



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**CARACTERIZACIÓN DE NANOACARREADORES LIPÍDICOS
QUE CONTIENEN FOSFATIDILINOSITOL PARA EL
TRATAMIENTO DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

CRISTIAN CRUZ VÁZQUEZ

DIRECTORA:

DRA. MARÍA TERESA CORONA ORTEGA

**UNIDAD MULTIDICIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL
ZARAGOZA**

**L-4 LABORATORIO DE ONCOLOGÍA CELULAR
Este trabajo recibió apoyo del proyecto PAPIIT 219315**



México, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres, por su apoyo, amor y comprensión. Gracias por todo.

A mis hermanos por preocuparse siempre por mi.

A Verónica por creer en mi.

Gracias, UNAM, FES Zaragoza, UMIEZ, amigos, compañeros y profesores.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	8
Cáncer.....	8
Cáncer cérvico-uterino	8
Inmunoterapia contra el CACU	11
Melanoma	12
Clasificación del melanoma	13
Tratamientos contra el melanoma.....	14
Citocinas y microambiente tumoral	15
Respuesta inmune antitumoral	17
Limitaciones de la terapia con IL-2	18
Liposomas como vehículos para suministro de fármacos	19
Fosfolípidos	23
Características de los liposomas	27
Propiedades biológicas de los liposomas	27
Microscopia electrónica de transmisión	30
Citometría de flujo	34
ELISA	37
Variantes de ELISA.....	37
ELISA indirecto	37
ELISA en sándwich	38
ELISA competitivo	38
Cultivo celular.....	40
Clasificación de los cultivos celulares:	40
Medio de cultivo	42
Contaminación	42
pH y temperatura	43
Sincronización.....	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44

HIPÓTESIS	46
OBJETIVOS GENERALES	47
OJETIVOS PARTICULARES	47
DIAGRAMA DE FLUJO	48
METODOLOGÍA	49
Material	49
Equipo	49
Material Biológico.....	50
Soluciones y Reactivos	50
Métodos	52
Fabricación de Liposomas que contienen PI con y sin IL-2.....	52
Microscopía Electrónica de Transmisión	52
Citometría de Flujo.....	53
Cuantificación de IL-2 mediante la técnica de ELISA	53
Ensayo in vitro.....	55
Ensayo in-vivo.....	56
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
Fabricación y caracterización por microscopia electrónica de transmisión (MET): Determinación de tamaño y morfología de nanoacarreadores con fosfatidilinositol (PI) para encapsular Interleucina 2 (IL-2)	57
Caracterización por citometria de flujo: Determinación del tamaño, complejidad y presencia de IL-2 expresada en la membrana de los nanoacarreadores lipídicos.....	62
Caracterización por ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA): Cuantificación de la IL-2 total contenida y/o expuesta en el sistema nanoacarreador que contiene PI.	70
Ensayo in vitro. Línea celular INBL	83
Ensayo in vitro. Línea celular B16F0	86
Ensayos in vivo: LIPPVAC y LIPPIIL-2 usados como tratamiento tópico en ratones nude (nu/nu) inoculados vía subdérmica con las líneas celulares B16F0 e INBL.	89
Ensayo in vivo. Línea celular INBL	92

Ensayo in vivo. Línea celular B16F0	96
CONCLUSIONES	100
BIBLIOGRAFÍA	101

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la utilidad clínica de las terapias más convencionales está limitada por la incapacidad de entregar las concentraciones terapéuticas de los principios activos a los tejidos diana o por los graves y perjudiciales efectos tóxicos en tejidos y órganos normales. Se han intentado diferentes enfoques para superar estos problemas, al proporcionar una entrega "selectiva" de fármacos en el área afectada usando varios acarreadores. Entre los diferentes tipos de partículas portadoras, los liposomas han recibido la mayor atención.

Durante más de tres décadas, los liposomas (vesículas fosfolipídicas artificiales) obtenidas por diversos métodos a partir de dispersión de lípidos en agua y capaces de encapsular el principio activo, han sido reconocidos como la mejor opción para numerosas aplicaciones.

Los liposomas son biocompatibles, provocan reacciones muy poco o nada antigénicas, pirogénicas, alérgicas y tóxicas; fácilmente sufren biodegradación, protegen al anfitrión de los efectos indeseables del fármaco y al mismo tiempo protege de la acción biodegradable del medio fisiológico y por último pero no menos importante, los liposomas son capaces de entregar sus contenidos dentro de muchas células. El lugar donde el fármaco está encapsulado, ya sea en el núcleo o en la bicapa de los liposomas, depende de las características del mismo y del proceso de encapsulación.

La biodistribución de los liposomas es un parámetro muy importante desde el punto de vista clínico. Los liposomas pueden alterar tanto la distribución en el tejido como la tasa de aclaramiento del fármaco haciendo que el principio activo logre adoptar las características farmacocinéticas del portador. Las variables farmacocinéticas dependen de las características fisicoquímicas de los liposomas, tales como tamaño, carga superficial, embalaje de lípidos de membrana, estabilización estérica, dosis y vía de administración.

En otro orden de ideas, al inicio del proyecto, los nanoacarreadores lipídicos con Interleucina-2 (IL-2), fueron diseñados principalmente para el tratamiento de cáncer cérvico-uterino ya que en México es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia; este tipo de cáncer presenta receptores funcionales para esta citocina inmunorreguladora. Posteriormente, debido a que las células tumorales de otros tipos de cáncer como el melanoma tienen receptores para IL-2 y a que este tipo de cáncer es de alta incidencia, se decidió estudiar también su interacción *in vitro* e *in vivo* con los mencionados nanoacarreadores lipídicos (liposomas).

Existen diversos fármacos o principios activos que podrían ser útiles en el tratamiento de estos tipos de cáncer; sin embargo, poseen una gran variedad de efectos secundarios o tóxicos, un caso particular es el uso de IL-2 que aunque es una citocina fuertemente inmunorreguladora, induce graves efectos tóxicos asociados, tales como hipotensión, síndrome de fuga vascular, edema pulmonar y toxicidad de corazón, por lo cual su uso es limitado. Debido a esto se han buscado nuevas alternativas para la administración de esta citocina; una de ellas es su encapsulación en liposomas para evitar sus efectos tóxicos, mejorar su biodistribución, conservar y/o mejorar su acción antitumoral. Por lo anterior, en el presente trabajo se caracterizó una nueva formulación de liposomas que encapsulan IL-2, así mismo se determinó la interacción de las nanopartículas con la inmunoproteína mencionada con el propósito de evaluar en un futuro el efecto de la IL-2 encapsulada en este tipo de liposomas sobre células tumorales.

MARCO TEÓRICO

Cáncer

El cáncer es una anomalía que puede abordarse de diferentes maneras. Desde el punto de vista biológico, es un trastorno caracterizado por la alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular; su consecuencia es el desarrollo de una clona que puede invadir y destruir los tejidos adyacentes, y diseminarse hacia sitios distantes en los que se forman nuevas colonias u ocurre propagación metastásica. Con frecuencia esta anomalía conduce a la muerte del individuo por deterioro de la función de los órganos vitales. Este trastorno puede remontarse hasta los genes supresores, los oncogenes y productos que controlan la diferenciación y proliferación celular.

En la práctica, cáncer es un término genérico empleado para referirse a más de un centenar de enfermedades distintas, con epidemiología, origen, factores de riesgo, patrones de diseminación, respuesta al tratamiento y pronóstico diversos.

Visto desde otro ángulo, el cáncer es un problema de salud pública, ya que causa una enorme pérdida de vidas humanas y recursos económicos⁽¹⁾.

Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino es una de las principales causas de muerte relacionadas con cáncer entre las mujeres. Para ser más específicos es la segunda neoplasia más común en el mundo entre las mismas. Casi el 85% de los casos ocurren en los países en desarrollo, particularmente en África, Asia y América del sur⁽²⁾. Contrario a lo que sucede en Estados Unidos de América y Europa, donde hasta el 75% de las ocasiones se diagnostica en Estadios Clínicos Tempranos (EC)⁽³⁾; en América Latina se estima que una de cada 1,000 mujeres de 35 a 55 años padece cáncer del cuello uterino, enfermedad que es precedida

durante meses o años de una lesión premaligna *in situ*⁽⁴⁾.

En México es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia. Según el INEGI, el porcentaje más alto en este tipo de padecimiento se concentra en la población de entre 45 a 49 años, que representa el 15.1% de las pacientes con tumores malignos. Las mujeres de entre 40 y 44 años y las de 50 a 54 años alcanzan una proporción de 14% y 13.2% respectivamente⁽⁵⁾.

Existen dos tipos histológicos de cáncer cérvico-uterino (CACU): el epidermoide, espinocelular o de células escamosas, y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix, el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical y una variación se origina en la mucosa endometrial y constituye el adenocarcinoma del endometrio. El cáncer *in situ* se presenta de manera significativa entre los 30 a 39 años de edad y el carcinoma invasor después de los 40 años⁽⁴⁾.

Hay múltiples factores de riesgo asociados con el cáncer cérvico-uterino. Uno de ellos es la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH)⁽⁶⁾.

En la actualidad se considera que el CACU es una de las neoplasias potencialmente curables. La posibilidad de detectar en forma temprana esta neoplasia hace factible reducir su mortalidad⁽⁴⁾. Sin embargo en nuestro país las etapas localmente avanzadas (IIB-IVa) son las que tienen mayor prevalencia, lo anterior refleja que el programa de detección oportuna con citología cérvico-vaginal no es lo suficientemente adecuado.

El diagnóstico de esta neoplasia se realiza con estudio histopatológico mediante una biopsia dirigida, ya sea mediante colposcopia en caso de no observarse una lesión o mediante toma directa si existe tumor visible.

La estadificación continúa siendo clínica, la cual utiliza la última modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en el año 2009, (Cuadro 1)⁽³⁾.

Cuadro 1: Estadificación del cáncer según la última modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en el año 2009.

Etapa	Descripción
I	Tumor confinado al cuello uterino.
IA	Tumor con invasión diagnosticado por patología con una profundidad máxima de 5 mm medida desde la capa basal y una extensión horizontal menos o igual a 7 mm.
IA1	Invasión estromal menor o igual a 3 mm y extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
IA2	Invasión estromal mayor a 3 mm pero menor de 5 mm, y extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
IB	Tumor clínicamente visible confinado al cérvix o etapas pre-clínicas mayores al estadio IA
IB1	Lesión clínicamente visible menor o igual de 4 cm en su dimensión mayor.
IB2	Lesión clínicamente visible mayor de 4 cm en su dimensión mayor.
II	Tumor que se extiende más allá del cuello uterino sin llegar a la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
IIA	Tumor que invade fondos de saco vaginal sin invasión parametrial.
IIA1	Tumor menor de 4 cm.
IIA2	Tumor mayor de 4 cm.
IIB	Tumor con invasión parametrial, sin llegar a la pared pélvica.
III	El tumor que se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IIIA	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina y no se extiende a la pared pélvica.
IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IV	El tumor se extiende fuera de la pelvis o presenta involucro comprobado por biopsia de la mucosa vesical o rectal. El edema buloso no se considera enfermedad metastásica.
IVA	El tumor invade a la mucosa de la vejiga o recto y/o se extiende más allá de la pelvis verdadera.
IVB	Metástasis a distancia.

Adaptada de: Gonzalo ME, Alberto CMJ, Adriana AZ, David CL, Daniel FA, Andrea OR, et al. Oncoguía: cáncer cervicouterino. Revista del Instituto Nacional de Cancerología 2011; 6(2).

En la actualidad, Gardasil™ (Merck) y Cervarix™ (GSK) han sido autorizados como vacunas profilácticas contra la infección por VPH. Estas vacunas se utilizan para reducir la incidencia

de cáncer de cuello uterino, pero no son eficaces en el tratamiento de sus enfermedades precancerosas o cáncer cervical existente⁽⁶⁾. La mayoría de nuestros conocimientos sobre el tratamiento del cáncer de cuello uterino provienen de estudios en cirugía, radiación y quimioterapia. En quimioterapia, agentes tales como doxorubicina, ciclofosfamida o fármacos de combinación han sido ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer cérvico-uterino y en última instancia, mejoran la calidad de vida. Sin embargo, estos agentes también muestran toxicidad y efectos secundarios graves. Por otra parte, los agentes quimioterapéuticos pueden no matar a todas las células cancerosas y la administración repetida da lugar a la farmacorresistencia.

Inmunoterapia contra el CACU

Las citocinas IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18 y el factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF) recombinantes se han utilizado preferentemente como inmunoterapia contra el cáncer. Estas citocinas promueven la activación de linfocitos T contra antígenos tumorales, activan la respuesta inmune no específica e inducen la expresión de otras citocinas activadoras. Además, pueden activar varias células de la respuesta inmune como: las células NK, monocitos y macrófagos. Estas citocinas favorecen la presentación de los antígenos específicos del tumor por parte de las propias células malignas. Particularmente, el efecto adyuvante de la IL-2 en cáncer cervical se ha probado en modelos tumorales asociados al VPH. Su efecto antitumoral es mediado por promover la activación de las células NK, células asesinas activadas por linfocinas (LAK) y otras células citotóxicas, así como la inducción de IFN- γ , TNF- α . La IL-2 se une a las subunidades β y γ de su receptor en células tumorales asociadas a VPH, dando como resultado los eventos de traducción de señales. Sin embargo, la inmunoterapia con citocinas como activadores de la respuesta inmune está limitada por la vida media de éstas y por su actividad tóxica a nivel sistémico⁽⁷⁾.

Melanoma

El Melanoma maligno cutáneo (MMC) fue descrito como una entidad por René Laennec al inicio del siglo XIX. Más de un siglo después se definieron los principales criterios pronósticos para MMC, una nomenclatura estandarizada y un formulario de notificación de las características histopatológicas de MMC.

Según un reciente informe sobre las tendencias internacionales en la incidencia de MMC entre 1953 y 2008, la mayor incidencia del MMC se ha observado en poblaciones de piel clara por todo el mundo durante las últimas décadas⁽⁸⁾.

Aunque no existe suficiente información en nuestro país acerca de la incidencia y prevalencia del MMC, se sabe que los factores de riesgo más importantes para su desarrollo son la ascendencia europea, color de piel claro, más de tres episodios de quemaduras solares antes de los 18 años, antecedentes familiares de MMC y la presencia de nevos melanocíticos previos⁽⁹⁾.

El melanoma surge de la transformación maligna de los melanocitos de la cresta neural situada en la capa basal de la epidermis donde los melanocitos y queratinocitos forman la unidad de melanina. Los melanocitos contienen el melanosoma que produce el pigmento, melanina. Los melanosomas son transferidos mediante las células dendríticas que rodean los queratinocitos como una defensa a la radiación ultra violeta (RUV), donde la melanina absorbe y disipa energía ultravioleta.

Está bien establecido que la RUV es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel, incluyendo MMC, causando el deterioro de la función inmune cutánea, aumento de la producción local de factores de crecimiento y formación de especies reactivas de oxígeno que dañan al ADN. Sin embargo, resulta claro que el MMC es una enfermedad genética heterogénea que consta de biológicamente de distintos subconjuntos genéticos. Para que un

nevo común se transforme en un tumor maligno implica varios pasos, incluyendo varios cambios genéticos⁽⁸⁾.

Clasificación del melanoma

Tradicionalmente se ha usado la clasificación anatomoclínica del melanoma propuesta por Clark (Wallace Clark, 1924-1998, Estados Unidos) en cuatro tipos: Melanoma lentigo maligno, Melanoma de extensión superficial, Melanoma maligno “nodular” y Melanoma acral lentiginoso.

Melanoma lentigo maligno. Supone un 5-10% del total de casos de melanoma, aparece casi siempre en individuos de más de 60 años, en la cara y sobre una piel con importante daño actínico. Tiene una fase inicial con crecimiento radial superficial muy prolongada (hasta 10 años o más), que ha recibido los nombres de melanosis de Dubreuilh y peca melanica de Hutchinson.

Suele localizarse en zonas expuestas a la luz solar, principalmente en la cara (mejillas) y cuello; puede afectar mucosas por contigüidad. Reinicia como una lesión plana, de color café oscuro, que crece con lentitud hasta 7 cm en promedio, y muestra elevaciones oscuras, con hiperqueratosis y ulceración. Algunos autores lo llaman lentigo maligno cuando está confinado a epidermis (in situ) y melanoma lentigo maligno cuando invade dermis⁽⁸⁻¹²⁾.

Melanoma de extensión superficial. Es el tipo clínico patológico de melanoma más frecuente (70% de los casos). Su presentación suele ser más precoz, con una incidencia máxima entre los 40 y los 60 años. Las localizaciones más habituales son el tronco y las piernas; en el tronco es más frecuente en los hombres y en las piernas en las mujeres.

Tiene una fase de crecimiento radial superficial, que puede durar meses o incluso años, pero es más corta que en el melanoma lentigo maligno. Aunque tiene similitud con la de este tipo de melanoma, en el de extensión superficial las lesiones iniciales suelen ser algo sobre elevadas y pueden mostrar hiperqueratosis y colores variados en su superficie. Los fenómenos de

regresión son más intensos, con formación frecuente de lesiones arciformes, a veces concéntricas y áreas blanquecinas, eritematosas o violáceas. En la fase de invasión en profundidad se producen nódulos, ulceración o hemorragia. La metástasis se originan por diseminación linfática y hemática; las primeras suelen ser más precoces⁽⁸⁻¹²⁾.

Melanoma maligno “nodular”. Es la forma más agresiva; representa 10 a 20% de los melanomas; sobreviene entre el quinto y sexto decenio de la vida; predomina en varones; se observa como una placa o tumoración semiesférica de aspecto “nodular”, de color café a azul oscuro, de superficie lisa, ulcerada o vegetante, que asienta con frecuencia en una piel normal. La localización predominante es en el tronco. En la raza blanca un 10-15% de los melanomas son de este tipo. Es un tumor de muy alta agresividad, que origina metástasis linfáticas y hemáticas⁽⁸⁻¹²⁾.

Melanoma acral lentiginoso. Se observa más a menudo en personas de raza negra y en mestizos; es la forma más frecuente en México; afecta palmas, plantas o falanges distales; puede ser periungueal o subungueal, y acompañarse de paroniquia y distrofia ungueal; produce manchas irregulares de crecimiento radial, y en etapas avanzadas genera formas exofíticas.

La transformación a la fase invasora a menudo pasa inadvertida por las peculiares localizaciones del tumor y la mayor parte de las veces se detecta por ulceración y hemorragia, debido al diagnóstico tardío por parte de médicos sin experiencia en este campo⁽⁸⁻¹²⁾.

Tratamientos contra el melanoma

El tipo de tratamiento seleccionado dependerá de la etapa y localización del melanoma, así como del estado de salud general de la persona afectada, pero como se menciona mas adelante la cirugía es la practica mas común para este tipo de cáncer.

La cirugía: El tratamiento electivo del melanoma es la extirpación quirúrgica y las posibilidades

del paciente dependen, en gran medida, de que se realice en el estudio más precoz posible. El margen de recesión de la lesión es de 1-3 cm, la conveniencia de efectuar una extirpación profiláctica de los ganglios linfáticos regionales y la asociación de diversas pautas de quimioterapia e inmunoterapia ha sido objeto de considerables debates, sin haber llegado a demostrarse un claro aumento de la supervivencia con ninguna de ellas.

Tratamientos sistémicos: Quimioterapia e inmunoterapia [interferón alfa y gamma (IFN- α y γ) y a altas dosis de interleucina 2 (IL-2)], son las únicas citocinas que han demostrado eficacia terapéutica en el tratamiento del melanoma. Aunque muchos de estos agentes inmunoterapéuticos han mostrado su eficacia, todavía existen muchos aspectos por definir para lograr una estrategia terapéutica verdaderamente efectiva e inocua.

Por lo anterior, existe una imperiosa necesidad de desarrollar modalidades terapéuticas con toxicidad y efectos secundarios mínimos o nulos para el tratamiento de estos dos tipos de cáncer^(2, 8-12).

Citocinas y microambiente tumoral

Muchos de los eventos de la respuesta inmune están regulados por moléculas solubles llamadas citocinas, las cuales son secretadas por una gran variedad de tipos celulares, pero principalmente las producen los linfocitos T CD4+. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, que pueden secretarse o permanecer unidas a la membrana celular. Las citocinas actúan de manera autócrina al modular la actividad celular, o de manera parácrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celular⁽⁷⁾.

Además, las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimiotaxis y en la activación de células de la respuesta inmune. En general, hay dos grupos de citocinas que pueden ser distinguibles con base en su participación en los procesos de infección y/o inflamación. Las citocinas que están directa o indirectamente

involucradas en los procesos inflamatorios reciben el nombre de citocinas proinflamatorias [IL-1, IL-2, IL-6, el IFN- γ y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)] promueven la respuesta inmune mediada por células. Las citocinas que suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias son las citocinas antiinflamatorias: por ejemplo, IL-4, IL-10 e IL-13, son potentes mediadores de los linfocitos B. De esta manera, el perfil de expresión de citocinas presentes en una enfermedad determinará el tipo de respuesta inmune que se genere⁽⁷⁾.

En diferentes neoplasias, se ha observado una tendencia en la expresión de citocinas antiinflamatorias y una disminución de expresión de citocinas proinflamatorias⁽⁷⁾.

Las células tumorales tienen baja capacidad para activar a la respuesta inmune, como resultado de la disminución de la expresión de moléculas del MHC clase I y II, de moléculas de adhesión celular y de moléculas coestimuladoras, lo cual impide la adecuada presentación de antígenos tumorales y la activación de los linfocitos T. Este efecto se confirma por la secreción de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β 1 y una nula expresión de citocinas proinflamatorias involucradas en la activación de la respuesta inmune⁽⁷⁾.

Sin embargo existen estudios que relacionan una inflamación crónica de larga duración con el desarrollo de varios tipos de cáncer. El mecanismo de carcinogénesis involucraría el daño repetitivo, la generación y aparición en los tejidos de especies altamente reactivas del oxígeno y de nitrógeno. Estas moléculas reactivas, como el óxido nítrico y H₂O₂ serían liberadas por las células inflamatorias e interaccionarían con el ADN del epitelio en proliferación y podrían producir de esta manera alteraciones genéticas. Diversos estudios epidemiológicos han sugerido una fuerte asociación entre la infección crónica, la inflamación y el cáncer. Algunos ejemplos lo constituyen, la enfermedad inflamatoria intestinal, el cáncer de colon y el cáncer gástrico^(13, 14).

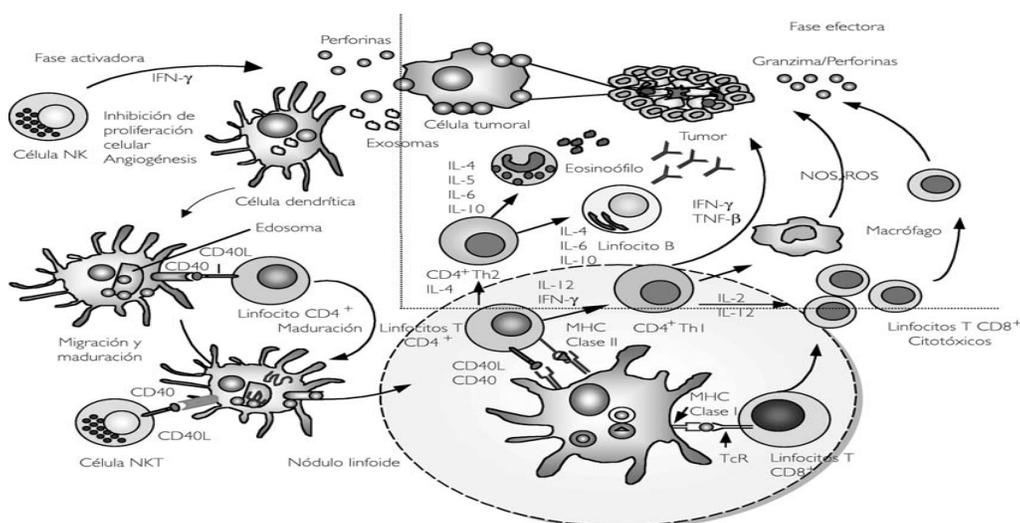
Respuesta inmune antitumoral

La inmunovigilancia tumoral se mide mediante dos tipos de mecanismos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata se considera como la primera barrera contra las células tumorales, las cuales son reconocidas por un proceso independiente de antígeno. Este mecanismo es mediado por un patrón de receptores y de moléculas de superficie celular expresados en la célula tumoral. Entre las principales células que reconocen a la célula tumoral se encuentran las células asesinas naturales (células NK), las cuales reconocen la baja o nula expresión de moléculas MHC I sobre la célula tumoral, así como proteínas relacionadas con estrés, como la expresión de MICA y MICB, que son ligandos de los receptores NKG2D expresados por las células NK⁽⁷⁾.

En relación con la respuesta inmune adaptativa, ésta requiere del reconocimiento de antígenos tumorales para reconocer y eliminar la célula tumoral por medio de las células efectoras de la respuesta inmune. Se ha demostrado que la respuesta inmune mediada por células es la más importante para eliminar las células neoplásicas. Esta respuesta es dependiente de la activación de los linfocitos T y de las células presentadoras de antígenos profesionales (APC). La activación de los linfocitos T, requiere que las células dendríticas (CD) capturen y procesen el detritus celular tumoral, migren a los nódulos linfáticos regionales para presentar los antígenos tumorales a los linfocitos T CD8+ mediante las moléculas del MHC clase I. En este proceso se activan tanto los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra péptidos tumorales, los cuales son reconocidos a través de las moléculas del MHC. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos son los responsables de lisar y eliminar a las células tumorales, por el reconocimiento de péptidos tumorales asociados a las moléculas del MHC clase I expresado en la superficie de la célula tumoral. Por otro lado, los linfocitos T CD4+ son los encargados de orquestar la respuesta inmune antitumoral, ya que están

involucrados en la inducción y activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos a través de la producción de citocinas. Además, los linfocitos T CD4+ son capaces de interactuar con las células APCs en el proceso de presentación de antígenos tumorales (priming) y activar a los precursores de linfocitos T CD8+ (Imagen 1)⁽⁷⁾.

Imagen 1: Mediadores de la respuesta inmune contra tumores.



La fase activadora de la respuesta inmune contra tumores inicia con la captura y procesamiento de vesículas de membrana liberadas por las células tumorales (exomas) captadas por las células dendríticas (CD), las cuales migran a los nódulos linfoides regionales para activar a las células de la respuesta inmune. Este proceso de maduración - migración de las CD a los nódulos linfoides es facilitado por la interacción del receptor del CD40 de las CD con el CD40L expresado en los linfocitos T CD4+ y en las células NKT. Por otro lado en la fase efectora el material endocitado del tumor se presenta a los linfocitos T CD8+ y CD4+ a través de las moléculas del MHC clase I y II, respectivamente. Los linfocitos T CD4+ activados son diferenciados en linfocitos T CD4+ Th1 y Th2 según las citocinas que secretan, y las citocinas pueden activar a la respuesta inmune humoral y celular. En la respuesta inmune humoral, los linfocitos B activados producen anticuerpos específicos contra antígenos tumorales, mientras que en la respuesta inmune celular, los linfocitos T CD8+ citotóxicos activados migran al sitio del tumor para reconocer y matar a la célula tumoral.

Fuente Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. Salud Pública de México. 2005;47(6).

Limitaciones de la terapia con IL-2

A pesar del gran potencial de la IL-2 en el tratamiento del cáncer, su aplicación en la clínica sigue siendo relativamente restringida debido a varios inconvenientes. La IL-2 tiene una vida media muy corta en sangre, en el rango de minutos, debido a su metabolismo y la eliminación rápida a través del riñón y para lograr un efecto óptimo inmuno-modulador, la IL-2

se administra en dosis altas que desgraciadamente pueden causar toxicidad severa. Altas dosis de IL-2 inducirán graves efectos tóxicos tales como hipotensión, síndrome de fuga vascular, edema pulmonar y toxicidad de corazón, estos son inconvenientes importantes que limitan la eficacia terapéutica de este tratamiento⁽¹⁵⁾.

Liposomas como vehículos para suministro de fármacos

Agitar con la mano una mezcla de agua y lípidos anfipáticos produce una suspensión turbia de vesículas lipídicas de variados tamaños que tienden a coalescer en estructuras más grandes rodeadas por múltiples capas de moléculas de lípido. Pero si la mezcla se realiza bajo ciertas condiciones, las vesículas resultantes, o liposomas, son mucho más pequeñas (< 200 nm en diámetro), de tamaño uniforme y estables por meses.

Es importante mencionar que los liposomas pueden encapsular tanto sustancias hidrosolubles como liposolubles, lo cual los hace atractivos como sistemas de suministro de fármacos. Cuando se aplican a la piel, los liposomas penetran las capas externas de células muertas y luego se fusionan con las células subyacentes, liberando su contenido directamente. La alta concentración local de un fármaco suministrado por liposomas ofrece una clara ventaja para tratar enfermedades cutáneas o inducir anestesia local, en particular cuando el fármaco tendría efectos adversos si se administrara de manera sistémica. Los liposomas tienen el potencial de suministrar paquetes de fármacos a otros tejidos, por ejemplo una dosis de toxinas a un tumor. Sin embargo, un gran desafío es formular la superficie del liposoma (por ejemplo, incorporando proteínas específicas) de modo que sólo se dirija a las células blanco deseadas⁽¹⁶⁾.

Cuando se utilizan liposomas como acarreadores de un fármaco, el objetivo principal es reducir los efectos secundarios tóxicos en órganos sensibles como el hígado, corazón y los riñones y dirigirlo a tejidos específicos o masas tumorales⁽¹⁷⁾.

Mediante la optimización de la composición lipídica, tamaño, fluidez de la membrana, carga superficial y estabilización estérica, es posible extender el índice terapéutico de acarreadores liposomales por encima de las formulaciones convencionales.

El uso de liposomas para propósitos de inmunización se basa en su capacidad para entregar un antígeno y estimular una respuesta inmune⁽¹⁷⁾.

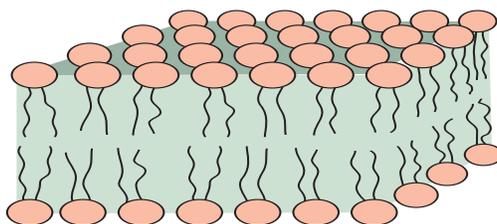
Estructura lipídica y ensamblaje

Las moléculas utilizadas para la preparación de liposomas son derivadas o basadas en la estructura de los lípidos anfipáticos de las membranas biológicas. Dos cadenas hidrocarbonadas ácidas (saturadas o no) son generalmente esterificadas a un esqueleto de glicerol (glicerolípidos), o los plasminógenos que son unidos al glicerol con enlaces éter α - β insaturado, otra forma menos común es que estas cadenas pueden enlazarse a una esfingosina y formar esfingolípidos. La parte hidrofóba de estas moléculas está vinculada a una cabeza hidrofílica que contiene un fosfato (fosfolípidos) o algunas unidades de carbohidratos (glicolípidos) formando lípidos biológicamente relevantes con características de zwitteriones [fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomieline (SM)], negativamente cargados [ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), cardiolipina (CL), glucolípidos sustituidos como monosialogangliosidos (GM1)], o totalmente sin carga (glucolípidos no sustituidos). Las cadenas acil saturadas que forman los lípidos anfipáticos típicamente varían en longitud de 10 carbonos (lauril), 12 (miristoil), 14 (palmitoil) a 16 (estearoil) y las cadenas de 18 carbonos ya son generalmente insaturados con uno (oleoil), dos (linoleil) o tres (linolenil) dobles enlaces en cis. El colesterol es fácilmente incorporado en la estructura de los liposomas hasta un 50%, mientras que los lípidos puramente hidrofóbicos tales como triacilglicéridos (TAG) no se dispersan en el agua, a menos que estén rodeados por una monocapa de surfactante (ej. fosfolípidos, detergente)

para formar una emulsión o una nanopartícula de lípidos sólidos (SLN). Los lípidos anfipáticos son poco solubles en agua como monómeros, con una concentración micelar crítica baja (CMC) típicamente entre 10^{-8} y 10^{-12} M, dependiendo de la longitud de la cadena de hidrocarburos. Mientras que los lípidos de cadena simple (cadenas acil libres insaturadas, detergentes, etc.) se ensamblan espontáneamente en micelas, la mayoría de los lípidos componentes de membrana tienden a ser incorporados en bicapas. Las estructuras laminares resultantes forman vesículas cerradas, es decir, liposomas. Se distingue comúnmente entre vesículas multilaminares (MLV, 0,1-10 micras), y las unilaminares que pueden ser pequeñas (SUV, <100 nm), grandes (LUV, 100-500 nm) o gigante (GUV, $\geq 1\mu\text{m}$)⁽¹⁷⁾.

La organización fundamental de una membrana biológica es la bicapa lipídica, una disposición bidimensional de moléculas anfipáticas cuyas colas se asocian entre sí, alejadas del contacto con el agua, y cuyos grupos cabeza interactúan con el solvente acuoso (Imagen 2).

Imagen 2: Membrana lipídica.

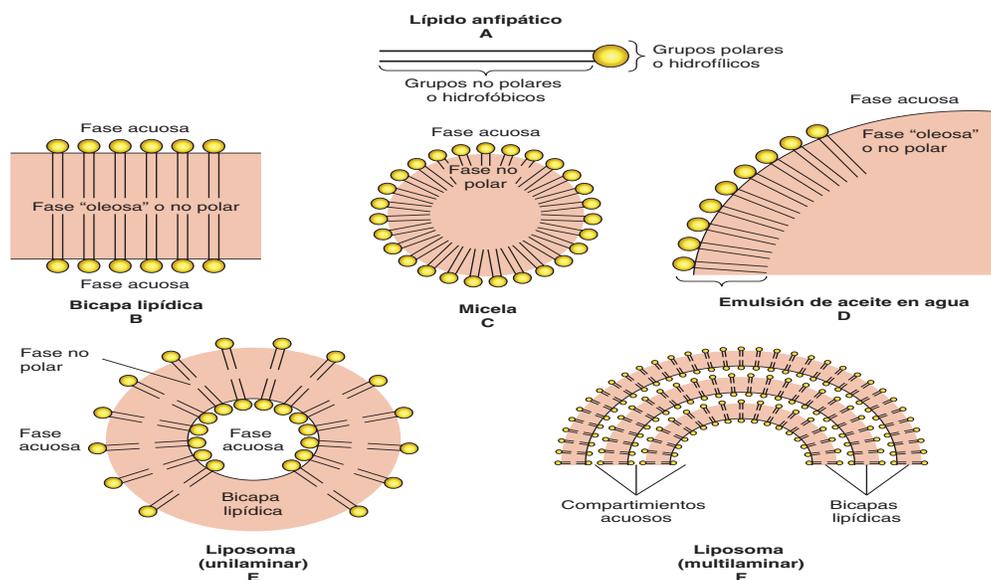


En la mayoría de los glicerofosfolípidos, la anchura del grupo cabeza es comparable a la anchura de las dos cadenas acilo. Por tanto los lípidos pueden formar una bicapa sin huecos entre moléculas de lípido.
Fuente: Pratt CW, Cornely K, Palacios Martínez R, Morales Saavedra JL. Bioquímica. México: Manual Moderno; 2012.

La belleza del uso de una bicapa como barrera para sistemas biológicos radica en que se forma de manera espontánea (sin el aporte de energía libre) debido a la influencia del efecto

hidrófobo, que favorece la agregación de grupos no polares energéticamente costosos de hidratar de manera individual. Además, una bicapa es autosellante y a pesar de su delgadez, puede encerrar un compartimento vasto o una célula entera. Esta propiedad se ha aprovechado en la creación de vesículas artificiales, que son compartimentos cerrados por una o varias bicapas (Imagen 3). Los glicerofosfolípidos y esfingolípidos tienen la geometría apropiada para formar bicapas, no así los ácidos grasos y triacilgliceroles. El colesterol puro no puede formar una bicapa por sí solo, porque es del todo hidrófobo excepto por un solo grupo hidroxilo polar. Se encuentra en mayor medida oculto en la región hidrófoba de una membrana, donde su estructura de anillo plano se inserta entre las cadenas acilo de otros lípidos. De modo similar, otros lípidos son solubles en las membranas, aunque no contribuyen a la estructura global de la bicapa⁽¹⁶⁾.

Imagen 3: Formación de membranas lipídicas.



Formación de membranas lipídicas, micelas, emulsiones y liposomas a partir de lípidos anfipáticos, por ejemplo fosfolípidos. Tomada de: Harper HA, Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, et al. Harper : bioquímica ilustrada. 2da ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2013.

Las bicapas lipídicas son estructuras dinámicas; su fluidez depende de la longitud y el grado

de saturación de sus grupos acilo: las cadenas más cortas y menos saturadas son más fluidas. El colesterol ayuda a mantener la fluidez y estabilidad de la membrana en una gama de temperaturas. Los lípidos de membrana pueden difundirse con libertad lateralmente, pero experimentan difusión transversal con mucha lentitud. Las membranas pueden contener balsas cristalinas formadas por colesterol y esfingolípidos⁽¹⁶⁾

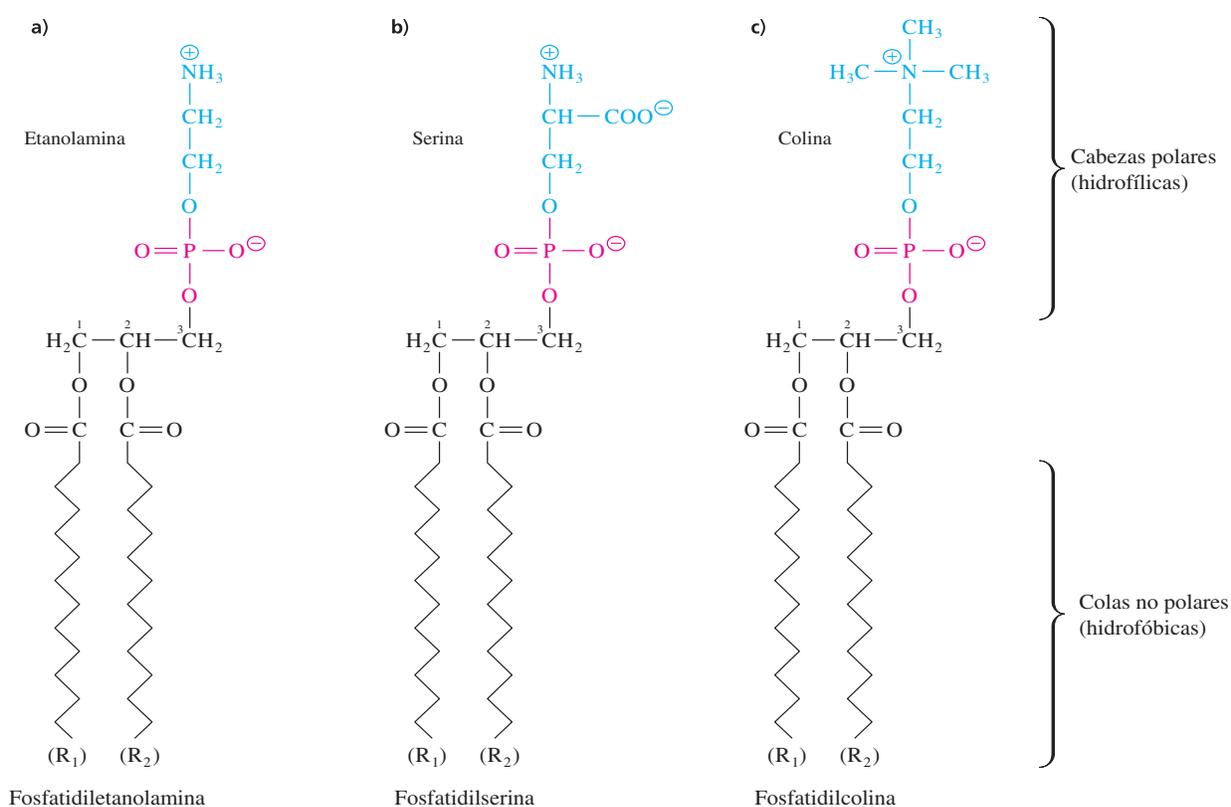
Fosfolípidos

Los glicerofosfolípidos o fosfolípidos, son lípidos anfipáticos, que se encuentran en todas las membranas celulares de plantas y animales, disponiéndose como bicapas lipídicas. Pertenecen al grupo de lípidos derivados del glicerol, presentando una estructura similar a la de los triglicéridos (TGs). En este sentido, los fosfolípidos están compuestos por una molécula de glicerol a la que se unen 2 ácidos grasos en las posiciones C-1 y C-2, estos ácidos grasos pueden presentar cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, y variar en el grado de insaturación según su procedencia. Sin embargo, se diferencian de los TGs ya que en la posición C-3 está ligada una molécula de ácido ortofosfórico, en lugar de un tercer ácido graso. Estos grupos fosfato están siempre unidos a diferentes tipos de moléculas, de esta forma, cuando esta molécula corresponde a colina, se forma la fosfatidilcolina (FC); cuando se une a un aminoácido como serina (FS), se forma la fosfatidilserina; cuando la unión es con etanolamina, se forma la fosfatidiletanolamina (FE) o cefalina (Imagen 4); y cuando se une al polialcohol cíclico inositol, se forma el fosfatidil inositol (PI), entre otros. Los fosfolípidos se caracterizan por su eficacia para incorporar diferentes ácidos grasos, esta incorporación de ácidos grasos específicos se ve reflejado en el incremento a nivel de la membrana celular y en consecuencia, tanto el tipo de fosfolípidos como los ácidos grasos acompañantes serán cruciales para lograr un efecto determinado (Imagen 5)⁽¹⁹⁾.

Cada tipo de glicerofosfolípido consiste en una familia de moléculas con el mismo grupo en la

cabeza polar, y distintas cadenas de ácido graso. Por ejemplo, las membranas de los glóbulos rojos humanos contienen cuando menos 21 especies distintas de fosfatidilcolina que difieren entre sí en las cadenas de ácido graso esterificadas en el C-1 y C-2 de la estructura de glicerina. En general, los glicerofosfolípidos tienen ácidos grasos saturados esterificados en el C-1 y ácidos grasos no saturados esterificados en el C-2⁽²⁰⁾.

Imagen 4: Estructuras de algunos fosfolípidos.



Estructuras de a) fosfatidiletanolamina, b) fosfatidilserina, c) fosfatidilcolina. Los grupos funcionales derivados de los alcoholes esterificados se muestran en gris claro ya que cada uno de estos lípidos pueden contener muchas combinaciones de grupos ácido graso, en el nombre general se refiere a una familia de compuestos y no a una sola molécula.

Extraída de: Horton HR, González y Pozo V. *Principios de bioquímica : un enfoque constructivista. 4a ed. México: Pearson; 2008.*

Los fosfoacilgliceroles que contienen colina son los fosfolípidos más abundantes de la membrana celular y representan una proporción grande de la reserva de colina del cuerpo.

fosfatidilcolina en que la etanolamina o serina, reemplazan a la colina. La fosfatidilserina también participa en la apoptosis (muerte celular programada). El inositol está presente en el fosfatidilinositol como el estereoisómero mioinositol. El fosfatidilinositol (PI) es un fosfolípido presente en las membranas celulares que posee la capacidad de ser fosforilado en las posiciones 3, 4 y 5 de su anillo inositol para generar siete fosfoinosítidos: PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,4)P2, PI(4,5)P2, PI(3,5)P2 y PI(3,4,5)P3. La fosforilación y desfosforilación que realizan enzimas cinasas y fosfatasas puede interconvertir rápidamente estos fosfoinosítidos. Adicionalmente el PI(4,5)P2 puede hidrolizarse generar dos moléculas que se comportan como segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol-1,4,5-trifosfato (In(1,4,5)P3), los cuales en su momento estimulan varios efectores DAG y la movilización de calcio mediada por In(1,4,5)P3. Precisamente este sistema de segundos mensajeros establece la importancia del metabolismo de los fosfoinosítidos en la regulación celular. Recientemente se ha descrito que PI(4,5)P2 y otros fosfoinosítidos participan activamente como sustratos o intermediarios de otras especies fosforiladas por interacción directa con proteínas, mediante la unión de afinidad variable a proteínas o sitios específicos de ellas a los grupos de cabeza de los fosfoinosítidos. Además la presencia de tipos específicos de fosfoinosítidos y sus uniones a proteínas funciona asociada a otras proteínas membranales conocidas como GTPasas pequeñas de la superfamilia Ras para reclutar proteínas citosólicas a estos compartimientos. Mediante esta interacción de lípidos-proteínas se regula la interfaz membranal y se controla un rango amplio de procesos, entre los que se encuentran vías de señalización, desestabilizaciones de membrana y fusión, dinámica de actina, microtúbulos, el transporte de iones y metabolitos a través de las membranas. Cabe mencionar que se han realizado estudios de toxicidad de diferentes formas de PI con células tumorales y se ha encontrado que el tipo de los grupos acilo de los carbonos 1 y 2 de los diacil 3

fosfatidilinositoles es la responsable de los efectos tóxicos; mientras que los que contienen ácido araquidónico (de origen vegetal) son sumamente tóxicos, aquellos de origen animal con ácido linoleico o preferiblemente oleico en la posición 2, no lo son^(18, 21, 22).

Características de los liposomas^(23, 24)

Los liposomas son estructuras esféricas, formadas por una o varias bicapas de lípidos concéntricos con una fase acuosa dentro y entre las bicapas lipídicas.

Hay diferentes tipos de vesículas liposomales:

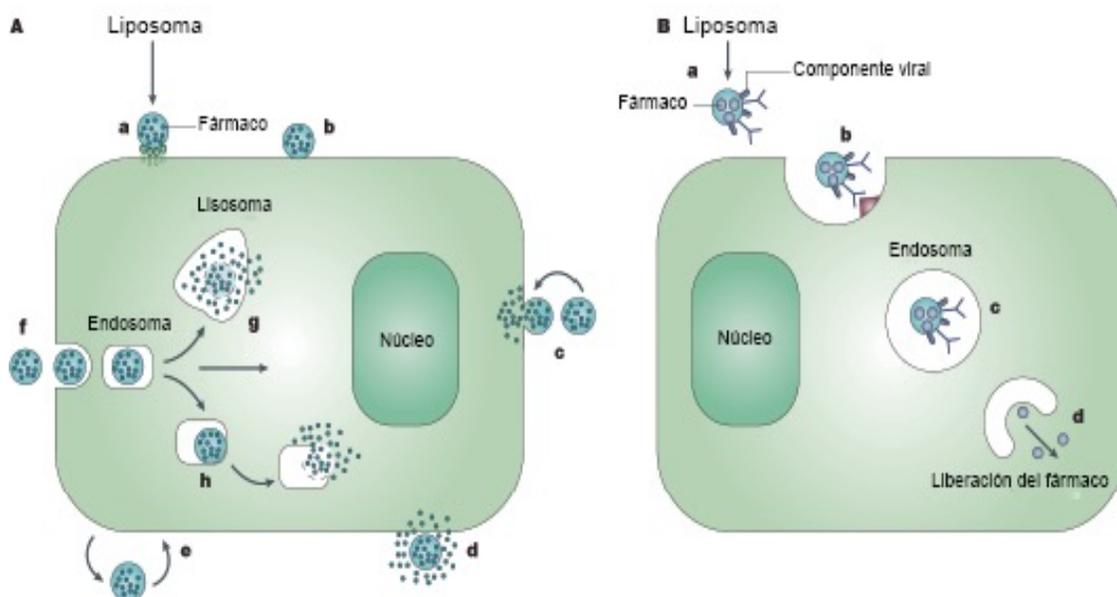
1. *Vesículas multilaminares*: estas varían en tamaño desde 500 a 5000 nm y constan de varias bicapas concéntricas.
2. *Vesícula unilaminar pequeña*: alrededor de 100 nm de tamaño y formado por una simple bicapa.
3. *Vesícula unilaminar grande*: varía en tamaño desde 200 a 800 nm.
4. *Liposomas de circulación prolongada*: liposomas modificados de tal manera (generalmente adicionando ciertos polímeros) que pueden permanecer en la sangre mucho más tiempo (horas) que los liposomas no modificados.
5. *Inmunoliposomas*: liposomas que llevan anticuerpos adheridos a su superficie y son capaces de acumular en el área dentro del cuerpo un anticuerpo que reconoce y se une a su antígeno.

Propiedades biológicas de los liposomas^(23, 24)

1. Son biocompatibles.
2. Pueden atrapar a agentes farmacéuticos solubles en agua (hidrofílicos) en su compartimiento interno y productos farmacéuticos insolubles en agua (hidrofóbicos) en la membrana.

3. Los fármacos están protegidos contra el efecto inactivador de las condiciones externas, sin embargo, los liposomas no causan reacciones secundarias indeseables.
4. Proporcionan una oportunidad única para entregar los productos farmacéuticos en las células o incluso dentro de los compartimentos celulares individuales (Imagen 6). Las propiedades de tamaño, carga y superficie del liposoma pueden ser cambiadas añadiendo nuevos ingredientes a la mezcla de lípidos antes de preparar el liposoma o por la variación de métodos de preparación (Imagen 7).

Imagen 6: Interacción célula - liposoma.

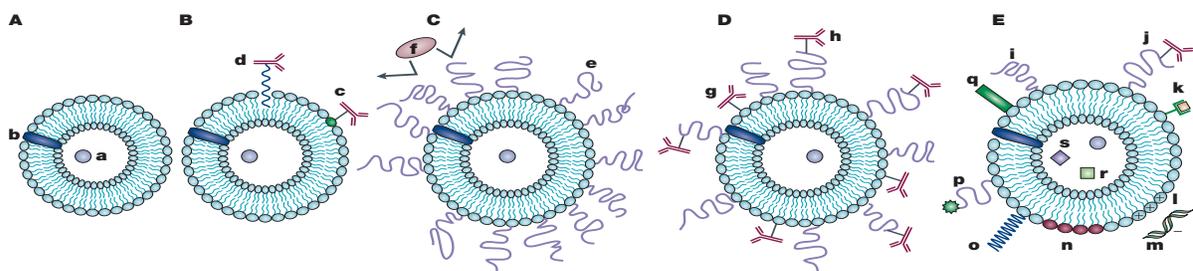


A) El fármaco encapsulado en el liposoma puede llegar al interior de la célula de forma específica (a) o inespecífica (b) por adsorción al acoplarse el liposoma sobre la superficie celular. Los liposomas también pueden fusionarse con la membrana de la célula (c) y liberan su contenido en el citoplasma o puede ser desestabilizados por ciertos componentes de la membrana cuando es fijado por adsorción en la superficie celular (d) para que el fármaco lanzado pueda entrar en la célula vía micropinocitosis. Los liposomas pueden experimentar el intercambio directo o transferencia mediada por proteínas de componentes lipídicos con la membrana de la célula (e) o ser sometido a endocitosis específica o inespecífica (f). En el caso de endocitosis, un liposoma puede ser entregado por el endosoma a los lisosomas (g) o, en el camino a los lisosomas, los liposomas pueden provocar la desestabilización del endosoma (h), que se traduce en liberación del fármaco en el citoplasma de la célula.

B) Los liposomas modificados con componentes virales específicos (a) y cargados con un fármaco pueden específicamente interactuar con las células (b), provocar la endocitosis, y, mediante la interacción de componentes virales con la membrana interna del endosoma (c), permiten la salida del principio activo en el citoplasma de la célula (d).

Tomada de: Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nature reviews Drug discovery 2005; 4(2): 145-60.

Imagen 7: Evolución de los liposomas.



A) Liposomas iniciales, fosfolípidos "simples" con el fármaco soluble en agua (a) fase acuosa en el interior del liposoma, fármacos insolubles en agua (b) incorporado a la membrana liposomal (estas designaciones no se repiten en las otras figuras). B) Immunoliposomas dirigidos con anticuerpos unidos covalentemente (c) a los fosfolípidos de la membrana reactivos, o anclados a la membrana liposomal (d) después de una modificación preliminar con una fracción hidrófoba. C) Liposomas de circulación prolongada recubiertos con un polímero protector (e) como el polietilenglicol (PEG), que protege la superficie del liposoma de la interacción con las proteínas (f) opsonizantes. D) Immunoliposomas de circulación prolongada, simultáneamente teniendo polímero protector y anticuerpo, que pueden fijarse a la superficie del liposoma (g) o, preferentemente, en el extremo distal de la cadena polimérica (h). E) Liposomas de nueva generación, la superficie de los cuales puede ser modificada (por separado o simultáneamente) por diferentes formas. Entre estas modificaciones son: el accesorio de polímero protector (i) o película protectora y ligando dirigido, tales como anticuerpos (j); la incorporación de una etiqueta diagnóstica (k); la incorporación de los lípidos cargados positivamente (l) permitiendo la formación de complejos con ADN (m); la incorporación de lípidos sensibles a estímulos (n); la incorporación de un polímero sensible a estímulos (o); la adición de péptidos de penetración celular (p); el uso de componentes virales (q). Además de un fármaco, los liposomas pueden ser cargados con partículas magnéticas (r) para ser dirigidos vía magnética o adicionarle oro coloidal o partículas de plata (s) para microscopía electrónica.

Adaptada de: Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nature reviews Drug discovery 2005; 4(2): 145-60.

Recientemente, se han construido varios tipos de partículas liposomales para transportar moléculas biológicas activas, como la IL-2. El fundamento de este vector de IL-2 es el transporte de las dosis de la molécula de IL-2 que es terapéuticamente activa *in situ*, sin los efectos tóxicos que se producen cuando se entregan sistémicamente en dosis significativamente más altas. En estudios realizados se reporta la construcción de liposomas catiónicos, aniónicos y neutrales para evaluar su capacidad para presentar la molécula IL-2 en su superficie externa y su afinidad a las células de cáncer de cuello uterino; los resultados indicaron que los liposomas catiónicos eran los únicos que no eran citotóxicos y presentaron la molécula IL-2 en la cara externa. Así mismo se ha demostrado la activación de leucocitos de ratones para matar las células de cáncer cervical *in vitro* y reducción significativa de la carga tumoral (cáncer cervical) en ratones inmunodeprimidos^(25, 26).

Microscopia electrónica de transmisión

Los *microscopios electrónicos de transmisión (TEM)* forman imágenes con los electrones que se transmiten a través de un espécimen, mientras que los *microscopios electrónicos de barrido (SEM)* utilizan electrones que rebotan en la superficie del espécimen.

El microscopio electrónico de transmisión puede proporcionar mucha mayor resolución que el microscopio óptico. El gran poder de resolución del microscopio electrónico se deriva de las propiedades de ondas de los electrones. El límite de resolución de un microscopio está en proporción directa con la longitud de onda de la luz: mientras mayor sea la longitud de onda, es menor la resolución. A diferencia de un fotón de luz que tiene una longitud de onda constante, la longitud de onda de un electrón varía con la velocidad a la que la partícula viaja, que a su vez depende del voltaje de aceleración aplicado en el microscopio. Esta relación se define mediante la ecuación:

$$\lambda = \sqrt{150/V}$$

Donde, lambda (λ) es la longitud de onda en angstroms (Å) y V es el voltaje de aceleración en voltios. Los microscopios electrónicos de transmisión estándar operan con un espectro de voltaje de 10 000 a 100 000 V. A 60 000 V, la longitud de onda de un electrón se aproxima a 0.05 Å. En realidad la resolución alcanzable con un microscopio electrónico de transmisión estándar es de unos dos órdenes de magnitud menor que su límite teórico. Esto se debe a la aberración esférica grave de las lentes que enfocan los electrones, lo cual requiere que la apertura numérica de la lente sea muy pequeña (casi siempre entre 0.01 y 0.001). El límite práctico de resolución de los TEM estándar se halla entre 3 y 5 Å. Por lo general el límite real cuando se observa una estructura celular está entre 10 y 15 Å.

Los microscopios electrónicos consisten sobre todo en una columna alta (imagen 8), cilíndrica y hueca por la que pasa el rayo de electrones, y una consola que contiene un panel

con discos que controlan la operación de la columna por medios electrónicos. En la parte superior de la columna se encuentra el cátodo, un filamento de alambre de tungsteno que se calienta para proveer una fuente de electrones. Los electrones se extraen del filamento caliente y se aceleran como un rayo fino mediante el voltaje aplicado entre el cátodo y el ánodo. El aire se bombea para sacarlo de la columna antes de la operación, lo que produce un vacío por el que los electrones viajan. Si no se extrajera el aire, los electrones se dispersarían antes de tiempo por colisión con las moléculas de gas.

Tal como un rayo de luz puede enfocarse con una lente de vidrio pulido, un rayo de electrones con carga negativa puede enfocarse con lentes electromagnéticas, las cuales se localizan en la pared de la columna. La fuerza de los magnetos se controla mediante la corriente que se les suministra, que está determinada por las posiciones de varios discos de la consola. Las lentes del condensador de un microscopio electrónico se colocan entre la fuente de electrones y el espécimen, y enfocan el rayo de electrones sobre la muestra. Ésta se sostiene en una pequeña rejilla de metal (3 mm de diámetro) que se inserta con pinzas en el sujetador de la misma, que a su vez se inserta en la columna del microscopio.

Como las longitudes focales de las lentes de un microscopio electrónico varían según la corriente que se les aplique, una lente del objetivo proporciona todo el espectro de magnificación que el instrumento alcanza. Como en el microscopio óptico, la imagen del objetivo sirve como el objeto para un sistema de lentes adicional. La imagen que se obtiene del objetivo de un microscopio electrónico sólo tiene una magnificación de unas 100 veces pero, a diferencia del microscopio óptico, esta imagen posee los detalles suficientes para incrementarla 10 000 veces más. Al modificar la corriente que se aplica a las diversas lentes del microscopio, las magnificaciones varían desde 1 000 hasta 250 000 veces. Los electrones que pasaron por el espécimen se enfocan en una pantalla fosforescente situada

en la base de la columna. Los electrones que golpean la pantalla excitan una cubierta de cristales fluorescentes que emiten su propia luz visible que el ojo percibe como una imagen del espécimen.

Imagen 8: Microscopio electrónico de transmisión.

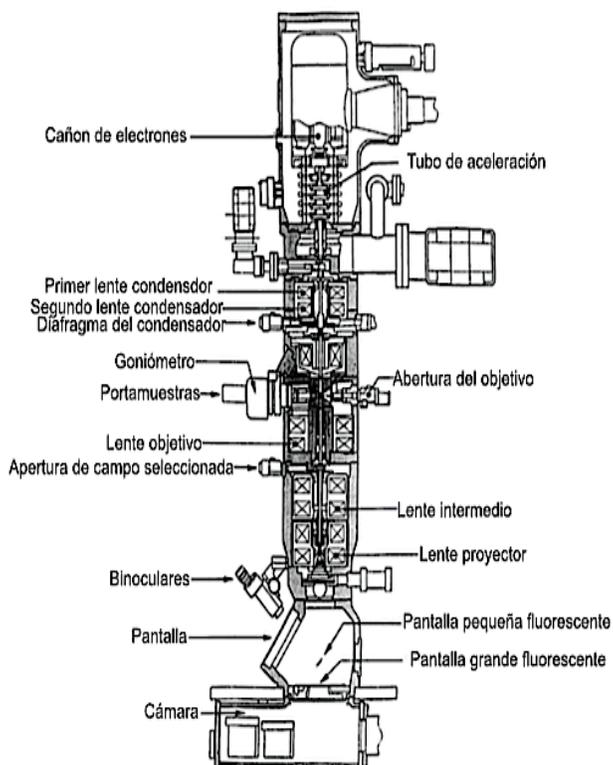


Imagen 8: Esquema general del microscopio electrónico de transmisión. Tomada de: Fultz B, Howe JM. *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*. 4th ed. Berlin: Springer Science; 2012.

La formación de una imagen en el microscopio electrónico depende de la dispersión diferencial de los electrones por las distintas partes del espécimen. Considérese un rayo de electrones emitido por el filamento y enfocado en la pantalla. Si no hubiera un espécimen en la columna, el rayo de electrones iluminaría de manera uniforme la pantalla y se produciría una imagen brillante uniforme. Por el contrario, si se coloca un espécimen en el trayecto del rayo, algunos de los electrones golpean átomos de la muestra y se dispersan. Los electrones que rebotan de la muestra no pueden pasar por la abertura tan pequeña en el plano focal

posterior de la lente del objetivo y por tanto no participan en la formación de la imagen.

La dispersión de los electrones por una parte del espécimen es proporcional al tamaño de los núcleos de los átomos que componen la muestra. Debido a que el material insoluble de las células o algunas partículas está compuesto por átomos que tienen un número atómico hasta cierto punto bajo (carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno), el material biológico tiene muy poca capacidad intrínseca para dispersar los electrones. Los tejidos se fijan y tiñen con soluciones de metales pesados para aumentar la dispersión electrónica y obtener el contraste necesario. Estos metales penetran en la estructura de las células y forman complejos selectivos con diferentes estructuras celulares o del espécimen en estudio. Las partes de una célula que se unen con la mayor cantidad de átomos metálicos permiten el paso de menor cantidad de electrones. Entre menos electrones se enfoquen en la pantalla en un punto determinado, ese punto es más oscuro. Las fotografías de la imagen se hacen al quitar la pantalla del camino y permitir que los electrones golpeen una placa fotográfica en posición por debajo de la pantalla. Como las emulsiones fotográficas tienen una sensibilidad directa a los electrones, tanto como a la luz, una imagen del espécimen se registra directamente en la película. El microscopio electrónico también es adecuado para examinar partículas muy pequeñas, inclusive agregados de alto peso molecular como virus, ribosomas, enzimas con múltiples subunidades, elementos del citoesqueleto y complejos proteínicos. También pueden resolverse las formas de proteínas individuales y ácidos nucleicos con el microscopio, siempre y cuando tengan el contraste suficiente con los elementos que los rodean. Una de las mejores formas para hacer visibles estas sustancias es emplear técnicas de tinción negativa en las que los depósitos de metales pesados se acumulan en toda la rejilla de la muestra, excepto donde hay partículas. Como resultado la muestra resalta en la pantalla por su brillantez relativa.⁽²⁷⁻³³⁾

Citometría de flujo

Antes de introducirnos al tema, es importante señalar el uso de la palabra célula dentro de los protocolos en citometría de flujo debido a que en estos días, a menudo se suelen medir cosas distintas a células. "Partículas" pueden ser utilizado como un término más general para cualquiera de los objetos que fluye a través de un citómetro de flujo. "Evento" es un término que se utiliza para indicar cualquier cosa que ha sido interpretada por el instrumento, con o sin razón, a ser una sola partícula o célula. Hay sutilezas por ejemplo, si el citómetro no tiene un flujo lo suficientemente rápido, dos partículas juntas pueden en realidad ser detectadas como un evento. Por tal motivo estos términos son utilizados con frecuencia como "sinónimos" durante la práctica.

La citometría de flujo es un proceso que permite que las partículas (500 – 4000/seg) pasen en fila dentro de un flujo a través del aparato. Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola partícula. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de eventos para definir las propiedades de una población o de las subpoblaciones que la componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la partícula como la dispersión de la luz, y características controladas como la fluorescencia. Al mismo tiempo, es posible separar las poblaciones definidas por éste análisis. Estas ideas son la base de la técnica conocida como FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). El FACS proporciona datos tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia. Para llevar a cabo lo anterior, el aparato necesita de un sistema combinado de flujo, óptico y electrónico. El sistema de flujo introduce y restringe a

las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computadora. El sistema de citometría de flujo está compuesto por cinco unidades principales (Imagen 9): una fuente de luz (lámpara de mercurio o láser), flujo celular, unidad de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específicas, fotodiodos o fotomultiplicadores para la amplificación de la señal y una unidad de operación y procesamiento de datos.

Imagen 9: Citómetro de flujo.

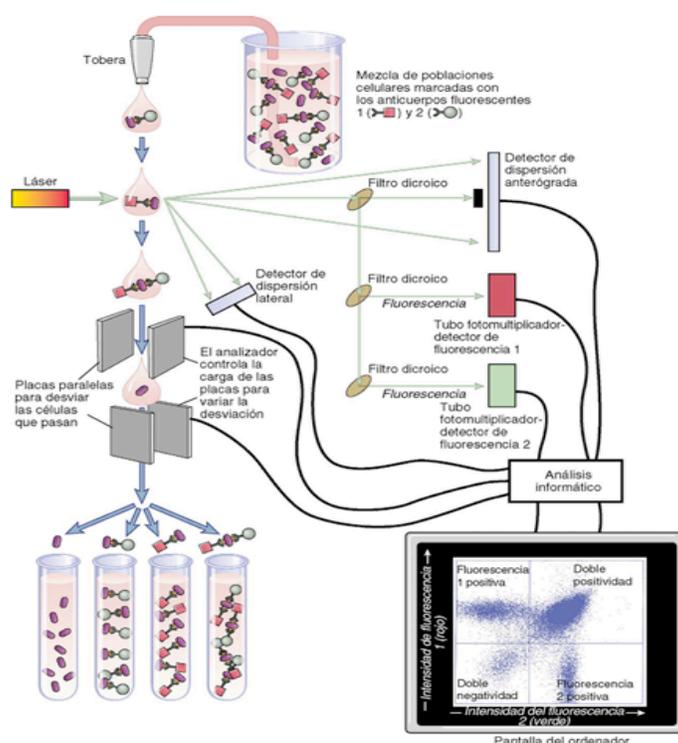


Imagen 9: Principio de la citometría de flujo y de la clasificación celular activada por fluorescencia. El haz de láser incidente tiene una longitud de onda determinada, y se analiza la dispersión anterógrada y lateral de la luz que sale de la muestra, así como la luz fluorescente de dos longitudes de onda como mínimo que depende de los fluorocromos ligados a los anticuerpos. La separación representada aquí se basa en dos marcadores antigénicos (clasificación bicromática). Los instrumentos modernos pueden analizar y separar poblaciones celulares con tres o más sondas de colores diferentes. Tomada de: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. *Inmunología celular y molecular*. Séptima ed. Barcelona, España: Elsevier; 2012.

El funcionamiento del FACS es relativamente sencillo. Una suspensión de partículas se inyecta al flujo laminar donde las células pasan una después de la otra a través de un capilar y llegan hasta un rayo láser. Cuando este rayo incide en una célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados de la célula y esto genera información. La luz dispersada hacia delante provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular. Si la partícula va marcada con un fluoróculo, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro. El FACS posee una unidad de separación de partículas que ofrece la posibilidad de separar subpoblaciones seleccionadas. Las células se cargan eléctricamente y las gotas resultantes se desvían al pasar a través de un campo eléctrico.

Para la obtención de los datos, el aparato de FACS se acopla a una computadora que adquiere los datos proporcionados por el sistema eléctrico y hace una presentación gráfica. La computadora produce un histograma o un despliegue de dos parámetros (dot plot o contour plot) a partir de la luz dispersada por las partículas o a partir de la fluorescencia⁽³²⁻³⁷⁾.

ELISA

El **ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas**, que suele conocerse como **ELISA** (o EIA), es similar en principio al RIA pero depende de una enzima en lugar de un marcador radiactivo. Una enzima conjugada con un anticuerpo reacciona con un sustrato incoloro para generar un producto con reacción de color. Ese sustrato se denomina **sustrato cromógeno**. Para ELISA se utilizan varias enzimas, como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y galactosidasa. Estas pruebas tienen sensibilidad comparable a los RIA y la ventaja de ser más seguras y menos costosas.

Variantes de ELISA

Se cuenta con algunas variaciones de ELISA que permiten la detección cualitativa o la medición cuantitativa de antígeno o anticuerpo. Cada tipo de ELISA puede usarse de manera cualitativa para detectar la presencia de anticuerpo o antígeno. De manera alternativa, se realiza una curva estándar con base en concentraciones conocidas de anticuerpo o antígeno, a partir de la cual es posible determinar la concentración desconocida de una muestra.

ELISA indirecto

Por medio de ELISA indirecto puede detectarse anticuerpo o determinarse de modo cuantitativo (imagen 10). Suero o alguna otra muestra que contenga el anticuerpo primario (Ab_1) se añade a un pozo de microtítulo recubierto con antígeno y se permite que reaccione con el antígeno unido al pozo. Después de eliminar por lavado cualquier Ab_1 libre, la presencia de anticuerpo unido a antígeno se detecta mediante la adición de un anticuerpo secundario (Ab_2) conjugado con enzima, que se une al anticuerpo primario. A continuación se elimina por lavado cualquier Ab_2 libre y se añade un sustrato para la enzima. La cantidad de producto de la reacción de color que se forma se mide con lectores espectrofotométricos

de placa especializados, que pueden medir la absorbancia de la totalidad de los pozos de una placa de 96, en segundos.

ELISA en sándwich

Es posible detectar o medir antígeno mediante ELISA en sándwich (imagen 10). En esta técnica, el anticuerpo (en lugar del antígeno) se inmoviliza en un pozo de microtítulo. Se añade una muestra que contiene antígeno y se deja reaccionar con el anticuerpo inmovilizado. Después de lavar el pozo, se agrega un segundo anticuerpo ligado a enzima específico para un epítipo distinto del antígeno y se permite que reaccione con el antígeno unido. Tras eliminar cualquier segundo anticuerpo libre mediante lavado, se añade sustrato y se mide el producto de la reacción de color.

ELISA competitivo

El método de ELISA competitivo es otra variante para medir cantidades de antígeno (imagen 10). En esta técnica se incuba primero anticuerpo en solución con una muestra que contiene antígeno. Después la mezcla de antígeno y anticuerpo se añade a un pozo de microtítulo recubierto con antígeno. Cuanto más antígeno se encuentra en la muestra, tanto menos anticuerpo libre está disponible para unirse al foso recubierto con antígeno. La adición de un anticuerpo secundario (Ab_2) conjugado con la enzima específica para el isotipo de un anticuerpo primario puede utilizarse para determinar la cantidad de anticuerpo primario unido al pozo como en un ELISA indirecto. Sin embargo, en la prueba competitiva cuanto más alta es la concentración de antígeno en la muestra original tanto más baja es la absorción^{(33, 35, 38-}

42).

Imagen 10: Variaciones de ELISA.

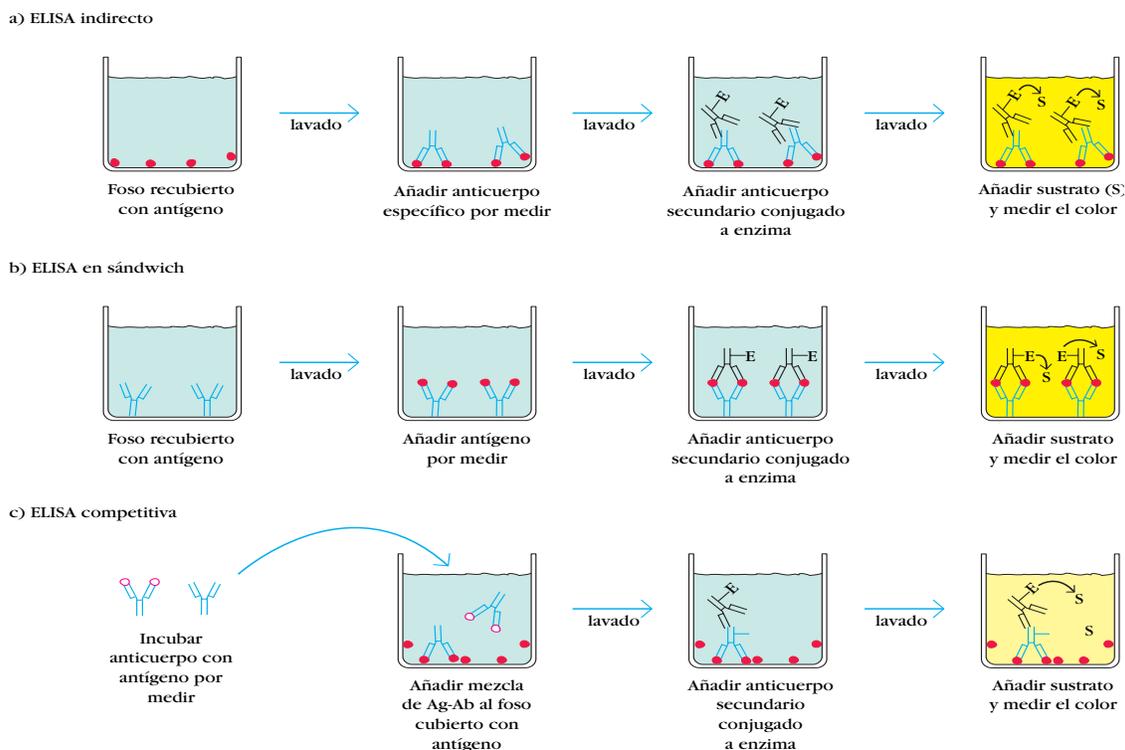


Imagen 10: Las variaciones en la técnica del ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) permiten determinar anticuerpo o antígeno. Cada prueba puede utilizarse de manera cualitativa o cuantitativa mediante la comparación con curvas estándar elaboradas con concentraciones conocidas de anticuerpo o antígeno. El anticuerpo puede determinarse con ELISA indirecto (a), en tanto que el antígeno puede determinarse por ELISA en sándwich (b) o ELISA competitivo (c). En este último, que es un ensayo tipo inhibición, la concentración de antígeno es inversamente proporcional al color que se produce. *Tomada de: Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Palacios Martínez R. Inmunología de Kuby. 2da ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2007.*

Cultivo celular

El cultivo celular es un conjunto de técnicas que permiten la presencia de las células *in vitro*, manteniendo en lo posible sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Existen diferentes tipos de cultivos, entre ellos, los cultivos celulares primarios que se realizan colocando células en medio de cultivo, tomadas directamente de tejidos animales; en los cultivos primarios las células mantienen su viabilidad por un periodo de tiempo limitado y pueden reproducirse si se les proporcionan las condiciones adecuadas, como en el caso de los fibroblastos y las células sanguíneas. Así mismo el subcultivo de un cultivo primario deriva en un cultivo secundario o terciario.

Clasificación de los cultivos celulares:

Cultivo primario: Cultivo celular derivado de fragmentos de tejido. Generalmente termina en el primer subcultivo.

Subcultivo (pase): Término para determinar el cambio de células de un frasco de cultivo a uno nuevo. Recambio de medio de cultivo.

Cultivo secundario: Células provenientes de un cultivo previo.

Línea celular continua: Cultivo celular con capacidad ilimitada de multiplicación *in vitro*.

Línea celular finita: Cultivo con limitada capacidad de crecimiento *in vitro*.

Clon: Población de células derivadas de una misma, que presentan el mismo fenotipo.

Senescencia: Punto final en el ciclo biológico de una línea celular finita, caracterizado por la ausencia de división. La conversión de una línea celular finita a una continua requiere sobrepasar la senescencia.

El primer paso en el cultivo celular es la obtención de células. En la mayor parte de los casos sólo debe extraerse una ampolleta de células congeladas cultivadas con anterioridad de un tanque de nitrógeno líquido, descongelar la ampolleta y transferir las células al medio de

espera. Un cultivo de este tipo se conoce como **cultivo secundario** porque las células provienen de un cultivo previo. En un **cultivo primario** las células se obtienen del organismo. Casi todos los cultivos primarios de células animales se toman de embriones, cuyos tejidos se disocian con más facilidad en células que los tejidos de los adultos. La disociación se efectúa con la ayuda de una enzima proteolítica, como la tripsina, que digiere los dominios extracelulares de las proteínas que median la adhesión celular. Luego el tejido se lava para eliminar la enzima y por lo general se suspende en una solución salina que carece de iones Ca^{2+} y contiene una sustancia, como tetraacetato de etilenediamina (EDTA), que se une (quela) con los iones de calcio, los iones de calcio desempeñan una función clave en la adhesión celular y su eliminación de los tejidos facilita mucho la separación de las células.

Las células normales (no malignas) pueden dividirse una cantidad limitada de veces (por lo general 50 a 100) antes de envejecer y morir. Por ello muchas de las células que suelen usarse en los estudios con cultivo de tejido se someten a modificaciones genéticas que les permiten crecer por tiempo indefinido. Las células de este tipo se conocen como **línea celular** y casi siempre crecen para formar tumores malignos cuando se inyectan en animales de laboratorio susceptibles. La frecuencia con la que una célula normal que crece en cultivo se transforma de manera espontánea en una línea celular depende del organismo del que proviene. Por ejemplo, las células de ratón se transforman con una frecuencia más o menos alta; las células humanas se transforman sólo raras veces, si es que sucede. Las líneas celulares humanas suelen derivarse de tumores humanos o de células tratadas con virus o sustancias que causan cáncer.

Las células pueden establecerse en forma de monocapa o en suspensión. El crecimiento en monocapa nos indica que las células se adhieren a un sustrato que puede ser una superficie plástica y en esa forma iniciar su proliferación, al respecto, muchas líneas celulares son

anclaje dependiente, es decir no inicia la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. El crecimiento en suspensión es para aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes del anclaje, como en el caso de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores.

Medio de cultivo

Para realizar un cultivo celular es necesario contar con un medio de cultivo que es una solución balanceada de sales y nutrientes como glucosa, con control de pH y adicionada con algunos aditivos como vitaminas. Entre los medios de cultivo que podemos utilizar se encuentra la solución de Han's (HBSS), el medio Eagle's (MEM), medio esencial mínimo de Dulbecco y RPMI 1640. Este último es uno de los más utilizados, esta suplementado con L-glutamina y necesita la adición de suero fetal de ternera entre un 10 y 20% como complemento.

Contaminación

Muchos microorganismos son capaces de crecer rápidamente en cultivos celulares de ahí que el mantener las condiciones de esterilidad es indispensable. Por lo tanto para trabajar con cultivos celulares, estos se deben realizar en una campana de flujo laminar y utilizar antibióticos y fungicidas en el cultivo.

Los contaminantes más comunes en los cultivos celulares son los estreptococos, estafilococos y las enterobacterias como la *E. coli*, por lo que los antibióticos de elección son la penicilina (110 U/mL) y la estreptomycinina (100 µg/mL) que muestran una buena eficiencia en cultivos de 72 horas. En el caso de que los cultivos sean más prolongados es mejor utilizar kanamicina (110 µg/mL) y gentamicina (50 µg/mL) y si se sospecha de que pueda contaminarse con *Pseudomonas sp* el antibiótico a usar es la polimixina B (100 U/mL). Como

antifungicos es posible usar nistatina (50 µg/mL) y anfotericina B (2.5 µg/mL) que son efectivos en contra de *Candida sp* y *Aspergillus sp*, que son los contaminantes más frecuentes en los cultivos celulares.

pH y temperatura

Los requerimientos de temperatura para un buen cultivo son de 37 °C con un intervalo de 36 a 38 °C, ya que temperaturas menores provocan que el progreso del cultivo sea lento y temperaturas mayores provocan muerte celular.

Con respecto al pH un intervalo adecuado es entre 7 y 7.4 y es conveniente mantener los cultivos con una atmósfera parcial de CO₂ al 5%

Sincronización

En un cultivo celular podemos tener células en todas las fases del ciclo celular, por lo que es necesario lograr una sincronía en el cultivo. Una forma de lograrlo es retirar ciertos nutrientes del medio de cultivo como es el suero fetal bovino, de esta forma la célula se encuentra en un ambiente (hostil) con los nutrientes limitados y al mantener así el ambiente durante un tiempo determinado se logra sincronizar el cultivo celular en la fase G₀. Otra forma de lograr la sincronía se adiciona un bloqueador químico como el metotrexato (MTX) en un estadio temprano del ciclo celular, este compuesto es un análogo del ácido fólico que tiene una alta afinidad por la enzima dihidrofolato reductasa que participa en la síntesis del ácido folínico por lo que este proceso se inhibe; el ácido folínico se requiere para la producción de timina y por lo tanto la síntesis de DNA. Las células entonces se bloquean antes de la síntesis del DNA en G₁/S, una vez que pasa el tiempo suficiente para que todas las células se detengan allí, se retira el bloqueo y todas seguirán el ciclo de forma sincronizada^(10, 31, 43, 44).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. Siendo este un problema de salud pública, ya que causa una enorme pérdida de vidas humanas y recursos económicos.

Existen diferentes fármacos que son utilizados para el tratamiento de este padecimiento, sin embargo tienen grandes desventajas debido a que son inespecíficos y altamente tóxicos.

Las citocinas, particularmente la Interleucina 2 (IL-2), se han probado en modelos tumorales de cáncer cervical y melanoma. La IL-2 es un potente activador de los linfocitos T, activa a las células NK, a los macrófagos, a los linfocitos B y estimula la liberación de varias citocinas inmunorreguladoras, lamentablemente la inmunoterapia con citocinas como activadoras de la respuesta inmune está limitada por la vida media de éstas y con su posible actividad tóxica a nivel sistémico.

Por lo anterior, existe una imperiosa necesidad de desarrollar modalidades terapéuticas con toxicidad y efectos secundarios mínimos o nulos. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha construido varios tipos de nanopartículas liposomales para transportar moléculas biológicas activas, como la IL-2. En estudios previos realizados se informa la construcción de liposomas que poseen gran capacidad para presentar la molécula de IL-2 en su superficie externa y su afinidad a las células de cáncer que posean su receptor, como son las de cuello uterino. En estos estudios también se demuestra la estabilidad de dichos nanoacarreadores por lo que son una propuesta prometedora para el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

En otro orden de ideas, el fosfatidilinositol (PI) representa solo una pequeña fracción de los fosfolípidos celulares pero controlan prácticamente todos los aspectos de la vida y muerte celular; su metabolismo está involucrado en un gran número de enfermedades incluyendo cáncer, por este motivo es importante utilizar este fosfolípido para la formulación de nuevos nanoacarreadores lipídicos y así conocer la influencia que éste pueda tener tanto en las

características del liposoma como en el desarrollo celular.

En este trabajo se fabricaron y caracterizaron liposomas unilaminares pequeños que contienen fosfatidilinositol (PI) como nanoacarreadores lipídicos de IL-2, con el objeto de identificar su posible participación en el tratamiento en tumores inducidos en ratones con células de cáncer cérvico-uterino y de melanoma, para lograr una reducción tumoral, reducir los efectos secundarios tóxicos en órganos sensibles, aumentar la vida media de esta citocina dirigida a tejidos específicos (tumores formados con células que poseen receptores para IL-2) y facilitar la unión del PI a sus receptores.

HIPÓTESIS

La composición lipídica de la nanopartícula tendrá efectos en su morfología y tamaño, en la expresión de la IL-2 en la superficie, en la cantidad encapsulada de la misma y en la interacción con las células tumorales.

OBJETIVOS GENERALES

Fabricar y caracterizar nanoacarreadores lipídicos que contengan fosfatidilinositol (PI) para encapsular IL-2.

Determinar la interacción de los liposomas con las células tumorales en un modelo *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Fabricar nanoacarreadores de una composición determinada para encapsular IL-2.

Determinar por Microscopía Electrónica de Transmisión la morfología y tamaño de los nanoacarreadores lipídicos.

Determinar las características físicas y la presencia de IL-2 en los nanoacarreadores lipídicos por Citometría de Flujo.

Cuantificar la interleucina 2 contenida en un sistema nanoacarreador lipídico, expresada tanto en la membrana liposomal y encapsulada por método de ELISA.

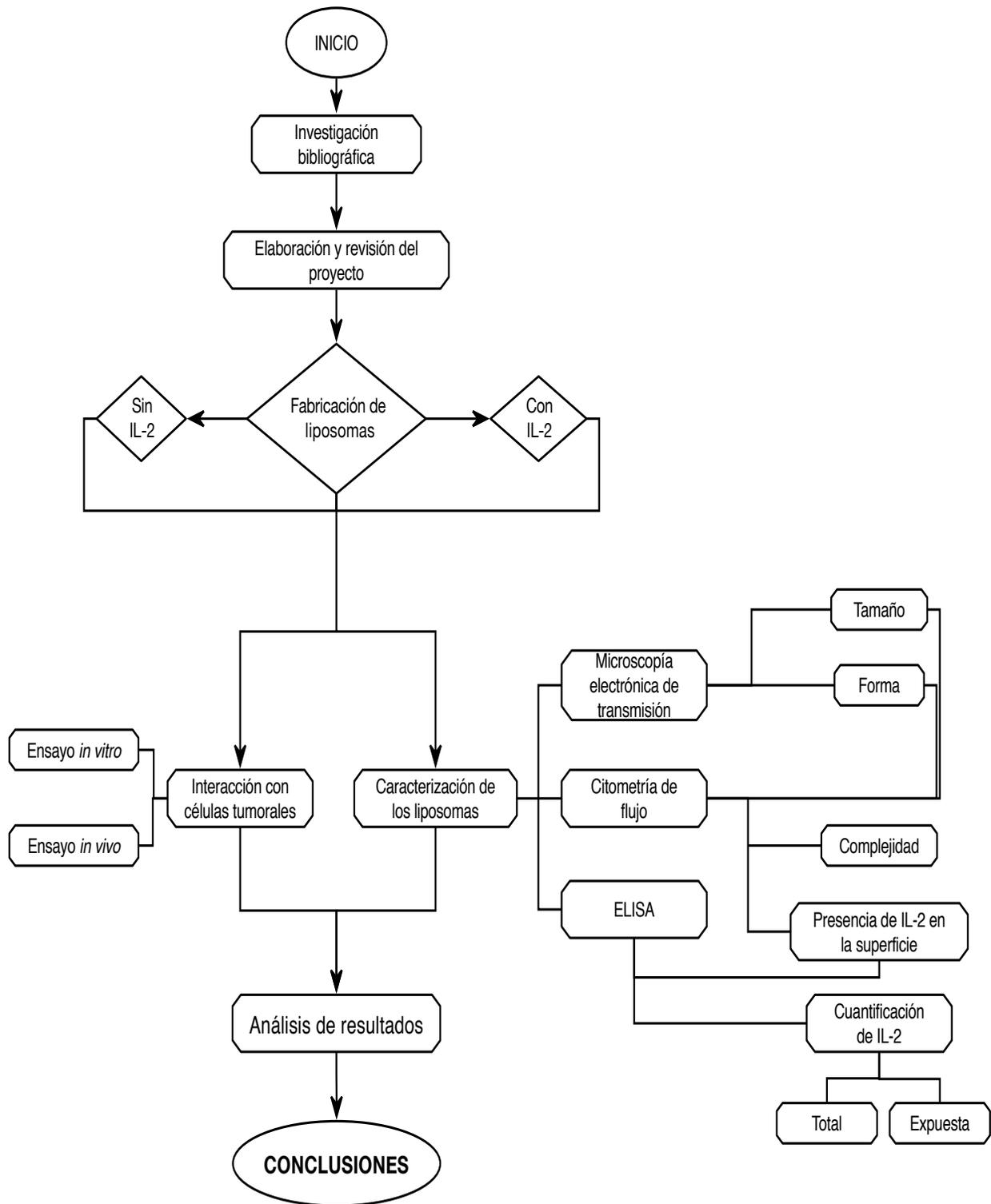
Determinar la interacción de los liposomas con las células tumorales INBL y B16F0 en un modelo *in vitro* e *in vivo*.

Determinar si la cepa de ratón nude (nu/nu) puede ser utilizada como modelos de estudio para ensayos futuros con líneas celulares INBL y B16F0.

Determinar si la vía de inoculación subdérmica es una vía viable para ser utilizada en ensayos futuros.

Utilizar la vía tópica como nueva vía de administración de liposomas para ensayos *in vivo*.

DIAGRAMA DE FLUJO



METODOLOGÍA

Material

- a) Tubos de ensayo 13x100 mm.
- b) Tanque de nitrógeno.
- c) Tubos cónicos de 1,5 mL.
- d) Jeringa de vidrio de 50 μ L.
- e) Micropipetas de 10, 200 y 1000 μ L.
- f) Puntas para micropipeta 10, 200 y 1000 μ L.
- g) Pipeta dosificadora.
- h) Camisas para ultracentrífuga.
- i) Tubos para ultracentrífuga 14x95 mm.
- j) Cronómetro.
- k) Inmunoplasmas.
- l) Tubos para Citómetro.
- m) Tubos cónicos 15 mL.
- n) Tubos cónicos 50 mL.
- o) Cajas Petri.
- p) Cajas para cultivo celular 25, 75 y 500cm².

Equipo

- a) Campana de flujo laminar.
- b) Balanza analítica.
- c) Sonificador.
- d) Ultracentrífuga.
- e) Potenciometro.
- f) Lector de ELISA.
- g) Citómetro de flujo.
- h) Microscopio electrónico.
- i) Microscopio óptico.
- j) Microscopio óptico invertido.
- k) Incubadora con inyección de CO².
- l) Centrífuga.
- m) Computadora.
- n) Cámara digital para microscopio.
- o) Cámara digital.

Material Biológico

- a) Línea celular de cáncer de cérvix INBL.
- b) Línea celular de melanoma B16F0.
- c) Ratón nude (nu/nu).

Soluciones y Reactivos

Soluciones y reactivos para la producción de Nanoacarreadores lipídicos o Liposomas.

- a) Cloroformo.
- b) Interleucina 2.
- c) Lípidos.
- d) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline. PBS).

Soluciones y reactivos para citometría.

- a) 1^{er} anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti-IL-2 de humano.
- b) 2^o anticuerpo IgG de conejo anti IgG de ratón acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- c) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline. PBS).
- d) Soluciones y reactivos para Microscopía Electrónica de transmisión.
- e) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline. PBS).
- f) Acetato de Uranilo al 4%.

Soluciones y reactivos para la técnica de ELISA.

- a) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline PBS).
- b) Buffer de lavado 0,05% Tween 20 en PBS, pH 7.2.
- c) Solución amortiguadora de Citratos pH 5.
- d) Solución TMB Stock.

- e) Solución sustrato: TMB, Buffer de citratos, H₂O₂
- f) Anticuerpo de captura.
- g) Anticuerpo de detección.
- h) IL-2r.
- i) PVP al 1% en buffer de lavado.
- j) Estreptavidina HRP.
- k) Solución Stop-Ácido Sulfúrico 1M.
- l) Solución tritón al 5%.

Soluciones y reactivos para ensayos *in-vitro*.

- a) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline PBS).
- b) Verseno pH 7.7.
- c) Medio RPMI-1640 pH 6.9 – 7.
- d) Medio DMEM pH 7.2 – 7.4.
- e) Antibiótico.
- f) Antimicótico.
- g) Suero fetal bovino.
- h) Glutaraldehído 0.1%.
- i) Cristal violeta
- j) Ácido acético glacial.

Soluciones y reactivos para ensayos *in-vivo*.

- a) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline PBS).
- b) Verseno pH 7.7.
- c) Medio RPMI-1640 pH 6.9 – 7.
- d) Medio DMEM pH 7.2 – 7.4.
- e) Antibiótico.
- f) Antimicótico.
- g) Suero fetal bovino.

Métodos

Fabricación de Liposomas que contienen PI con y sin IL-2.

- a) Mezclar espermidil colesterol, fosfatidilcolina y fosfatidilinositol (liposomas vacíos) e IL-2 (liposomas con IL-2) en un tubo de ensayo de 13x100 mm, previamente esterilizado.
- b) Sonicar ambas mezclas en sus tubos por 3 ciclos de 5 segundos, con descanso de 10 segundos entre cada ciclo.
- c) Diluir el tubo Liposomas PI vacíos en PBS y acondicionar en tubos de 2 mL.
- d) Ultracentrifugar el tubo liposomas PI IL-2 a 40 000 RPM durante 40 minutos.
- e) Desechar el sobrenadante y resuspender en PBS.
- f) Acondicionar en tubos de 2 mL.

Microscopía Electrónica de Transmisión

- a) Tomar muestras de liposomas vacíos y con IL-2.
- b) Diluir cada muestra 1:10.
- c) Tomar 5 μ L de cada muestra y colocarlos en rejillas de cobre con 200 mallas que estén cubiertas con formvar.
- d) Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- e) Eliminar el líquido por decantación con papel filtro.
- f) Teñir las muestras con una solución acuosa de acetato de uranilo al 4% durante 5 minutos.
- g) Eliminar el exceso de líquido.
- h) Dejar reposar durante 24 horas.
- i) Observar las muestras en el microscopio electrónico de transmisión y tomar fotografías a 40 K, 80 K y 100K.

Citometría de Flujo

- a) Tomar 100 μ L de la muestra y adicionar 100 μ L del primer anticuerpo monoclonal contra IL-2 a una concentración de 5 μ g/mL.
- b) Incubar durante una hora a 37 °C.
- c) Adicionar el segundo anticuerpo conjugado a FITC a una dilución 1:80.
- d) Incubar por una hora a 37 °C en obscuridad.
- e) Completar el volumen a un mililitro con PBS.
- f) Colocar las muestras en tubos para citometría de 12 x 75 mm.
- g) Leer las muestras en el citómetro FACScalibur.
- h) Guardar y analizar los datos obtenidos.

Cuantificación de IL-2 mediante la técnica de ELISA

Preparación de la placa para ELISA.

- a) Transferir 100 μ L/pozo del anticuerpo de captura a una placa de ELISA.
- b) Sellar la placa e incubar a temperatura ambiente.
- c) Aspirar cada pozo y lavar con Buffer de Lavado, repetir el proceso dos veces para un total de 3 lavados.
- d) Bloquear la placa adicionando 150 μ L de PVP al 1%.
- e) Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
- f) Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2.

Procedimiento para la valoración de IL-2 expuesta y encapsulada en el sistema nanoacarreador.

- a) Preparar las diluciones problema y estándares.
- b) Para la cuantificación de la IL-2 total agregar a los pozos de las muestras 50 μ L de tritón para deshacer los liposomas.

- c) Adicionar 50 μ L/pozo de la muestra o estándar.
- d) Cubrir con una tira adhesiva e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
- e) Repetir la aspiración/lavado.
- f) Adicionar 100 μ L del anticuerpo de detección, en cada pozo.
- g) Cubrir con una tira adhesiva nueva e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
- h) Repetir la aspiración/lavado.
- i) Adicionar 100 μ L de estreptavidina HRP en cada pozo.
- j) Cubrir la placa e incubar por 20 min a temperatura ambiente.
- k) Repetir la aspiración/lavado.
- l) Adicionar 100 μ L de Solución Sustrato en cada pozo. Incubar por 20 - 30 minutos a temperatura ambiente. Evitar colocar la placa a luz directa.
- m) Adicionar 50 μ L de Solución Stop en cada pozo. Golpear la placa suavemente para garantizar un mezclado completo.
- n) Determinar la densidad óptica de cada pozo dentro de 30 minutos, usando un lector de microplacas a 450 nm. Si la corrección de la longitud de onda está disponible, establecerla a 540 nm o 570 nm. Si la corrección de la longitud de onda no está disponible, restar lecturas a 540 nm o 570 nm de la lectura a 450 nm. Esta resta será correcta para las imperfecciones ópticas de la placa. Lecturas realizadas directamente a 450 nm sin corrección pueden ser menos exactas.

Ensayo *in vitro*.

- a) Realizar el cultivo celular de las líneas INBL y B16F0 hasta obtener el número adecuado para el ensayo.
- b) Colocar en una placa de 96 pozos 3000 células/pozo. Considerando los controles necesarios y los tiempos programados (24, 72 y 120Hrs).
- c) Sincronizar las líneas celulares INBL y B16F0.
- d) Colocar el correspondiente estímulo a cada pozo de ambas líneas celulares.
- e) Incubar durante una hora.
- f) Quitar el estímulo y hacer lavados con PBS.
- g) Incubar la placa durante 24, 72 y 120 horas.
- h) Fijar las líneas celulares a su tiempo correspondiente (24, 72 y 120Hrs) con glutaraldehído al 0.1%.
- i) Incubar durante 20 minutos.
- j) Quitar el glutaraldehído y hacer lavados con PBS.
- k) Agregar 100 μ L/pozo de cristal violeta.
- l) Agitar durante 20 minutos.
- m) Desechar el cristal violeta y lavar con PBS hasta eliminar completamente el cristal violeta.
- n) Adicionar 100 μ L de ácido acético glacial.
- o) Agitar durante 20 minutos.
- p) Leer la placa a 570nm.

Ensayo *in-vivo*^(45, 46).

- a) Revisar, marcar, pesar y armar los grupos de ratones necesarios para el ensayo.
- b) Realizar el cultivo celular de las líneas INBL y B16F0 hasta obtener el número adecuado para el ensayo.
- c) Hacer el conteo celular de cada línea.
- d) Hacer la dilución correspondiente, utilizando PBS, a cada línea celular para obtener el número adecuado de inoculación en 300µL por ratón (10^6 de células para la línea INBL y 10^5 para la línea B16F0).
- e) Inocular vía subdérmica 300 µL de la línea INBL o B16F0 a cada ratón, excepto a los controles negativos.
- f) Revisar diariamente a cada grupo de ambas líneas inoculadas hasta cumplir 20 días después de la inoculación.
- g) Aplicar tratamiento vía tópica el día 21 después de la inoculación. El tratamiento tendrá una duración de 5 días.
- h) Sacrificar todos los grupos un día después de terminar el tratamiento.
- i) Tomar fotografías y registrar los resultados.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Fabricación y caracterización por microscopía electrónica de transmisión (MET): Determinación de tamaño y morfología de nanoacarreadores con fosfatidilinositol (PI) para encapsular Interleucina 2 (IL-2).

Con la finalidad de utilizar nanoacarreadores (liposomas) de una composición determinada que incluye PI e IL-2, para utilizarlos como tratamiento de células tumorales que poseen el receptor de IL-2; se procedió a mezclar fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina y espermidilcolesterol para fabricar nanoacarreadores llenos y vacíos (con y sin IL-2). Los resultados mostraron que al usar PI se formaron nanopartículas entre 20 y 60 nm con un predominio de 40 nm (Imagen 11 y 12), además estos presentaron una forma esférica regular. Al usar PI y la IL-2 se formaron nanopartículas de entre 20 y 70 nm con un promedio de 50 nm (Imagen 13, 14 y 15), al igual que los liposomas vacíos estos también presentaron una forma esférica. Comparando las imágenes obtenidas por MET de los liposomas llenos y vacíos (Imagen 16 y 17) muestran que la IL-2 tuvo una ligera influencia en el tamaño de los liposomas, pues los liposomas vacíos presentaron un menor tamaño respecto a los liposomas que contenían IL-2.

Las imágenes fueron obtenidas después de haber procesado las muestras y ser observadas al microscopio electrónico. Con un aumento de 80,000x.

Liposomas con fosfatidilinositol sin IL-2 (LIPPIVAC, Liposomas vacíos).

Imagen 11: Liposomas con fosfatidilinositol sin IL-2

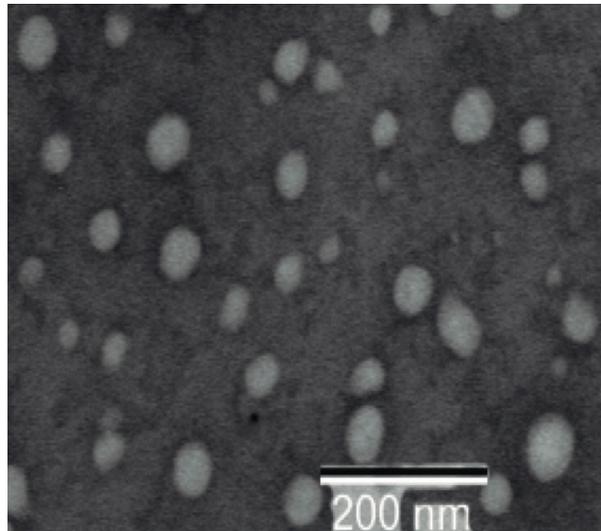


Imagen 11: La figura fue procesada con el programa Macnification para poder obtener una escala aproximada y así determinar el tamaño de las nanopartículas.

Imagen 12: Liposomas con fosfatidilinositol sin IL-2

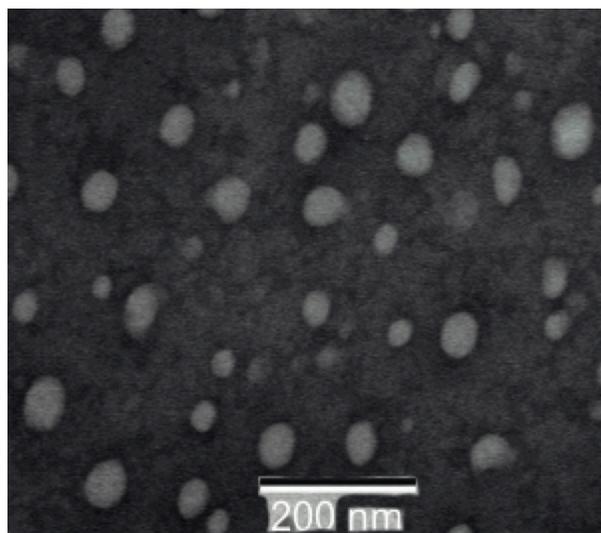


Imagen 12: La figura fue procesada con el programa Macnification para poder obtener una escala aproximada y así determinar el tamaño de las nanopartículas.

Liposomas con fosfatidilinositol e IL-2 (LIPPI IL-2, Liposomas llenos).

Imagen 13: Liposomas con IL-2 y fosfatidilinositol

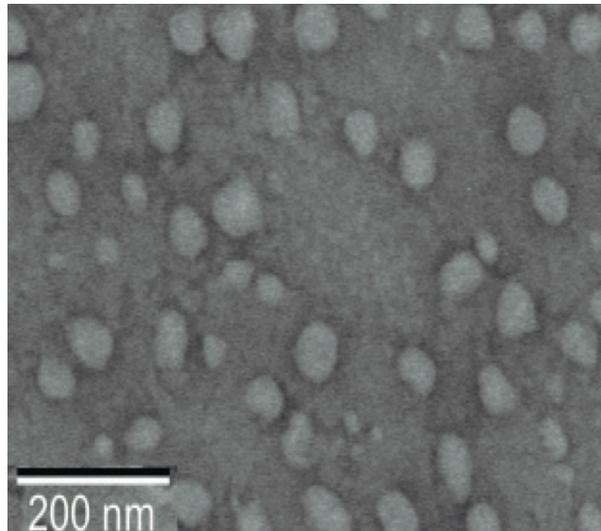


Imagen 13: La figura fue procesada con el programa Macnification para poder obtener una escala aproximada y así determinar el tamaño de las nanopartículas.

Imagen 14: Liposomas con IL-2 y fosfatidilinositol

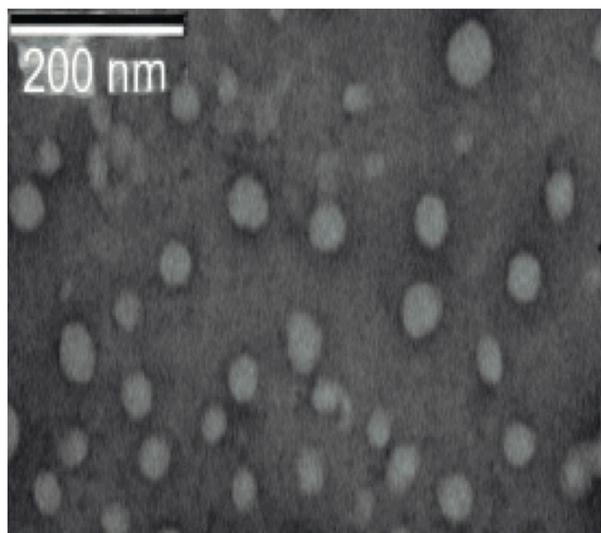


Imagen 14: La figura fue procesada con el programa Macnification para poder obtener una escala aproximada y así determinar el tamaño de las nanopartículas.

Imagen 15: Liposomas con IL-2 y fosfatidilinositol

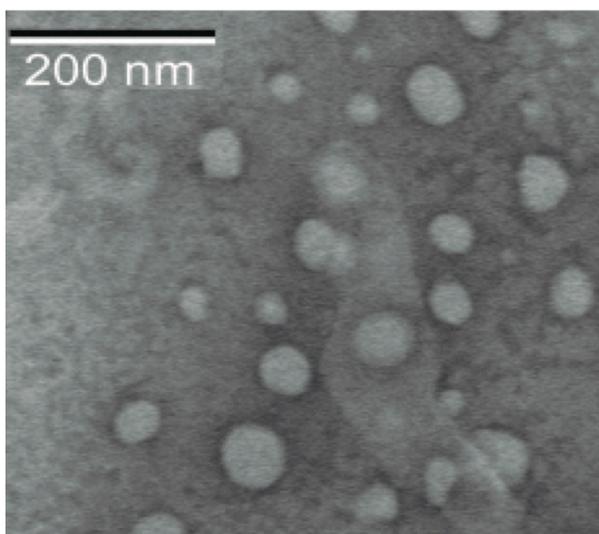


Imagen 15: La figura fue procesada con el programa Macnification para poder obtener una escala aproximada y así determinar el tamaño de las nanopartículas.

Comparacion entre LIPPIVAC y LIPPI IL-2

Imagen 16: Comparación de liposomas con fosfatidilinositol llenos y vacíos

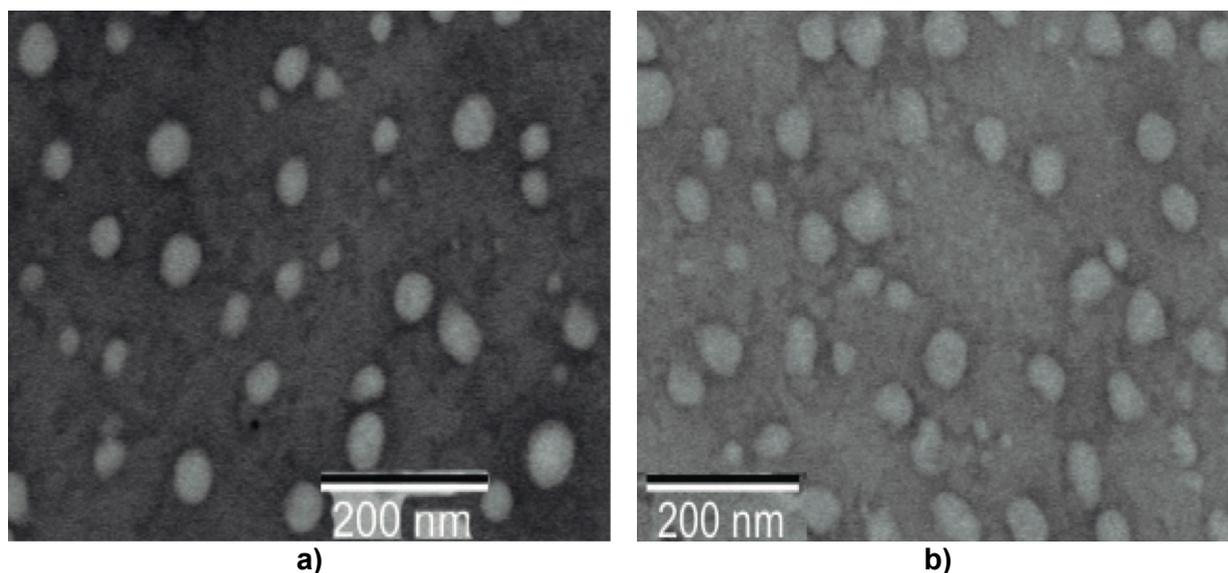


Imagen 16: Comparación de a) LIPPIVAC y b) LIPPI IL-2.

Imagen 17: Comparación de liposomas con fosfatidilinositol llenos y vacíos

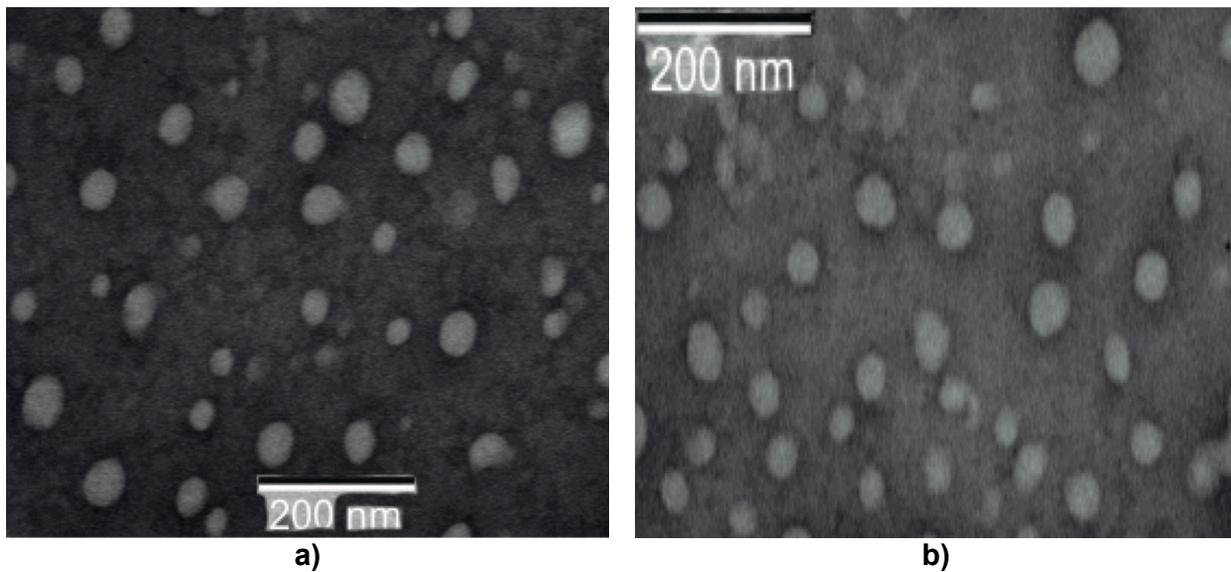


Imagen 17: Comparación de a) Liposomas vacíos y b) Liposomas llenos.

Comparando el tamaño y morfología de las dos partículas no se observó una diferencia relevante. Los liposomas vacíos presentaron un tamaño ligeramente menor a los liposomas que contenían IL-2. Ambos tenían una forma esférica similar.

Caracterización por citometría de flujo: Determinación del tamaño, complejidad y presencia de IL-2 expresada en la membrana de los nanoacarreadores lipídicos.

Para comparar los resultados obtenidos por MET, además de determinar la complejidad y la presencia de IL-2 en la superficie del liposoma, las partículas obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo y se determinaron los parámetros antes mencionados. El análisis indicó que las partículas son de tamaño y complejidad (Imagen 18 y 20) similar a las utilizadas anteriormente por nuestro grupo de trabajo^(25, 32) las cuales no contenían PI. Así mismo, mediante el uso de anticuerpos anti IL-2 fluoresceínados, se detectó la presencia de IL-2 en su superficie (Imagen 21 y 25). Para lograr lo anterior, se usó como control negativo o fluorescencia propia del sistema la muestra de liposomas vacíos (Imagen 19 y 25). Además, se analizó la relación que existe entre el tamaño y/o la complejidad (Imagen 22) de la partícula y la presencia de IL-2 en la superficie. Con respecto al tamaño, no existe relación ya que hubo partículas de diversos tamaños que expresaban la misma fluorescencia de IL-2 en la superficie, es decir nanopartículas pequeñas con la misma IL-2 expresada en la membrana que las nanopartículas de mayor tamaño; no pasa lo mismo con la rugosidad, los liposomas de mayor complejidad presentaron una mayor cantidad de IL-2 en la superficie, es decir que no importó si las nanopartículas eran grandes o pequeñas, la IL-2 expresada en la membrana es directamente proporcional a la complejidad del liposoma.

Al final se hicieron las comparaciones del tamaño y complejidad de nanopartículas llenas y vacías. En cuanto al tamaño no se observó diferencia (imagen 23), las dos nanopartículas se encuentran en el mismo rango de tamaño, referente a la complejidad (Imagen 24), la IL-2 influyo en la rugosidad de la partícula, la IL-2 les proporciona una mayor complejidad a los liposomas. Esto también se ve reflejado en los ensayos con anticuerpos fluoreceínados (imagen 25), donde se muestra que (comparando con el control negativo), un cierto número

de liposomas expresa la IL-2 en la superficie y la otra parte la encapsula totalmente, esta condición se ve reflejada en la complejidad del sistema (imagen 22) como ya se explicó anteriormente. Debido a que existe IL-2 expresada en la membrana del liposoma, fue necesario determinar la concentración de ésta mediante un ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) validado en nuestro laboratorio.

Imagen 18: Análisis de los Liposomas con fosfatidilinositol y sin IL-2 por citometría de flujo.

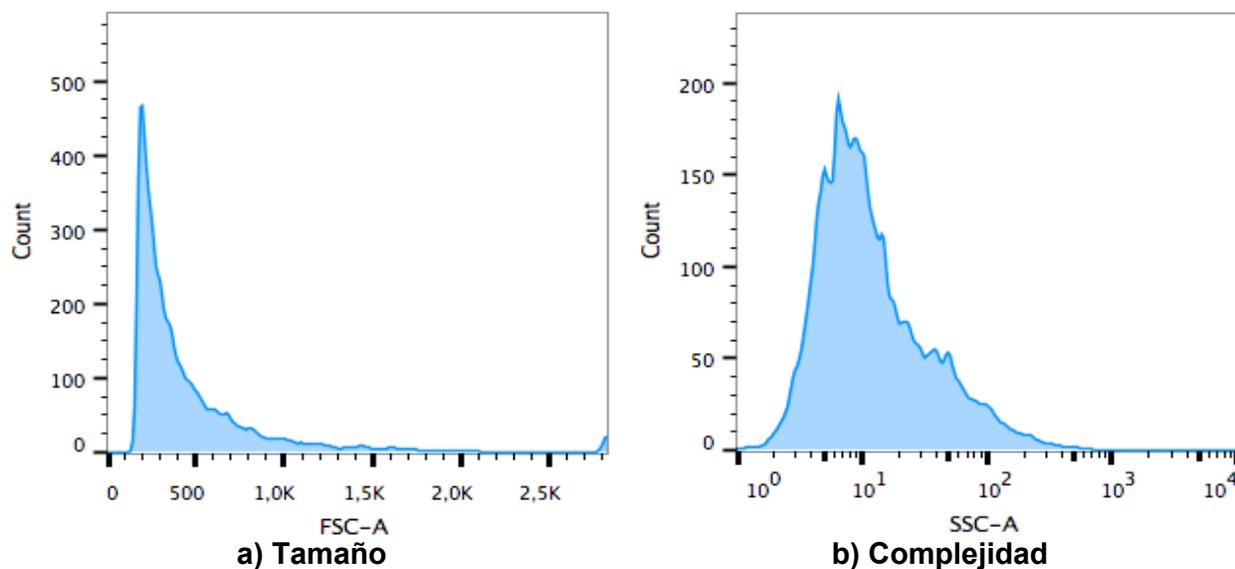


Imagen 18: La grafica a) representa el tamaño de la población y b) la complejidad de la misma. Las abscisas representan el tamaño a) o rugosidad b) y las ordenadas el número de eventos.

Imagen 19: Análisis de fluorescencia de los Liposomas con fosfatidilinositol y sin IL-2 por citometría de flujo.

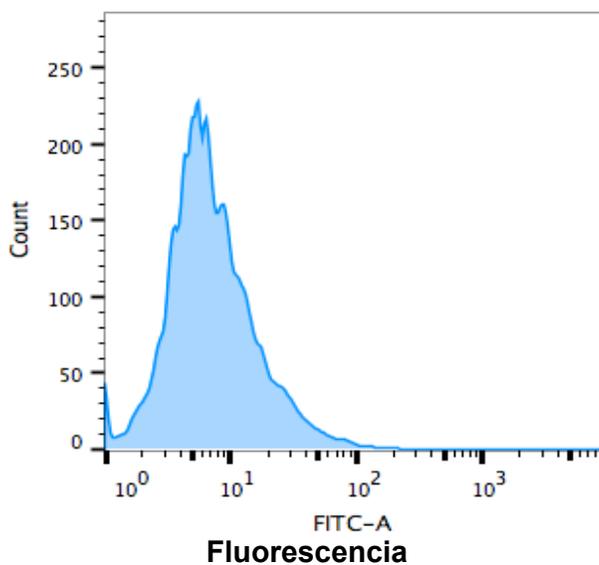


Imagen 19: La grafica expresa la fluorescencia captada por las nanopartículas sin IL-2 al usar el segundo anticuerpo conjugado a FITC. Por tanto, representa el control negativo utilizado para determinar la presencia de IL-2 en la superficie de las nanopartículas con IL-2.

Imagen 20: Análisis de los Liposomas con fosfatidilinositol e IL-2 por citometría de flujo.

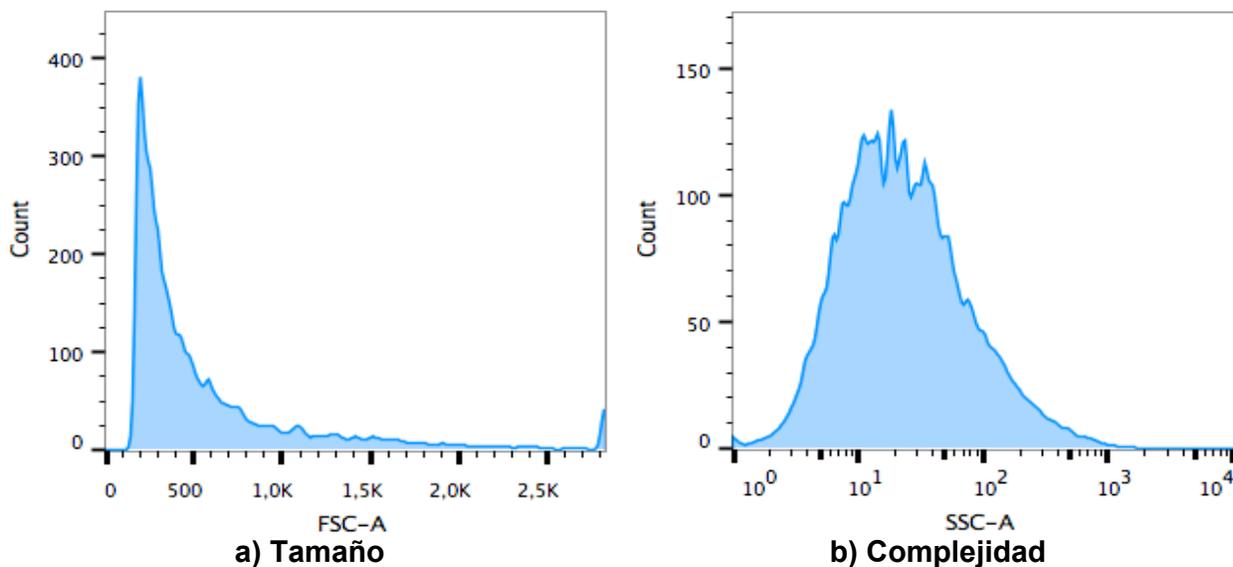


Imagen 20: La grafica a) representa el tamaño de la población y b) la complejidad de la misma. En las abscisas se observa el tamaño a) o rugosidad b) y las ordenadas el número de eventos analizados.

Imagen 21: Análisis de fluorescencia de los Liposomas con fosfatidilinositol e IL-2 por citometría de flujo.

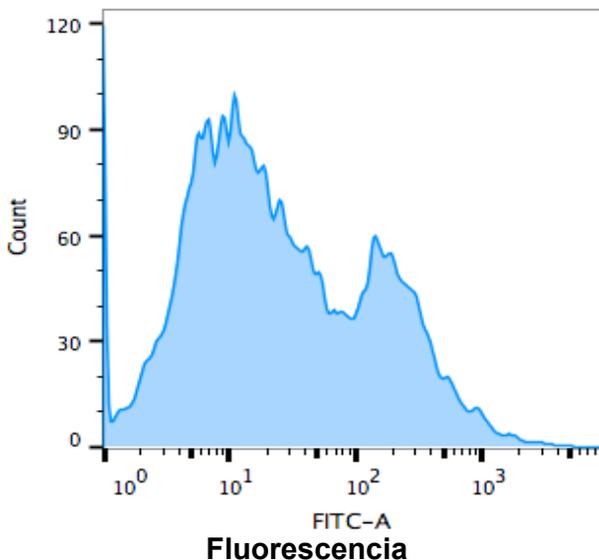


Imagen 21: La grafica muestra la fluorescencia de los liposomas con PI e IL-2 al usar el anticuerpo anti-IL-2 conjugado a FITC. La imagen indica el desplazamiento comparado al control negativo y determina la presencia de IL-2 en la superficie de las nanopartículas.

Imagen 22: Análisis de los Liposomas con fosfatidilinositol e IL-2 por citometría de flujo.

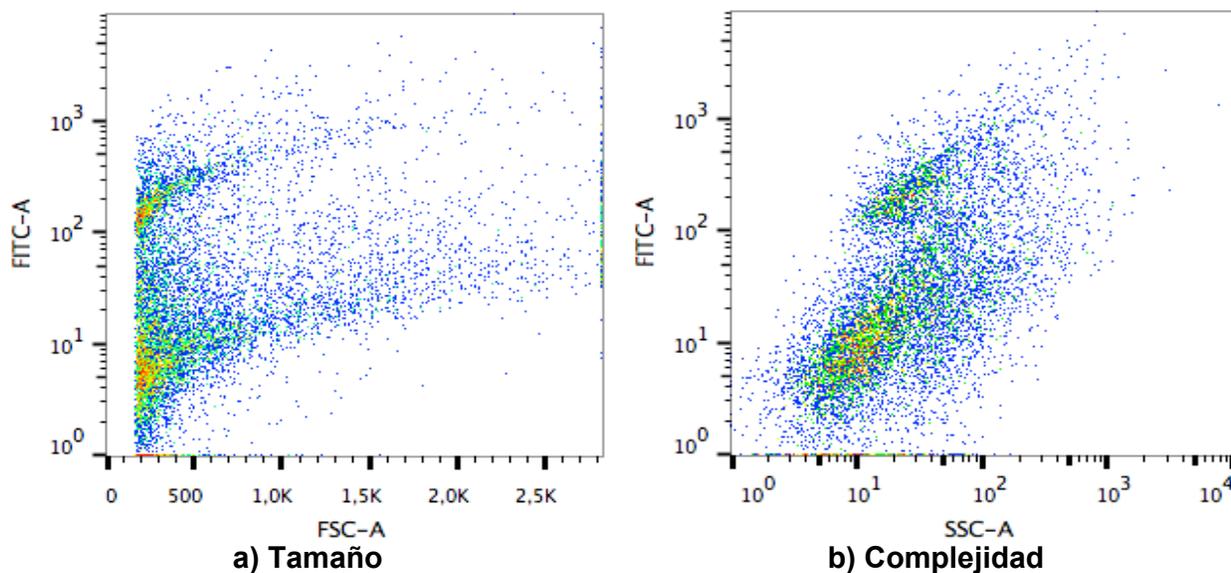


Imagen 22: La grafica representa la fluorescencia con respecto a) tamaño de la población y b) la complejidad de la misma. En las abscisas se observa el tamaño a) o rugosidad b) y las ordenadas la fluorescencia. Con respecto al tamaño dicha relación no existe, como muestra la gráfica a) hubo partículas de diversos tamaños que expresaban la misma cantidad de IL-2 en la superficie. No pasa lo mismo con la rugosidad b), los liposomas de mayor complejidad presentaron una mayor cantidad de IL-2 en la superficie. La IL-2 presente en la superficie de la nanopartícula no tiene relación con el tamaño liposomal, pero es directamente proporcional a la complejidad del sistema.

Imagen 23: Comparación del tamaño entre las nanopartículas que contienen fosfatidilinositol con y sin IL-2 por Citometría de flujo.

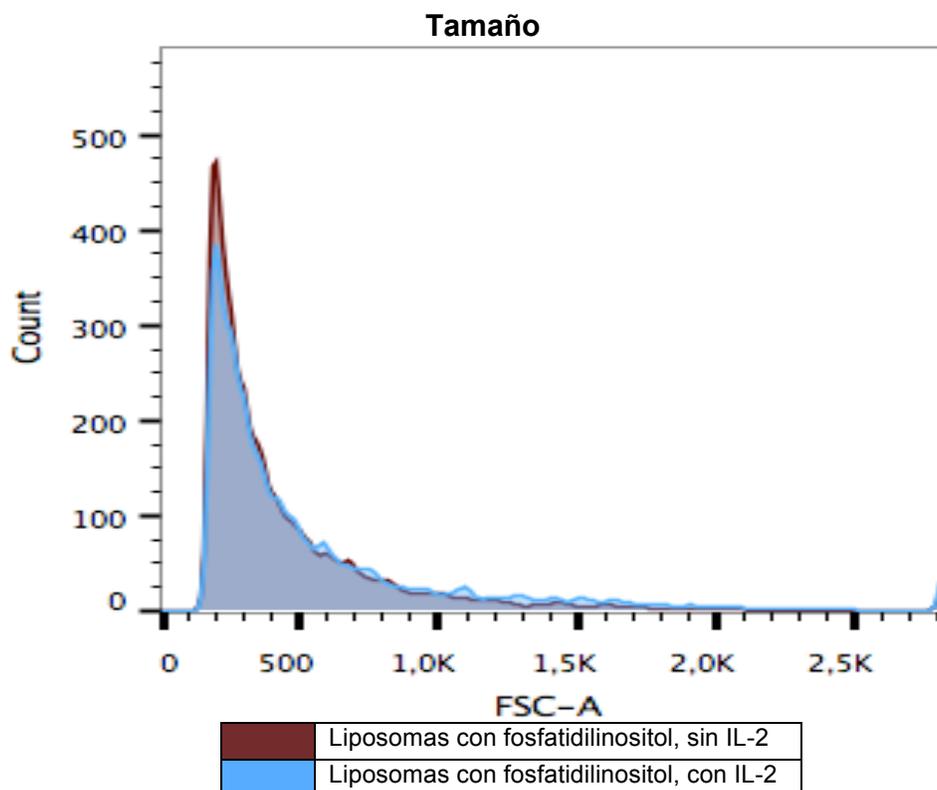


Imagen 23: Comparación en tamaño entre liposomas con fosfatidilinositol con y sin IL-2.

La grafica muestra que no existe una diferencia significativa del tamaño entre las nanopartículas que contienen IL-2 y las nanopartículas que no contienen esta citocina. Confirmando los resultados que se obtuvieron por microscopía electrónica de transmisión, donde se observó una población de liposomas ligeramente más pequeña, la cual no contiene IL-2 con respecto a la que si contiene esta pequeña proteína.

Imagen 24: Comparación de la complejidad entre las nanopartículas que contienen fosfatidilinositol con y sin IL-2 por Citometría de flujo.

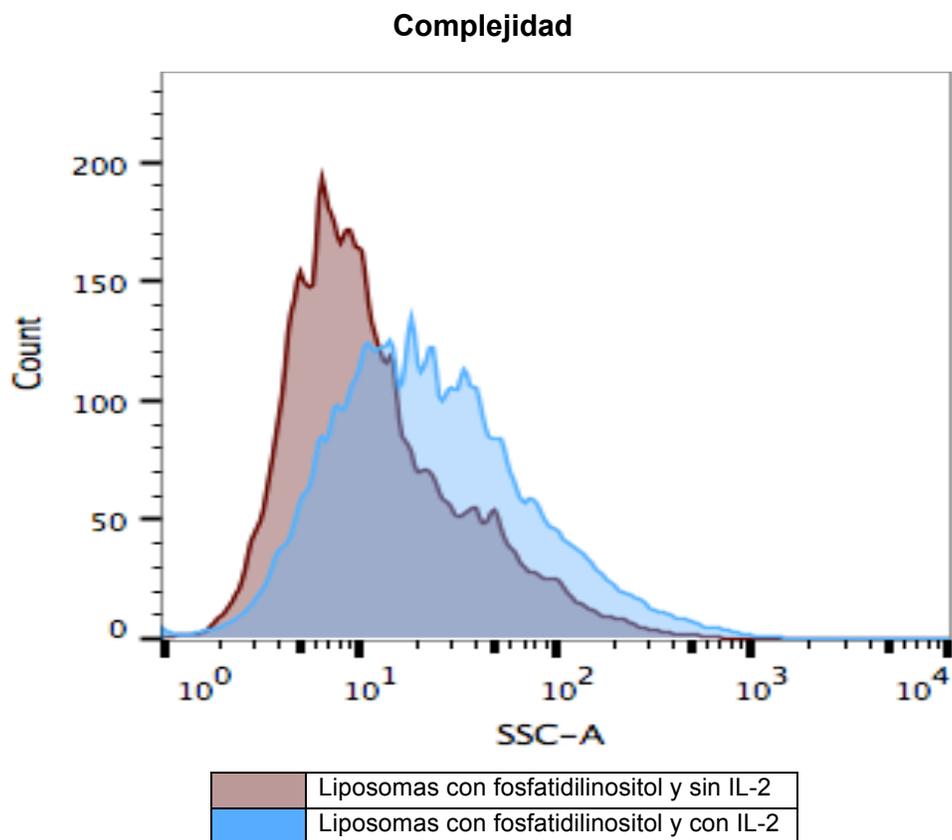


Imagen 24: Comparación de la granularidad entre LIIPPIVAC y LIPPIIL-2.

La imagen muestra las dos diferentes nanopartículas, con respecto a su complejidad, se observó una diferencia significativa en la rugosidad del sistema que acarrea IL-2 con respecto a la partícula que carece de esta citocina.

Imagen 25: Comparación de la fluorescencia entre las nanopartículas con fosfatidilinositol, con y sin IL-2.

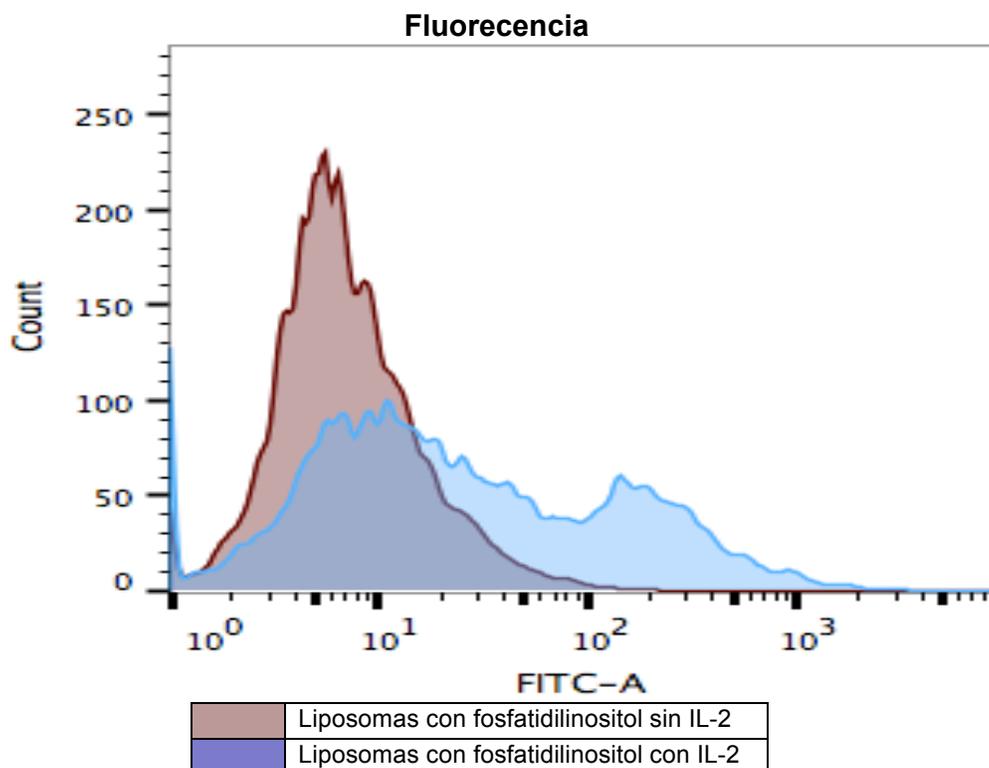


Imagen 25: Liposomas llenos y vacíos sin anticuerpo conjugado a FITC.

La imagen muestra las dos diferentes nanopartículas. Con el fin de observar la fluorescencia propia del sistema. Se sometieron ambas nanopartículas a un estudio de fluorocitometría de flujo adicionando el anticuerpo acoplado a FITC. Obteniendo así la fluorescencia propia de cada nanopartícula. Se observa una fluorescencia basal (liposomas vacíos), la segunda nanopartícula presenta dos poblaciones una similar a la fluorescencia de los liposomas vacíos esto significa que esas nanopartículas solo contienen IL-2 encapsulada y no en la superficie. La otra población que presento mayor fluorescencia, representa los liposomas que expresan cierta concentración de IL-2 en la superficie.

Caracterización por ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA): Cuantificación de la IL-2 total contenida y/o expuesta en el sistema nanoacarreador que contiene PI.

Para poder calcular la concentración de IL-2 de todas las muestras procesadas fue necesario construir una curva estándar (Tablas 2-7 y 13-16) (Imagen 26 y 27), la cual se realizó con una solución patrón de rIL-2, al mismo tiempo que eran procesadas las muestras.

Una vez que se demostró la presencia de IL-2 en la superficie de las nanopartículas por citometría de flujo, se procedió a cuantificar la concentración de IL-2 total, expresada en la membrana liposomal y la encapsulada por la nanopartícula. Para calcular la IL-2 encapsulada en la partícula fue necesario lisar el liposoma lo que daba como resultado la IL-2 total (Tablas 9-11 y 20-22), a la vez que se cuantificaba la citocina expresada en la membrana (Tablas 6-8 y 17-19), al final del procedimiento se restó la concentración de IL-2 expresada en la superficie a los resultados obtenidos de las muestras lisadas, obteniendo así la concentración de IL-2 encapsulada (Tablas 12 y 23), en promedio la concentración de IL-2 encapsulada por el sistema fue de 33 UI/mL (Tablas 12-13 y 24-25). Mientras que la expresada en la superficie de la partícula fue de 22 UI/mL (Tablas 6-8 y 17-19). Dando un promedio de 55 UI/mL (Tablas 9-11 y 20-22) de la IL-2 total de sistema nanoacarreador. A pesar de que en el proceso de producción se adicionaba IL-2 para que al final los liposomas tuvieran una concentración de 100 UI/mL, estos solo presentaron la mitad de la concentración esperada, lo que implica que este sistema no logro encapsular completamente la IL-2 adicionada durante la fabricación y la restante se perdió durante el proceso de lavado por ultracentrifugación. Para que esto no suceda puede optimizarse el proceso de fabricación con el fin de lograr una concentración final de IL-2 de 100 UI/mL.

Curva estándar de diluciones patrón de rIL-2

Tabla 2. Lectura de absorbancias

Concentración ng/mL	ABS 450 nm			ABS 570 nm		
	0	0.058	0.062	0.056	0.043	0.047
2.5	0.077	0.075	0.069	0.056	0.055	0.049
5	0.081	0.081	0.084	0.049	0.05	0.052
10	0.098	0.105	0.118	0.044	0.051	0.064
20	0.144	0.144	0.154	0.044	0.043	0.054
40	0.241	0.243	0.236	0.045	0.047	0.042

Tabla 3. Resta de absorbancias 450nm-570nm

Concentración ng/mL	Corrección (ABS 450nm-570nm)			Media	S	CV
	0	0.015	0.015			
2.5	0.021	0.02	0.02	0.0203	0.00057	2.8394
5	0.032	0.031	0.032	0.0316	0.00057	1.8232
10	0.054	0.054	0.054	0.054	0	0
20	0.1	0.101	0.1	0.1003	0.00057	0.5754
40	0.196	0.196	0.194	0.1953	0.00115	0.5911

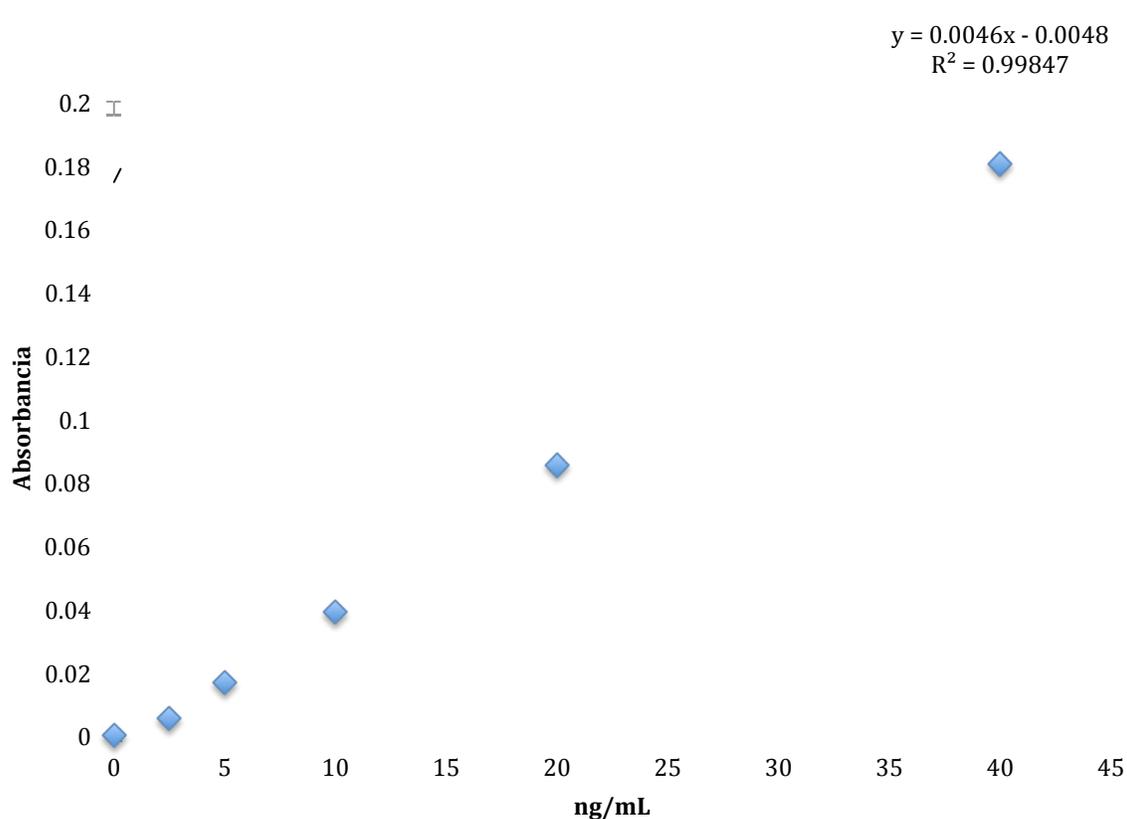
Tabla 4. Corrección de Absorbancia - Blanco

Concentración ng/mL	Corrección de ABS – Blanco (0.015)			Media
	2.5	0.006	0.005	
5	0.017	0.016	0.017	0.0166
10	0.039	0.039	0.039	0.039
20	0.085	0.086	0.085	0.0853
40	0.181	0.181	0.179	0.1803

Tabla 5. Valores finales y ecuación de la recta

Concentración ng/mL	ABS	Ecuación de la recta
0	0	y = 0.0046x - 0.0048 R ² = 0.99847
2.5	0.0053	
5	0.0166	
10	0.039	
20	0.0853	
40	0.1803	

Imagen 26. Gráfica de la curva estándar para la cuantificación de IL-2.



Curva estándar realizada para la cuantificación de IL-2 presente en el sistema nanoacarreador. En la tabla 2 se muestran las absorbancias obtenidas a 450 y 570nm de las diluciones patrón realizadas. La tabla 3 presenta el resultado de la resta de las absorbancias obtenidas a 450nm menos los resultados a 570nm. Este paso se realizó para eliminar posibles errores provocados por imperfecciones ópticas presentes en la placa. En la tabla 4 se observa la corrección del blanco, para finalmente obtener los resultados presentes en la tabla 5 y expuestos en la imagen 26. El método fue validado anteriormente, estableciendo que el coeficiente de determinación, $r^2 \geq 0.95$, por lo que los resultados obtenidos en esta curva estándar fueron aceptados y pudieron ser usados para la determinación de IL-2 presente en los liposomas estudiados.

Determinación de IL-2 en Liposomas

- IL-2 Expuesta

Tabla 6. Lecturas de absorbancia

IL-2 Expuesta				
Muestra	450 nm	570 nm	Corrección ABS (450nm -570nm)	ABS – Blanco (0.0015)
1	0.08	0.048	0.032	0.017
2	0.079	0.048	0.031	0.016
3	0.082	0.051	0.031	0.016

Tabla 7. Concentraciones de IL-2

Muestra	Concentración de la muestra ng/mL	Concentración total ng/mL	UI/mL
1	4.7582	9.5163	22.8391
2	4.5403	9.0805	21.7933
3	4.5403	9.0805	21.7933

Tabla 8. Datos estadísticos

Promedio	S	CV
22.1419	0.6038	2.7270

La tabla 6 muestra las absorbancias obtenidas a 450 y 570nm, además de los resultados obtenidos de la resta entre los mismos y finalmente la sustracción del blanco. Seguida esta la tabla 7 donde se presenta la concentración de la muestra, la concentración total (ya multiplicada por la dilución) y por último la conversión de la concentración total en unidades internacionales por mL (UI/mL). En el cuadro 8 se expresa el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados expuestos en la tabla 7. Estos resultados representan la concentración de IL-2 presente solo en la superficie de la membrana liposomal.

- **IL- 2 Total**

Tabla 9. Lecturas de absorbancia

Interleucina Total				
Muestra	450 nm	570 nm	Corrección ABS (450nm-570nm)	ABS - Blanco
1	0.114	0.05	0.064	0.049
2	0.12	0.058	0.062	0.047
3	0.115	0.052	0.063	0.048

Tabla 10. Concentraciones de IL-2

Muestra	Concentración de la muestra ng/mL	Concentración total ng/mL	UI/mL
1	11.7304	23.4608	56.3060
2	11.2946	22.5893	54.2143
3	11.5125	23.0251	55.2601

Tabla 11. Datos estadísticos

Promedio	S	CV
55.2601	1.0458	1.8926

La tabla 9 muestra las absorbancias obtenidas a 450 y 570nm, además de los resultados obtenidos de la resta entre los mismos y finalmente la sustracción del blanco. Seguido está el cuadro 10 donde se presenta la concentración de la muestra, la concentración total (ya multiplicada por la dilución) y por último la conversión de la concentración total en unidades internacionales por mL (UI/mL). En la tabla 11 se expresa el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados expuestos en el cuadro 10. Estos resultados representan la concentración de IL-2 total del sistema nanoacarreador.

- **IL-2 Encapsulada**

Tabla 12. Concentración de IL-2 encapsulada

Muestra	IL-2 Total UI/mL	IL-2 Expuesta UI/mL	Resta (IL-2 Total – IL-2 Expuesta) IL-2 Encapsulada UI/mL
1	56.3060	22.8391	33.4669
2	54.2143	21.7933	32.421
3	55.2601	21.7933	33.4668

Tabla 13. Datos estadísticos

Promedio	S	CV
33.1177	0.6033	1.8218

En la tabla 12 se presentan los resultados de IL-2 total y expresada en la membrana en unidades internacionales para poder obtener la cantidad de IL- 2 encapsulada en el sistema.

En la tabla 13 se expresa el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados expuestos en el cuadro 12.

Curva estándar de diluciones patrón de rIL-2

Tabla 14. Lectura de absorbancias

26/03/15						
Concentración ng/mL	ABS 450 nm			ABS 570 nm		
0	0.049	0.048	0.047	0.041	0.04	0.039
2.5	0.07	0.066	0.068	0.049	0.044	0.046
5	0.076	0.081	0.074	0.043	0.048	0.041
10	0.083	0.086	0.085	0.043	0.046	0.045
20	0.16	0.16	0.163	0.046	0.046	0.045
40	0.23	0.234	0.233	0.044	0.048	0.046

Tabla 15. Resta de absorbancias 450nm-570nm

Concentración ng/mL	Corrección (ABS 450nm-570nm)			Media	S	CV
0	0.008	0.008	0.008	0.008	0	0
2.5	0.021	0.022	0.022	0.0216	0.0006	2.6647
5	0.033	0.033	0.033	0.033	0	0
10	0.04	0.04	0.04	0.04	0	0
20	0.114	0.114	0.118	0.1153	0.0023	2.0024
40	0.186	0.186	0.187	0.1863	0.0006	0.3098

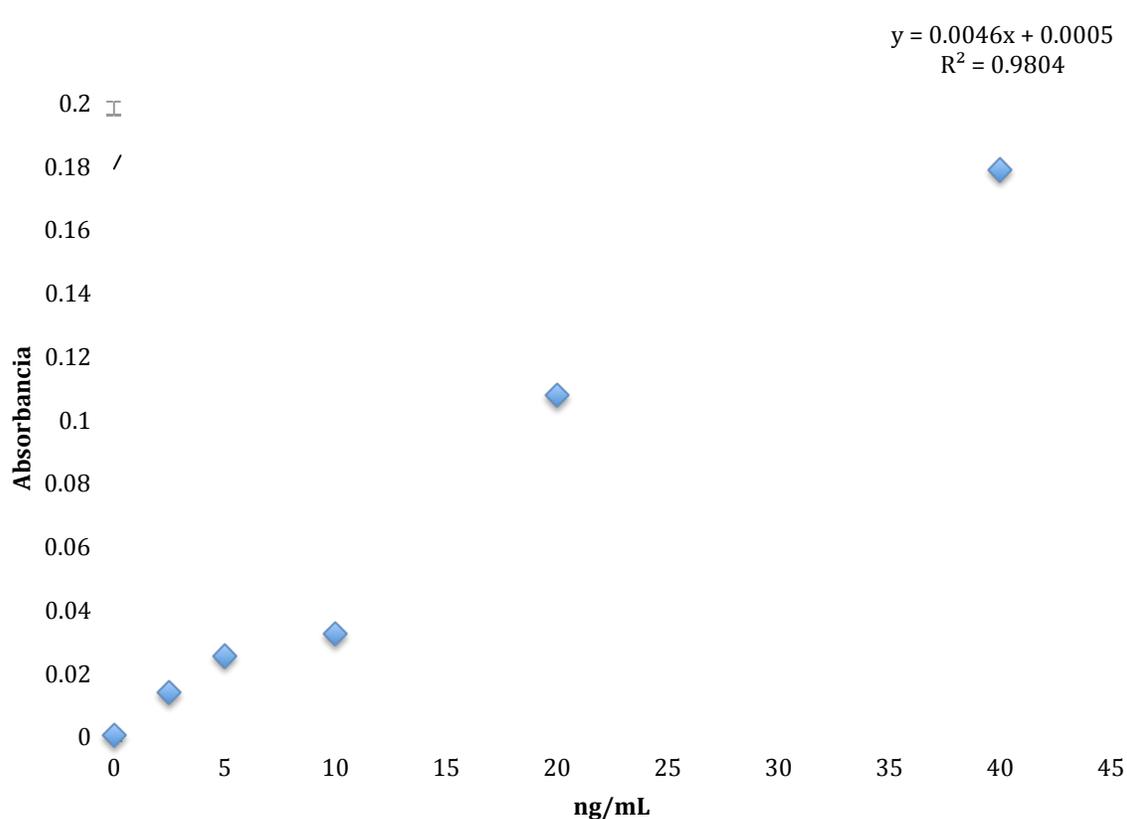
Tabla 16. Corrección de Absorbancia - Blanco

Concentración ng/mL	Corrección de ABS – Blanco (0.008)			Media
2.5	0.014	0.014	0.0136	0.014
5	0.025	0.025	0.025	0.025
10	0.032	0.032	0.032	0.032
20	0.106	0.11	0.1073	0.106
40	0.178	0.179	0.1783	0.178

Tabla 17. Valores finales y ecuación de la recta

Concentración ng/mL	ABS	Ecuación de la recta
0	0	$y = 0.0046x + 0.0005$ $R^2 = 0.9804$
2.5	0.014	
5	0.025	
10	0.032	
20	0.106	
40	0.178	

Imagen 27. Grafica de la curva estándar para la cuantificación de IL-2.



Curva estándar realizada para la cuantificación de IL-2 presente en el sistema nanoacarreador. En la tabla 14 se muestran las absorbancias obtenidas a 450 y 570nm de las diluciones patrón realizadas. La tabla 15 presenta el resultado de la resta de las absorbancias obtenidas a 450nm menos los resultados a 570nm. Este paso se realizó para eliminar posibles errores provocados por imperfecciones ópticas presentes en la placa. En la tabla 16 se observa la corrección del blanco, para finalmente obtener los resultados presentes en la tabla 17 y expuestos en la imagen 27. El método fue validado anteriormente, estableciendo que el coeficiente de determinación, $r^2 \geq 0.95$, por lo que los resultados obtenidos en esta curva estándar fueron aceptados y pudieron ser usados para la determinación de IL-2 presente en los liposomas estudiados.

Determinación de IL-2 en Liposomas

- IL-2 Expuesta

Tabla 18. Lecturas de absorbancia

IL-2 Expuesta				
Muestra	450 nm	570 nm	Corrección ABS (450nm -570nm)	ABS – Blanco (0.0015)
1	0.075	0.046	0.029	0.021
2	0.076	0.048	0.028	0.02
3	0.077	0.048	0.029	0.021

Tabla 19. Concentraciones de IL-2

Muestra	Concentración de la muestra ng/mL	Concentración total ng/mL	UI/mL
1	4.5026	9.0052	21.6124
2	4.2834	8.5668	20.5603
3	4.5026	9.0052	21.6124

Tabla 20. Datos estadísticos

Promedio	S	CV
21.2617	0.6074	2.8568

La tabla 18 muestra las absorbancias obtenidas a 450 y 570nm, además de los resultados obtenidos de la resta entre los mismos y finalmente la sustracción del blanco. Seguida esta la tabla 19 donde se presenta la concentración de la muestra, la concentración total (ya multiplicada por la dilución) y por último la conversión de la concentración total en unidades internacionales por mL (UI/mL). En el cuadro 20 se expresa el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados expuestos en la tabla 19. Estos resultados representan la concentración de IL-2 presente solo en la superficie de la membrana liposomal.

- **IL-2 Total**

Tabla 21. Lecturas de absorbancia

Interleucina Total				
Muestra	450 nm	570 nm	Corrección ABS (450nm-570nm)	ABS - Blanco
1	0.106	0.046	0.06	0.052
2	0.107	0.048	0.059	0.051
3	0.108	0.049	0.059	0.051

Tabla 22. Concentraciones de IL-2

Muestra	Concentración de la muestra ng/mL	Concentración total ng/mL	UI/mL
1	11.2972	22.5943	54.2264
2	11.0780	22.1560	53.1743
3	11.0780	22.1560	53.1743

Tabla 23. Datos estadísticos

Promedio	S	CV
53.5250	0.6074	1.1348

La tabla 21 muestra las absorbancias obtenidas a 450 y 570nm, además de los resultados obtenidos de la resta entre los mismos y finalmente la sustracción del blanco. Seguido está el cuadro 22 donde se presenta la concentración de la muestra, la concentración total (ya multiplicada por la dilución) y por último la conversión de la concentración total en unidades internacionales por mL (UI/mL). En la tabla 23 se expresa el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados expuestos en el cuadro 22. Estos resultados representan la concentración de IL-2 total del sistema nanoacarreador.

Tabla 24. Concentración de IL-2 encapsulada

Muestra	IL-2 Total UI/mL	IL-2 Expuesta UI/mL	Resta (IL-2 Total – IL-2 Expuesta) IL-2 Encapsulada UI/mL
1	54.2264	21.6124	32.614
2	53.1743	20.5603	32.614
3	53.1743	21.6124	31.5619

Tabla 25. Datos estadísticos

Promedio	S	CV
32.2633	0.6074	1.8827

En la tabla 24 se presentan los resultados de IL-2 total y expresada en la membrana en unidades internacionales para poder obtener la cantidad de IL- 2 encapsulada en el sistema.

En la tabla 25 se expresa el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados expuestos en el cuadro 24.

Ensayos *in vitro*: Interacción de los Liposomas que contienen fosfatidilinositol con y sin IL-2, con las líneas celulares B16F0 e INBL.

Con el propósito de determinar la influencia que tienen algunos componentes de la formulación de los nanoacarreadores lipídicos con respecto al crecimiento de las líneas celulares de interés; se realizaron cultivos celulares y fueron estimulados con la formulación fabricada y con algunos de sus componentes individualmente (Tablas 26-31) (Imagen 27-28), comparando con un control negativo, este control muestra el crecimiento de las líneas celulares sin ningún tipo de estímulo y fue usado como referencia para los demás cultivos que tuvieron algún tipo de estímulo. Al comparar la proliferación de cultivos celulares de las líneas INBL y B16F0 que fueron estimulados con IL-2 libre, con los controles negativos respectivos; se observa un crecimiento considerable, esto dejó en evidencia que ambas líneas celulares tienen receptores para IL-2 y que la IL-2 es un activador de la proliferación celular (mitógeno). La línea celular B16F0 mostró una sensibilidad mayor a este componente debido a que se aprecia tanto gráfica como visualmente (Tabla 31, Imagen 28) un crecimiento mayor que el de la línea INBL con el mismo estímulo. Por otro lado, con el estímulo de PI libre, también se observó un crecimiento remarcado comparado con el control negativo y de igual manera B16F0 tuvo mayor sensibilidad a este componente habiendo un crecimiento mayor en esta línea celular que en INBL, al ver que PI libre provocó un crecimiento positivo en ambas líneas celulares se puede decir que ambas líneas celulares tienen receptores o componentes asociados a la activación por PI. Con estos resultados podemos suponer que la nueva formulación de nanoacarreadores lipídicos cuenta con dos componentes importantes para ser dirigidos a tejidos específicos y que puedan interactuar entre sí.

Al estimular ambas líneas celulares con nanopartículas con PI sin IL-2 (LIPPIVAC), el comportamiento fue diferente a lo obtenido con los componentes por separado. Para la línea celular INBL, tuvo un efecto positivo similar a IL-2 o PI libre, mientras que para la línea B16F0, a pesar de que fue positivo (comparado con el blanco), esta no presentó la misma sensibilidad que cuando se usó IL-2 o PI libre, esto significa que esta nueva formulación no influye demasiado en el crecimiento celular; sin embargo podría ser usada para otros tipos de tratamientos dirigidos (terapia génica por ejemplo). Sería interesante hacer estudios con otras líneas celulares provenientes de diferentes tipos de cáncer. El crecimiento positivo de la línea celular INBL observado al ser estimulada con LIPPIVAC pudo haber sido por el PI incluido en la formulación, como ya se mencionó, con estos resultados podemos ver el potencial de esta nueva formulación en diversos tratamientos dirigidos además del cáncer. Finalmente se estimularon los cultivos celulares con la formulación final enfocada al tratamiento de cáncer que fueron nanoacarreadores que contenían PI e IL-2 (LIPPIIL-2) y con esto se procedió a observar el comportamiento de ambas líneas celulares. Para ambos casos el crecimiento de los cultivos fue menor al control negativo, esto quiere decir que la formulación completa logra inhibir el crecimiento celular de ambas líneas, a pesar de que estos resultados son prometedores existe un factor a considerar que es la concentración incluida en el sistema. Como se demostró en los ensayos de ELISA esta formulación no logró encapsular la concentración de IL-2 deseada, por lo que sería útil modificar la orden de producción para lograr la concentración de IL-2 deseada y estudiar nuevamente el comportamiento de las líneas celulares para finalmente compararlos con los resultados aquí expuestos y así considerar esta nueva formulación como un posible tratamiento para el CaCU o melanoma.

Ensayo *in vitro*. Línea celular INBL

Tabla 26. Cinética de proliferación de la línea celular INBL

INBL					
Horas	ABSORBANCIA				
	Blanco	IL-2 Libre	PI Libre	LIPPI VAC	LIPPI- IL-2
24 Horas	0.059	0.065	0.062	0.063	0.058
	0.066	0.072	0.067	0.068	0.059
	0.071	0.066	0.066	0.067	0.060
Promedio	0.065	0.068	0.065	0.066	0.059
SD	0.006	0.004	0.003	0.003	0.001
CV	9.226	5.595	4.070	4.009	1.695
72 Horas	0.073	0.083	0.079	0.075	0.072
	0.068	0.071	0.075	0.076	0.069
	0.073	0.072	0.073	0.081	0.074
Promedio	0.071	0.075	0.076	0.077	0.072
SD	0.003	0.007	0.003	0.003	0.003
CV	4.047	8.838	4.038	4.157	3.512
120 Horas	0.063	0.061	0.060	0.073	0.058
	0.064	0.061	0.062	0.067	0.061
	0.055	0.061	0.066	0.068	0.058
Promedio	0.061	0.061	0.063	0.069	0.059
SD	0.005	0.000	0.003	0.003	0.002
CV	8.131	0.000	4.875	4.636	2.936

El cuadro 26 presenta las absorbancias obtenidas a 450nm, los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación para cada estímulo y tiempo a los que fue sometida la línea celular INBL.

Tabla 27. Promedios de la cinética de proliferación de la línea celular INBL

INBL					
Horas	Blanco	IL-2 Libre	PI Libre	LIPPI VAC	LIPPI- IL-2
24	0.065	0.067	0.065	0.066	0.059
72	0.071	0.075	0.076	0.077	0.072
120	0.063	0.061	0.060	0.073	0.058

En la tabla 27 se resumen los promedios de las absorbancias obtenidas a 450nm para ser expuestos en la imagen 27.

Imagen 27. Cinética de proliferación de la línea celular INBL



CARACTERIZACIÓN DE NANOACARREADORES LIPÍDICOS QUE CONTIENEN FOSFATIDILINOSITO L PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

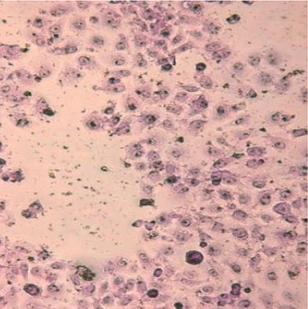
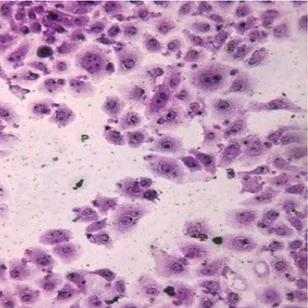
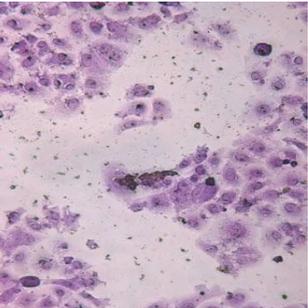
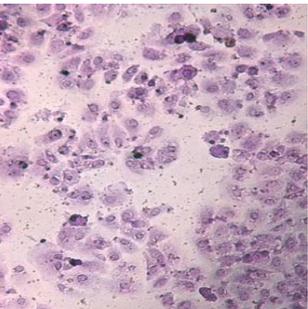
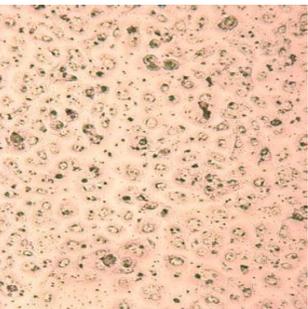
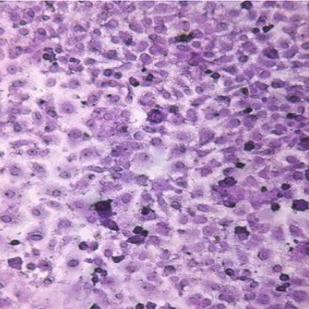
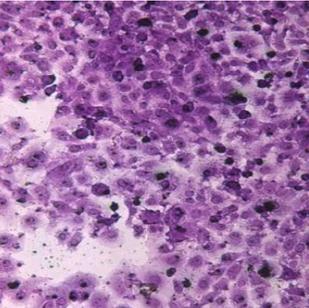
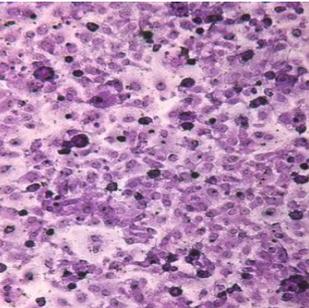
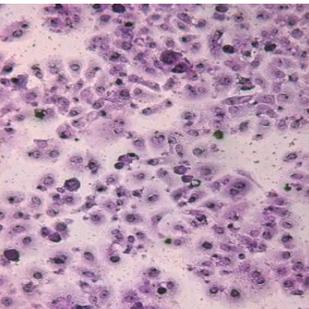
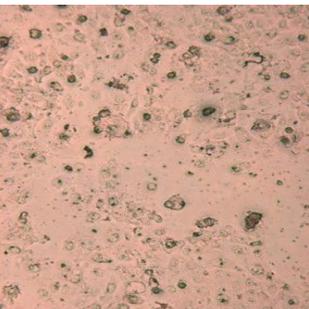
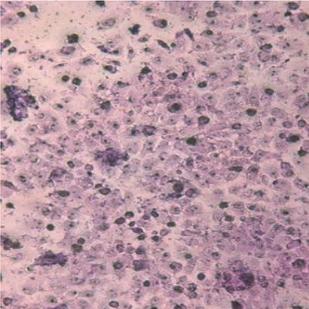
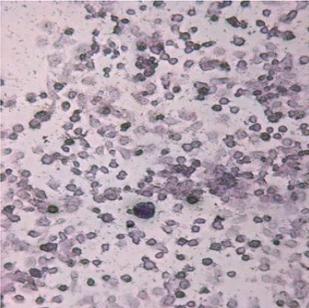
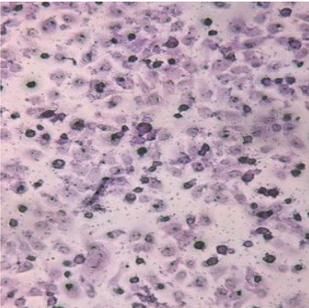
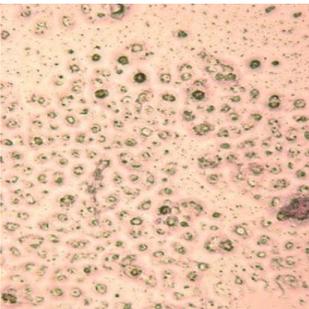
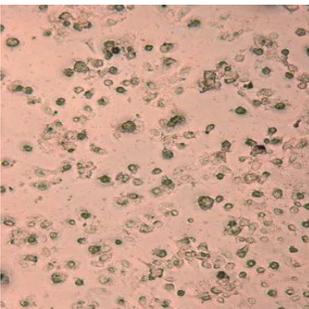
Horas	INBL				
	Blanco	IL-2 libre	Fosfatidilinositol libre	LIPVAC	LIPIL-2
24					
72					
120					

Tabla 28. Cinética de proliferación de la línea celular INBL.

Ensayo *in vitro*. Línea celular B16F0

Tabla 29. Cinética de proliferación de la línea celular B16F0

Cinética Realizada 05/09/2014					
B16F0					
Horas	ABSORBANCIA				
	Blanco	IL-2 Libre	PI Libre	LIPPI VAC	LIPPI- IL-2
24 Horas	0.064	0.081	0.085	0.057	0.059
	0.064	0.092	0.087	0.073	0.059
	0.077	0.075	0.085	0.072	0.065
Promedio	0.068	0.083	0.086	0.067	0.061
SD	0.008	0.009	0.001	0.009	0.003
CV	10.984	10.429	1.348	13.311	5.679
72 Horas	0.086	0.128	0.105	0.081	0.062
	0.068	0.120	0.108	0.093	0.063
	0.081	0.122	0.124	0.104	0.083
Promedio	0.078	0.123	0.112	0.093	0.069
SD	0.009	0.004	0.010	0.012	0.012
CV	11.862	3.376	9.093	12.414	17.086
120 Horas	0.079	0.084	0.071	0.090	0.073
	0.077	0.051	0.077	0.086	0.068
	0.088	0.108	0.080	0.092	0.070
Promedio	0.081	0.081	0.076	0.089	0.070
SD	0.006	0.029	0.005	0.003	0.003
CV	7.204	35.331	6.030	3.420	3.578

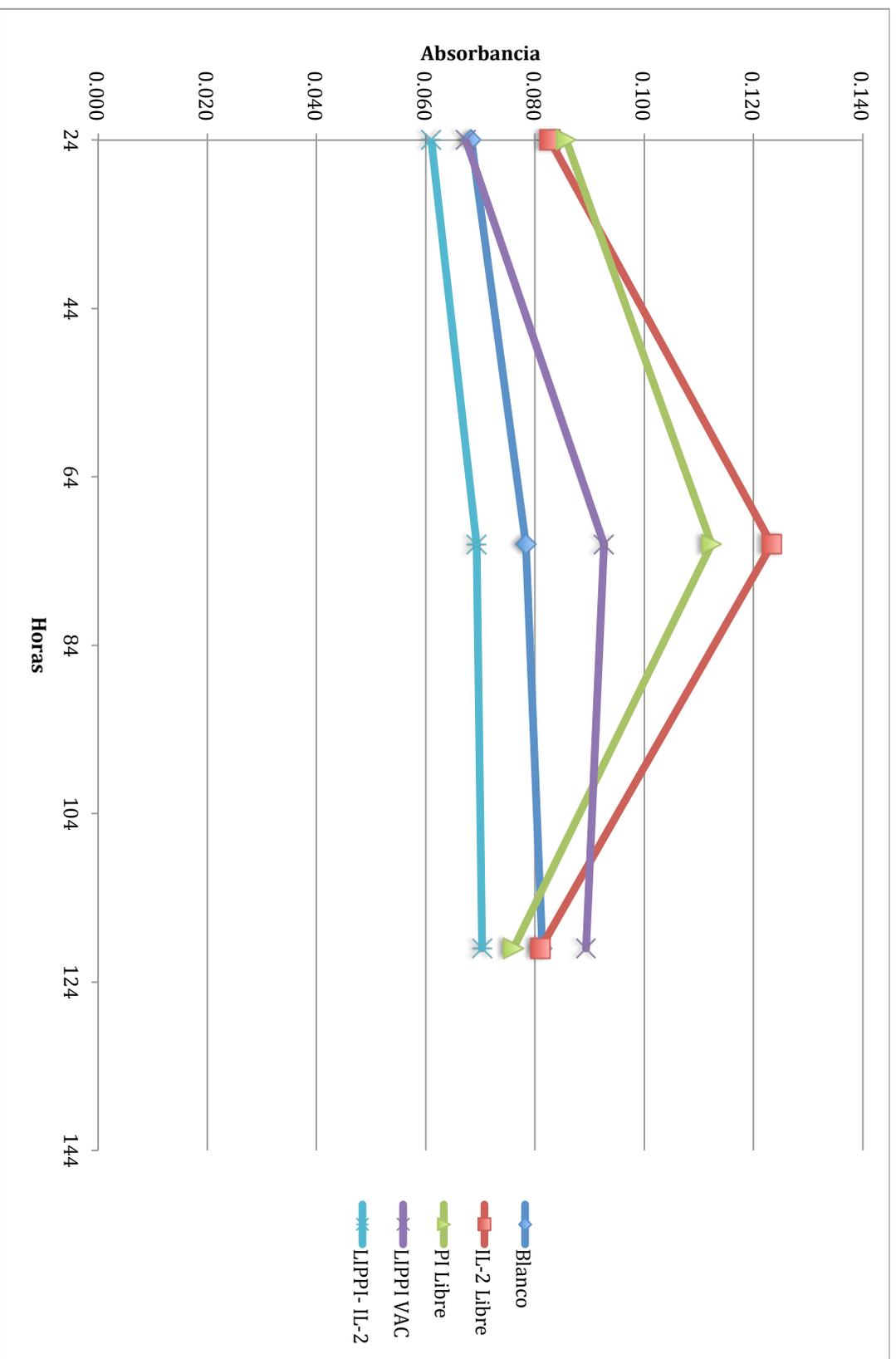
El cuadro 29 presenta las absorbancias obtenidas a 450nm, los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación para cada estímulo y tiempo a los que fue sometida la línea celular B16F0.

Tabla 30. Promedios de la cinética de proliferación de la línea celular B16F0

B16F0					
Horas	Blanco	IL-2 Libre	PI Libre	LIPPI VAC	LIPPI- IL-2
24	0.068	0.083	0.086	0.067	0.061
72	0.078	0.123	0.112	0.093	0.069
120	0.081	0.081	0.076	0.089	0.070

En la tabla 30 se resumen los promedios de las absorbancias obtenidas a 450nm para ser expuestos en la imagen 28.

Imagen 28. Cinética de proliferación de la línea celular B16F0



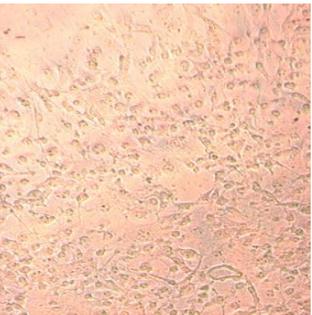
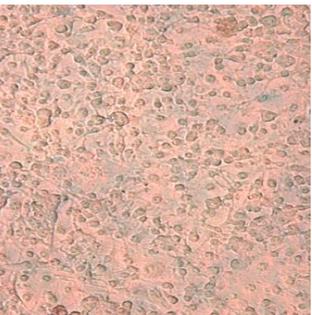
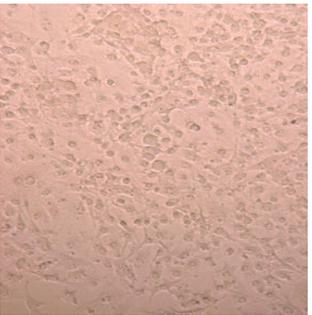
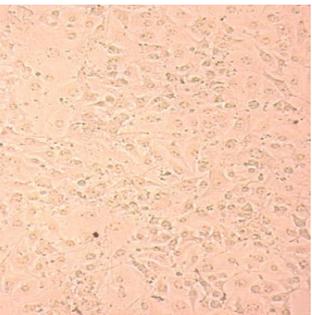
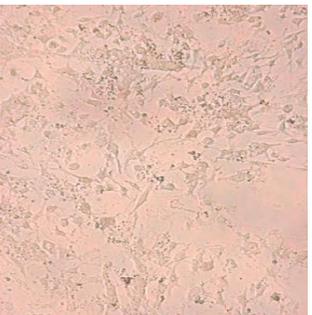
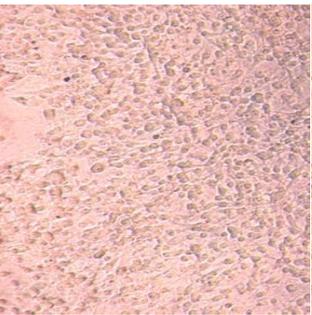
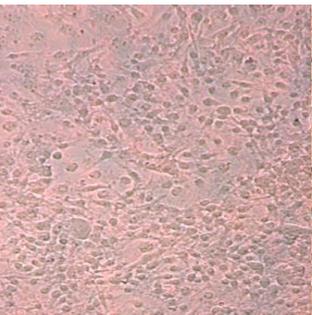
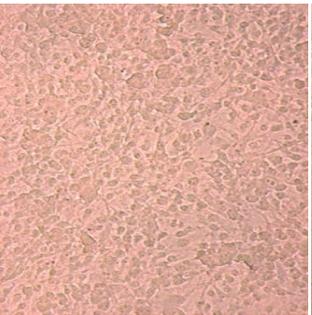
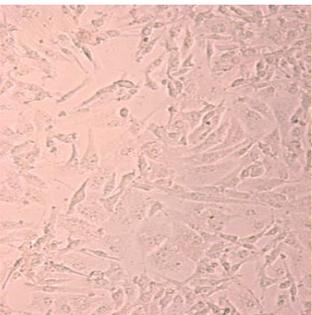
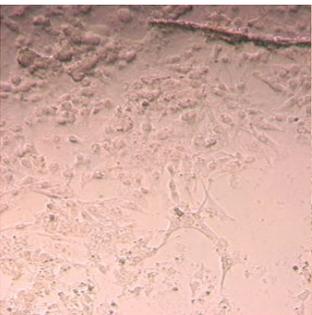
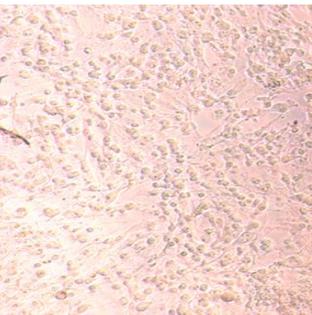
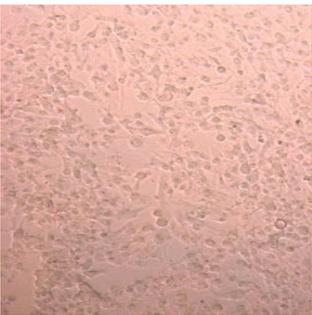
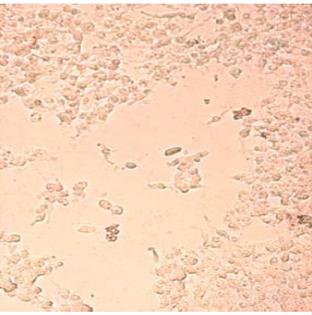
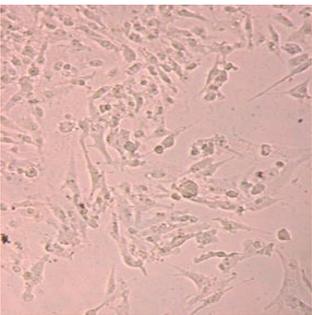
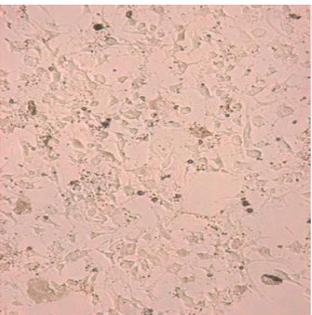
	B16F0				
Horas	Blanco	IL-2 libre	Fosfatidilinositol libre	LPIVAC	LPIIL-2
24					
72					
120					

Tabla 31. Cinética de proliferación de la línea celular B16F0.

Ensayos *in vivo*: LIPPIVAC y LIPPIIL-2 usados como tratamiento tópico en ratones nude (nu/nu) inoculados vía subdérmica con las líneas celulares B16F0 e INBL.

Los ensayos *in vivo* se realizaron con varias finalidades. Con anterioridad, el grupo de trabajo, ha utilizado diversas vías de inoculación y otras cepas de ratón, como C57BL/6 o CBA para la inoculación de B16F0 e INBL respectivamente. La primera cepa se utiliza por que la línea celular inoculada es un modelo autólogo de la cepa, es decir esa línea celular proviene de esa cepa de ratón por lo que su uso tiene ventajas ya que no es necesario inmunodeprimir al ratón para que la línea celular desarrolle tumores; por su parte, la cepa CBA se ha utilizado como modelo de cáncer cérvico-uterino, donde es necesario seguir un protocolo de inmunodepresión para lograr el desarrollo de tumores causados por el crecimiento de la línea celular. Con el objeto de tener una nueva cepa y otra vía de inoculación como herramientas para los estudios que se realizan en el laboratorio, se seleccionó la cepa nude debido a que tiene muchas ventajas. Es un modelo de ratón inmunodeprimido por lo que no es necesario seguir protocolos de inmunodepresión durante un ensayo *in vivo*, otra ventaja es que esta cepa no tiene pelaje por lo que al inocular la línea celular B16F0 vía subdérmica el melanoma sería visible y fácil de ser tratado por vía tópica.

Por lo anterior, en estos ensayos se determinó si las líneas celulares lograban desarrollarse en esta cepa de ratón y se probó una vía de inoculación y tratamiento diferente, además de no necesitar seguir un protocolo de inmunodepresión.

La línea celular B16F0 se logró desarrollar en un modelo no autólogo (cepa nude) e inoculada vía subdérmica; por lo que parece ser una buena opción para evaluar diversos tratamientos. La línea celular INBL no logro desarrollarse satisfactoriamente, aunque sí lograron obtenerse tumores del mismo tamaño que se han observado con otros modelos de animales, no se logró tener un número significativo de tumores comparado con los obtenidos con la B16F0 donde se observan masas tumorales en la mayoría de los

animales utilizados además de un volumen considerablemente mayor. El hecho de que la línea celular INBL no creció como era esperado pudo deberse a varios factores: creemos que la principal fue la vía de inoculación, posiblemente las células no se encontraban en un ambiente idóneo para su desarrollo por lo tanto no proliferaron; otro motivo probable fue el número de células utilizadas pues para los ensayos *in vivo* de esta línea celular es necesario inocular un gran número de células para obtener tumores al final del protocolo, y si agregamos el posible ambiente hostil, el resultado fue una escasa aparición de tumores durante el protocolo. Con respecto a la línea celular B16F0, como ya se mencionó se desarrolló más que satisfactoriamente, lo que indica que cepa nude y la vía de inoculación fueron buenas; sin embargo, debe tenerse en cuenta que los resultados obtenidos revelan que la línea celular B16F0 es muy agresiva por lo que sería bueno reducir el número de células a inocular así como iniciar el tratamiento antes de lo sugerido en los protocolos.

Los resultados obtenidos serán de utilidad para ensayos futuros y así mejorar este modelo alternativo para poder ser utilizado cotidianamente dentro de nuestro grupo de trabajo.

En cuanto a la interacción de la nueva formulación con las células tumorales en un modelo *in vivo* (Tablas 32-37), los datos obtenidos con la línea celular INBL muestran que los tumores no se desarrollaron satisfactoriamente y solo se presentaron tres masas tumorales en tres grupos diferentes (control positivo, PI libre y LIPPIVAC) de seis en total, lo que es importante mencionar es que el tumor de mayor masa fue el encontrado en el grupo PI libre, seguido del que se encontraba en el grupo LIPPIVAC, lo cual podría tener una relación con los resultados encontrados en los ensayos *in vitro*.

La interacción que se observa de los liposomas con la línea celular B16F0 en el modelo *in vivo* (Tablas 38-43) no es muy clara, esto puede deberse a que la vía de administración fue tópica y no aplicada directamente a la masa tumoral, sin embargo dos ratones de

diferentes grupos (LIPPVAC y LIPPIIL-2, ratón 3 y 2 respectivamente) mostraron una reducción de la masa tumoral, esto confirma lo ya expuesto en los ensayos *in vitro* donde se observa un crecimiento inhibido para esta línea celular con ambos tratamientos (más marcado con LIPPIIL-2), además se tiene que tomar en cuenta que los nanoacarreadores no contenían la concentración de IL-2 deseada y esto pudo influir en la ausencia de resultados contundentes. (Como ya se mencionó), optimizando la producción de nanoacarreadores lipídicos usados en este trabajo, se lograría obtener partículas con la concentración de IL-2 deseada y posiblemente se obtendrían resultados que podrían ser comparados con los de otros modelos experimentales realizados con nanopartículas sin PI.

Ensayo *in vivo*. Línea celular INBL

Tabla 32. Grupo 1: Ambiental (control negativo)

Línea celular INBL						
Grupo 1: Ambiental (control negativo)						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	26.97	27	No	-	-	
R2	25.16	24	No	-	-	
R3	32.62	-	No	-	-	Murió durante el protocolo. Presentaba inflamación en un costado, posible tumor autólogo



Tabla 33. Grupo 2: Control positivo

Línea celular INBL						
Grupo 2: Control positivo						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	21.4	21.7	Si	0.2	0.1	Tumor en pata derecha trasera
R2	27.3	-	-	-	-	Murió durante el protocolo
R3	31.3	30	No	-	-	



Tabla 34. Grupo 3: PI libre + gel

Línea celular INBL						
Grupo 3: PI libre + gel						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	25.64	26.8	No	-	-	
R2	33.17	32.3	No	-	-	
R3	27.36	28.1	Si	0.4	0.4	Tumor en la base de la cola



Tabla 35. Grupo 4: IL-2 libre + gel

Línea celular INBL						
Grupo 4: IL-2 libre + gel						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	23.78	23	No	-	-	
R2	26.39	25.8	No	-	-	
R3	29.95	29.6	No	-	-	



Tabla 36. Grupo 5: LIPPIVAC + gel

Línea celular INBL						
Grupo 5: LIPPIVAC + gel						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	32.7	31.5	Si	0.3	0.3	Tumor en pata trasera derecha
R2	30.41	31.7	No	-	-	
R3	27.26	27.2	No	-	-	



Tabla 37. Grupo 6: LIPPI IL-2 + gel

Línea celular INBL						
Grupo 6: LIPPI IL-2 + gel						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	31.75	-	-	-	-	Murió durante el protocolo
R2	31.8	31.1	No	-	-	
R3	27.91	27.1	No	-	-	



Tablas 32 – 37. Muestran los resultados obtenidos de los ensayos realizados *in vivo* en ratones cepa nude (nu/nu), al ser inoculados con la línea celular INBL y tratados con las dos diferentes nanopartículas usadas en este estudio.

Además de observar por separado la influencia de cada uno de los componentes de las nanopartículas sobre los tumores de ambas líneas celulares.

Ensayo *in vivo*. Línea celular B16F0

Tabla 38. Grupo 1: Ambiental (control negativo)

Línea celular B16F0						
Grupo 1: Ambiental (control negativo)						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo	Ancho	
R1	14.96	23	No	-	-	
R2	18.61	29.2	No	-	-	
R3	17.54	25.3	No	-	-	



Tabla 39. Grupo 2: Control positivo

Línea celular B16F0						
Grupo 2: Control positivo						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	16.7	-	-	-	-	Murió un día antes del sacrificio
R2	19.46	34.1	Si	3	2.7	Tumor en pata trasera derecha
R3	18.44	28.5	Si	0.6	0.5	Tumor en la base de la cola



Tabla 40. Grupo 3: PI libre + gel

Línea celular B16F0						
Grupo 3: PI libre + gel						
ID Ratón	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	16.42	26.5	Si	3.1	2.1	Tumor en pata trasera derecha
R2	17.78	28.1	Si	2.1	1.4	Tumor en la base de la cola
R3	19.36	41.5	Si	0.6	0.5	Tumor en la base de la cola
				3.1	2	Tumor presente entre los órganos



Tabla 41. Grupo 4: IL-2 libre + gel

Línea celular B16F0						
Grupo 4: IL-2 libre + gel						
ID Raton	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	17.8	27.1	Si	0.6	0.4	Tumor en el lomo
R2	16.81	27	Si	1.8	1.1	Tumor en el lomo
R3	17.32	29.7	Si	2.2	1.6	Tumor en el lomo

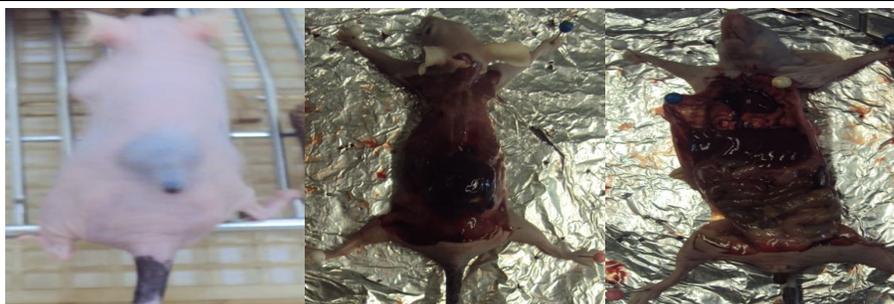


Tabla 42. Grupo 5: LIPPIVAC + gel

Línea celular B16F0						
Grupo 5: LIPPIVAC + gel						
ID Raton	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	17.64	25.8	Si	1.4	0.9	Tumor en el lomo
R2	16.89	25.8	Si	1.3	1.1	Tumor en el lomo
R3	16.17	23	Si	1.1	0.9	Tumor en el lomo. Reducción de la masa tumoral durante el tratamiento.



Tabla 43. Grupo 6: LIPPI IL-2 + gel

Línea celular B16F0						
Grupo 6: LIPPI IL-2 + gel						
ID Raton	Peso Inicial g	Peso Final g	Presencia de tumores	Tamaño		Observaciones
				Largo (cm)	Ancho (cm)	
R1	16.7	30.4	Si	2.2	1.5	Tumor en el lomo
R2	17.34	27	Si	2.0	1.2	Tumor en el lomo. Reducción de la masa tumoral durante el tratamiento.
R3	16.32	29	Si	0.9	0.5	Tumor en el lomo



Tablas 38 – 43. Muestran los resultados obtenidos de los ensayos realizados *in vivo* en ratones cepa nude (nu/nu), al ser inoculados con la línea celular B16F0 y tratados con las dos diferentes nanopartículas usadas en este estudio.

CONCLUSIONES

Se fabricaron y caracterizaron nanoacarreadores lipídicos que contenían fosfatidilinositol (PI) e Interleucina 2 (IL-2) encapsulada y expresada en la membrana.

Se determinó la morfología y tamaño de los liposomas por medio de microscopía electrónica de transmisión, este sistema nanoacarreador tiene una forma esférica y un tamaño promedio de 40 a 50 nm. Además por medio del citómetro de flujo se determinó la complejidad y la presencia de IL-2 en la superficie de la nanopartícula, revelando que la concentración de IL-2 expresada en la membrana es directamente proporcional a la complejidad del liposoma. También se logró cuantificar la cantidad de interleucina 2 contenida en el sistema nanoacarreador lipídico por el método de ELISA, obteniendo las concentraciones de IL-2 total, encapsulada y expresada en la membrana liposomal. La técnica de ELISA reveló que el sistema nanoacarreador solo logra encapsular la mitad de la concentración de IL-2 deseada.

Se determinó la interacción de los liposomas con las células tumorales en un modelo *in vitro* e *in vivo*, observando que la formulación LIPPIIL-2 inhibe el crecimiento de las líneas celulares INBL y B16F0 por lo se debería dar seguimiento a esta línea de investigación y determinar si esta nueva formulación podría ser una alternativa para el tratamiento de cáncer cérvico-uterino y melanoma en un futuro.

Se demostró que la cepa de ratón nude (nu/nu) y que la vía de inoculación subdérmica pueden ser utilizados en modelos de estudio para ensayos futuros con líneas celulares B16F0 (principalmente) e INBL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Granados García M, Herrera Gómez A. Manual de oncología : procedimientos médico quirúrgicos. 4ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
2. Tang S, Gao D, Zhao T, Zhou J, Zhao X. An evaluation of the anti-tumor efficacy of oleanolic acid-loaded PEGylated liposomes. *Nanotechnology* 2013; 24(23).
3. Gonzalo ME, Alberto CMJ, Adriana AZ, David CL, Daniel FA, Andrea OR, et al. Oncogüía: cáncer cervicouterino. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 2011; 6(2).
4. López CA, Álvares MJ, Murillo LIJ. Cáncer cervicouterino, epidemiología y su relación con los factores de riesgo. *Arch Salud Sin* 2010; 4(1).
5. Salud Sd. Los 5 tipos de cáncer que más afectan a Mexicanos Secretaria de Salud 2013 [cited 2015 Enero 28]. Available from: <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
6. Kim H, Kwon B, Sin J-I. Combined Stimulation of IL-2 and 4-1BB Receptors Augments the Antitumor Activity of E7 DNA Vaccines by Increasing Ag-Specific CTL Responses. *PloS one* 2013; 8(12).
7. Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud Pública de México*. 2005;47(6).
8. Eriksson H, Lyth J, Månsson-Brahme E, Frohm-Nilsson M, Ingvar C, Lindholm C, et al. Low level of education is associated with later stage at diagnosis and reduced survival in cutaneous malignant melanoma: A nationwide population-based study in Sweden. *Eur J Cancer*. 2013 Aug;49(12):2705-16.
9. Gutierrez MP, Barengo M, Mainardi C, Garay I, Kurpis M, Lascano AR. Melanoma cutaneo asociado a nevo previo. *Medicina (Buenos Aires)* 2009; 69(5): 536-40.
10. Sánchez Cepeda Miriam N. Evaluación del efecto de il-2 sobre la proliferación de células de la línea de melanoma B16F0 (para obtener el título de Licenciatura en Biología). Mexico: UNAM, 2014.
11. Sánchez Yus E, Herrera M, Simón RS, Requena L. Controversias en Dermatología: Pero...¿hubo alguna vez una clasificación de Clark de los melanomas?. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 101(1): 19–30.
12. Temple-Oberle CF, Byers BA, Hurdle V, Fyfe A, McKinnon JG. Intra-lesional interleukin-2 therapy for in transit melanoma. *Journal of surgical oncology* 2014; 109(4): 327-31.
13. Sáenz López P, Vázquez Alonso F, Romero JM, Carretero R, Tallada Buñuel M, Ruiz Cabello F, et al. Polimorfismos en genes de respuesta inflamatoria en cáncer renal metastásico. *Actas Urológicas Españolas* 2009; 33(5): 474-81.

14. Lin W-W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(5).
15. Sim GC, Radvanyi L. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews* 2014; 25(4): 377-90.
16. Pratt CW, Cornely K, Palacios Martínez R, Morales Saavedra JL. *Bioquímica. México: Manual Moderno; 2012.*
17. Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*. 2002; 22(2): 129-50.
18. Harper HA, Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, et al. *Harper : bioquímica ilustrada. 2da ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2013.*
19. García JT, Agüero SD. Fosfolípidos: propiedades y efectos sobre la salud. *Nutrición Hospitalaria* 2014; 31(1).
20. Horton HR, González y Pozo V. *Principios de bioquímica : un enfoque constructivista. 4a ed. México: Pearson; 2008.*
21. Bunney TD, Katan M. Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10(5): 342-52.
22. Jett M, Chudzik J, Alving CR, Stanacev NZ. Metabolic fate of liposomal phosphatidylinositol in murine tumor cells: implications for the mechanism of tumor cell cytotoxicity. *Cancer Research* 1985; 45(10): 4810-5.
23. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery* 2005; 4(2): 145-60.
24. Weissig V. *Liposomes : methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2010.*
25. Corona-Ortega T, Rangel-Corona R, Hernández-Jiménez M, Baeza I, Ibáñez M, Weiss-Steider B. Characterization of cationic liposomes having IL-2 expressed on their external surface, and their affinity to cervical cancer cells expressing the IL-2 receptor. *Journal of drug targeting* 2009; 17(7): 496-501.
26. Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, del Río-Ortiz I, Nieves-Ramírez ME, Morán-Bañuelos H, González-Tenorio O, et al. Cationic liposomes bearing IL-2 on their external surface induced mice leukocytes to kill human cervical cancer cells in vitro, and significantly reduced tumor burden in immunodepressed mice. *Journal of Drug Targeting* 2011; 19(2): 79-85.
27. Fultz B, Howe JM. *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials. 4th ed. Berlin: Springer Science; 2012.*

28. Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Springer; 2007.
29. Reimer L, Kohl H. Transmission electron microscopy: physics of image formation. 5th ed. New York: Springer; 2008.
30. Williams DB, Carter C. Transmission Electron Microscopy: A Text Book for Materials Science. 2nd ed. New York: Springer; 2009.
31. Karp G, Araiza Martínez ME, Karp G. Biología celular y molecular: conceptos y experimentos: 4^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
32. Hernandez Jimenez Miriam A. Caracterizacion de liposomas neutros y cationicos como acarreadores de interleucina 2 (IL-2) (Tesis para obtener el título de Químico Farmaceutico Biologo). México: UNAM; 2005.
33. Juárez López Raul. Estudios de estabilidad de un producto constituido por un sistema nanoacarreador por un sistema nanoacarreador que contiene il-2 para tratamiento de cáncer cérvicouterino (Tesis que para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico Biológica). México: UNAM; 2012.
34. Hawley TS, Hawley RG. Flow cytometry protocols. 3rd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2004.
35. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. Inmunología celular y molecular. Séptima ed. Barcelona, España: Elsevier; 2012.
36. Salgado Lynn M. Citometría de Flujo: Fluorescence - Activated CellSorting (FACS). México: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México; 2002.
37. Macey MG. Flow cytometry: principles and applications. Totowa, New Jersey: Humana Pres; 2007.
38. Anaya J. Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2005.
39. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Palacios Martínez R. Inmunología de Kuby. 2da ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2007.
40. Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway CA, Ehrenstein M, Rivera Muñoz B, et al. Inmunobiología de Janeway. 7^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
41. Crowther JR, Walker JM. The ELISA guidebook. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Pres; 2009.
42. Velasco Lomas Iván M. Diseño de un bioensayo para la cuantificación de interleucina 2 (il-2) contenida en un sistema nanoacarreador (Tesis que para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico Biológica). México: UNAM; 2012.

43. Martha LH, Isabel SC, T. TLM, Leticia MF, Fernando HC, Catalina MR, et al. Manual de prácticas para el laboratorio de genética clínica, parte 2: 8o semestre carrera de Q.F.B: México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2009.
44. Huante García Rosa M. Evaluación farmacocinética de Il-2 contenida en un sistema nanoacarreador (Tesis que para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico Biológica). México: UNAM; 2014.
45. Mexicana NO. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de Laboratorio México: Diario Oficial de la Federación. 1999.
46. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. 1ª ed. Perú: Instituto Nacional de Salud; 2008.