



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**SÍNTESIS Y COMPARACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE DOS  
MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DEL LÍPIDO CATIONICO ESPERMIDIL-  
COLESTEROL PARA EL DISEÑO DE LIPOSOMAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

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

**GUADALUPE MONTSERRAT VERA LEMUS**

**JURADO DE EXAMEN**

**DIRECTORA: DRA. MARÍA TERESA CORONA ORTEGA**

**ASESOR: DR. ADELFO NATALIO REYES RAMÍREZ**

**ASESOR: Q.F.B. ARTURO VALLE MENDIOLA**

**SINODAL: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ**

**SINODAL: LEONARDO TRUJILLO CIRILO**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2023**



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.

## Contenido

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	3
3.1. LÍPIDOS CATIÓNICOS.....	3
3.2. LIPOSOMAS .....	4
3.3. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	13
3.4. CULTIVO CELULAR .....	15
3.5. ANTICUERPOS Y RECEPTORES FC .....	16
3.6. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA (WOUND HEALING) .....	19
3.7 CAPACIDAD CLONOGÉNICA.....	20
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	21
5. HIPÓTESIS .....	22
6. OBJETIVO GENERAL.....	23
6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
8. MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
8.1. MATERIALES .....	25
8.2. METODOLOGÍA .....	25
9. RESULTADOS.....	28
10. DISCUSIÓN .....	34
11. CONCLUSIONES.....	38
12. PERSPECTIVAS.....	38
13. REFERENCIAS.....	39

## Abreviaturas

Abreviatura	Significado
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrómetro
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
Fc $\gamma$ RIII	Receptor CD16
HCT116	Línea celular de colon
INBL	Línea celular cervicouterina
L	Litro
MLV	Vesículas multilaminares
mL	Mililitro
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
RPMI 1640	Medio Roswell Park Memorial Institute
LUV	Vesículas Unilaminares Grandes
SUV	Vesículas Unilaminares Pequeñas
UV	Vesículas Unilaminares

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Teresa por brindarme la oportunidad de colaborar en este proyecto y por su apoyo para continuar mi desarrollo académico y profesional.

A mis asesores por su guía y compartir sus conocimientos para llevar a cabo este trabajo y poder finalizar esta etapa de mi vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Oncología Celular por el apoyo y momentos de felicidad que compartimos al estar trabajando juntos.

A mis amigos de la universidad por todos los momentos de aprendizaje y diversión que compartimos a lo largo de la carrera y que nuestra amistad perdure toda la vida.

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIIT IN216521 "Desarrollo de un sistema liposomal para liberación sitio específico de D-Penicilamina contra artritis reumatoide", estoy agradecida por el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## DEDICATORIAS

A mis padres por todo lo que me han brindado a lo largo de mi vida y poder llegar a este momento, gracias por su amor, dedicación y esfuerzo. A mi hermano Enrique y a mi hermana Gabriela por apoyarme, guiarme y demostrarme su cariño día a día. Este logro académico es para mi familia.

A mi novio Jorge por acompañarme, motivarme y darme su apoyo incondicional.

A mis perritos peludos porque cada día me enseñan a ser una mejor persona.

*“Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndose y buscando una piedra más lisa o una concha más bonita de lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con todo por descubrir”*

*Isaac Newton*

## 1. RESUMEN

Los liposomas son nanoportadores de diversas moléculas, han demostrado ser una opción viable para la administración de tratamientos oncológicos debido a sus características, ya que existe una mayor biocompatibilidad y tienen una administración localizada y controlada. Estos sistemas de administración se componen principalmente de lípidos que pueden tener cargas o ser neutros. Por ello en el presente proyecto de tesis se realizó la comparación de dos métodos de síntesis para la obtención del lípido catiónico espermidil-colesterol, que se utiliza como precursor para la fabricación de liposomas. En el Laboratorio de Oncología Celular se diseñaron estos dos métodos que son nombrados como Lípido A y Lípido B, sin embargo, se realizó una modificación al método B; en el cual se dejó en reposo la reacción durante 18 horas, con ello se determinó que el producto tiene menos impurezas y se obtiene un mayor rendimiento de reacción del 69.92%.

Posteriormente los productos A y B fueron utilizados como lípidos catiónicos para la fabricación de liposomas, a su vez se caracterizaron por citometría de flujo, obteniendo como resultado dot plots e histogramas comparativos que reflejan que ambas nanovesículas tienen el mismo tamaño y complejidad.

Se evaluó la estimulación a la aparición en la superficie celular del receptor FcγRIII (CD16) en las células tumorales de cérvix mediante citometría de flujo, en la cual se obtuvo que ambos tipos de liposomas tienen el mismo comportamiento y presentan una expresión del receptor sin tener una actividad citotóxica para las células. Se realizaron otros ensayos como cierre de herida (wound healing) y capacidad clonogénica, utilizando la línea celular HCT116 debido a que el proyecto se continuó en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), esto para confirmar la seguridad de los liposomas fabricados con el espermidil-colesterol B sintetizado; se observó que el lípido catiónico no interfiere en la capacidad de migración ni de crecimiento celular, por lo cual con todos los resultados comparativos entre ambos productos (Lípido A y B), los liposomas fabricados muestran seguridad y eficacia como sistema de administración para tratamientos futuros.

## **2. INTRODUCCIÓN**

En la actualidad se continúa con la investigación para desarrollar sistemas de administración de fármacos, recientemente se han utilizado liposomas. Los liposomas son vesículas producidas a partir de moléculas anfipáticas o fosfolípidos y tienen grandes ventajas en cuanto a su estructura, composición y diseño; por lo que proporcionan una absorción de forma localizada y controlada en el sitio de acción.

Los lípidos catiónicos se componen principalmente de tres partes: la cabeza polar, el enlazador y una cola hidrofóbica. Actualmente se han diseñado una gran variedad de estos lípidos, mediante la combinación de sus principales estructuras, utilizando ésteres, carbamatos, amidas, poliaminas, derivados de colesterol, entre otros. Por ello Gao y Huang desarrollaron un lípido catiónico usando un agente derivado del colesterol en el cual demostraron mayor eficiencia y menor toxicidad en el tratamiento liposomal.

La síntesis del agente catiónico espermidil-colesterol se basa en el método de Gao Huang y una patente expirada de Aronex Pharmaceuticals, Inc.; sin embargo, el equipo del Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza ha realizado modificaciones en este procedimiento, por ello se han desarrollado dos métodos de producción clasificándose como Lípido A y Lípido B.

En las investigaciones previas de este laboratorio han encontrado que el producto de la síntesis del Lípido B tiene mayor rendimiento, sin embargo tiene un comportamiento inadecuado en las células; por ello es importante fabricar los liposomas con ambos productos de síntesis, caracterizarlos en cuanto a tamaño y complejidad mediante citometría de flujo y evaluar su actividad biológica en una línea celular, así mismo se determinará cuál de ambos métodos produce el lípido espermidil-colesterol con mayor rendimiento, eficiencia de transfección celular y menor toxicidad para que sea utilizado como materia prima en la producción de liposomas.



### 3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

#### 3.1. LÍPIDOS CATIONICOS

Los lípidos están conformados por grupos no polares (en general con un alto contenido de carbono e hidrógeno, tiene la propiedad común de ser relativamente insolubles en el agua y solubles en solventes no polares.<sup>1</sup>

Los lípidos catiónicos son moléculas sintéticas que forman una bicapa, su carga puede pasar mediante los poros nucleares y están constituidos por cadenas de 12 a 18 átomos de carbono y cationes de aminos. Se clasifican en ionizables y cargados permanentemente: a su vez se diferencian en que los primeros tienen una carga insignificante a pH fisiológico, pero están completamente cargados a pH ácido. Esta característica reduce las interacciones electrostáticas con componentes cargados en la circulación sanguínea.<sup>2</sup>

Una vez en las células, las aminos, en grupos de cabeza de lípidos catiónicos ionizables, se protonan gradualmente con la disminución del pH. Con el aumento de la carga de cationes de lípidos, las interacciones entre los lípidos y la membrana plasmática aumentan, facilitando la transfección y migración del ADN hacia el núcleo.<sup>2</sup> La bicapa lipídica es la asociación molecular que adoptan los lípidos anfipáticos que tienen una forma molecular cilíndrica, como la fosfatidilcolina, el diámetro de la región polar es muy parecido al de las cadenas hidrocarbonadas. Como los extremos de la bicapa quedarían expuestos a un ambiente acuoso, la bicapa se cierra y forma una vesícula llamada liposoma (Es la forma básica de todas las membranas biológicas.<sup>2</sup>

Cada lípido tiene una temperatura de transición ( $T_c$ ) en la que ocurre el cambio de estado. Los liposomas con lípidos que tienen una  $T_c$  inferior a la temperatura ambiente son líquidos y las que tienen una  $T_c$  superior son sólidos. La  $T_c$  se da mediante las interacciones de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, por lo que depende de la longitud y la insaturación de estas cadenas.<sup>2</sup>

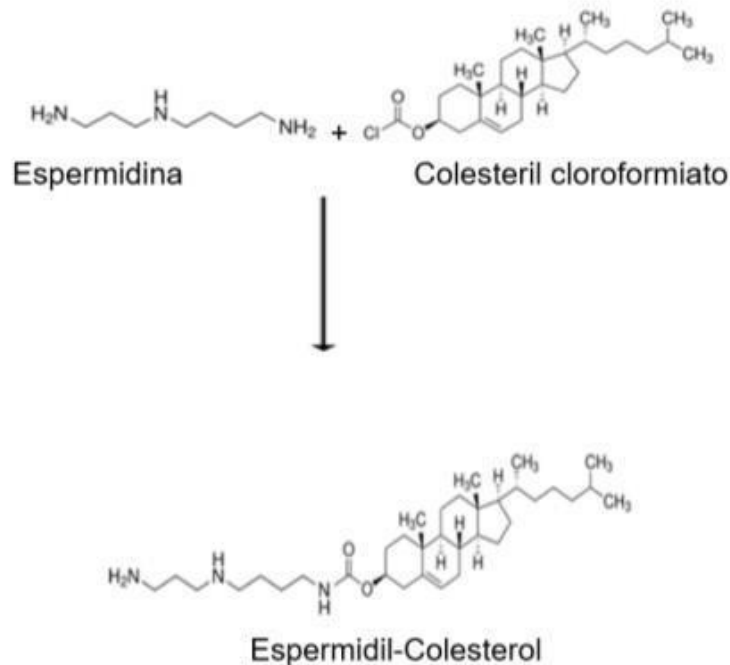


Fig.1. Representación de la reacción para la obtención del lípido catiónico Espermidil-Colesterol.

### 3.2. LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas esféricas que actualmente se utilizan como transportadores de fármacos, algunas de sus ventajas al administrarse son: su excelente biocompatibilidad y biodegradación sin toxicidad e inmunogenicidad, ya que se componen de fosfolípidos y colesterol; son capaces de proteger el fármaco de la exposición directa al sistema circulatorio, pueden contener enzimas, hormonas, vitaminas, antibióticos o citocinas. Así mismo, pueden tener un objetivo específico ya que pueden ser elaborados con ligandos, anticuerpos monoclonales o materiales sensibles al microambiente.

Estructuralmente los liposomas están compuestos por fosfolípidos en una solución acuosa. La bicapa lipídica tiene una cola hidrofóbica y una cabeza hidrofílica, con ello se forma una molécula anfifílica. La composición por lípidos afecta el tamaño de partícula, rigidez y fluidez. La cabeza hidrofílica usualmente puede contener una carga negativa, positiva o zwitteriónica, ya que alguno de estos grupos le da estabilidad.

Se clasifican en categorías basadas en su tamaño y el número de bicapas: multilamelares y unilamelares, a su vez estas últimas se dividen en vesículas multilamelares grandes y pequeñas. En los liposomas unilamelares la vesícula tiene una única bicapa de fosfolípidos que encierra la solución acuosa.

En los liposomas multilamelares, las vesículas tienen una estructura de cebolla.<sup>2, 3,4</sup>

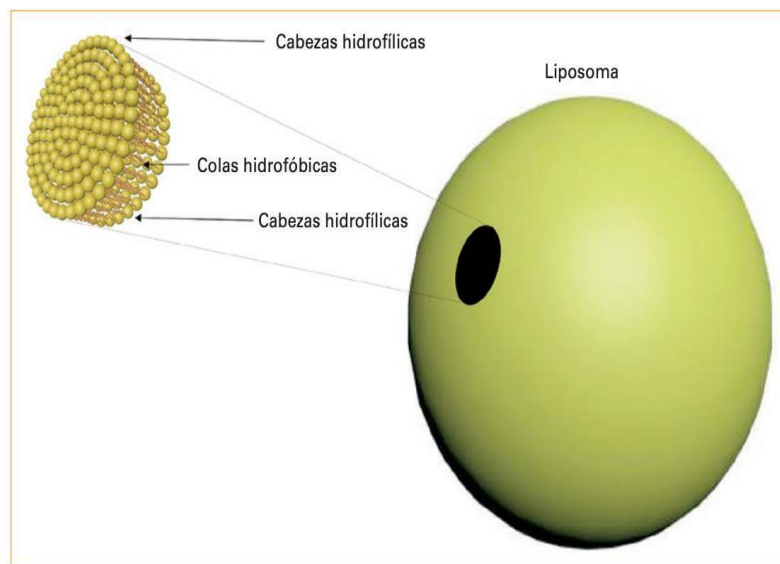


Fig. 2 Liposoma y corte de la bicapa lipídica. Obtenida Yu H. et al.2021<sup>3</sup>

### Tipos de liposomas

El tamaño de los liposomas puede variar desde vesículas muy pequeñas (0,025  $\mu\text{m}$ ) hasta de otras más grandes (2,5  $\mu\text{m}$ ). Además, los liposomas pueden tener una o más bicapas. El tamaño de la vesícula es un parámetro exacto para determinar la vida media de circulación de los liposomas y el número como el tamaño de las bicapas afectan la cantidad de fármaco encapsulado en los liposomas. A partir de su tamaño y número de bicapas, los liposomas son clasificados también en una de las siguientes dos categorías: Vesículas multilaminares (MLV) y Vesículas Unilaminares (UV). Dentro de las UV encontramos dos categorías más: Las Vesículas Unilaminares Grandes (LUV) y Las Vesículas Unilaminares Pequeñas (SUV). En los liposomas unilaminares la vesícula sólo es una esfera hecha de una sola bicapa de fosfolípidos mientras que en los liposomas multilaminares tienen una estructura como la de una “cebolla”, es decir, diversas vesículas unilaminares formarán dentro de otra una estructura de esferas concéntricas separadas por capas de agua.<sup>5</sup>

Tabla 1. Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del tamaño y la lamelaridad.<sup>5</sup>

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre completo/lamelaridad</b>	<b>Tamaño</b>
MLV	Vesículas multilaminares	> 0,5 $\mu\text{m}$
OLV	Vesículas oligolamelares	0.1-1 $\mu\text{m}$
UV	Vesículas unilamelares	Todos los rangos de tamaños
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas	40 - 100 nm
LUV	Vesículas unilamelares grandes	> 400 nm
GUV	Vesículas unilamelares gigantes	> 1 $\mu\text{m}$
MVV	Vesículas multivesiculares	> 1 $\mu\text{m}$

### Componentes de Liposomas

Su estructura consiste en tres partes importantes: la cabeza, enlazador y una cola. (Fig.7)

La cabeza juega un rol importante en la interacción con la membrana celular, su composición química puede influir en su mecanismo de absorción; algunos compuestos más utilizados para conformarla estructuralmente son: sales cuaternarias de amonio, aminas, guanidina, compuestos heterocíclicos.

En particular los lípidos que contienen poliaminas (PAs) han surgido como transfectantes prometedores, sin embargo, las poliaminas ramificadas tienen menos

problemas en cuanto a su plegamiento, por lo que tienen mayor estabilidad.<sup>6</sup>

Las poliaminas pueden obtenerse de manera endógena a partir de L-arginina ya que es el precursor principal a partir de su conversión a ornitina a través de la enzima arginina descarboxilasa y posteriormente se convierte a putrescina, esta a su vez será metabolizada a espermidina y espermina. También, pueden obtenerse de manera exógena por medio de la alimentación, leche materna y formulaciones lácteas.

En las legumbres y vegetales se puede encontrar la espermidina, los alimentos que contienen un gran porcentaje de esta amina son: germen de trigo, soja, algunos hongos, nueces y semillas. Participa en la mayoría de las funciones celulares, incluida la activación de la autofagia, la estabilidad del ADN, la transcripción, la traducción y la apoptosis.

Estos compuestos se han relacionados con importantes procesos fisiológicos, como la proliferación y viabilidad celular, la nutrición y la fertilidad. También han sido vinculadas con el sistema nervioso en el cual son abundantes, y se ha sugerido que pueden actuar como neurotransmisores. En el sistema inmunológico, también se ha asociado a las PAs con funciones inmunoestimuladoras relevantes en la diferenciación, activación y reclutamiento de células inmunes. Además, estos compuestos desempeñan un papel importante en la modulación de las reacciones inflamatorias y se han planteado diferentes mecanismos por los que pueden ejercer funciones antiinflamatorias.<sup>7, 8,9</sup>

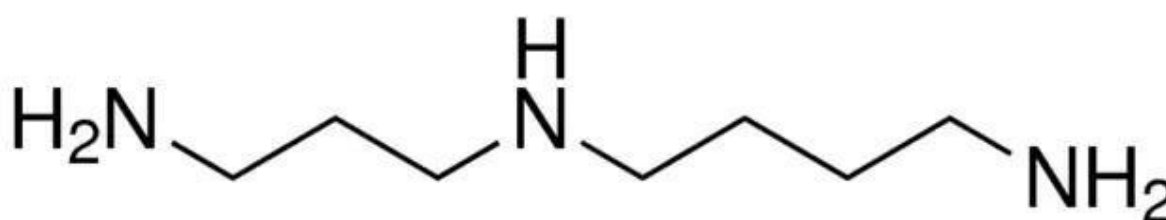


Fig. 3. Estructura de Espermidina. Obtenida de Sigma-Aldrich

### Enlazador

El enlazador provee ciertas características al lípido como la carga general, impedimento estérico, la flexibilidad conformacional de la molécula anfifílica. Los grupos utilizados como enlazadores son éteres, ésteres, carbamatos.

Cuando se utiliza un enlazador de carbamato los lipocomplejos tienen una mayor estabilidad, así mismo, tienen excelentes propiedades de transfección y menor

toxicidad, un inconveniente de este grupo es que pueden sufrir una hidrólisis ya que son sensibles a los cambios de pH. Gao y Huag sugirieron que las esterasas intracelulares escinden rápidamente los enlazadores, de tal manera se biodegradan una vez que han entrado en la célula, estos autores propusieron el uso del carbamato en su lípido catiónico denominado DC-Chol.<sup>10, 11</sup>

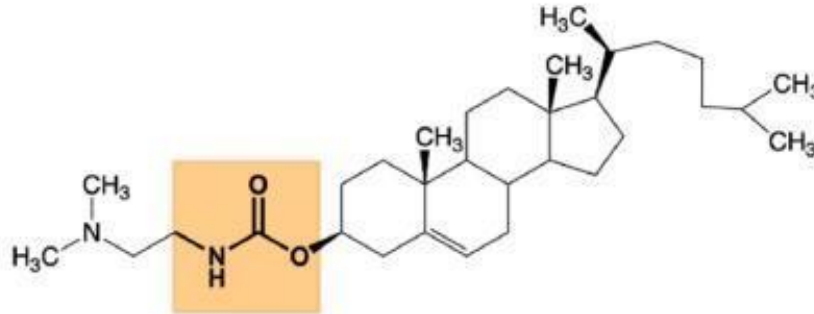


Fig.4. Lípido catiónico DC-Chol. El área resaltada muestra el enlazador. Obtenida de Gao X, 1991.

#### Parte Hidrófoba

Los derivados de colesterol son esteroides que se utilizan con más frecuencia en la preparación de liposomas, ya que el colesterol modula la permeabilidad de la membrana, cambia la fluidez y mejora la estabilidad de las membranas bicapa en presencia de fluidos biológicos como la sangre y el plasma. La región hidrofílica del colesterol es el grupo hidroxilo y la parte hidrofóbica la constituye el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Su región polar es muy pequeña, por ello no forman bicapas lipídicas por sí solo. El colesterol en liposomas hace que se presente una temperatura de transición cercana a la temperatura ambiente, provoca una disminución en la fluidez de la bicapa y en la permeabilidad a solutos hidrofílicos, así confiere una gran estabilidad al liposoma.<sup>11</sup>

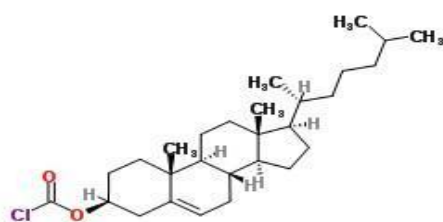


Fig. 5. Colesteril Cloroformiato. Obtenida de NINGBO INNO PHARMCHEM CO., LTD. En un estudio realizado por Malaekéh B. se sintetizaron las poliaminas mediante la reacción de cloroformiato de colesterol y tres oligoaminas diferentes en presencia de trietilamina. La oligoamina se disuelve en diclorometano anhidro, el cloroformiato es agregado lentamente a una temperatura de 23°C-25°C con agitación durante toda la noche. Los productos que obtuvieron se muestran en la Fig. 7

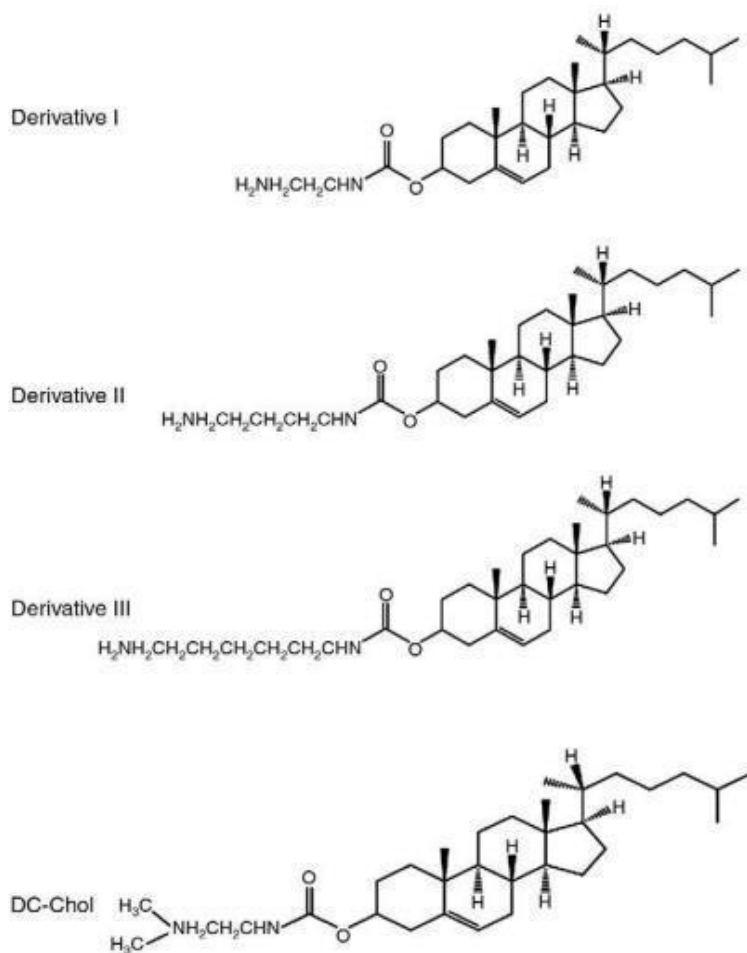


Fig. 6. Estructura del (2-dimetilamino-etil)-carbamato éster de colesterol (DC-Chol), (2-amino-etil)-carbamato éster de colesterol (derivado I), (4-amino-butil)-carbamato

éster de colesterol (derivado II), (6-amino-hexil)-carbamato éster de colesterol (derivado III). Obtenida de Malaekheh B. et al, 2009.<sup>12</sup>

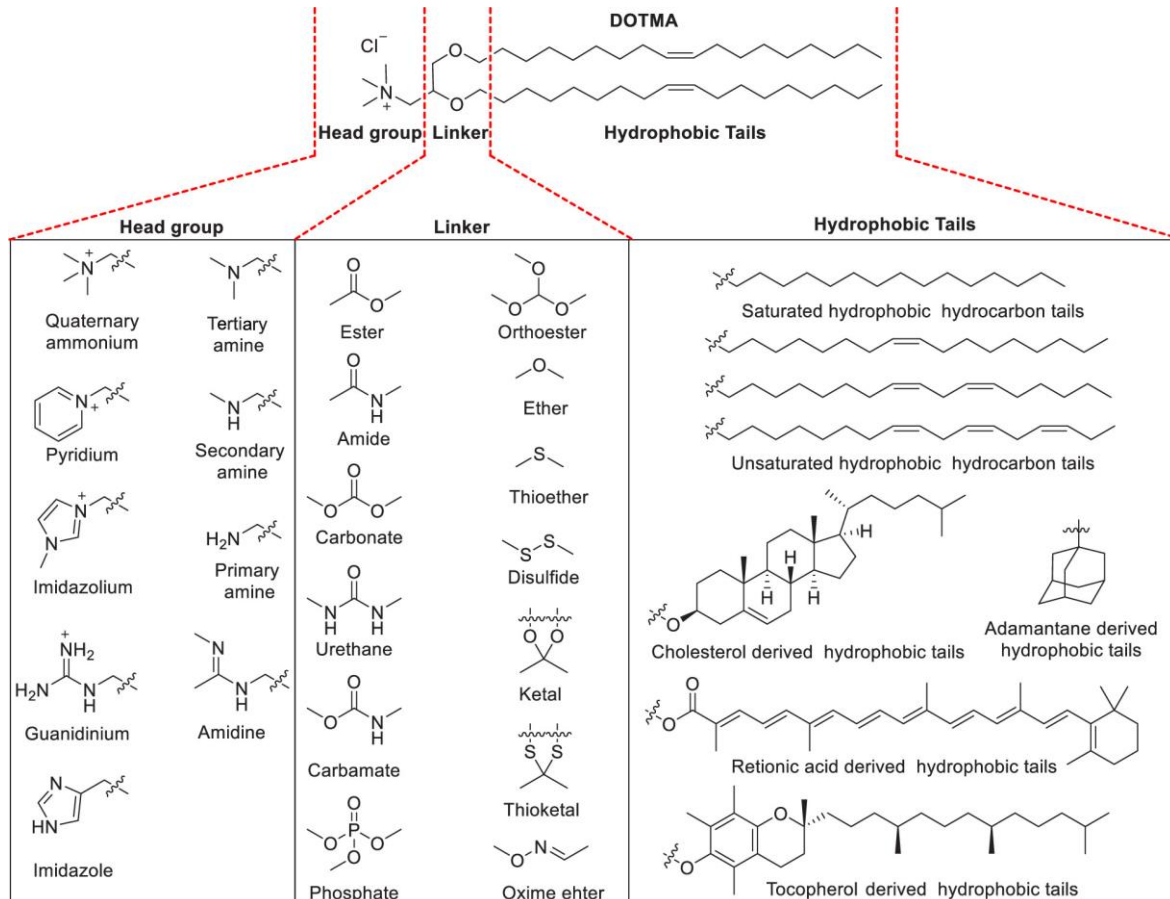


Fig. 7. Estructuras químicas de lípidos catiónicos DOTMA y estructuras de los tres segmentos que conforman los liposomas. Obtenido de Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery.

### Etapas de preparación de liposomas

Todos los métodos de preparación de los liposomas implican cuatro etapas básicas:

1. Secado de lípidos de disolvente orgánico.
2. Dispersión del lípido en medios acuosos.
3. Purificación del liposoma resultante.
4. Análisis del producto final.<sup>13</sup>



## Métodos Generales de Preparación de Liposomas

### 1. Método de hidratación de película delgada (método Bangham):

Consiste en disolver en un solvente orgánico adecuado todos los lípidos y el fármaco, posteriormente se evapora el disolvente a presión reducida para crear una película de capa delgada, se hidrata con una solución tampón acuosa. El cambio de tamaño de los liposomas, los tipos de lamelalidad y las distribuciones de partículas se pueden controlar mediante extrusión a través de membranas de policarbonato de tamaños de poro específicos o mediante el uso de sonicadores de baño o sonda.

### 2. Evaporación en fase reversa

En este método, se parte de una disolución de los fosfolípidos en éter etílico que se mezcla con una fase acuosa en una relación de volúmenes 1:3 (fase orgánica/fase acuosa). Esta mezcla se emulsifica por sonicación obteniéndose una suspensión de micelas invertidas. A continuación, se elimina el éter a presión reducida ( $\approx 300$  mm Hg), produciéndose al mismo tiempo una agregación de dichas micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual finalmente acaba por romper cuando se sigue incrementando el grado de vacío aplicado ( $\approx 700$  mm Hg) para lograr la completa eliminación del disolvente orgánico. En todo este proceso las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras, como para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas.

Las vesículas formadas de esta manera son de tipo uni u oligolaminar, con un tamaño medio en torno a 500 nm, aunque bastante heterogéneo.

### 3. Método de eliminación de detergente

En un disolvente orgánico se disuelven los lípidos y un tensioactivo de alta concentración crítica de micelas, se obtiene una película delgada después de la evaporación suave del solvente, el tensioactivo se elimina mediante diálisis, cromatografía de exclusión, adsorción en perlas hidrofóbicas o dilución. Formando una vesícula de liposomas LUV.

#### 4. Método de deshidratación-rehidratación

Es un método en el cual no se utilizan solventes orgánicos para formar LUV por sonicación. Se basa en la dispersión directa de los lípidos a bajas concentraciones en una solución acuosa que contiene fármaco, posteriormente se realiza la sonicación. La deshidratación se da mediante la evaporación con nitrógeno para crear una película multicapa que atrapa las moléculas del fármaco.

#### 4. Método de Calentamiento

Es una técnica libre de disolventes orgánicos, los lípidos se hidratan directamente con una solución acuosa y se calientan durante no menos de una hora por encima de la temperatura de transición de los fosfolípidos usados en presencia de un 3- 5% de agente hidratante como glicerina o propilenglicol. Los agentes hidratantes actúan como estabilizadores y aditivos isotonzantes que evitan la coagulación y sedimentación de las nanopartículas. <sup>14,15</sup>

#### Mecanismo de transporte a través de liposomas.

Los estudios *in vivo e in vitro* de los contactos con las células han demostrado que la principal interacción de los liposomas con las células es la simple adsorción (mediante interacciones específicas con los componentes de la superficie celular, fuerzas electrostáticas o por hidrófobo débil no específico) o después de la endocitosis (por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, por ejemplo, macrófagos y neutrófilos). Este mecanismo se puede apreciar de manera general en la Fig.8. <sup>15</sup>

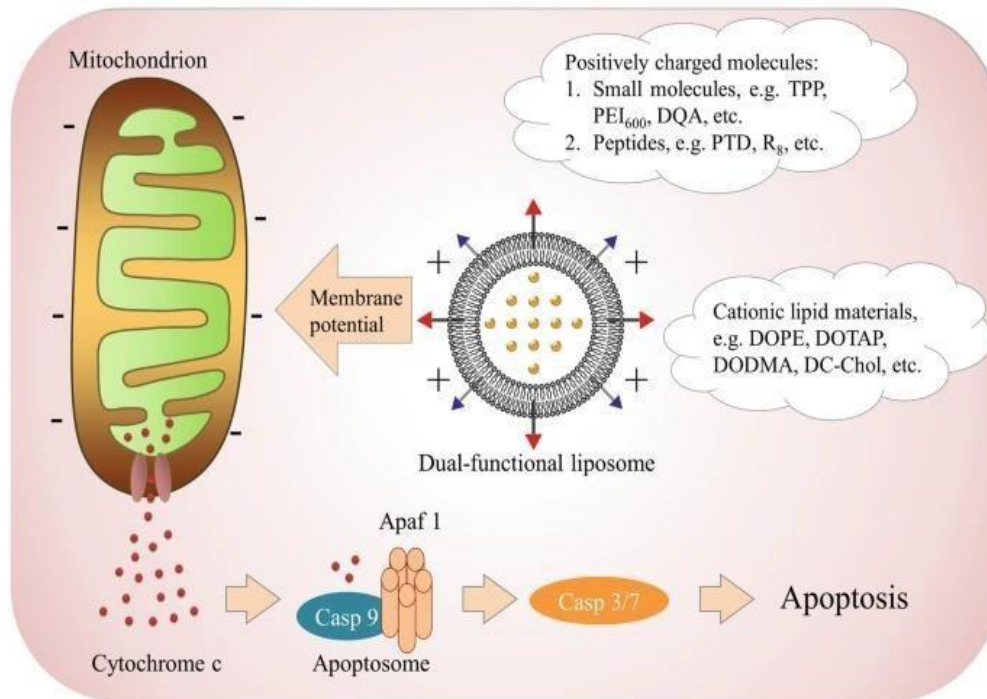


Fig. 8. Ilustración del blanco mitocondrial de un sistema de liberación liposomal. Hu Y. et al. 2017

### 3.3. CITOMETRÍA DE FLUJO

El citómetro de flujo es un sistema para analizar el movimiento de las células o partículas mediante la corriente de un fluido que atraviesa por un láser. Las señales son inducidas a partir de la dispersión de la luz y la fluorescencia emitida por las partículas microscópicas.

Dos parámetros intrínsecos en la citometría de flujo (no dependientes de la fluorescencia, pero muy importantes en la evaluación celular) son el conocido bajo las siglas de FSC (Forward Scatter Channel) que nos informa del tamaño celular y el SSC (Side Scatter Channel) que nos informa de lo que se conoce como complejidad (rugosidad celular, granulosidad celular). Las células pueden ser marcadas por fluorocromos conjugados a anticuerpos o marcadores fluorescentes de membrana, citoplasmáticos o nucleares.<sup>16</sup>

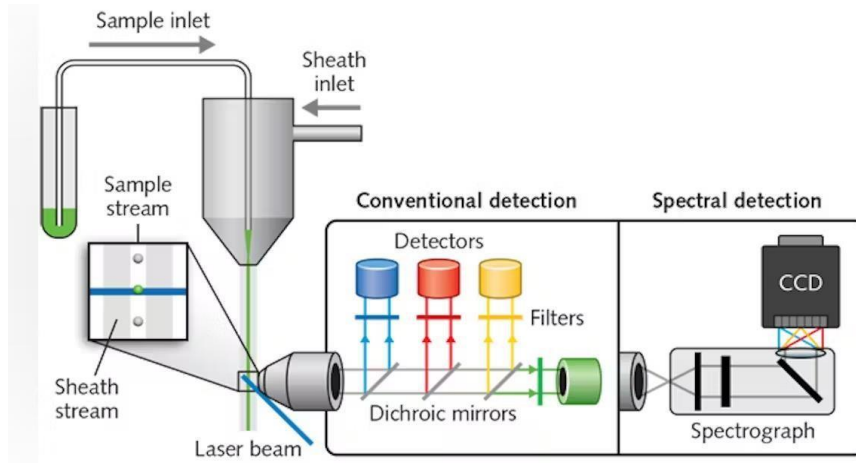


Fig. 9. Esquema de un citómetro de flujo. Obtenida de: Laser Focus World.Gefvert B.

## Componentes del Citómetro de Flujo

### Banco Óptico

Son los componentes que estabilizan y alinean la fuente de luz y el objeto de iluminación.

### Sistema de Fluído

Está compuesto por un depósito de líquido llamado flujo envolvente, el cual proporciona un vehículo para dirigir las partículas a través del sistema de flujo. Generalmente suele ser una solución amortiguadora con componentes adecuados para las partículas que se analizan, las partículas entran en contacto hasta después de ser analizadas por ello en ocasiones se utiliza agua destilada a menos que tenga un análisis específico.

### Sistema Electrónico

Los fotodetectores convierten las señales de luz en impulsos eléctricos. A los tubos fotomultiplicadores se le aplican voltajes para que la cascada de electrones resultante del impulso de luz original se convierta en una corriente lo suficientemente grande para ser detectada.<sup>17</sup>

### Fluorescencia

La fluorescencia es producida mediante la excitación de las células con un láser que emite un haz de luz, posteriormente se recolecta la incidencia del haz de luz. El equipo cuenta con filtros que seleccionan la longitud de onda correspondiente a la medición de la fluorescencia. Para medir la fluorescencia en citometría de flujo se utilizan fluorocromos que se unen a los anticuerpos de interés, estos compuestos excitan un

tipo de láser específico del equipo. Los más utilizados son fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), complejo peridina-clorofila-proteína (PerCP), 6-carboxifluoresceína, entre otros. Los fluorocromos tienen una longitud de onda específica de absorción y emisión de fluorescencia.<sup>17, 18</sup>

### 3.4. CULTIVO CELULAR

Es una técnica en la cual a partir de una muestra de algún tejido es procesada para aislar las células que lo componen y se colocan en un medio con sustratos y condiciones ambientales favorables para su preservación e incluso puedan continuar con el ciclo celular. Existen dos tipos de cultivo:

- Cultivo celular primario: Los cultivos primarios consisten en células que se adquieren de un organismo vivo y se mantienen en crecimiento in vitro.
- Cultivo Continuo: Se componen de un solo tipo de célula que se propaga en serie para un número limitado de divisiones celulares.

#### Morfología del cultivo:

- Cultivos en monocapa: las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio). El anclaje al sustrato es un prerrequisito para la proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células excepto para las hematopoyéticas.
- Cultivos en suspensión: las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje. Este tipo de cultivo se restringe a las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes.<sup>19, 20</sup>

La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica que:

- Aumenta el número de células obtenidas
- Acaban predominando uno o dos tipos celulares: los que tienen mayor tasa de crecimiento la población celular se hace uniforme y homogénea
- Sus características se conservan durante las sucesivas generaciones y, si se conservan en nitrógeno líquido, de forma indefinida.<sup>21</sup>

### 3.5. ANTICUERPOS Y RECEPTORES FC

Las inmunoglobulinas (Ig) son un tipo de proteínas denominadas glicoproteínas, parte específica del complejo receptor de células B (BCR, por sus siglas en inglés). Cuando una sustancia extraña al organismo, denominada antígeno, interactúa con la membrana del linfocito B, desencadenando una respuesta que incluye la activación de más linfocitos inmunes que atacan al antígeno. Además, funcionan como moléculas circulantes secretadas por las células plasmáticas provenientes de la activación, la proliferación y la diferenciación de dichas células B.

Las inmunoglobulinas se dividen en dos fragmentos idénticos conocidos como Fab (fragmento de unión al antígeno, por sus siglas en inglés) que son los que se unen al antígeno, y en un fragmento que posee la propiedad de ser fácilmente cristalizable denominado Fc (fracción cristalizable). La formación de puentes disulfuro internos en las cadenas da como resultado la obtención de dominios proteicos globulares, característico de todos los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas.<sup>22, 23</sup>



Fig. 10. Los fragmentos Fab se obtienen cuando las regiones variables de las cadenas pesadas (VH, por sus siglas en inglés) y el primer dominio constante de las cadenas pesadas (CH1, por sus siglas en inglés) se asocian con los dominios constante y variable de las cadenas livianas (VL y CL, por sus siglas en inglés), las regiones dos y tres de las cadenas pesadas (CH2 y CH3) forman la Fc. Esta región cumple con funciones efectoras, tales como transporte placentario, potenciación de la fagocitosis (opsonización) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas

en inglés). Obtenida de Bermúdez K. et al. 2019.

En algunos mecanismos de defensa, es importante la participación de la fracción cristalizante Fc, como el proceso de citotoxicidad dependiente de anticuerpos inmunomediada (ADCC). Este proceso comienza con el reconocimiento de un antígeno expresado en la superficie de la célula diana por inmunoglobulinas específicas. El dominio Fc se une a los receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) expresados en las células efectoras inmunitarias, lo que desencadena la liberación de gránulos citotóxicos hacia la célula diana o aumenta la expresión de los receptores de muerte en la superficie celular. Por ejemplo, los linfocitos citolíticos naturales (NK-natural killer) al expresar su receptor CD16 activado por ADCC, genera señales que hacen que el linfocito NK descargue las proteínas de sus gránulos que matan la célula opsonizada (es decir la célula está cubierta por partículas llamadas opsoninas que facilitarían su fagocitosis como se puede observar en la siguiente figura.<sup>23, 24</sup>

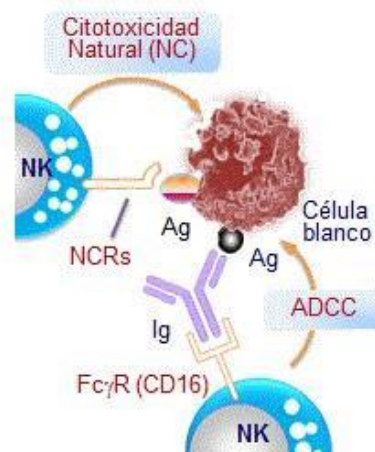


Fig. 11. Citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Obtenida Inmunosalud.Peña J., 2023.

### Tipos de Receptores FC

Existen 3 diferentes clases de receptores que reconocen las regiones Fc de IgG (Fc $\gamma$ R), la IgA (Fc $\alpha$ R) y la IgE (Fc $\epsilon$ R). En los seres humanos existen a su vez tres clases de receptores para IgG (Fc $\gamma$ R):

- Fc $\gamma$ RI (CD64)
- Fc $\gamma$ RII (CD32)
- Fc $\gamma$ RIII (CD16)

Los receptores Fc mencionados anteriormente, se caracterizan por una cadena  $\alpha$  de glucoproteínas que se unen al anticuerpo y que tiene dominios extracelulares homólogos a los dominios de las inmunoglobulinas. Los Fc $\gamma$ R se expresan de forma constitutiva en diferentes tipos de células, esto se debe a la agregación de los Fc $\gamma$ R en la superficie celular con la consecuente transducción de la señal y la activación del receptor inmunitario (ITAM) o tirosinas de inhibición del receptor inmunitario (ITIM). El receptor Fc $\gamma$ RIII se expresa en monocitos, macrófagos, células Natural Killer (NK) y algunos linfocitos T. En la siguiente figura (Fig. 11) se muestra una tabla de las características más relevantes de estos receptores y sus isoformas.<sup>22</sup>

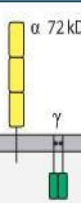
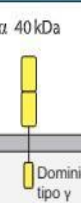
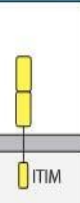
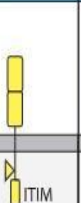
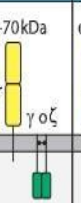
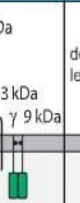
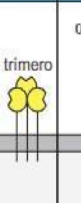


Receptor	Fc $\gamma$ RI (CD64)	Fc $\gamma$ RII-A (CD32)	Fc $\gamma$ RII-B2 (CD32)	Fc $\gamma$ RII-B1 (CD32)	Fc $\gamma$ RIII (CD16)	Fc $\epsilon$ RI	Fc $\epsilon$ RII (CD23)	Fc $\alpha$ RI (CD89)	Fc $\alpha$ / $\mu$ R
<b>Estructura</b>									
<b>Unión</b>	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgE	IgE	IgA1, IgA2	IgA, IgM
<b>Orden de afinidad</b>	$10^8 M^{-1}$ 1) IgG1=IgG3 2) IgG4 3) IgG2	$2 \times 10^6 M^{-1}$ 1) IgG1 2) IgG3=IgG2* 3) IgG4	$2 \times 10^6 M^{-1}$ 1) IgG1=IgG3 2) IgG4 3) IgG2	$2 \times 10^6 M^{-1}$ 1) IgG1=IgG3 2) IgG4 3) IgG2	$5 \times 10^5 M^{-1}$ IgG1=IgG3	$10^{10} M^{-1}$	$2-7 \times 10^7 M^{-1}$ (trimer) $2-7 \times 10^6 M^{-1}$ (monomer)	$10^7 M^{-1}$ IgA1=IgA2	$3 \times 10^9 M^{-1}$ 1) IgM 2) IgA
<b>Tipo celular</b>	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Plaquetas Células de Langerhans	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Linfocitos B Mastocitos	Células NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Mastocitos Basófilos	Eosinófilos Linfocitos B	Macrófagos Eosinófilos† Neutrófilos	Macrófagos Linfocitos B
<b>Efecto de la ligadura</b>	Captación Estimulación Activación de la explosión respiratoria Inducción de la madurez	Captación Liberación de gránulos (eosinófilos)	Captación Inhibición de la estimulación	No captación Inhibición de la estimulación	Inducción de la madurez (células NK)	Secreción de gránulos	Desgranulación	Captación Inducción de la madurez	Captación

Fig. 12. Receptor Fc. Obtenida de inmunología básica. Abul K. Abbas

En el caso del receptor Fc $\gamma$ RIII (CD16), en el cual se centrará el siguiente proyecto, se ha demostrado que existen dos formas codificadas por dos genes vinculados que se encuentran en el locus FCGR (del inglés, Fc gamma Receptor), una forma transmembrana con una cola citoplasmática de 25 aminoácidos llamada CD16A (Fc $\gamma$ RIIIa) y una forma glicosilfosfatidilinositol (GPI) llamada CD16B (Fc $\gamma$ RIIIb). Las dos formas son tan similares que sus secuencias extracelulares difieren en tal solo seis aminoácidos, su región extracelular comprende dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas de tipo C2.<sup>24, 25</sup>



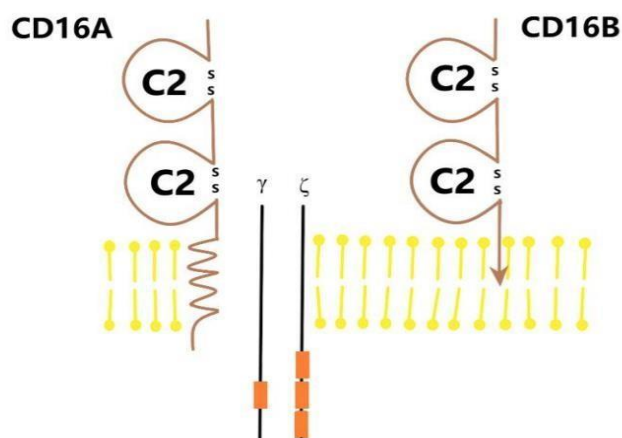


Fig. 13. Estructura de las dos isoformas de CD16: CD16A es un receptor transmembrana que se asocia a moléculas adaptadoras, y CD16B está anclado a la membrana celular mediante un glicosilfosfatidilinositol ( $\alpha$ -GPI). Obtenida de Bermúdez K. et al. 2019.

### 3.6. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA (WOUND HEALING)

El ensayo de cierre de herida estudia la migración celular *in vitro*. Se basa en la observación de la migración celular desde una herida realizada en la monocapa celular, se controla a medida que se capturan imágenes inmediatamente después de la creación de la herida, así como en puntos de tiempo determinados durante el cierre de la herida, posteriormente las imágenes se comparan para calcular la migración celular. De igual manera depende del tipo de células ya que algunas migran hacia la herida como poblaciones débilmente conectadas (fibroblastos) o como láminas de células (células epiteliales y endoteliales).

La migración de las células está regulada por la matriz extracelular (MEC) debajo de las células como por los factores solubles, así como las interacciones intercelulares en el caso de las células endoteliales y epiteliales.

La mayoría de las veces, las células se cultivan en placas de Petri pequeñas o en placas de 6 a 96 pocillos de acuerdo con los protocolos estándar de laboratorio hasta que forman un monocapa adherente compacta de células, en la que se forma un rasguño o una herida, la mayoría de las veces de forma lineal o circular. Este rasguño o herida se puede crear de varias maneras; la mayoría de las veces se genera a mano de forma secuencial en pozos individuales utilizando una pipeta, un raspador de células o

automáticamente a través de varios dispositivos comerciales o de fabricación propia. A continuación, se procede a la obtención de imágenes de células vivas en condiciones de incubación definidas mediante microscopía de lapso de tiempo en campo brillante o espectro de fluorescencia, lo que permite el estudio de la migración celular como un proceso dinámico registrado como un conjunto de información espacial y temporal.<sup>26, 27</sup>

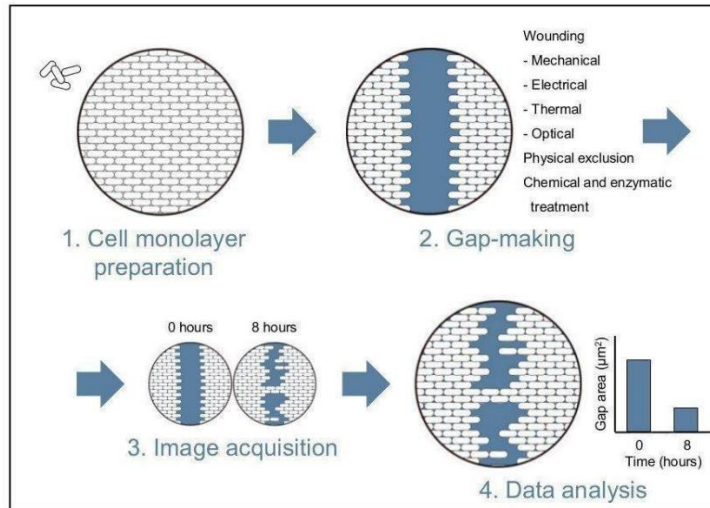


Fig. 14. Esquema del ensayo cierre de herida. Obtenida de CytoSMART, 2023.

### 3.7 CAPACIDAD CLONOGÉNICA

Se basa en analizar la capacidad de cada célula para someterse a una división ilimitada y poder convertirse en una colonia. El ensayo clonogénico es el método de elección para determinar la muerte celular después de un tratamiento con radiación ionizante o para determinar la eficacia de otros agentes citotóxicos. Solo una fracción de las células sembradas retiene la capacidad de producir colonias. Antes o después del tratamiento, las células se siembran en diluciones apropiadas para formar colonias en 1 a 3 semanas. Las colonias se fijan con glutaraldehído o etanol, se tiñen con cristal violeta y se cuentan usando un microscopio estereoscópico. Además, este ensayo también se ha desarrollado para detectar el origen de las células cancerosas aisladas de tumores y líneas de células cancerosas.

En un tumor, sólo unas pocas células conservan las características de células troncales tumorales, aquellas que tienen la potencia para sufrir alteraciones epigenéticas que conducen a la división celular asimétrica e iniciar la tumorigénesis. Este método ayuda a evaluar la capacidad de las células derivadas de tumores propagadas *in vitro* o las células troncales cancerosas de líneas celulares para convertirse en un nuevo tumor tras el trasplante en un receptor *in vitro*.<sup>28, 29</sup>

#### 4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los lípidos catiónicos son agentes primordiales para la generación de nanoacarreadores como sistemas de administración farmacéutica, por ello se han desarrollado combinaciones entre los grupos funcionales que conforman sus partes hidrófobas, hidrofílica y el enlazador. No obstante, en algunas investigaciones se ha demostrado que los lípidos basados en poliaminas como la espermidina o espermina como parte polar tienen una transfección mayor, al igual que el uso de una cola hidrofóbica de colesterol. Además, si el enlazador es de carbamato puede estabilizar el lípido en el sistema circulatorio mientras que se degradan en moléculas más pequeñas con una toxicidad mucho menor.

En 1991 Gao y Huang desarrollaron un método para la producción de liposoma, en esta investigación realizaron la síntesis de un lípido catiónico derivado de un colesterol utilizando cloroformiato de colesterol y N, N-dimetil etilendiamina a 0°C obteniendo un rendimiento del 21.8% de 3βN- ([N, N-dimetilaminoetanol)-carbamoil colesterol. Posteriormente en 1997, Aronex Pharmaceuticals, Inc. patentó un transportador anfipático en el cual la síntesis del lípido se realiza mediante la reacción de espermidina o espermina y cloroformiato de colesterol en cloruro de metileno y N, N-Diisopropiletilamina a temperatura ambiente durante 2 horas.

En el Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza se desarrollaron dos órdenes de producción para obtener espermidil- colesterol, basándose en el método de Gao-Huang y la patente expirada de Aronex Pharmaceuticals, Inc. La primera síntesis se clasifica como Lípido A mientras que la segunda Lípido B.

En las investigaciones previas realizadas por el Laboratorio de Oncología Celular, se ha determinado que en la producción del lípido B, se obtiene un rendimiento más alto; a pesar de ello el comportamiento del producto es inusual ya que es más agresivo para la transfección causando disrupciones en la membrana celular blanco mientras que el Lípido A no presenta este comportamiento.

Por tal razón, en el siguiente proyecto se realizó una comparación de ambos productos y métodos de síntesis; fabricando liposomas con el lípido A y lípido B; se evaluó la estimulación a la aparición de receptores CD16 de la membrana de la línea celular INBL, así mismo se realizaron ensayos citotóxicos complementarios en la línea celular HCT116, debido a la colaboración con el Instituto de Investigación, Desarrollo e

Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Alicante, España, de cierre de herida y capacidad clonogénica para determinar cuál de los dos compuesto es más eficaz, eficiente y seguro para la producción de estas nanovesículas.

## **5. HIPÓTESIS**

Se han encontrado diferencias en el rendimiento y comportamiento biológico de los productos de la síntesis del lípido catiónico espermidil-colesterol por el método A y B, en el presente trabajo se sintetizará el lípido catiónico utilizando ambos procedimientos, se fabricarán liposomas utilizando los productos A y B para analizar su comportamiento biológico mediante la estimulación de los receptores FcγRIII(CD16) en las membranas celulares de líneas tumorales y se espera analizar las posibles diferencias en el comportamiento biológico debido a los procesos de síntesis.

## 6. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y comparar dos métodos de producción del lípido catiónico espermidil-colesterol, clasificados como Lípido A y B, mediante la fabricación y evaluación biológica de liposomas preparados con los productos obtenidos de ambos métodos, para determinar cual tiene un mayor rendimiento y que cumpla con los parámetros de eficiencia, eficacia y seguridad.

### 6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar epermidil-colesterol establecidos en las órdenes de producción del Laboratorio de Oncología Celular
- Fabricación de los liposomas utilizando como materia prima los Lípidos A y B
- Realizar la caracterización de los liposomas por medio de citometría de flujo
- Evaluación de la actividad biológica de los liposomas con ambos lípidos catiónicos mediante la estimulación de una línea celular
- Determinar un método de síntesis adecuado para la producción de liposomas y realizar su orden de producción que asegure su reproducibilidad.

## **7. DISEÑO EXPERIMENTAL**

**Finalidad del Estudio:** Descriptiva

**Tipo de Estudio:** Experimental

**Secuencia Temporal:** Transversal

**Cronología de los hechos:** Prospectivo

**Población de Estudio:** Espermidil-Colesterol sintetizado por la orden de producción PNO-LOCE-240222, PNO-090822, PNO-LOCE-100323 y PNO-090323, en el Laboratorio de Oncología de la FES Zaragoza.

### **Variables**

- **Independientes**

Control negativo de células INBL

Espermidil-Colesterol (A y B)

Estímulo con liposomas (A y B)

- **Dependientes**

Expresión del receptor CD16

Capacidad de crecimiento celular en la siembra de colonias

Cierre de la herida realizada en las células HCT116

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1. MATERIALES

#### ➤ MEDIOS DE CULTIVO

- DMEM Gibco™
- RPMI 1640 Laboratorios MICROLAB S.A. DE C.V.

#### ➤ LÍNEAS CELULARES

- La línea utilizada se denomina INBL, la cual fue establecida previamente por el Laboratorio de Oncología de la FES Zaragoza a partir de un carcinoma epidermoide de cuello uterino compuesto por células grandes no queratinizadas de tumores metastásicos tipo IVB.
- La línea celular HCT116 se aisló del colon de un hombre adulto con cáncer de colon de morfología epitelial.

#### ➤ ANTICUERPO

CD16 Anticuerpo (3G8) PE: sc-19620. Santa Cruz Biotechnology, USA.

### 8.2. METODOLOGÍA

#### ● **Síntesis de Espermidil Colesterol A**

Se realizó conforme al procedimiento maestro para espermidin-colesterol establecido por el Laboratorio de Oncología Celular, brevemente se realizó una reacción donde se añadió espermidina (Sigma Aldrich®), más colesteril cloroformiato (Sigma Aldrich®), con cloroformo y se dejó reaccionar durante una hora posteriormente se realizaron lavados con una mezcla de cloroformo-metanol 1:1 y agua destilada. Se obtuvo un sólido viscoso de color amarillo.

#### ● **Síntesis de Espermidil Colesterol B**

Se realizó conforme al procedimiento maestro para espermidil-colesterol establecido por el Laboratorio de Oncología Celular, de manera general se añadió espermidina (Sigma Aldrich®) y colesteril cloroformiato (Sigma Aldrich®) en cloroformo en baño de hielo, se dejó reaccionar durante 3 horas. La reacción se dejó en refrigeración durante

18 horas. Después de transcurrir este tiempo, se vertió una solución de hidróxido de sodio 0.1 M, posterior a este paso se dejó reaccionar durante una hora. Al paso de este tiempo se realizó una extracción con solución salina al 50% y agua destilada. Al obtener la fase orgánica se recuperó un producto sólido de color blanco.

#### ● **Fabricación de liposomas**

Se realizó mediante dos métodos de producción conforme a la orden de producción de liposomas establecido por el Laboratorio de Oncología Celular, se pesaron 1.35 mg de espermidil colesterol del lote PNO-090822 y del lote PNO-LOCE240222, posteriormente se añadió fosfatidilcolina (Sigma Aldrich®), con ayuda de una Jeringa Hamilton de 25 µL, y cloroformo grado molecular, se agitó mediante un vortex y se secó mediante una corriente de nitrógeno, se añadió una solución de fosfatos y se sónico con ayuda del equipo Avanti Sonicator (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AB, EE. UU.) . Después, se añadió 5 mL de solución de PBS y se acondicionaron 1.5 mL de liposomas en tubos Eppendorf® para su posterior refrigeración. La estabilidad del liposoma es de 7 días en refrigeración.

El método utilizado en la Universidad Miguel Hernández de Elche en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria fue la fabricación de liposomas por fase reversa en el cual, se pesaron 1.35 mg de espermidil colesterol del lote PNO-LOCE-100323 y del lote PNO- 090323 y se colocaron en un matraz forma corazón esmerilado con dos bocas, también se añadió fosfatidilcolina (Sigma Aldrich®) y cloroformo, se utilizó para secar una corriente de argón, posteriormente se añadió solución de fosfatos y éter etílico. En una campana de extracción, se conectaron las mangueras a los conectores esmerilados del matraz y una de ellas se conectó a una bomba de vacío para extraer el disolvente mientras se agita durante 45 segundos, posteriormente se vuelve a agitar durante 45 segundos. Al formarse la película lipídica se añadieron 5 mL de solución de fosfatos para obtener la suspensión liposomal y se acondicionaron en tubos Eppendorf® de 5 mL.

#### ● **Caracterización de Liposomas**

Se tomó un tubo Eppendorf® acondicionado con liposomas A y B, se colocaron en tubos para citometría de flujo y se añadió solución de fosfatos para su posterior lectura en el citómetro y su caracterización en forward scatter (FSC) y side scatter (SSC) para analizar el tamaño y complejidad de los liposomas fabricados con ambos lípidos



cati3nicos en el Cit3metro de flujo Cytex™ Aurora.

#### ● **Evaluaci3n Biol3gica de los l3pidos A y B**

Se cultivaron en 9 cajas Petri de 60 mm  $1 \times 10^6$  c3lulas en cada una con medio RPMI sin suero durante 24 horas, se etiquetaron 3 cajas para control, 3 para l3pido A y 3 para l3pido B, al d3a siguiente se a3adieron los tratamientos con una concentraci3n de 300  $\mu\text{M}$  de liposomas A y B en sus respectivas cajas, se incubaron durante 30 minutos; al terminar el periodo de incubaci3n se retir3 el tratamiento y se lavaron con una soluci3n de fosfatos. Se obtuvo el bot3n celular de cada caja en un tubo Eppendorf® de 2 mL, se a3adieron 5  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-CD16 (3G8) PE (sc-19620. Santa Cruz Biotechnology, USA) y 100  $\mu\text{L}$  de PBS; se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Al finalizar el tiempo se realiz3 un lavado del bot3n celular y se fijaron las c3lulas con paraformaldeh3do al 4%. Se leen las muestras en el cit3metro Cytex™ Aurora.

#### ● **Capacidad Clonog3nica**

En el ensayo de capacidad clonog3nica, se sembraron  $2 \times 10^3$  c3lulas de HCT116 por pocillo en placas de 6 pozos y se aplic3 el tratamiento de liposomas preparados con espermidil-colesterol B, durante 24 horas, utilizando 6 concentraciones diferentes: 0  $\mu\text{M}$ , 37.25  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 225  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$ . Al d3a siguiente se retir3 el tratamiento, se adicion3 medio nuevo y se dejaron incubar por 7 d3as a 37°C. Despu3s, se retir3 el medio y se a3adi3 etanol absoluto frio al 70% durante 10 minutos para fijar las c3lulas. Al pasar el tiempo, se a3adi3 1 mL de cristal violeta, se dej3 te3ir durante 10 minutos, se realizaron lavados para retirar el excedente de colorante y se realiz3 el recuento de colonias en la placa.

#### ● **Cierre de Herida (Wound Healing)**

Para la t3cnica de cierre de herida se sembraron dos placas con  $5 \times 10^4$  c3lulas por pocillo en placas 96 pozos, al tener una confluencia del 100% se procedi3 a realizar el ensayo a3adiendo la sonda Hoechst, para te3ir el ADN celular y obtener una imagen precisa de la herida, posteriormente se realizaron heridas mediante la ayuda de la pipeta multicanal con puntas de 100  $\mu\text{L}$  en cada pocillo. Se a3adi3 el tratamiento con liposomas a una concentraci3n de 150  $\mu\text{M}$  y se coloc3 en el equipo Cytation 5 tomando fotograf3as cada hora por 24 horas.

## 9. RESULTADOS

### • Síntesis de Espermidil-Colesterol

En el Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza se ha diseñado un procedimiento para la fabricación de liposomas catiónicos, ya que estos favorecen la interacción membranal debido a su carga positiva. Así mismo, el laboratorio ha obtenido dos métodos de síntesis para la producción del lípido catiónico llamado espermidil-colesterol. Por ello en este trabajo se realizó una comparación de ambas síntesis del lípido clasificándolas en Lípido A y Lípido B. El proceso de purificación en el método B es más efectivo y tiene un mayor rendimiento.

Tabla 2. Rendimiento de la reacción obtenido en la síntesis de espermidil-colesterol por dos métodos diferentes.

Síntesis	Rendimiento promedio de reacción
Lípido A	35.97%
Lípido B	69.92 %

### • Caracterización de los liposomas

En los resultados de la caracterización de liposomas se observan los dot plots de ambas nano vesículas con los diferentes productos de las síntesis (Fig. 14).

Las poblaciones analizadas muestran el mismo tamaño y existe una pequeña variación en la complejidad al observarse en el histograma comparativo (Fig. 16), sin embargo, no es significativa. Por ello se puede decir que al utilizar el espermidil colesterol producido por cualquiera de los métodos

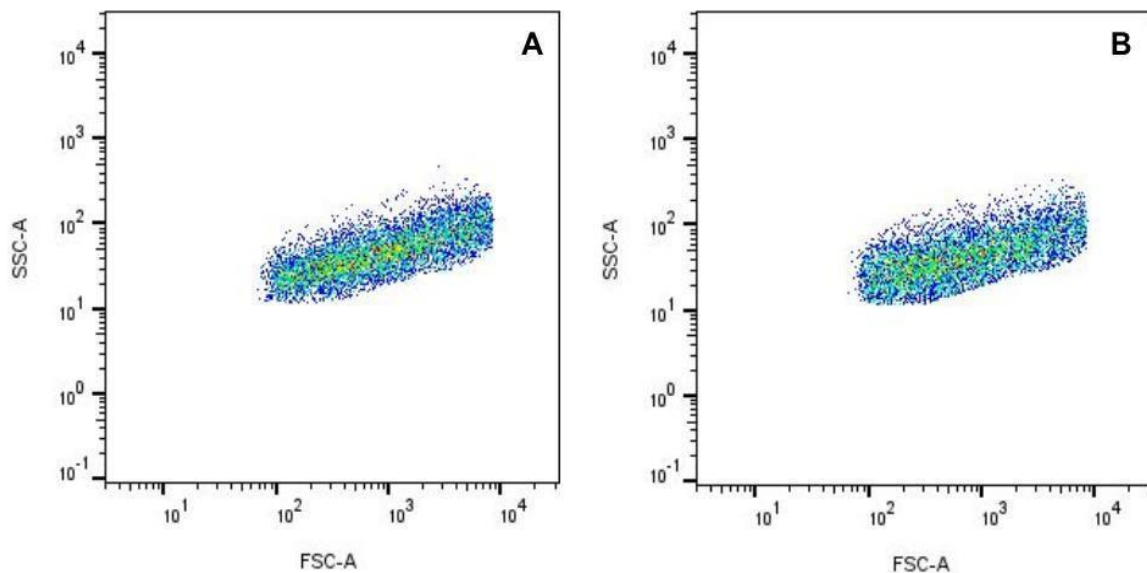
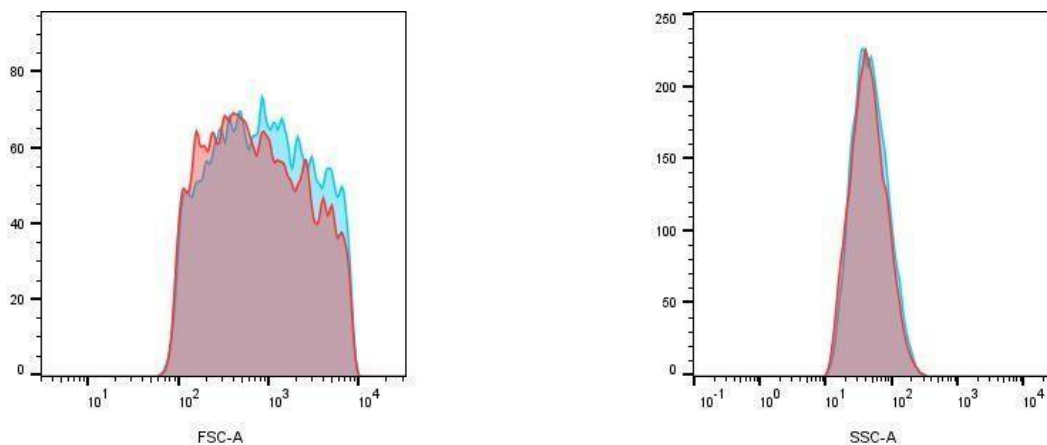


Fig.15. Caracterización de los liposomas fabricados con lípidos A y B respectivamente, representados en dot plots.



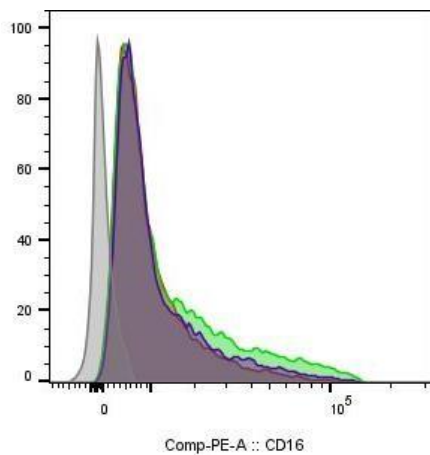
	Nombre	Eventos
	Liposomas vacíos A	7483
	Liposomas vacíos B	7120

Fig. 16. Histograma comparativo de tamaño (derecha) y complejidad (izquierda) de los liposomas fabricados con Lípidos A y B.

• **Estimulación del receptor CD16 con liposomas vacíos A y B**

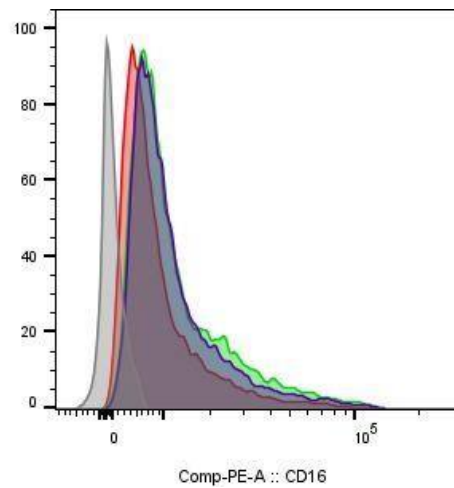
A continuación, se presentan los histogramas comparativos obtenidos por citometría de las células INBL control negativo sin marcador, INBL basal marcadas con anticuerpo anti-CD16 sin estimulación, células INBL estimuladas con lípido A y B durante 30 minutos y marcadas con anticuerpo anti-CD16. Cada ensayo representa una repetición del experimento en las mismas condiciones anteriormente explicadas. El desplazamiento promedio obtenido al estimular las células tumorales es de 14.79% con el Lípido A y 17.10% con el Lípido B, por lo cual se concluye que esta línea celular expresa el receptor CD16. (Fig. 17.)

ENSAYO 1



	Tratamiento	Eventos
■	INBL control negativo	15981
■	INBL basal	12088
■	INBL estimuladas con lípido A	13877
■	INBL estimuladas con lípido B	14156

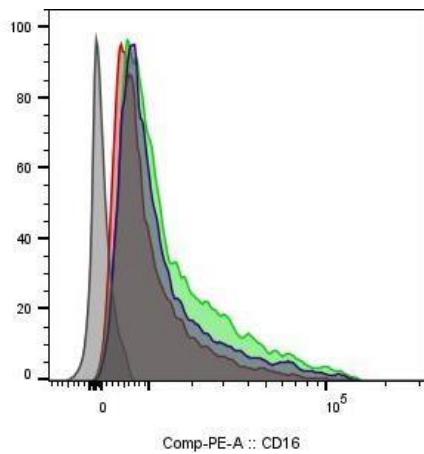
ENSAYO 2



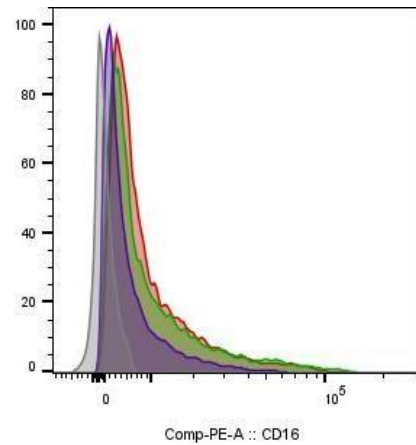
	Tratamiento	Eventos
■	INBL control negativo	15981
■	INBL basal	11522
■	INBL estimuladas con lípido A	12974
■	INBL estimuladas con lípido B	12052

### ENSAYO 3

### ENSAYO 4



Tratamiento	Eventos
INBL control negativo	15981
INBL basal	14156
INBL estimuladas con lípido A	12568
INBL estimuladas con lípido B	11899



Tratamiento	Eventos
INBL control negativo	15981
INBL basal	14139
INBL estimuladas con lípido A	13213
INBL estimuladas con lípido B	11085

Fig. 17. Histogramas obtenidos de los diferentes ensayos realizados para la evaluación de la estimulación del receptor CD16 en INBL, utilizando un control, células basales, células tratadas con liposomas A y células tratadas con liposomas B

#### ● Ensayo Cierre de Herida

Se realizó el ensayo cierre de herida para corroborar la seguridad de los liposomas empleando el lípido espermidil-colesterol B en la línea celular HCT116, las se muestra el control y una imagen con tratamiento(Fig. 18).Se puede observar en la figura D que la migración celular no se ve afectada por los liposomas y existe un mayor crecimiento celular cerca de la herida al compararse con la imagen en el tiempo 0 con tratamiento, con este resultado se confirma que los liposomas no son citotóxicos.

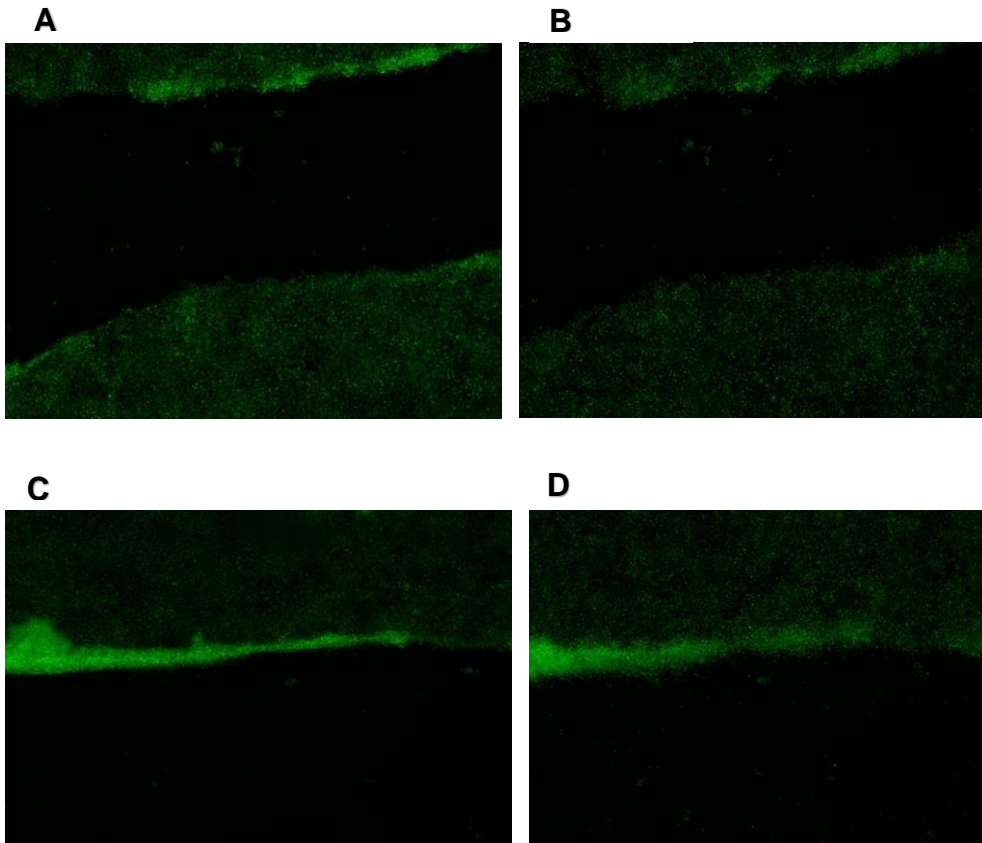


Fig. 18. Imagen de las heridas realizadas en la línea celular HCT116, donde A) herida control en el tiempo 0; B) herida control en 24 horas; C) se aplicó tratamiento de liposomas con lípido B en el tiempo 0 y D) se muestra la herida con tratamiento a las 24 horas.

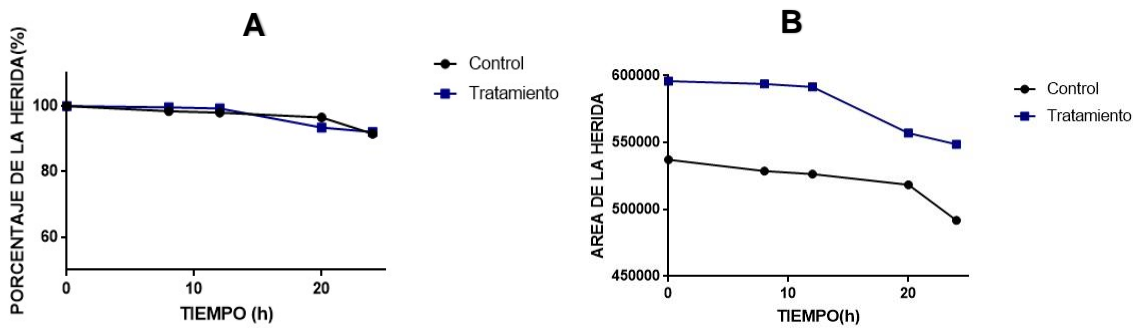


Fig. 19. A) Gráfico de % de apertura de la herida vs tiempo del control y tratamiento; B) Gráfico del área de la herida vs tiempo del control y tratamiento.

### • Capacidad clonogénica

Los resultados obtenidos en el ensayo de capacidad clonogénica, al ser tratadas con el tratamiento de liposomas B, muestra una disminución en el tamaño y diámetro de las colonias al compararse con el control, sin embargo, no existe una diferencia significativa entre el crecimiento y tamaño de las colonias a las diferentes concentraciones del tratamiento.

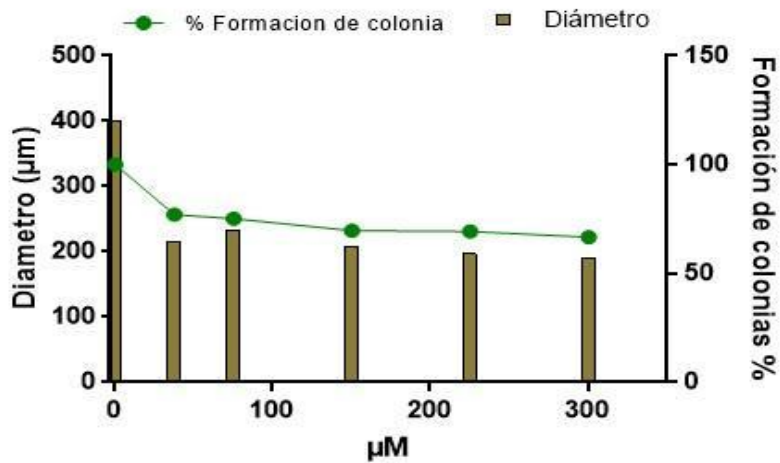


Fig. 20. Gráfico de doble eje representando el diámetro promedio de las colonias formadas vs concentración y % de formación de colonia vs concentración.

## 10. DISCUSIÓN

Los liposomas son sistemas de administración de fármacos que han demostrado tener mayor efectividad en tratamientos contra enfermedades inmunitarias y oncológicas, ya que tienen una mejor absorción del fármaco en las membranas, administración localizada, liberación controlada, entre otras ventajas. Por lo tanto, la investigación para mejorar los métodos de fabricación sigue en marcha.

Los compuestos que han resultado más eficientes y eficaces para la producción de liposomas son los esteroides como el colesterol, un enlazador que sea del grupo carbamato y una poliamina como la espermidina ya que mejoran la estabilidad en las bicapas lipídicas. La espermidina presenta un sistema de carga positiva que fortalece la interacción hidrofóbica. (Zou-Yu et al., 2022)

En el Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza se ha diseñado un procedimiento para la fabricación de liposomas catiónicos, ya que estos favorecen la interacción membranal debido a su carga positiva. Así mismo, el laboratorio ha obtenido dos métodos de síntesis para la producción del lípido catiónico llamado espermidil-colesterol. Por ello en este trabajo se realizó una comparación de ambas síntesis del lípido clasificándolas en Lípido A y Lípido B.

La reacción para obtener este lípido se basa en la formación de una amida mediante la sustitución del haluro de acilo en el colesteril cloroformiato por el nucleófilo del grupo amino presente en la espermidina. Para optimizar la síntesis A se recuperó el cloroformo utilizado mediante un rotavapor, mientras que en las síntesis B se vio favorecida al dejar la reacción durante 18 horas en refrigeración con los reactantes; espermidina y colesteril cloroformiato. Al transcurrir este tiempo se realizó la purificación con hidróxido de sodio, ya que en la reacción se liberan iones hidronio, finalmente se realizaron lavados con agua y solución salina para eliminar los rastros de impurezas. El rendimiento promedio obtenido en la síntesis B fue de 69.92% mientras que en la síntesis del lípido A fue de 35.97%, por lo que la reacción para obtener el lípido B es más eficiente.

Posteriormente al obtener los productos de ambas síntesis se realizaron liposomas, debido a que el lípido catiónico necesita estar conjugado al liposoma para estimular e incrementar la expresión del receptor FcγRIII (CD16) en la línea celular INBL. (Urias S., 2016)



En los resultados de la caracterización de liposomas se observan los dot plots de ambas nano vesículas con los diferentes productos de las síntesis (Fig. 15), las poblaciones analizadas muestran el mismo tamaño y existe una pequeña variación en la complejidad al observarse en el histograma comparativo (Fig. 16), sin embargo, no es significativa. Por ello se puede decir que al utilizar el espermidil colesterol producido por cualquiera de los métodos planteados en este experimento, son funcionales para el diseño liposomal.

En investigaciones previas por la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza se estableció que la línea celular INBL es capaz de expresar el receptor CD16 al estimularse con liposomas encapsulados con fosfatidilinositol (CoronaOrtega et al., 2019), sin embargo, en esta investigación el objetivo era determinar si los liposomas realizados con los lípidos catiónicos vacíos tienen el mismo efecto para desencadenar esta respuesta inmunitaria.

Se ha demostrado que la vía de absorción de nanopartículas lipídicas en células de carcinoma de cuello uterino está mediada por endocitosis, específicamente el proceso macropinocitosis, en el cual las células absorben una cantidad elevada de líquido extracelular formando una vesícula de 0.5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro llamado macropinosoma, en la cual podrían ser captados los liposomas. (Makvandi et al. 2021). Siendo así un sistema de liberación localizado para transportar tratamientos oncológicos.

Al explicar lo anterior los liposomas empleados, es posible que al incorporarse a la membrana celular, mediante la macropinocitosis anteriormente explicada, podrían activar la vía de señalización del receptor Fc $\gamma$ RIII, como se puede observar en los histogramas obtenidos por citometría de flujo, el desplazamiento promedio obtenido al estimular las células tumorales es de 14.79% con el Lípido A y 17.10% con el Lípido B (Fig. 17), por lo tanto si existe una expresión de receptores Fc en la línea celular INBL. La presencia del receptor Fc $\gamma$ RIII en la línea celular INBL es una respuesta adquirida por las células para evadir el sistema inmunológico antitumoral y activar vías de proliferación celular. (Díaz A, 2014) que podría ayudar en investigaciones futuras a desarrollar tratamientos para combatir el cáncer cervicouterino utilizando como blanco estos receptores.

Se realizaron estudios complementarios como el ensayo de cierre de herida y capacidad clonogénica en colaboración con el Instituto de Investigación, Desarrollo e

Innovación en Biotecnología en Elche, Alicante, España para corroborar la seguridad de los liposomas producidos por el lípido catiónico espermidil-colesterol B, se utilizó la línea celular HCT116, derivada de cáncer de colon para los experimentos, ya que no se contaba con la línea celular INBL.

El ensayo de cierre de herida (wound healing), consiste en romper mecánicamente la monocapa confluyente, dejando así un área sin células, a través del tiempo la apertura va cerrando ya que las células en el borde del daño, que no están inhibidas por el contacto, van desplazándose. En los resultados obtenidos (Fig 18) se puede comparar, en las fotografías obtenidas por el equipo en el tiempo 0 y 24 horas (A y B) contra las imágenes tratadas con liposomas a las 0 y 24 horas (C y D), la herida continúa abierta, sin embargo, existe una mayor confluencia celular cerca del borde de la herida superior. No obstante, no se logró observar el borde inferior de la herida debido a que el enfoque fotográfico no fue correcto por la falta de mantenimiento del equipo. Al realizarse las mediciones de área correspondientes a la apertura de la herida, se determinó que se realizó una herida de mayor diámetro en las células con tratamiento de liposomas como se puede visualizar en el gráfico B (Fig. 19)

En el gráfico comparativo A (Fig. 19), la tendencia del porcentaje de cierre de la herida es la misma en el control y en el tratamiento con liposomas conforme pasa el tiempo, por ello se puede decir que los liposomas fabricados con el espermidil-colesterol B no influyen en la migración celular, lo cual nos indica que no tiene un efecto citotóxico en las células.

Los resultados obtenidos en el ensayo de capacidad clonogénica, al ser tratadas con el tratamiento de liposomas B, muestra una disminución en el tamaño y diámetro de las colonias al compararse con el control (Fig. 20), sin embargo, no existe una diferencia significativa entre el crecimiento y tamaño de las colonias a las diferentes concentraciones del tratamiento. La diferencia entre el control y los tratamientos puede deberse al proceso de fabricación de liposomas, ya que en estas pruebas se fabricaron mediante el método de fase reversa y se utilizó un lote de producción diferente para cada ensayo, por ello existe una mayor probabilidad de que contengan restos de los solventes utilizados en su fabricación que pueden provocar una respuesta negativa hacia las células.

Al compararse los resultados obtenidos se establece que los liposomas realizados con espermidil-colesterol A y B tienen un tamaño y complejidad adecuado para utilizarse como nanotransportadores, así mismo ambos expresan el receptor CD16; el lípido B no tiene un comportamiento citotóxico como se planteaba al inicio del proyecto, ya que se demuestra con los ensayos complementarios de cierre de herida y capacidad clonogénica que no afecta el ciclo celular de la línea celular HCT116.

Por lo que ambos lípidos catiónicos espermidil-colesterol A y B pueden ser utilizados como sistemas de administración seguros, eficaces y eficientes para la investigación de tratamientos oncológicos. Así mismo, el espermidil-colesterol obtenido por la síntesis B muestra un comportamiento estable y seguro al interactuar con las células, por ello es más conveniente utilizarlo para la fabricación de liposomas, ya que el producto tiene un mejor rendimiento y se utiliza una menor cantidad de solventes para su producción

## **11. CONCLUSIONES**

Al compararse ambas formulaciones de liposomas mediante los ensayos biológicos se puede decir que los lípidos espermidil-colesterol obtenidos por las síntesis A y B tienen comportamientos similares, ya que al utilizarse como precursores de liposomas muestran el mismo tamaño y complejidad, de igual manera estimulan las células tumorales de cérvix para expresar el receptor FcγRIII.

El lípido B no muestra una actividad perjudicial hacia las células como se puede corroborar con los ensayos de cierre de herida y capacidad clonogénica. Así mismo, en la reacción del método B se obtiene un mayor rendimiento y no genera una gran cantidad de residuos como en el método A. Por ello se podría concluir que el lípido B puede ser utilizado con seguridad para la producción de sistemas liposomales.

## **12. PERSPECTIVAS**

Para tener un amplio conocimiento del lípido catiónico espermidil-colesterol, se podría realizar un análisis de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas para determinar los componentes que están presentes en los productos de las síntesis A y B, analizar si los niveles de trazas de impurezas son bajos y así mismo establecer una ficha técnica del compuesto mediante la determinación de sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas.

### 13. REFERENCIAS

1. Carvajal C. Lípidos, lipoproteínas y aterogénesis. San José, CR: Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS), 2019. [Consultado el Diciembre 2021] Disponible en: <https://repositorio.binasss.sa.cr/repositorio/bitstream/handle/20.500.11764/721/lipidos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
2. Edwards K. Liposomes in Analytical Methodologies. [Internet]. New York: Taylor & Francis Group; 2016 [Consultado en Febrero 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1201/b19912>
3. López R. et Olivares Liposomas, de la física biológica a la medicina molecular. Ciencia [Internet] 2022 [Consultado en Enero 2023]; 73(3). Disponible en: [https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/73\\_3/PDF/05\\_73\\_3\\_1278.pdf](https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/73_3/PDF/05_73_3_1278.pdf)
4. Hernández A. El pequeño mundo de los liposomas. Biol.on-line [Internet] 2017 [Consultado en Noviembre 2022]; 6(2). Disponible en: [https://revistes.ub.edu/index.php/b\\_on/article/view/19521/21873](https://revistes.ub.edu/index.php/b_on/article/view/19521/21873)
5. Torres D. et Begoña Seijo. Nano sistemas Lipídicos. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela. 2009. [Consultado el Noviembre 2022] Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/230316735.pdf>
6. Zhi D, Zhang S, Cui S. et al. The Headgroup Evolution of Cationic Lipids for Gene Delivery. Bioconjugate Chem [Internet] 2013 [Consultado Febrero de 2023]; 24(4) pp. 487-519. Disponible en: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1021/bc300381s>
7. Lee E, Harris D, Slegel C, Eastman S et al. Genzyme Corporation. Cationic amphiles containing spermine or spermidine cationic group for intracellular delivery of therapeutic molecules. US; 5, 783,565. 1998
8. Zheng L, Xie Y, Sun Z. et al. Serum Spermidine in Relation to Risk of Stroke: A

Multilevel Study. *Front. Nutr.* [Internet] 2022 [Consultado en Febrero 2023]; 9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.843616/full>

9. Aguirre Y, Aguado K. et González I. La nano medicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ. quím.* [Internet] 2016. [Consultado en Mayo 2022]; 27(4). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>

10. Gao X et Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*. Universidad de Tennessee, Estados Unidos de América: 1991; 179(1) pp. 280-285.

11. Yu Z, Zhen Y, Zhao Y. et al. pH-sensitive, tail-modified, ester-linked ionizable cationic lipids for gene delivery. *Biomaterials Advances* [Internet] 2022 [Consultado en Octubre 2022]; 139. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212984>

12. Malaekheh B, Malaekheh M, Kazemi R. et Ramezani M. Preparation, characterization, transfection efficiency, and cytotoxicity of liposomes containing oligoamine-modified cholesterol as nanocarriers to Neuro2A cells. *Nanomedicine*. [Internet]. 2009. [Consultado el Diciembre 2022] 5(4) pp. 457-462. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.02.001>

13. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [Internet] 2013 [Consultado Febrero 2023]; 8 (102). Disponible en: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/1556-276X-8-102>

14. Hamdi N, Dima K, Usama S. et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon* [Internet] 2022 [Consultado en Enero 2023]; 8(5). Disponible en: [10.1016/j.heliyon.2022.e09394](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394)

15. Hu Y, Jun R, Zeng F. et al. Liposomes in Drug Delivery: Status and Advances. En: Shen Y. *Biomaterial Engineering*. Berlin: Springer; 2021. pp 3-24. Disponible en: [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-3-662-49320-5\\_1](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-3-662-49320-5_1)

16. Macey M. Principles of Flow Cytometry. [Internet]. En: Macey, M. Londres UK: Humana Press; 2007. Pp.1-15. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-59745451-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745451-3_1)
17. Longobardi A. Flow Cytometry: First Principles. 2ª Edición. New York: Wiley-Liss; 1992.
18. Marquina Á. Diseño de paneles en citometría de flujo. [Internet]. España: Hospital Nacional de Parapléjicos; 2022. [Consultado en Marzo de 2023]. Disponible en: <https://saishnp.com/2022/07/20/disenio-de-paneles-en-citometria-de-flujo/>
19. Beltrán N. et González C. Técnicas de cultivos celulares e Ingeniería de Tejidos. [Internet] Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa; 2016. [Consultado en Mayo de 2022]. Disponible en: [https://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Tecnicas\\_de\\_Cultivos\\_Celulares\\_e\\_Ingenieria\\_de\\_Tejidos.pdf](https://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Tecnicas_de_Cultivos_Celulares_e_Ingenieria_de_Tejidos.pdf)
20. Sigma-Aldrich. Fundamental Techniques in Cell Culture: Laboratory Handbook. 3ª Edición. Alemania: Sigma Aldrich Corp.; 2016. [Consultado en Mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/425/663/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf>
21. Morales J, Ulloa A, Castro S. et al. Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. Tecnología en Marcha. [Internet] 2019 [Consultado en Julio 2022]; 32 pp 56-65. Disponible en: [https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/download/4628/4234/12934](https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/download/4628/4234/12934)
22. Abul K, Lichtman A. et Pillai S. Inmunología Básica: Funciones y trastornos del sistema Inmunitario. 5ª Edición. España: Elsevier; 2016.
23. Male D., Brostoff J, Roth D et Roitt I. Inmunología. 8ª Edición. Londres: Elsevier; 2013.

24. Bermudez K, Hidalgo G. et al. Anticuerpos monoclonales biespecíficos: desarrollo, producción y uso como terapia anticancerígena. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*. [Internet] 2019 [Consultado en Julio 2022]; 13(1). Disponible en: <https://doi.org/10.15517/rmucr.v13i1.37573>
25. Yeap W, Wong K, Shimasaki N. et al. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep*. [Internet] 2016 [Consultado Octubre 2022]; 6(34310). Disponible en: 10.1038/srep34310
26. Vašínková M., Krumnikl M., Mikulková Z, Gajdoš P. et Kriegová E. Simple Approach for Dynamics Evaluation of Scratch Wound Healing Assay. *Advances in Intelligent Networking and Collaborative Systems*. [Internet] 527 pp. 380–392.
27. Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol*. [Internet] 2020 [Consultado en Marzo de 2023]; 2109 pp. 225-229. Disponible en: 10.1007/7651\_2019\_259
28. Rajendran V. et Vilas Jain M. In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. *Methods in Molecular Medicine*. [Internet] 2018 [Consultado en Marzo 2023]; 1692 pp. 89-95. Disponible en: 10.1007/978-1-4939-7401-6\_8
29. Nikko B, Samaga D. et al. The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. *Radiat Oncol*. [Internet] 2020 [Consultado en Abril 2023]; 15 (248). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13014-020-01697y>
30. Chaudhary N, Jayaram K, Bodepudi V. et Hogan M. Aronex Pharmaceuticals, Inc. Amphipathic nucleic acid transporter. *US*; 5, 614,503.1997.
31. Corona T, Valle A, Soto I. et al. Intracellular CD16 as a New Phenotype Marker: CD16 Inter in Adherent Leukocytes and Cervical Cancer Cells Can Be Induced by Liposomes Containing Phosphatidylinositol to Be Expressed in Their Cellular Membranes. *Biomark Applic* [Internet] 2018. [Consultado en Agosto 2022] 2018(1). Disponible en: <https://www.gavinpublishers.com/article/view/intracellularcd16-as-a-new-phenotype-marker-cd16-inter-in-adherent-leukocytes-and-cervicalcancer-cells-can-be>



induced-by-liposomes-containing-phosphatidylinositol-to-beexpressed-in-their-cellular-membranes.

32. Cayetano D. Separación de Isómeros de Espermidil-Colesterol mediante HPLC de fase reversa para su uso en la fabricación de nanovesículas catiónicas transportadoras de fármacos [Tesis] Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza; 2023.

33. Campos B. Evaluación antiinflamatoria de un sistema nanoacarreador en gel que contiene penicilamina para el tratamiento de ratones CBA como modelo experimental de artritis reumatoide. [Tesis] Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza; 2020.

34. Urias S. Efecto de liposomas formulados, en la vía de señalización PI3K/AKT y expresión de receptores FCγRIII (CD16) en células tumorales. [Tesis] Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza; 2016.

35. Castillo G. Determinación de la expresión de GLUT4 en membrana de células tumorales inducido por liposomas catiónicos que contienen PI (4,5) P2. [Tesis] Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza; 2021.

36. Losada Echeberría M. Estudio de la capacidad antiproliferativa en modelos celulares de cáncer de mama de un extracto de hoja de olivo enriquecido en polifenoles [Tesis Doctoral]. Alicante: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2019.

37. Makvandi P, Chen M, Sartorius P. et al. Endocytosis of abiotic nanomaterials and nanobiovectors: Inhibition of membrane trafficking. *Nanotoday* [Internet] 2021 [Consultado Junio 2023]; 40, 101279. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101279>