. Debe de llevarse a cabo a la muestra bajo condiciones de almacenamiento, en función a sus propiedades químicas, propiedades de la matriz y propiedades del sistema contenedor, que reflejen las situaciones que pueden presentarse durante la manipulación de la muestra, su almacenamiento y análisis.^{23, 30}

Se debe de evaluar la estabilidad del analito durante la recolección y manipulación de la muestras después de su almacenamiento bajo condiciones establecidas, como almacenamiento a largo plazo (temperatura de congelación), a corto plazo (temperatura ambiente) o después de ciclos de congelación y descongelación.²³

Exactitud

La exactitud de una método analítico expresa el grado de concordancia o cercanía entre el valor que se acepta como convencional verdadero o valor de referencia y el resultado o valor obtenido por el método.^{21, 22, 23, 26, 27, 29, 30,31}

En ocasiones no es posible establecer la exactitud para productos biológicos, debido a la falta de disponibilidad de estándares puros. En estos casos, se realiza una comparación con un producto de referencia que se evalúa en paralelo en el mismo ensayo. Puede que no sea necesaria si el método tiene una sensibilidad y especificidad satisfactoria.²⁶

La exactitud de un método analítico se determina por análisis repetidos de las muestras que contienen cantidades conocidas del analito. Se recomienda realizar un mínimo de 5 determinaciones en 3 niveles de concentración dentro del intervalo de concentración.

La exactitud debe reportarse como porcentaje de recobro, como la diferencia entre la media de los valores obtenidos y los valores aceptados como verdaderos en conjunto con el intervalo de confianza.^{26, 30}

Recobro

Respuesta obtenida a partir de una cantidad del analito adicionada a la muestra o excipientes (placebo adicionado), en comparación con la respuesta obtenida del estándar, empleando el método analítico.^{22, 23, 26, 30}

El recobro debe determinarse mediante la comparación de los resultados analíticos de las muestras a 3 niveles de concentración (alta, media y baja).³⁰

Precisión

Expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas^{26,27} obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones preestablecidas. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.^{22, 29, 30}

- **Repetibilidad:** Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un intervalo corto de tiempo, donde se realizan múltiples determinaciones de una muestra individual en una solo ensayo.²⁶ Se denomina precisión intra-ensayo.^{22, 26}
- **Precisión intermedia:** Expresa la variaciones dentro de un mismo laboratorio como: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc., cuando se realizan múltiples determinaciones de un muestra individual. Puede ser considerada como precisión inter-ensayo.^{22, 26, 29}

Su objetivo es verificar que se obtienen los mismos resultados intra-laboratorio una vez que ha concluido la fase de desarrollo.²³

- **Reproducibilidad:** Expresa la precisión entre laboratorios (estudios en colaboración^{26, 29}, usualmente aplicada para la estandarización de la metodología).²² Se debe determinar mediante el uso de alícuotas de un mismo lote en diferentes laboratorios y por diferentes analistas.²³

La precisión se debe establecer utilizando un mínimo de 5 determinaciones en 3 niveles de concentración dentro del intervalo de concentración.³⁰ Se debe expresar como la desviación estándar o el coeficiente de variación (CV).²²

Límite de detección (LD)

El límite de detección de un método analítico es la mínima cantidad del analito en la muestra que puede ser detectada²⁷, pero no necesariamente cuantificada con un valor o cantidad exacta.^{21, 22, 23, 26, 28, 30} Expresa la cantidad del analito que es detectada al menos 95% del tiempo por el método analítico.³¹

Límite de cuantificación (LC)

Es la mínima cantidad del analito dentro de una muestra que puede ser determinada²⁷ cuantitativamente con precisión y exactitud^{22,26,31} bajo condiciones de operación establecidas.²¹

El límite de cuantificación es un parámetro cuantitativo en la valoración de niveles bajos de analito en matrices, y es particularmente utilizado para la determinación de impurezas, y/o productos de degradación.²³

Linealidad

La linealidad de un método analítico es la habilidad (dentro de un intervalo determinado) de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en una muestra.^{21, 22, 23 26}

La linealidad debe determinarse en un mínimo de 5 niveles de concentración.^{22, 29, 30}

La linealidad se puede expresar mediante el coeficiente de determinación (r^2), coeficiente de correlación (r) y la pendiente de la recta.²⁶

Curva de calibración

La calibración es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. La curva de calibración (curva estándar) debe ser generada para cada analito presente en la muestra y debe ser preparada en la matriz biológica, igual a las muestras en estudio, por adición de cantidades conocidas del analito.²³

Intervalo de concentración

Es el intervalo entre la concentración (cantidad) más alta y la concentración más baja del analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el método analítico tiene niveles adecuados de precisión, exactitud^{22, 23, 26}, en el cual se comporta de manera lineal.^{27, 31}

Si la relación entre la respuesta y la concentración no es lineal, el intervalo puede ser estimado por medio de la curva de calibración.²³

Robustez

Es la capacidad del método analítico de mantener sus resultados inalterados cuando se producen cambios pequeños, pero deliberados en las condiciones de operación²², y proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.^{26, 28, 29, 31}

Las variaciones pueden deberse a la temperatura ambiental, temperatura de incubadora, humedad relativa, tiempo de incubación, pH, distintos proveedores, etc. Se puede medir la exactitud, precisión o algún otro parámetro, en cada una de estas condiciones para determinar si estas condiciones pueden ser toleradas por el método.^{26, 29}

Sensibilidad

Es la capacidad del método para diferenciar pequeñas diferencias en la concentración o cantidad del analito.³¹ Es la pendiente de la curva de calibración que se obtiene al graficar la respuesta obtenida frente a la concentración o cantidad del analito.²³

Los métodos analíticos deben ser lo suficientemente sensibles para detectar y cuantificar el analito en los límites de concentración.³¹

Validación

Es la evidencia documentada que demuestra que un método analítico cumple con los requisitos para los cuales fue diseñado.^{21, 22, 29}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que el cáncer cérvico uterino representa un alto índice de mortalidad, tanto en la población mundial como en la mexicana, y por lo tanto un problema de salud pública, es necesario dar pauta al desarrollo de productos biotecnológicos como nueva alternativa para combatir este padecimiento.

Los liposomas son ampliamente utilizados en diversas disciplinas, debido a sus características de biocompatibilidad, protección, tamaño, carga, propiedades superficiales y principalmente por poseer un alto potencial como transportadores de fármacos, siendo esta última, la que influye directamente en la farmacocinética y biodisponibilidad de fármaco, lo que conlleva a disminuir la toxicidad y prolongar el efecto terapéutico.

La Interleucina 2 (IL-2) al ser una de las principales citocinas del sistema inmune, ya que promueve la activación y proliferación de los linfocitos T, ha cobrado gran interés como alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cáncer. Su actividad biológica ha sido probada, tanto en animales como en humanos, provocando una regresión de tumores en estados avanzados; con lo cual se ha demostrado su efecto antitumoral. Sin embargo, una administración sistémica puede provocar severos efectos secundarios limitando así su uso.

Para resolver este problema, la IL-2 es encapsulada en un sistema nanoacarreador conformado por liposomas, protegiéndola contra la inactivación o degradación; favoreciendo así su liberación en el sitio/órgano blanco, reduciendo su toxicidad y/o incrementando la eficacia de la misma.

El desarrollo y validación de métodos analíticos juegan un papel importante en el descubrimiento, desarrollo y fabricación de productos farmacéuticos. Por tanto, los métodos de ensayo derivados de dichos procesos se utilizan como base en el control de calidad para garantizar la identidad, pureza y potencia de productos farmacéuticos.

Con base a lo anterior, en el presente trabajo se pretende el desarrollo y validación de un bioensayo que permita evaluar la estabilidad química de un producto antineoplásico conformado por IL-2 en un sistema nanoacarreador formulado en una suspensión inyectable, con la finalidad de ofrecer una composición farmacéutica estable, segura y eficaz para el tratamiento del cáncer cérvico uterino, que cumpla con las recomendaciones de la normatividad tanto nacional como internacional vigentes. La meta final es proporcionar una alternativa para el tratamiento del cáncer cérvico uterino mediante un producto biotecnológico innovador que cumpla con especificaciones de calidad vigentes.

OBJETIVOS

General

- Desarrollar un bioensayo, mediante la técnica de ELISA, que permita cuantificar IL-2, contenida y expuesta, en un producto antineoplásico conformado en un sistema nanoacarreador, formulado en una suspensión inyectable.

Específicos

- Optimizar y estandarizar la técnica de ELISA para cuantificación de IL-2 expuesta y encapsulada en el sistema nanoacarreador.
- Validar la técnica de ELISA para la cuantificación de IL-2 en el sistema nanoacarreador.

HIPÓTESIS

Debido a que los inmunoensayos son altamente específicos y sensibles para detectar compuestos como la Interleucina 2 (IL-2), esperamos que al desarrollar y validar un bioensayo capaz de cuantificar la IL-2 contenida y/o expuesta en un sistema nanoacarreador (liposomas) en suspensión inyectable; de forma confiable, estaremos en posibilidad en un futuro de evaluar la estabilidad química del sistema para finalmente proponer una forma farmacéutica segura y eficaz.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

- Experimental prospectivo longitudinal.

Población de estudio:

- Debido al costo y disponibilidad de materias primas (Interleucina, lípidos), reactivos (anticuerpos, solución sustrato, estreptavidina, etc) y equipos ajenos al laboratorio (ultracentrífuga), el desarrollo del bioensayo se realizara con un solo lote de producción LOC-02/2012 de suspensión inyectable de nanoacarreadores con IL-2, fabricado en el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM.

Criterios de Inclusión:

- Frasco vial de suspensión inyectable correctamente acondicionada de nanoacarreadores con IL-2 del lote LOC-02/2012, sin partículas extrañas que permanezcan dentro de las condiciones de estudio.

Criterios de exclusión

- Suspensión inyectable de IL-2 en liposomas contaminadas, abiertas, fuera del refrigerador, material de empaque roto o estrellado, no etiquetada.

Criterios de eliminación

- Perdida de la muestra de solución inyectable, muestras que presenten contaminación durante el estudio, muestras con cambio de color.

METODOLOGÍA

Preparación de reactivos

- Solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2 - 7,4 (Phosphate Buffered Saline, PBS). Pesar con exactitud aproximadamente 8,0 g de cloruro de sodio, 0,20 g de cloruro de potasio, 0,20 g de fosfato monobásico de potasio, 1,15 g de fosfato dibásico de sodio. Agregarlos a un matraz aforado que contenga 200 mL de agua destilada y homogenizar perfectamente. Ajustar el pH y aforar a 1000 mL con agua destilada.
- Buffer de lavado 0,05% Tween 20 en PBS, pH 7.2 - 7,4. A 1000 mL de PBS adicionar 500 μ L de Tween 20 y homogenizar.
- Solución amortiguadora de citratos. Pesar con exactitud aproximadamente 2,10 g de ácido cítrico y 7,69 de citrato de sodio, disolverlos en 100 mL de agua destilada y homogenizar.
- Solución de 3,3-5,5-tetrametilbenzidina stock (TMB stock). Pesar con exactitud aproximadamente 1,0 mg de TMB y disolverlo perfectamente en 1,0 mL de DMSO. Almacenar esta solución de 2 a 8 °C.
- Solución sustrato. Mezclar 500 μ L de TMB stock con 4,5 mL de solución buffer de citratos y homogenizar. Adicionar 1,0 μ L de H₂O₂, homogenizar y proteger de la luz.
- Anticuerpo monoclonal contra IL-2 humana (Anticuerpo de captura, obtenido de células de mieloma de ratón). Reconstituir 500 μ g en 1,0 mL de PBS estéril y homogenizar. Almacenar esta solución de 2 a 8 °C.
- Interleucina 2 (IL-2 recombinante derivada de *E. coli*). Reconstituir 50 μ g de IL-2 en 500 μ L de ácido acético 100 mM estéril que contenga menos de 0,1% de albumina de suero bovino y homogenizar. Agregar 500 μ L de PBS estéril y homogenizar. Almacenar esta solución de 2 a 8 °C.
- Anticuerpo biotinilado contra IL-2 humana (Anticuerpo de detección, obtenido de IgG policlonal de cabra). Reconstituir 50 μ g en 250 μ L de buffer trisalino estéril, pH 7,3 que contenga 0,1 % de albumina de suero bovino y homogenizar. Agregar 750 μ L de PBS estéril y homogenizar. Almacenar esta solución de 2 a 8 °C.

- Solución Stop (Ácido Sulfúrico 1 M). Tomar 56 mL de ácido sulfúrico y disolverlos en agua destilada. Llevar a volumen de 1 L con agua destilada y homogenizar.
- Solución de tritón al 5%. Tomar 500 μ L de tritón y disolverlos en 9,5 mL de PBS.
- Polivinilpirrolidona al 1% en buffer de lavado (PVP). Pesar con exactitud aproximadamente 1,0 g de PVP y llevar a aforo a 100 mL con buffer de lavado.
- Albumina de suero bovino al 1% en buffer de lavado (BSA). Pesar con exactitud aproximadamente 1,0 g de BSA y llevar a aforo a 100 mL con buffer de lavado.
- Estreptavidina HRP (Estreptavidina con peroxidasa de rábano). Tomar 12,5 μ L de estreptavidina HRP y disolverlos en 5,0 mL de buffer de lavado y homogenizar.
- Solución stock de IL-2. Tomar 10 μ L de la fuente (50 μ g/mL) y colocarlos en un tubo cónico de 100 μ L que contenga 990 μ L de PBS. Esta solución contiene 0,5 ng/mL de IL-2.
- Placebo analítico (matriz). Colocar 15 μ moles de fosfatidilcolina y 15 μ moles de espermidin colesterol en un tubo de ensayo que contenga 500 μ L de cloroformo. Evaporar el disolvente y agregar 500 μ L de PBS. Agregar 100 μ L de tritón al 5% y aforar a 9,6 mL con PBS.

Materiales

Fabricación del sistema nanoacarreador con IL-2

- Balanza analítica.
- Tubos de ensayo 13x100 mm.
- Sonificador.
- Tanque de nitrógeno.
- Tubos cónicos de 1,5 mL de polipropileno.
- Jeringa de vidrio de 100 μ L.
- Micropipetas de 10, 200 y 1000 μ L.

- Pipeta dosificadora (dispensador múltiple).
- Ultracentrífuga.
- Cronómetro.
- Microjeringa de 100 μ L.
- Campana de flujo laminar.
- Cloroformo.
- Interleucina 2 stock.
- Lípidos.
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 -7.4 (PBS).
- Frasco vial de borosilicato de 2 mL de capacidad con tapón de neopreno y casquillo de aluminio.
- Engargoladora.

Cuantificación de IL-2 por técnica de ELISA

- Inmunoplasacas.
- Micropipetas de 2, 20, 100 y 1000 μ L.
- Lector de ELISA EL_x800.
- Tubos cónicos de 15 mL y de 2 mL de polipropileno.
- Micropipeta dosificadora (dispensador múltiple).
- Puntas para micropipetas de 2, 20, 100 y 1000 μ L.
- Reservorios.
- Agitador de tubos.
- Centrifuga para tubos cónicos de 2 mL.
- Potenciómetro.
- PBS.
- Buffer de lavado.
- Solución sustrato.
- Solución stop.
- Tritón al 5%.
- Solución amortiguadora de citratos.
- Solución de PVP.
- Anticuerpo de captura.
- Anticuerpo de detección.

- Estreptavidina HRP.
- Papel Parafilm®.

Desarrollo de técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador

En un diseño matricial, como se muestra en la Figura 6:

- La concentración de anticuerpo de detección y captura se mantuvo fija.
- Se ensayaron tres diluciones de estreptavidina HRP; 1:100, 1:200 y 1:400.
- Se probaron dos soluciones de bloqueo: BSA al 1% en buffer de lavado y PVP al 1% en buffer de lavado.
- Se ensayaron las siguientes diluciones de solución sustrato: 1:10, 1:20 y 1:40.
- Se utilizó un intervalo de concentración de IL-2 de 0, 4, 8 y 16 ng/ml, en cada cuadrante, para evaluar un posible intervalo de concentración.

Una vez analizados los resultados y se eligieron las concentraciones de anticuerpos y reactivos en los que el valor de absorbancia se encuentren entre 0,100 y 0,800.

En esta primera etapa de desarrollo se estableció la concentración de estreptavidina HRP y al PVP como solución de bloqueo.

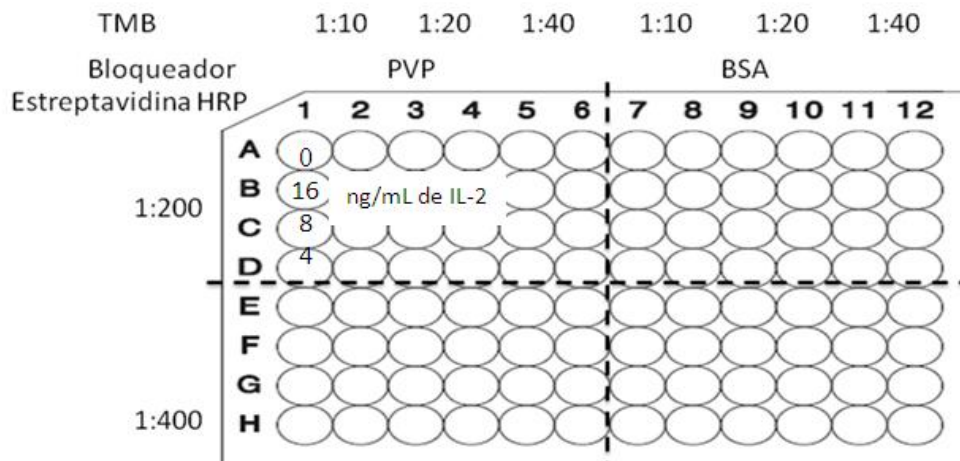


Figura 6. Matriz utilizada para establecer la dilución estreptavidina -HRP y la solución de bloqueo.

Una vez establecidas dos variables, antes mencionadas, se procedió a establecer la concentración del anticuerpo de detección y dilución de solución sustrato, mediante el uso de un diseño matricial como el que se muestra en la Figura 7, en el que:

- Se ensayaron dos concentraciones de anticuerpo de detección: 200 y 400 ng/mL y una de captura: 2000 ng/mL.
- Se probaron tres diluciones de solución sustrato: 1:10, 1:20 y 1:40, en ambos lados.
- Se utilizó un intervalo de concentración de 0, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 8 ng/mL de IL-2, en cada lado.

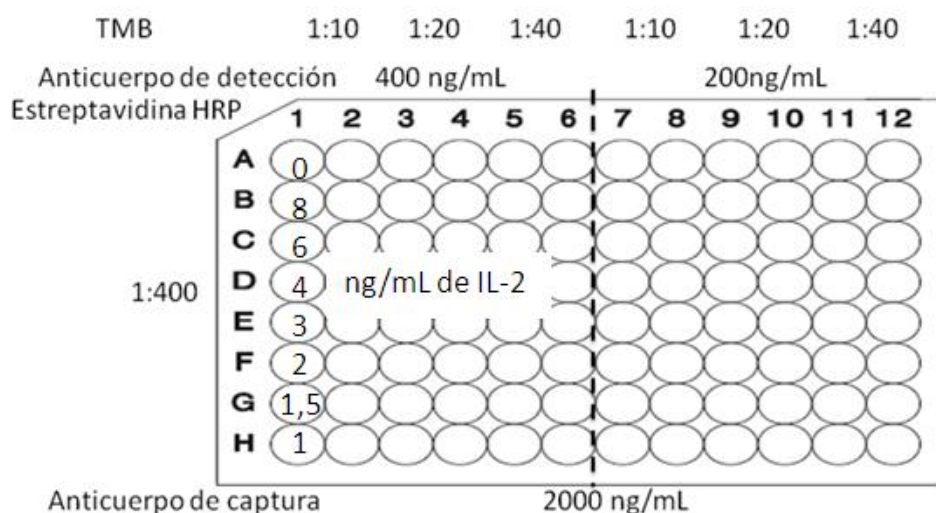


Figura 7. Matriz utilizada para determinar la concentración de anticuerpo de captura y de detección, así como dilución de solución sustrato.

En esta segunda etapa se logró establecer la concentración de anticuerpo de detección, se descartó una dilución de solución sustrato y se observó el comportamiento (linealidad) de la curva estándar tentativa de IL-2.

Una vez que se obtuvo una relación lineal aceptable entre la concentración del analito y la respuesta analítica, se procedió a optimizar la técnica.

Optimización y estandarización de técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador

Para optimizar la técnica, se procedió a determinar el número de lavados necesarios para eliminar el exceso de anticuerpos y/o anticuerpo libre, el tiempo y temperatura de incubación, así como establecer la concentración de solución sustrato, sin que la confiabilidad de los resultados se viera comprometida. Para lograr esto se utilizó un diseño matricial, como el que se muestra en la Figura 8, en el que:

- Se realizaron pruebas con 3 y 4 lavados/etapa.
- Se probaron dos diluciones de solución sustrato: 1:10 y 1:20.
- Se evaluó una temperatura y temperatura de incubación de 25 °C y 24 hrs, respectivamente.

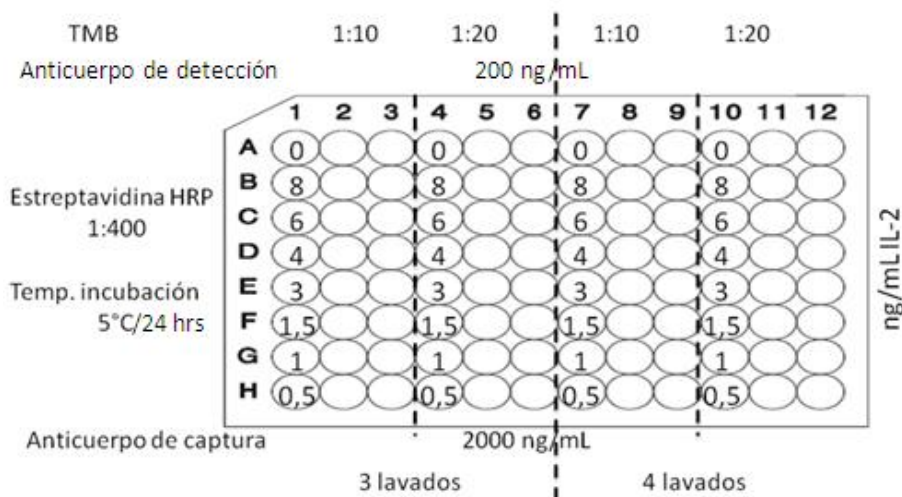


Figura 8. Matriz utilizada, en la etapa de optimización, para determinar temperatura y tiempo de incubación, número de lavados y dilución de solución sustrato.

Una vez que se establecieron el número de lavados/etapa, la dilución de la solución sustrato y el tiempo y temperatura de incubación, se estandarizó la técnica de ELISA. En esta etapa se evaluó el efecto en la respuesta analítica debida a la forma de preparar la solución stock de IL-2 y la concentración de la muestra (sistema nanoacarreador), como se muestra en la Figura 9.

- Se procedió a preparar dos soluciones stock, como se indica a continuación: 1) Tomar 10 μL de la fuente y colocarlos en un tubo cónico de 100 μL que contenga 990 μL de PBS, 2) Tomar 1 μL de la fuente y colocarlos en un tubo cónico de 50 μL que contenga 9 μL de PBS. Ambas soluciones contienen 0,5 ng/mL de IL-2.
- Se probaron tres concentraciones de la muestra: 1x, 0,5x y 0,25x, que equivalen a diluciones de 1:1, 1:2 y 1:4, respectivamente.
- Se utilizó un intervalo de concentración de 0 a 16 ng/mL de IL-2. Donde se utilizaron las siguientes concentraciones: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 ng/mL de IL-2.
-

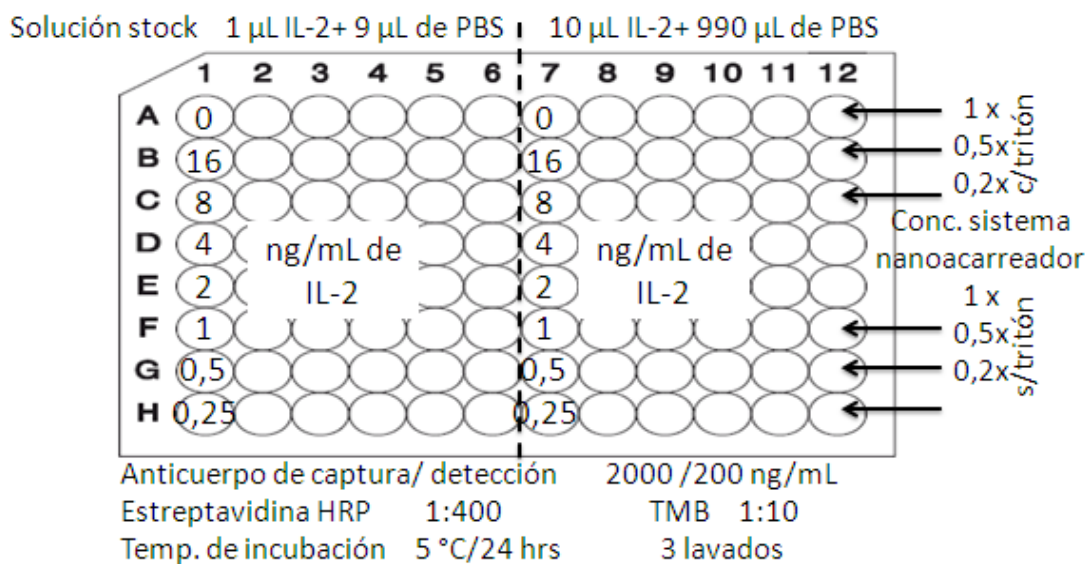


Figura 9. Matriz utilizada, en la etapa de estandarización, para determinar el intervalo de concentración de IL-2, la preparación de solución stock de IL-2 y la concentración de la muestra.

En esta última, se seleccionaron las concentraciones/condiciones que favorecieron una relación proporcional entre la concentración del analito y la respuesta analítica, con lo cual se estandarizó la técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador.

Validación de técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador.

Especificidad

Se analizaron las siguientes muestras:

1. Placebo analítico
2. PBS
3. Placebo adicionado
4. PBS adicionado con IL-2.

El análisis se realizó por sextuplicado, para cada uno de las muestras.

Se calculó la media aritmética (\bar{y}), varianza (S^2), varianza muestral (S_p^2), desviación estándar (S), desviación estándar muestral (S_p) t de Student $t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)}$, con un valor de $\alpha=0,05$.

Linealidad y curva estándar

La curva estándar se realizó por alícuotas independientes, a partir de la solución stock de IL-2, como a continuación se indica:

1. Se adicionó 24,0 μL de la solución stock y colocó en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL de placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 12 ng/mL de IL-2.
2. Se adicionó 20,0 μL de la solución stock y colocó en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 10 ng/mL de IL-2.
3. Se adicionó 16,0 μL de la solución stock y colocó en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 8 ng/mL de IL-2.
4. Se adicionó 12,0 μL de la solución stock y colocó en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 6 ng/mL de IL-2.
5. Se adicionó 8 μL de la solución stock y colocó en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 4 ng/mL de IL-2.

6. Se adicionó 4,0 μL de la solución stock y colocó en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 2 ng/mL de IL-2.
7. Se adicionó 2,0 μL de la solución stock y colocó en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 1 ng/mL de IL-2.
8. Se adicionó 1,0 μL de la solución stock y colocandolo en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 0,5 ng/mL de IL-2.

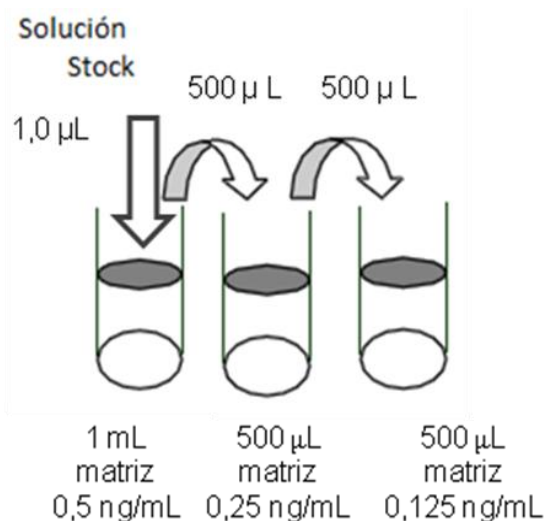
Se realizó el análisis por triplicado para cada nivel de concentración.

Se calculó el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)).

Límite de Cuantificación y límite de detección.

A partir de la solución que contiene 0,5 ng/mL, realizar las siguientes diluciones como a continuación se indica:

1. Se tomó 1,0 μL de la solución stock se colocó en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL de placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 0,5 ng/mL de IL-2.
2. Se tomaron 500 μL de la solución anterior y se colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 500 μL de placebo analítico. La solución final tuvo una concentración de n contiene 0,25 ng/mL de IL-2.
3. Se tomaron 500 μL de la solución anterior y se colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 500 μL de placebo analítico. La solución final tuvo una concentración de 0,125 ng/mL de IL-2.



Se analizaron por triplicado cada uno de los niveles de concentración.

Se calculó el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)), la desviación estándar para los blancos (S_b) y la pendiente (b_1).

El LD y el LC se determinaron mediante la curva de calibración basada en la desviación estándar de los blancos.

Intervalo de concentración

Una vez realizada la curva estándar (curva de calibración) de acuerdo a lo indicado en la linealidad, desde una concentración de 12 ng/mL hasta 0,125 ng/mL. Establecer el intervalo de concentración para curva estándar mediante el coeficiente de variación (CV) para cada nivel de concentración.

Se calculó el coeficiente de variación (CV) para cada nivel de concentración.

Exactitud

Se ensayaron 3 niveles de concentración, bajo, medio y alto. Las soluciones se prepararon como a continuación se indica:

1. Alto. Se tomaron 20,0 μ L de la solución stock y colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 10 ng/mL de IL-2.
1. Medio. Se tomaron 16,0 μ L de la solución stock y colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL de placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 8 ng/mL de IL-2.
2. Bajo. Se tomaron 12,0 μ L de la solución stock y colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL de placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 6 ng/mL de IL-2.

El análisis se realizó por sextuplicado para los niveles de concentración bajo, medio y alto.

Se calculó la media aritmética y el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro para cada nivel de concentración.

Repetibilidad

Se ensayaron 3 niveles de concentración, bajo, medio y alto. Los niveles de concentración se prepararon como a continuación se indica:

1. Alto. Se tomaron 20,0 μL de la solución stock y colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 10 ng/mL de IL-2.
2. Medio. Se tomaron 16,0 μL de la solución stock y colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL de placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 8 ng/mL de IL-2.
3. Bajo. Se tomaron 12,0 μL de la solución stock y colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL de placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 6 ng/mL de IL-2.

El análisis se realizó por sextuplicado para cada nivel de concentración.

Se calculó el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro para cada nivel de concentración.

Precisión intermedia

Para realizar esta prueba se preparó la siguiente solución:

1. Se tomaron 12,0 μL de la solución stock y colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL de placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 6 ng/mL de IL-2.

El análisis se realizó por sextuplicado por 2 analistas diferentes en 2 días diferentes de acuerdo al procedimiento de valoración.

Se calculó la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) de la potencia utilizando todos los resultados.

Estabilidad analítica de la muestra

Para determinar la estabilidad analítica de la muestra se procedió a preparar las siguientes muestras como a continuación se indica:

1. Se tomaron 12,0 μL de la solución stock y colocaron en un tubo cónico de 2 mL que contenía 1 mL de placebo analítico y se homogenizó. La solución final tuvo una concentración de 6 ng/mL de IL-2.

Las muestras se almacenaron en un tubo de polipropileno a 25 °C durante una y dos horas. El análisis se realizó por sextuplicado de acuerdo al procedimiento de valoración.

Se calculó la media aritmética (y) de la potencia y la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial (condición normal).

Robustez

Para este parámetro se utilizó una pipeta de capacidad y marca diferente (Rainin® 200 μL) para adicionar los anticuerpos a la inmunoplaca.

Las muestras se analizaron por sextuplicado y se reportó la concentración del analito, para las muestras de condición normal de operación y para las muestras en la condiciones de operación diferente, expresadas como porcentaje.

Se calculó la media aritmética de la condición normal de operación (y_0), la media aritmética para cada condición de operación diferente a la condición normal (y_1) y se determinó la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal [d_1].

Los resultados deben expresarse como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de desempeño y criterios de aceptación.

Parámetro	Criterios de aceptación
Especificidad	La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito. ²¹ .
Linealidad	$r^2 \geq 0,95$ IC(β_1), no debe incluir el cero. ^{21,30}
Intervalo de concentración	CV $\leq 15\%$, para cada nivel de concentración. CV $\leq 20\%$ en el límite de cuantificación. ^{22,30}
Exactitud	\bar{y} del porcentaje de recobro debe ser $\pm 15\%$, para la concentración baja, media y alta. ³⁰
Estabilidad analítica de la muestra	$ d \leq 5\%$. ²¹
Precisión	Repetibilidad El CV del porcentaje de recobro para cada nivel de concentración debe ser $\leq 15\%$. ³⁰
	Precisión intermedia CV $\leq 15\%$. ^{21,30}
Límite de cuantificación	$r^2 \geq 0,95$ IC (β_1), no debe incluir el cero. ^{21,22}
Límite de detección	$r^2 \geq 0,95$ IC(β_1), no debe incluir el cero. ^{21,22}
Robustez	$ d \leq 5\%$. ²¹

Fabricación de suspensión inyectable de nanoacarreadores con IL-2.^{4,8}

1. Se pesó con exactitud aproximadamente 30 mmoles de espermidin colesterol y se colocaron en un tubo de ensayo de 13x100 mm, previamente esterilizado.
2. Se agregaron 30 mmoles de fosfatidilcolina al tubo de ensayo, con ayuda de una microjeringa de 100 μ L.
3. Con ayuda de una micropipeta de 1000 μ L, se agregaron 3 mL de cloroformo a la mezcla de lípidos. Se agitó hasta observar una solución.
4. La solución se separó en tres tubos de ensayo de 13x100 mm estériles.

5. Se evaporó el disolvente mediante una corriente de nitrógeno.
6. A cada tubo se le agregó IL-2 a 100 UI/mL de producto final diluida en un máximo de 700 µL de PBS.
7. Cada tubo se sonicó en 3 ciclos de 5 segundos, con descanso de 10 segundos entre cada ciclo.
8. Se procedió a colocar la solución de lípidos, contenida en cada tubo, en un tubo de ensayo de 13x100 mm estéril.
9. Se sonicó nuevamente, en 3 ciclos de 5 segundos, con descanso de 10 segundos entre cada ciclo.
10. La solución se dividió en dos tubos cónicos de polipropileno de 1,5 mL, llenándolos a su máxima capacidad con PBS.
11. El contenido de los tubos cónicos de 1,5 mL se ultracentrifugó a 40 000 rpm durante 40 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en PBS.
12. Se trasvasó la solución de los 2 tubos a un tubo de polipropileno de 50 mL y se agregó PBS cbp 40 mL.
13. El producto final se acondicionó, con ayuda del dispensador múltiple, en frasco vial de 2,0 mL con tapón de neopreno y casquillo de aluminio, previamente esterilizados, en presencia de nitrógeno.

Cuantificación de IL-2, total y expuesta, en el sistema nanoacarreador mediante técnica de ELISA (técnica estandarizada)

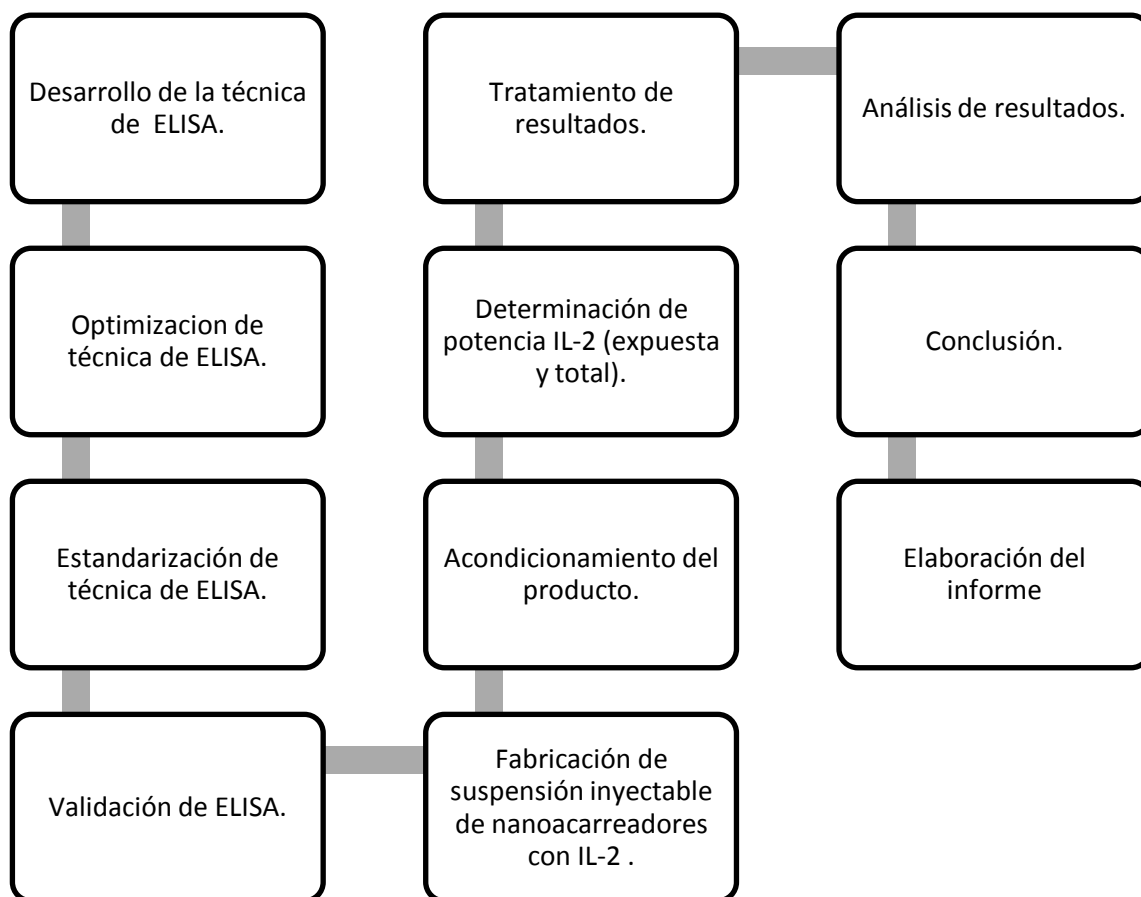
Preparación de la muestra:

- **Cuantificación de IL-2 total.** Se tomó 1 mL de la solución inyectable de nanoacarreadores que contienen IL-2. Se colocó en un tubo cónico de 2 mL, se le adicionaron 100 µL de solución tritón y se homogenizó.
- **Cuantificación de IL-2 expuesta.** Se tomó 1 mL de la solución inyectable de nanoacarreadores que contienen IL-2 y se colocó en un tubo cónico de 2 mL.

Para cuantificar la IL-2 expuesta y contenida se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se transfirieron 100 μ L/pozo del anticuerpo de captura a una placa de ELISA. La placa se selló con papel Parafilm® e incubó a 5 °C \pm 2 durante 24 hrs.
2. Se aspiró el contenido de cada pozo y se adicionaron 300 μ L de buffer de lavado con ayuda del dispensador múltiple. El proceso se repitió dos veces más para un total de 3 lavados. Después del último lavado, se removi6 el remanente de buffer de lavado por aspiraci6n e inversi6n de la placa. Secar con una toalla de papel limpia.
3. Se adicionaron 50 μ L/pozo de soluci6n de PVP, para bloquear. Se incub6 a 5 °C \pm 2 durante una hora. Se repiti6 el proceso de lavado/aspirado descrito en el paso dos.
4. Se adicionaron 100 μ L/pozo de la muestra. Para homogenizar se golpe6 suavemente el marco de la placa durante un min. Se cubri6 la placa con papel Parafilm® nuevo y se incub6 por 24 horas a 5 °C \pm 2. Se repiti6 el proceso de lavado/aspirado descrito en el paso 2.
5. Se adicionaron 100 μ L/pozo del anticuerpo de detecci6n. Se homogeniz6 golpeando suavemente el borde de la placa y se cubri6 con papel Parafilm® nuevo. La placa se incub6 por dos horas a temperatura ambiente. Se repiti6 el proceso de lavado/aspirado descrito en el paso 2.
6. Se adicionaron 100 μ L/pozo de estreptavidina HRP. Para homogenizar se golpe6 suavemente el marco de la placa durante 1 min. Se cubri6 la placa con Parafilm® y se incub6 por 20 min a 5 °C \pm 2. Se repiti6 el proceso de lavado/aspirado descrito en el paso 2.
7. Se adicionaron 100 μ L/pozo de soluci6n sustrato. Se incub6 30 minutos a temperatura ambiente., evitando colocar la placa a luz directa.
8. Se adicionaron 50 μ L/pozo de soluci6n stop. Se homogeniz6 golpeando suavemente el borde de la placa y se cubri6 con papel Parafilm®.
9. Se determin6 la densidad 6ptica de cada pozo a 450 nm y 570 nm, dentro de 30 minutos, en un lector de ELISA ELx800 (ver Figura 11). Se rest6 la densidad 6ptica obtenida a 570 nm a 450 nm (450 nm – 570 nm) para eliminar las imperfecciones 6pticas de la placa. Lecturas realizadas directamente a 450 nm sin correcci6n de lectura pueden ser menos exactas.
10. Los resultados se expresaron una vez realizada la correcci6n de lecturas.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Validación de la técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador

Especificidad

Con el fin de determinar si los componentes presentes en el placebo analítico provocan una interferencia en la respuesta analítica, se ensayaron bajo las mismas condiciones las siguientes muestras: PBS, placebo analítico, placebo adicionado y PBS adicionado con IL-2. Los resultados indicaron que no existe interferencia por parte de los componentes presentes en la matriz, por lo tanto la respuesta analítica se debe únicamente al analito. (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Respuesta analítica del PBS – Respuesta placebo analítico.

	Absorbancia	
	PBS	Placebo analítico
	0.055	0.103
	0.070	0.105
	0.064	0.120
	0.069	0.127
	0.068	0.101
	0.067	0.086
Media aritmética	0.066	0.107
Varianza	3.07×10^{-5}	2.13×10^{-4}
Desv. Estándar	0.0055	0.0146
n	6	6

$$H_0: \mu_A = \mu_{A+X}; \mu_A + \mu_{A+X} = 0$$

$$H_a: \mu_A \neq \mu_{A+X}; \mu_A + \mu_{A+X} \neq 0$$

$$\alpha = 0,05$$

$$t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)} = -2,4728$$

$$t_{(1-\alpha/2, n_1+n_2-2)} = 2,4728$$

$$S_p^2 = 0,010071$$

$$S_p = 0,10035$$

$$t = -0,7163$$

No existe evidencia suficiente para rechazar H_0 con un valor de confianza del 95,0%. Por lo tanto, no existe interferencia por parte de los componentes presentes en la matriz.

Tabla 6. Respuesta analítica de PBS-IL-2

	Absorbancia	
	PBS- IL-2	Placebo adicionado
	0,887	0,890
	0,834	0,830
	0,834	0,779
	0,868	0,826
	0,829	0,789
	0,826	0,832
Media aritmética	0,845	0,824
Varianza	$4,82 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-3}$
Desv. Estándar	0.0219	0.03927
n	6	6

$$S_p^2 = 0,03061$$

$$S_p = 0,1749$$

$$t = 0,2013$$

No existe evidencia suficiente para rechazar H_0 con un valor de confianza del 95,0%. Por lo tanto, la respuesta del método se debe únicamente al analito.

Linealidad/Intervalo de concentración.

Para evaluar si la curva estándar a utilizar presenta un comportamiento proporcional entre la respuesta analítica y la concentración del analito, se usó un intervalo de concentración de 0 a 12 ng/mL por alícuotas independientes. Los resultados muestran que existe un comportamiento lineal en el intervalo de concentración establecido. (Tabla 7 y Figura 10)

Tabla 7. Concentración del analito – Respuesta analítica (abs)

Concentración (ng/mL)	Media aritmética	Desviación estándar	C.V. %
12	0.887	0.05	5.43
10	0.763	0.02	2.44
8	0.696	0.02	2.92
6	0.575	0.06	9.76
4	0.499	0.02	4.16
0.5	0.082	0.02	12.81
0.25	0.093	0.01	6.88
0.125	0.032	0.01	15.18

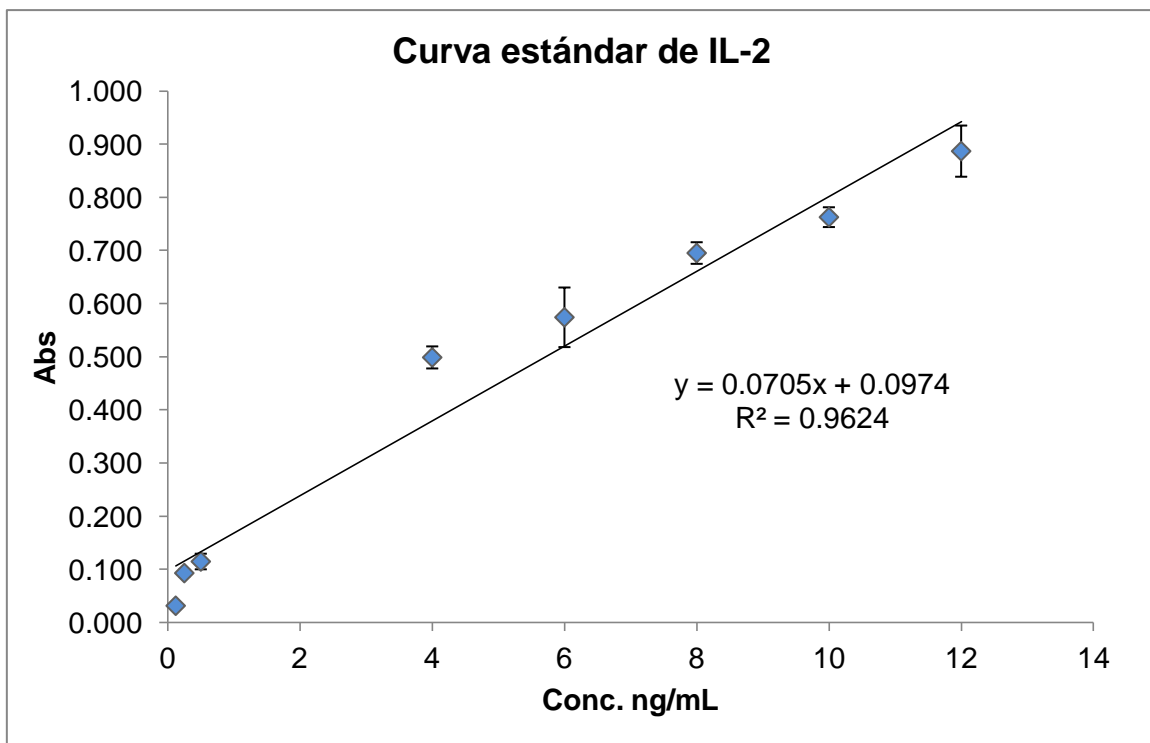


Figura. 10. Curva estándar de IL-2. Se utilizó un intervalo de concentración de 0 a 12 ng/ mL. Pendiente (b_1)= 0.0705 Intersección (b_0) = 0.0974 $r^2 = 0.9624$ IC(β_1) = 0.010, 0.134. El intervalo no incluye al cero. El método es lineal en un intervalo de concentración de 0,125 a 12,0 ng/mL.

Exactitud y repetibilidad

Con la finalidad de evaluar si el método es capaz de proporcionar resultados acordes a la cantidad adicionada del analito con respecto a la cantidad de referencia, así como de ofrecer precisión intraensayo; se evaluaron tres niveles de concentración bajo las mismas condiciones. Los resultados indicaron que existe precisión intraensayo y exactitud en los tres niveles de concentración (tabla 8).

Tabla 8. Promedio cantidad adicionada-Promedio cantidad recuperada-Promedio % de recobro

Concentración	Promedio cantidad adicionada (ng/mL)	Promedio cantidad recuperada (ng/mL)	Promedio % de recobro	S	% CV
Alta	9.80	9.08	92.67	2.69	2.90
Media	7.84	8.43	107.58	11.15	10.36
Baja	5.90	7.11	120.43	12.07	10.02

n = 8

La media aritmética para el % de recobro difiere en menos del $\pm 15\%$ para la concentración alta y media. El CV para el porcentaje de recobro en las concentraciones baja, media y alta es menor a $\pm 15\%$.

Precisión intermedia

Para determinar que el método mantiene su capacidad de proporcionar resultados confiables al utilizarlo en diferentes días y por diferentes analistas, se evaluó la precisión inter-ensayo mediante su realización por dos analistas en diferentes días en un nivel de concentración. Los resultados indican que existe precisión intermedia (tabla 9).

Tabla 9. Absorbancia del analito a una concentración de 6,0 ng/mL.

	Analista		
	1	2	
Día	1	0.762	0.731
		0.734	0.814
		0.695	0.530
		0.831	0.790
		0.728	0.779
	2	0.816	0.741
		0.756	0.770
		0.736	0.740
		0.787	0.770
		0.788	0.788
	0.835	0.790	
	0.801	0.829	
Promedio	0.764		
S	0.06		
% CV	8.11		

El coeficiente de variación obtenido es menor al 15%, por lo que el método presenta precisión intermedia.

Estabilidad analítica

A fin de determinar si el analito mantiene sus características químicas en un intervalo de tiempo equivalente al de su análisis, se evaluó su estabilidad durante una y dos horas a una temperatura de 25°C. Los resultados confirmaron que el analito mantiene su concentración inalterada durante dos horas (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración del analito en ng/mL.

Muestra	Inicial (Y ₀)	Tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente (25°)	
		1 hora	2 horas
1	7.697	8.417	8.417
2	7.462	8.458	9.275
3	7.697	9.123	8.348
4	7.005	9.040	9.538
5	7.393	9.704	8.666
6	7.310	10.548	10.701
7	6.742	8.874	9.441
Promedio	7.330	9.166	9.198
% d1, d2		1.84	1.87

El valor de d1 y d2 no exceden el 5%, por tanto el analito es estable durante dos horas.

Limite de cuantificación y limite de detección.

Para establecer la cantidad mínima del analito que puede ser cuantificada con exactitud, así como la que puede ser detectada, se determinó el límite de cuantificación y detección mediante la curva de calibración basada en la desviación estándar de los blancos. Se estableció el límite de cuantificación en 0.166 ng/mL y el de detección en 0.055 ng/mL (tabla 11 y 12).

Tabla 11. Cantidad adicionada (x)- Respuesta analítica (y).

Placebo analítico adicionado	x (ng/mL)	y (abs)
1	0.50	0.299
2	0.50	0.291
3	0.25	0.227
4	0.25	0.227
5	0.25	0.215
6	0.125	0.168
7	0.125	0.160
8	0.125	0.161
9	0.125	0.170

$b_1 = 0.3473$
 $r^2 = 0.9724$
 $b_0 = 0.1263$
 $S_{y/x} = 0.0096$
 $S_{b1} = 0.0221$
 $\alpha = 0.05$

$IC(\beta_1) = 0.2950, 0.3997$. El intervalo no incluye el cero.

Tabla 12. Placebo analítico-Respuesta analítica.

Placebo analítico	y (Absorbancia)
1	0.043
2	0.040
3	0.040
4	0.039
5	0.039
6	0.040
7	0.041
8	0.057
9	0.039

$\Sigma y = 0.3780$
 $\Sigma y^2 = 0.0161$
 $n = 9$
 $S_b = 0.0058$

$$LD = (3.3 \times 0.0058) / 0.3473 = 0.055 \text{ ng/mL}$$

$$LC = (10 \times 0.0058) / 0.3473 = 0.166 \text{ ng/mL}$$

Robustez

Por último, con el propósito de mostrar que el método mantiene su capacidad de proporcionar resultados confiables al hacer un cambio pequeño pero deliberado en su uso, se utilizó una micropipeta de capacidad y marca diferente para adicionar el analito. El resultado indicó que el método es robusto para el cambio de instrumento de medición (tabla 13).

Tabla 13. Robustez al cambio de capacidad y marca de pipeta para adicionar el analito.

Muestra	Con ng/mL	
	y_1	Normal (y_0)
1	10.216	9.247
2	10.244	8.860
3	9.912	8.320
4	9.926	10.202
5	9.815	8.777
6	9.870	9.995
Promedio	9.997	9.234
d_1	0.76	



Figura 11. Inmunoplatea con la curva estándar de IL-2.

Determinación de la potencia de IL-2, expuesta y total.

Para cuantificar la cantidad de IL-2 que se encuentra expuesta en la superficie del sistema nanoacarreador, así como la presente en el interior, se determinó la potencia en UI/mL de una muestra de la suspensión, mediante la evaluación del analito en presencia y ausencia de un detergente capaz de disolver el sistema nanoacarreador. Los resultados indicaron que la potencia total promedio es de 91.99 UI/mL, de las cuales 44.16 están disponibles en la superficie del sistema.

Tabla 14. Potencia de IL-2 en el sistema nanoacarreador.

En UI/mL	Total	Expuesta
	90.44	37.30
	93.76	39.29
	91.77	55.90
Promedio	91.99	44.16
S	1.67	10.21
% CV	1.82	23.13

Una vez concluida la validación del bioensayo, con la que se pretendió demostrar que el método es capaz de proporcionar resultados con un alto grado de certeza y reproducibilidad y en la que se demostró el cumplimiento satisfactorio de los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, intervalo, exactitud, estabilidad analítica de la muestra, repetibilidad, precisión intermedia, límite de cuantificación y detección y robustez, se presenta el resumen de validación (tabla 15); donde se pone de manifiesto los resultados, especificaciones y conformidad con los resultados.

Tabla 15. Resumen de validación.

Parámetro	Resultado	Especificación	Dictamen
Especificidad	La respuesta del método se debe únicamente al analito	La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito. ²¹	Cumple
Linealidad	$r^2 = 0.9624$ IC (β_1) = 0.010, 0.134. El intervalo no incluye al cero.	$r^2 \geq 0,95$ IC(β_1), no debe incluir el cero. ^{21,30}	Cumple
Intervalo de concentración	El intervalo de concentración se establece de 0.125 a 12.0 ng/mL.	CV $\leq 15\%$, en cada nivel de concentración. CV $\leq 20\%$ en el límite de cuantificación. ^{22, 30}	Cumple
Exactitud	Baja: 120.43% Media: 107.58% Alta: 92.67%	\bar{y} del porcentaje de recobro debe ser $\pm 15\%$, para la concentración baja, media y alta. ³⁰	Cumple para los niveles de concentración media y alta
Estabilidad analítica de la muestra	$d_1 = 1.84\%$ $d_2 = 1.87\%$	$ d \leq 5\%$. ²¹	Cumple para d_1 y d_2 .
Precisión	Repetibilidad Baja CV = 10.02% Media CV = 10.36% Alta CV = 2,90%	CV del porcentaje de recobro para cada nivel de concentración debe ser $\leq 15\%$. ³⁰	Cumple para los niveles de concentración baja, media y alta.
	Precisión intermedia CV = 8.11 %	CV $\leq 15\%$. ^{21,30}	Cumple
Limite de cuantificación	$r^2 \geq 0,9724$ IC(β_1), 0.2950, 0.3997 LC = 0.166 ng/mL	$r^2 \geq 0,95$ IC (β_1), no debe incluir el cero. ^{21, 22}	Cumple
Límite de detección	$r^2 \geq 0,9724$ IC(β_1), 0.2950, 0.3997 LD = 0.055 ng/mL	$r^2 \geq 0,95$ IC (β_1), no debe incluir el cero. ^{21, 22}	Cumple
Robustez	$ d = 0.76\%$	$ d \leq 5\%$. ²¹	Cumple

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La introducción de nuevos ensayos desarrollados por el laboratorio, para su propio uso, debe realizarse con base a actividades planificadas por personal calificado que cuente con los recursos necesarios y si es preciso, las actividades deben ser actualizadas a medida que se avanza en el desarrollo del método.

En este contexto, se ha demostrado que el desarrollo de inmunoensayos permite detectar y/o cuantificar pequeñas cantidades de un analito presente en una muestra o matriz biológica, por tanto, representan una alternativa lo suficientemente ventajosa, frente a otras técnicas, debido a su alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, al hacer uso de una metodología no normalizada fue necesario recurrir a la validación con la finalidad de confirmar, a través de pruebas de laboratorio y evidencias objetivas, que el bioensayo desarrollado cumple con requisitos particulares para los cuales fue diseñado.

Una de las mayores ventajas que se obtiene al desarrollar un bioensayo, basado en la actividad enzimática, es su sencillez, ya que no se requiere de equipos sumamente sofisticados para llevarlos a cabo. De igual manera, su versatilidad permite que pueda aplicarse para detectar/cuantificar un analito de interés en un sin número de aplicaciones. Por tanto, al desarrollar un bioensayo capaz de cuantificar IL-2 contenida y expuesta en un sistema nanoacarreador, su aplicación dentro del Laboratorio de Oncología Celular se podrá ampliar, no sólo para determinar la estabilidad química de dicho sistema, sino que podrá utilizarse en la detección/cuantificación de IL-2 en sueros, tejidos u órganos, en los que se tenga interés por estudiar la distribución o presencia de dicha citocina, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro*.

El uso de diseños matriciales para ensayar diversos parámetros en una sola determinación, hizo posible desarrollar el bioensayo para cuantificar la potencia de la IL-2 de una manera más rápida, sencilla y barata, ya que se pudo reducir el uso de reactivos y al mismo tiempo, se pudieron obtener resultados confiables en poco tiempo, lo cual representó un ahorro en la adquisición de reactivos y materiales, lo que se ve traducido en un ahorro significativo de capital, ya que no se utilizó el kit distribuido por el fabricante, lo que redujo costos en la adquisición de insumos.

La optimización del método permitió reducir costos, pero de igual manera, reducir el tiempo de horas/hombre para llevar a cabo la experimentación, sin que se viera comprometida la confiabilidad de los resultados. Ya que se lograron reducir el número de lavados y la cantidad de buffer de lavado para los mismos, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Es bien sabido que una gama de factores determinan la exactitud y confiabilidad de los ensayos realizados en el laboratorio, como lo son: el factor humano, instalaciones, condiciones ambientales, equipos, muestreo y manejo de muestras. Por este motivo se recurrió a la validación, en donde encontramos lo siguiente.

Entre los parámetros de desempeño a estudiar en un validación se encuentra la especificidad, ya que nos da razón si el método es capaz de detectar/cuantificar únicamente al analito, sin interferencias debido a los demás componentes presentes en la muestra. Para demostrar que esto se cumple, se recurrió a realizar una prueba t de Student, con un nivel de significancia $\alpha=0,05$, en la que encontramos que el valor obtenido de $t= 0,2013$ se encuentra dentro del intervalo de confianza, $-2,4728 - 2,4728$, con la cual podemos inferir, al no rechazar la hipótesis nula, que la respuesta del método se debe únicamente al analito. Por tanto, el método es específico, que es una característica esencial de los ensayos inmunoenzimáticos.

Al evaluar la linealidad del método, encontramos un coeficiente de determinación $r^2= 0,9624$ y un $IC(\beta_1) = 0.010, 0.134$, con lo cual podemos inferir que el método tiene la habilidad de proporcionar resultados confiables proporcionales a la concentración del analito. Aunado a esto, se observa que el CV de variación para cada nivel de concentración es menor al 15%, por lo que el intervalo de concentración se establece de 0,125 a 12,0 ng/mL.

Con el fin comprobar si el método proporciona resultados precisos, se procedió a evaluar la repetibilidad y precisión intermedia. Para la primera, se ensayaron 3 niveles de concentración en los que se encontró que el CV es menor al 15%, lo que significa que el método presenta precisión intra-ensayo. En cuanto a la precisión intermedia, sólo se evaluó un nivel de concentración, por dos diferentes analistas en distintos días, obteniéndose un $CV= 8,11\%$, lo que sugiere precisión inter-ensayo. Con base a esto, podemos inferir que existe concordancia entre los resultados obtenidos cuando el análisis se realiza a diferentes concentraciones, por analistas diferentes y en días diferentes.

Otro parámetro dentro de la validación es la exactitud, en la que encontramos que el valor promedio para el % de recobro es menor al $\pm 15\%$ para la concentración alta y media. Sin embargo, para la concentración baja encontramos un valor de 120,43%, que es superior al $\pm 15\%$, lo que supone un mal manejo o toma de muestra, al momento de pipetear la IL-2 y colocarla en el placebo analítico, que se refleja como un valor mayor obtenido con respecto al valor de referencia. Aunque esto, no supone la falta de exactitud del método, ya que de acuerdo con la ICH Q2(R1), la exactitud se puede inferir una vez que la linealidad, precisión y especificidad se hayan establecido.

De acuerdo con los resultados obtenidos al evaluar la estabilidad analítica de la muestra, encontramos que no existe diferencia significativa en la potencia del

analito, con un valor de d1 y d2 menor al 5%, al almacenarse por 1 y 2 horas a 25 °C. Lo que evidencia, que la potencia de la IL-2 no se ve comprometida desde la toma de muestra hasta el análisis de la misma.

Anteriormente se mencionó que el CV para cada nivel de concentración no excede el 15%. Dicho esto, y al observar el CV para las concentraciones más bajas, que corresponden a 0,125 y 0,25 ng/mL, encontramos valores de 6,88 y 15,18% respectivamente, lo que supone que aún no se ha alcanzado el límite de cuantificación y detección. Para corroborar lo dicho, se procedió a calcular el LC y LD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos, estableciéndose el LC a 0,166 ng/mL y el LD a 0,055 ng/mL, con lo cual se confirma la alta sensibilidad que presentan los inmunoensayos.

Debido a que el método será utilizado por amplia gama de analistas y en un determinado caso en otros equipos, debe ser capaz de proporcionar datos fiables, por tanto debe ser lo suficientemente robusto, con lo cual se garantiza que el método no pierda su eficacia durante su uso. En este contexto, se demuestra que el método es capaz de proporcionar resultados confiables cuando se cuenta con instrumentos de función similar, aunque no necesariamente del mismo fabricante.

Por lo tanto, una vez concluida la etapa de validación, se determina con un alto grado de confianza, que la potencia de la IL-2 contenida (total) en el sistema nanoacarreador es de 91,99 UI/mL, que difiere en 8,01 UI/mL con respecto al valor teórico. De igual manera, se determinó que la potencia de la IL-2 expuesta en la superficie del sistema nanoacarreador es de 44,16 UI/mL, sin embargo es importante mencionar que el %CV es superior al 15%, lo que sugiere que existe una variación significativa en el tamaño del sistema nanoacarreador. Estos resultados evidencian que el bioensayo está debidamente desarrollado para satisfacer los requisitos para los que fue diseñado, que es la cuantificación de IL-2 contenida en liposomas.

CONCLUSIONES

Se validó el bioensayo, basado en la técnica de ELISA, para cuantificar IL-2, sustentado en un cumplimiento satisfactorio de los parámetros de validación de métodos bioanalíticos.

El uso de diseños matriciales permitió optimizar y estandarizar la técnica de ELISA para cuantificar IL-2 en el sistema nanoacarreador, manteniendo la confiabilidad de los resultados.

Se logró desarrollar un bioensayo que permite cuantificar la IL-2 contenida y/o expuesta en un sistema nanoacarreador.

Con el presente trabajo se impulsó el desarrollo de productos biotecnológicos, especialmente formulados en forma nanoestructurada, que provean una mejora en el tiempo de vida media, termoestabilidad, solubilidad, seguridad y eficacia en los productos farmacéuticos antineoplásicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud [sede Web]. Washington: OPS; 2008 [acceso 5 de noviembre de 2011]. Vacuna contra el VPH: buscan superar obstáculos. Disponible en: http://www.paho.org/spanish/dd/pin/ahora03_jul08.htm.
2. Organización Mundial de la Salud. Vacunas contra el virus del papiloma humano, Documento de posición de la OMS. [Monografía en internet]. 15° ed. Ginebra: OMS; 2009 [acceso 6 de noviembre de 2011]. Disponible en: http://www.who.int/immunization/documents/WER_report HPV Spanish.pdf.
3. Encourager l' utilisation de la technologie, l'innovation et la société de l'information pour la compétitivité. Aplicaciones industriales de la nanotecnología. [Monografía en internet]. 2008. Asturias: ESTIIC; [acceso 6 de noviembre de 2011]. Disponible: http://www.idepa.es/sites/web/idepaweb/Repositorios/galeria_descargas_idepa/AplicacionesIndustriales_Nanotecnologia.pdf
4. Corona S.R., Corona M.T, inventores; Universidad Nacional Autónoma de México, titular. Composición de un Producto Antineoplásico e Inmunoregulador y su Uso para el Tratamiento de Cáncer Cérvico Uterino. Patente Mexicana. Expediente: MX/a/2008/008681.
5. Wu J, Chen D, Pepe J, Himberg BE, Rich M. Application of liposomes to sonoporation. *Ultrasound in Med. & Biol.* (NY). 2006; 32(3): 429-437.
6. Farrell S, Sirkar KK. Controlled release of liposomes. *J Memb Sci* (NJ). 1997; 127: 223-227.
7. Torchilin VP. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nat Rev Drug Discov* (London). 2005; 4: 145-160.
8. Corona T, Rangel R, Hernández M, Baeza I, Ibáñez M, Weiss B. Characterization of cationic liposomes having IL-2 expressed on the external surface, and their affinity to cervical cancer cells expressing the IL-2 receptor. *J Drug Target* (London). 2009;17 (7): 496-501.
9. Ishida T, Kojima H, Hrashima H, Kiwda H. Biodistribution of liposomes and C3 fragments associated with liposomes: evaluation of their relationship. *Int J Pharm* (Japan). 2000; 205: 183-193.
10. Lasic DD. Application of liposomes. In: Lipowsky R, Sackmann E, editor. *Handbook of Biological Physics*. California: Elsevier Science B.V.; 1995. p 491-519.
11. Bundavari S, coordinador. *The Merck Index*. 12a ed. New York: Merck and Co., Inc.; 1996.
12. XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Caracterización de liposomas catiónicos como acarreadores de interleucina 2 (IL-2); 13-18 de noviembre 2005. Oaxaca: Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.; 2005.
13. Rho J., Lovie G. *Handbook of Pharmaceutical Biotechnology*, New York: Pharmaceutical Products Press; 2003.
14. Zwirner NW. ELISA. En: Aníbal MR, editor. *Inmunología e Inmunoquímica, Fundamentos*. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1996. p. 798-820.
15. Crowther J. *The ELISA Guidebook Vol 149*. Vienna: Humana Press; 2002.

16. Crowther J. The ELISA Guidebook Vol 516. 2^a ed. Vienna: Humana Press; 2009.
17. Toraño PG, Hernández VI, Baly A, Toledo RM. Validación de un ensayo tipo ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular *Haemophilus influenzae* tipo b. Rev Cubana Med Trop. 2005; 57 (3): 8-20.
18. R&D System, Inc. ELISA development guide: a guide for the use of antibodies in ELISA development. Minnesota: R&D Systems, Inc; 2010. Documentos de trabajo 17.
19. Rodrigues WC, Wang G, Moore C, Agrawal A, Vincent MJ, Soares JR. Development and Validation of ELISA and CG- MS procedures for the Quantification of Dextromethophan and its Main Metabolite Dextrophan in Urine and Oral Fluid.
20. Howanitz PJ. Howanitz JH. Inmunoensayos y técnicas afines. Marcadores tumorales. En: Bernard HJ, director. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Tomo I. 8a ed. México: Salvat; 1991. p. 351-369.
21. Guía de Validación de Método Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A.C.
22. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1); 4 Version. Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005).
23. Ludwig Huber. Validation of Analytical Methods. New York: Agilent Technologies; 2007.
24. ISO/IEC 17025, General requirements for de competence of testing and calibration laboratories, 2005.
25. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Ginebra: OMS; 2010. Serie de informes técnicos: 957.
26. Chaloner LG, Anderson R, Egan A. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2: Validation. Geneva: WHO; 1997. Documentos de trabajo: 100.
27. Breaux J, Jones K, Boulas P. Analytical methods development and validation. Analytical Chemistry & Testing. 2003.
28. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Reserch, Center for Biologics Evaluation and Reserch. Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies; Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. U.S.A.: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Reserch, Center for Biologics Evaluation and Reserch; 1998. Documentos de trabajo: 37.
29. World Health Organization. Supplementary Guidelines on Good Manufacturing Practices (GMP): Validation. Geneva: WHO; 2005. Documentos de trabajo: 77.
30. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Reserch. Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. U.S.A.: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Reserch; 1998. Documentos de trabajo: 16.

31. Trapman S, Burns M, Broll H, Macarthur R, Wood R, Zel J. Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories. Belgium: European Commission, Joint Reserch Centre, Institute for Reference Materials and Measurements; 2009. EUR 22756 EN/2-2009. Documentos de trabajo: 48.

ANEXO. FORMULARIO

1. Media aritmética.

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

2. Desviación estándar.

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

3. Coeficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

4. Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica)

5. Intervalo de confianza para la pendiente

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$$Sb_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$IC(\beta_1) = t_{0,975,n-1} Sb_1.$$

6. Intercepción (ordenada al origen)

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

7. Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{n((\sum x^2) - (\sum x)^2) - n(\sum y^2) - (\sum y)^2}$$

8. Porcentaje de recobro.

$$\% \text{ de recobro} = \frac{\bar{x}}{x} \times 100$$

9. Intervalo de confianza para media poblacional

$$IC(\mu) = y \pm t_{0,95,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

n=Número de recobros.

10. Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal.

$$|d_1| = \bar{y}_1 - \bar{y}_0$$

11. Límite de detección.

$$LD = \frac{3,3 \times S_b}{b_1}$$

12. Límite de cuantificación.

$$LC = \frac{10 \times S_b}{b_1}$$

13. Varianza muestral.

$$S_p^2 = \frac{S_1^2(n_1 - 1) + S_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

14. Desviación estándar muestral.

$$S_p = \sqrt{S_p^2}$$

15. t de Student.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - d_0}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$