



Universidad Nacional Autónoma de México.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

Estudios de compatibilidad y estabilidad de una formulación liposomal
con IL-2 en gel con criopreservadores trehalosa y glicerol

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA
CONTRERAS NAVA LAURA

JURADO DE EXAMEN

DIRECTORA: DRA. MARIA TERESA CORONA ORTEGA

ASESOR: DR. RAMON SOTO VAZQUEZ

ASESOR: DR. ARTURO VALLE MENDIOLA

SINODAL: DR. BENNY WEISS STEIDER

SINODAL: DR. LEONARDO TRUJILLO CIRILO



CIUDAD DE MÉXICO, 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento de los proyectos DGAPA-PAPIME PE211323 y DGAPA-PAPIIT IN222623, en el Laboratorio de Oncología Celular (LOCE) ubicado en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ). Dirigido por la Dra. María Teresa Corona Ortega, asesorado por el Dr.

Agradecimientos

A mi madre, quien, con su fortaleza inquebrantable, su valentía y su amor infinito ha sido el corazón que me impulsa y la luz que me guía. Mamá, eres una mujer extraordinaria, fuerte, valiente y cariñosa, siempre dispuesta a protegernos con esa mezcla perfecta de ternura y coraje. Gracias porque, con cada palabra y cada gesto, me has enseñado a enfrentar los desafíos con valentía y a mirar más allá de los obstáculos. Así como el águila extiende sus alas para enfrentar los vientos más fuertes, tú me has dado el poder de volar alto y superar cada adversidad. Contigo aprendí a elevarme con la mirada fija en el horizonte, a enfrentar los desafíos del vuelo sin temor y a creer en mis propias capacidades. Tu amor ha sido mi refugio en las tormentas, mi impulso en los momentos de duda y la razón por la que sigo soñando con alcanzar nuevas alturas. Eres mi fuerza, mi ejemplo y el motivo por el que me esfuerzo cada día por ser mejor. Gracias, mamá, por ser mi pilar, mi guía y mi mayor inspiración. Este logro es tan tuyo como mío, porque sin tu fortaleza y tu amor, este camino habría sido imposible.

A mi padre, un hombre valiente y fuerte, quien siempre ha sido un ejemplo de integridad y determinación. Papá, aunque no siempre expresas tus emociones con palabras, tu forma de demostrar amor y apoyo es única y profunda. Gracias por confiar en mí incluso en los momentos en que yo mismo dudaba de mis capacidades. Esa confianza tuya ha sido una fuerza que me ha impulsado a levantarme tras cada caída y a superar los desafíos con valentía. Tu valentía al enfrentar la vida me ha enseñado que ser fuerte no significa no sentir miedo, sino avanzar a pesar de él, con firmeza y convicción. Gracias por inculcarme la importancia de la responsabilidad, el esfuerzo y el trabajo honesto, valores que me han guiado en cada paso de este camino. Tus acciones han demostrado siempre que crees en mí, y por ello, este logro también es tuyo. Tus enseñanzas y tu ejemplo han sido esenciales en cada etapa de mi vida. Gracias, papá, por ser mi guía y mi ejemplo de fortaleza y dedicación.

A mis hermanos, mis eternos compañeros de vida y mis primeros ejemplos de lucha y valentía.

A José Manuel, mi superhéroe, quien siempre ha sido un modelo de integridad y fortaleza. José, admiro profundamente tu valentía, no solo en cómo enfrentas los desafíos, sino también en la generosidad y amor con los que cuidas de quienes te rodean. Tu sentido de protección, tu responsabilidad y tu espíritu noble han sido un faro para mí. Tu amor y dedicación me han mostrado que, con esfuerzo y perseverancia, todo es posible. Gracias por ser un pilar en mi vida y un ejemplo de lo que significa ser fuerte, valiente y noble.

A Sergio, mi ejemplo de tenacidad y amor desinteresado. Sergio, admiro tu perseverancia y tu capacidad para transformar cualquier desafío en una oportunidad para crecer. Tu lealtad como hermano y amigo, siempre dispuesto a escuchar y a brindar apoyo, ha sido un pilar para mí. Gracias por ser un modelo de lucha, alguien a quien siempre miraré con admiración y un motivo constante para esforzarme por ser mejor.

Gracias, mamá, papá, José y Sergio, por ser mi guía, mi fuerza y mi inspiración en cada paso de este camino. Este logro no es solo mío; es de ustedes también, porque en cada etapa de este recorrido, sus enseñanzas, su amor y su apoyo han sido mi mayor fortaleza.

A la Dra. Teresa Corona, un ser humano excepcional y una científica admirable, cuyo trabajo y dedicación han dejado una huella imborrable en mi vida. Doctora, usted es mi ejemplo a seguir, no solo por su extraordinaria trayectoria profesional, sino por la pasión con la que se entrega a cada proyecto y por la forma en que inspira a quienes tenemos el privilegio de conocerla.

Su amor por la ciencia y su compromiso con el conocimiento son contagiosos, pero lo que realmente la distingue es su bondad y su humanidad. Su amabilidad y generosidad no solo enriquecen a quienes la rodean, sino que también nos motivan a esforzarnos por ser mejores en todos los aspectos de nuestras vidas. Gracias por demostrar que es posible alcanzar la excelencia sin perder la esencia de lo que nos hace humanos: la empatía, la humildad y el deseo de ayudar a los demás.

A la Dra. Marta Castro, cuyo generoso apoyo fue clave para el desarrollo de mi proyecto. Su disposición para compartir su conocimiento y brindarme las herramientas necesarias en momentos cruciales demuestra no solo su compromiso con la ciencia, sino también su gran calidad humana.

Gracias, doctora, por su amabilidad y por contribuir de manera tan significativa a este trabajo. Su ayuda fue fundamental para que pudiera alcanzar este logro, y siempre recordaré con gratitud el impacto positivo de su apoyo en mi formación y en este proyecto.

Contenido

Abreviaturas	6
Resumen	7
1.Introducción	8
2. Marco teórico	10
2.1 Liposomas	10
2.2 Estructura y Composición de los Liposomas	11
2.3 Clasificación de Liposomas	12
2.3.1 Clasificación por Tamaño	12
2.3.2 Clasificación por Lamelaridad	14
2.3.3 Clasificación por Composición Lipídica	14
2.3.3.1 Liposomas neutros	14
2.3.3.2 Liposomas Zwitteriónicos (Sin Carga Neta)	15
2.3.3.3 Liposomas cargados.....	15
2.4 Funcionamiento Básico: Encapsulación y Liberación Controlada	16
2.4.1 Encapsulación	17
2.4.2 Liberación Controlada	17
2.5 Estructura y Mecanismo de Acción de IL-2	18
2.6 Rol de IL-2 en el Sistema Inmunológico	18
2.7 Aplicaciones de IL-2 en el Tratamiento del Cáncer	18
2.8 Liposomas y su Eficiencia en la Administración de IL-2	19
2.9 Criobiología y Preservación de Formulaciones Farmacéuticas	19
2.10 Rol de la Trehalosa y el Glicerol como Agentes Crioprotectores	20
2.11 Efecto Sinérgico de la Trehalosa y el Glicerol en Formulaciones Avanzadas	22
2.12 Aprobación Regulatoria y Relevancia Clínica	22
2.13 Aplicación Transdérmica: Funcionalidad y Tipos de Geles	24
2.14 Mecanismo de Acción	24
2.15 Aplicación de Geles Transdérmicos	24
2.16 Reacciones en la Aplicación Transdérmica	24
2.17 Formulaciones en Gel	24
2.18 Tipos de Geles Transdérmicos	25
2.19 Policarbofilo Noveon® y Tipos de Geles Transdérmicos	26
2.20 Estudios de Estabilidad	26

2.21 Teoría de la Ley de Arrhenius	27
2.22 Aplicaciones y Limitaciones.....	28
2.23 Legislación farmacéutica en México sobre estabilidad y compatibilidad.....	29
3. Planteamiento del problema	30
4. Justificación	30
5. Objetivo General	31
5.1 Objetivos Específicos	31
6.1 Preparación de liposomas.....	32
6.2 Fabricación de Gel mucoadhesivo.....	32
6.3 Criopreservación	33
6.4 Evaluación de estabilidad y compatibilidad por citometría de flujo	33
7 resultados y discusión:.....	34
7.1 Aplicación de la técnica de citometría de flujo para identificar y regionalizar liposomas.....	34
7.2 Evaluación de estabilidad de tamaño de liposomas sin y con IL-2 en gel con criopreservadores.....	39
8. Comentarios finales	49
9. Conclusiones	50
Referencias.....	51

Abreviaturas

Abreviatura:

SUVs- LUVs: Vesículas Unilamelares

MLVs: Vesículas multilamelares

MVVs: Vesículas multivesiculares

IL2: Interleucina 2

mM: Melanoma Metastásico

mRCC: Carcinoma de Células Renales Metastásicas

NK: Natural Killer

Tregs: Células T reguladoras

HD IL-2: Altas dosis de Interleucina 2

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

Resumen

Los liposomas han revolucionado la administración de fármacos al permitir una encapsulación eficiente y una liberación controlada de compuestos terapéuticos. Este trabajo se centra en el desarrollo de formulaciones liposomales con interleucina-2 (IL-2) en gel, utilizando criopreservadores como trehalosa y glicerol para evaluar su estabilidad estructural y funcionalidad durante el almacenamiento a -20°C , -80°C y -190°C . La IL-2, una citocina clave en la inmunoterapia, enfrenta limitaciones por su rápida degradación y efectos secundarios sistémicos. La encapsulación en liposomas protege su estructura, mejora su biodisponibilidad y permite una liberación específica en el microambiente tumoral, ofreciendo una alternativa prometedora en terapias contra el cáncer.

El estudio se llevó a cabo mediante la preparación de liposomas con y sin IL-2, incorporados en geles con diferentes criopreservadores. Se evaluó la estabilidad de las formulaciones a través de citometría de flujo, observando el tamaño de las partículas en intervalos de dos a seis meses. Los resultados indicaron que tanto la trehalosa como el glicerol brindaron protección inicial, pero su efectividad disminuyó a largo plazo, evidenciándose un incremento en el tamaño de los liposomas debido a procesos de fusión y agregación. La combinación de ambos criopreservadores mostró un mejor desempeño relativo a -80°C , pero no eliminó completamente las alteraciones estructurales.

En conclusión, los liposomas en gel con criopreservadores demostraron estabilidad limitada en periodos prolongados. La temperatura de -80°C fue la más favorable, aunque insuficiente sin optimizaciones adicionales. Los cambios estructurales observados subrayan la importancia de explorar nuevas combinaciones de criopreservadores y evaluar la actividad biológica de los agregados liposomales formados, lo que podría aportar información crucial para el desarrollo de sistemas de liberación más estables y efectivos en oncología.

1.Introducción

Los liposomas, como sistemas de liberación de fármacos, han revolucionado el campo de la terapia farmacológica debido a su versatilidad y eficacia (Bozzuto & Molinari, 2015; Martínez & López, 2022). Su capacidad para encapsular una amplia gama de compuestos terapéuticos, desde fármacos hidrofílicos hasta lipofílicos, los convierte en una herramienta poderosa en el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el cáncer (Bulbake *et al.*, 2017; Düzgüneş & Gregoriadis, 2005). La estructura de estas vesículas, compuestas por una bicapa lipídica que simula las membranas celulares, proporciona un entorno ideal para la protección y liberación controlada de los fármacos, lo que contribuye a mejorar su biodisponibilidad y reducir la toxicidad sistémica (Pérez & García, 2023; Lasic, 1992).

En el contexto específico del cáncer cervicouterino, uno de los tipos de cáncer más comunes entre las mujeres, se han explorado diversas estrategias terapéuticas para mejorar la eficacia de los tratamientos y reducir los efectos secundarios adversos (Soto & Ortiz, 2019; Corona *et al.*, 2010). Entre estas estrategias, el uso de interleucina-2 (IL-2) es una opción prometedora debido a su capacidad para modular la respuesta inmune antitumoral (Romero & Morilla, 2021; Corona *et al.*, 2009). La IL-2 es una citocina clave en la activación y proliferación de células T y células asesinas naturales (NK), componentes esenciales del sistema inmune implicados en la destrucción de células cancerosas (Ortega *et al.*, 2023; Gómez & Torres, 2023). Sin embargo, su administración sistémica puede desencadenar efectos secundarios graves, limitando su utilidad clínica (López *et al.*, 2023; Sánchez & Pérez, 2022).

La encapsulación de IL-2 en liposomas presenta una oportunidad única para mejorar la eficacia terapéutica de esta citocina mientras se minimizan los efectos secundarios sistémicos (Danhier *et al.*, 2010; González & Rodríguez, 2021; Díaz & Rodríguez, 2021). Los liposomas se han utilizado como vehículos de entrega específicos, dirigiendo la IL-2 hacia el tejido tumoral y permitiendo una liberación controlada en el microambiente tumoral (Corona & Soto, 2022). Estudios recientes han demostrado que la encapsulación de IL-2 en liposomas no solo mejora su estabilidad y vida media en circulación, sino que también potencia su actividad antitumoral, lo que resulta en una mayor eficacia terapéutica y una reducción de la toxicidad sistémica (Martínez & López, 2019; Soto & Ortiz, 2019).

A pesar de los avances en el desarrollo de liposomas como sistemas de liberación de fármacos, su estabilidad sigue siendo un factor crítico que afecta su eficacia clínica, especialmente durante el almacenamiento prolongado (García & López, 2020). La criopreservación ha surgido como una estrategia eficaz para abordar este desafío, utilizando crioprotectores como la trehalosa y el glicerol, que ayudan a preservar la integridad estructural de los liposomas durante la congelación y el almacenamiento a bajas temperaturas (Hernández & Díaz, 2020; Martínez & López, 2019; Pérez & Sánchez, 2019). Diversos estudios han demostrado que estos crioprotectores mejoran la estabilidad a largo plazo de las formulaciones liposomales, manteniendo su capacidad para liberar los compuestos terapéuticos de manera controlada en el microambiente tumoral (Fernández & Pérez, 2022).

Además, la formulación de liposomas en gel ofrece una estrategia de soporte que mejora tanto la estabilidad física del sistema como el control sobre la liberación del fármaco (Vega *et al.*, 2022;). Los geles, en particular los hidrogeles, proporcionan una matriz tridimensional que retiene grandes cantidades de agua, creando un entorno adecuado para el alojamiento de liposomas (Rodríguez & Vega, 2018; López *et al.*, 2021). Este enfoque permite una mayor retención del fármaco en el sitio de acción y minimiza la necesidad de dosis frecuentes, lo que puede reducir los efectos secundarios sistémicos (López *et al.*, 2022). Así, la combinación de liposomas en gel con crioprotectores como la trehalosa y el glicerol no solo optimizaría la estabilidad y durabilidad de la formulación, sino que también facilitaría una administración más controlada y segura en tratamientos oncológicos (Hernández & Díaz, 2020; Fernández & Pérez, 2022).

2. Marco teórico

2.1 Liposomas

Han transcurrido más de cinco décadas desde la descripción seminal de los sistemas lipídicos conocidos como liposomas, en un estudio seminal realizado por Bangham y colaboradores en 1965 (Düzgüneş & Gregoriadis, 2005; Liu *et al.*, 2022). Desde entonces, la nanotecnología, mediante el uso de nanovesículas como los liposomas, se ha consolidado como una herramienta crucial en la formulación de medicamentos (Bulbake *et al.*, 2017; Martínez & López, 2022). Esta tecnología ofrece múltiples ventajas, entre ellas, la protección de moléculas activas, el control de la liberación del fármaco, y la mejora de propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas. Asimismo, facilita la solubilidad y biodisponibilidad, y permite la dirección precisa hacia objetivos terapéuticos específicos (Smith & Elkordy, 2018; Ortega *et al.*, 2023; Bozzuto & Molinari, 2015).

Los liposomas son sistemas versátiles y biodegradables que han diversificado sus aplicaciones, abarcando desde sistemas avanzados de liberación de fármacos hasta estrategias de supresión génica intracelular, gracias a su estructura de doble compartimento, capaz de alojar tanto moléculas hidrofílicas como lipofílicas (Corona *et al.*, 2016, 2013; Ortega *et al.*, 2023; Vega *et al.*, 2022). Estas vesículas esféricas, compuestas principalmente por fosfolípidos anfifílicos y colesterol, presentan una bicapa cerrada que encapsula componentes acuosos y permite la asociación con fármacos hidrofóbicos, optimizando así su actividad farmacológica y estabilidad (Sercombe *et al.*, 2015; Pérez & García, 2023).

La capacidad de los liposomas para atrapar sustancias tanto lipofílicas en su membrana como hidrofílicas en su núcleo acuoso, con tamaños que varían entre nanómetros y micrómetros, les permite encapsular una amplia gama de sustancias, incluyendo medicamentos, genes y marcadores para imagenología médica (Kieler *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2022). Esta estructura hace que los liposomas actúen como eficientes vectores, transportando compuestos a sitios específicos y protegiendo su carga frente a influencias externas, minimizando además el riesgo de daño a tejidos sanos (Bozzuto & Molinari, 2015; López & Olivares, 2022; Vega *et al.*, 2022).

La clasificación de los liposomas puede realizarse según distintas variables, como su composición, vía de administración o método de obtención, lo cual amplía su aplicabilidad

en la formulación de medicamentos (Panahi *et al.*, 2017; Oropesa & Jauregu, 2012). En particular, los liposomas han demostrado ser una opción destacada en el desarrollo de fármacos dérmicos y transdérmicos debido a su composición lipídica, que presenta una estructura semejante a la de la piel (Felice *et al.*, 2014; Souto *et al.*, 2021). Esto ha impulsado la investigación y desarrollo de formulaciones liposomales de diversas generaciones, ampliando significativamente las posibilidades de aplicación en sistemas farmacéuticos (Panahi *et al.*, 2017; López & Olivares, 2022).

El valor de los liposomas en la formulación de medicamentos radica en su capacidad comprobada de mejorar la eficacia y biodisponibilidad de los compuestos encapsulados (Almeida *et al.*, 2020; López & Olivares, 2022). Estos sistemas de transporte, que imitan las propiedades de las membranas celulares y pueden incorporar una gran variedad de compuestos, son altamente valorados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Martínez & López, 2022; López *et al.*, 2023). Además, la versatilidad de los liposomas en la encapsulación de moléculas de distinta naturaleza permite modificar propiedades críticas de los fármacos, tales como la solubilidad y estabilidad, mejorando su comportamiento en un entorno biológico (Felice *et al.*, 2014; Sercombe *et al.*, 2015).

2.2 Estructura y Composición de los Liposomas

Los liposomas son vesículas artificiales que consisten en una bicapa de fosfolípidos que rodea un núcleo acuoso (Kim *et al.*, 2018; Campos, 2020). Sus propiedades, como tamaño, composición, carga eléctrica y lamellaridad, pueden variar según su aplicación. La estructura de los fosfolípidos, compuesta por una cabeza polar y una cola apolar, permite la formación de una bicapa en la que las cadenas hidrofóbicas quedan alineadas en paralelo, creando una región hidrófoba entre ambas capas, mientras que las cabezas hidrofílicas se orientan hacia el medio externo e interno de la vesícula (Mahmoodi *et al.*, 2019; Campos, 2020). Esta disposición estructural facilita que los liposomas encapsulen moléculas hidrofílicas en su compartimento acuoso y moléculas hidrofóbicas en la bicapa lipídica (Chen *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2017).

Las características de los liposomas los hacen particularmente relevantes en diversas disciplinas como la biología, la medicina y las ciencias farmacéuticas, así como en aplicaciones cosméticas y dermocosméticas, debido a su capacidad para proteger y liberar de manera controlada diferentes tipos de moléculas (Nakhaei, 2021).

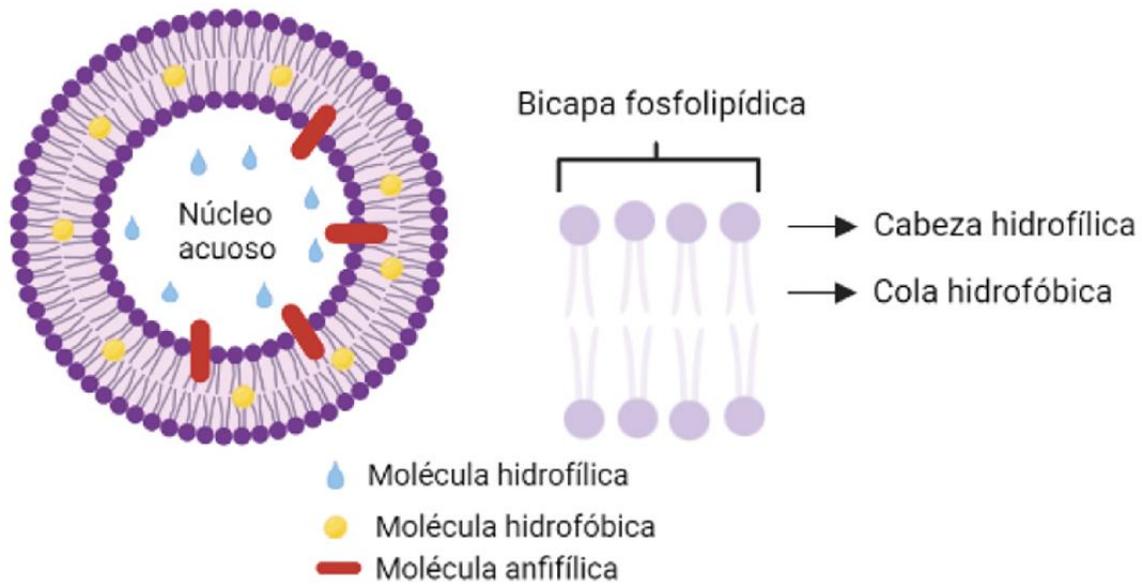


Figura 1: Representación esquemática de un liposoma unilamellar. Recuperado de Alvizo *et al.*, (2023).

2.3 Clasificación de Liposomas

Los liposomas, vesículas esféricas compuestas por una o más bicapas lipídicas que encapsulan un núcleo acuoso, se clasifican de acuerdo con diferentes características estructurales y composicionales. Estas categorías son fundamentales para comprender su comportamiento, funcionalidad y aplicaciones en investigación biomédica y farmacéutica. Las principales clasificaciones se basan en el tamaño, el número de bicapas (o lamelas), y la composición lipídica. A continuación, se detalla cada criterio de clasificación, junto con las abreviaturas más comunes utilizadas en la literatura científica:

2.3.1 Clasificación por Tamaño

Los liposomas se dividen en distintos tipos según su tamaño, lo cual influye en sus aplicaciones y eficacia en la administración de fármacos.

Tipo de Liposoma	Tamaño	Aplicación	Referencia
Vesículas Unilamelares Pequeñas (SUVs)	<100 nm	Utilizadas en estudios de entrega de fármacos por su capacidad de penetración de tejidos y células	Akbarzadeh <i>et al.</i> , 2013; Martínez <i>et al.</i> , 2022.
Vesículas unilamelares grandes (LUVs)	100-1000 nm	Ideales para encapsulación de moléculas de mayor tamaño y liberación controlada de fármacos	Corona <i>et al.</i> , 2016 & Molinari, 2015; Ramírez <i>et al.</i> , 2022.
Vesículas multilamelares (MLVs)	>500 nm	Adecuadas para encapsulación de múltiples dosis, proporcionando liberación prolongada	Emami <i>et al.</i> , 2016, Hernández & Ávila, 2022.

Tabla 1: Clasificación de liposomas por tamaño.



Figura 2: Representación esquemática de las vesículas de liposomas. Recuperado de López (2022).

2.3.2 Clasificación por Lamelaridad

La lamelaridad de los liposomas hace referencia al número de bicapas lipídicas que contienen. Esta característica determina tanto su capacidad de encapsulación como su comportamiento en la liberación de compuestos.

Tipo de Vesícula	Número de Bicapas	Descripción y Aplicación	Referencias
Vesículas Unilamelares (SUVs y LUVs)	1	Compuestas por una sola bicapa, utilizadas principalmente en la administración de fármacos debido a su simplicidad y facilidad de modificación	Akbarzadeh et al., 2013; Pérez <i>et al.</i> , 2023.
Vesículas Multilamelares (MLVs)	Múltiples	Contienen varias bicapas concéntricas, lo cual permite la liberación prolongada de diferentes fármacos	Bozzuto & Molinari, 2015; Pérez <i>et al.</i> , 2023.
Vesículas Multivesiculares (MVVs)	Múltiples	Contienen varias vesículas pequeñas dentro de una mayor, adecuadas para la liberación sostenida en tratamientos de administración prolongada	Emami et al., 2016; Pérez <i>et al.</i> , 2023.

Tabla 2: Clasificación por lamelaridad.

2.3.3 Clasificación por Composición Lipídica

Los liposomas pueden clasificarse según su composición lipídica, lo cual influye en sus propiedades fisicoquímicas y aplicaciones terapéuticas. A continuación, se detallan las principales categorías:

2.3.3.1 Liposomas neutros

Estos liposomas están compuestos por fosfolípidos sin carga neta a pH fisiológico, como la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) (Pérez *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

La ausencia de carga les confiere estabilidad y biocompatibilidad, reduciendo interacciones no deseadas con componentes sanguíneos y disminuyendo la opsonización y eliminación por el sistema inmunológico (Wang *et al.*, 2023). Son ampliamente utilizados en la administración de fármacos debido a su baja toxicidad y capacidad para encapsular tanto moléculas hidrofílicas como hidrofóbicas (Pérez *et al.*, 2023; López & Rodríguez, 2022).

2.3.3.2 Liposomas Zwitteriónicos (Sin Carga Neta)

Los liposomas zwitteriónicos contienen fosfolípidos con grupos funcionales que poseen tanto cargas positivas como negativas, resultando en una carga neta neutra a pH fisiológico (Salazar & Velasco 2023; Jiménez & López, 2022). Este tipo de liposomas presenta propiedades que minimizan las interacciones no deseadas con proteínas plasmáticas y células del sistema inmunológico, lo cual puede aumentar su tiempo de circulación en el organismo (Zhang *et al.*, 2022; Salazar & Velasco 2023). Los fosfolípidos como la fosfatidilcolina y la esfingomielina son ejemplos de lípidos zwitteriónicos comunes en la formulación de estos liposomas (Jiménez & López, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

2.3.3.3 Liposomas cargados

Dependiendo de la naturaleza de los fosfolípidos, los liposomas pueden presentar cargas negativas o positivas, lo que afecta su comportamiento en el organismo y su interacción con las células.

- **Cargados Negativamente:** Estos liposomas incluyen fosfolípidos como la fosfatidilserina (PS) o el ácido fosfátidico (PA) (Martínez & Gómez, 2023). La carga negativa facilita la interacción con células o tejidos cargados positivamente, mejorando la entrega dirigida de fármacos específicos (García & Sánchez, 2022; Chen *et al.*, 2022). Los liposomas con carga negativa también suelen tener una baja opsonización, lo que favorece su uso en aplicaciones que requieren liberación dirigida.
- **Cargados Positivamente:** Están compuestos por fosfolípidos catiónicos como la estearilamina o la fosfatidilcolina catiónica (Fernández & Martínez, 2022). Este tipo de liposomas es particularmente efectivo en la entrega de ácidos nucleicos y otros fármacos que requieren interacciones electrostáticas, ya que forman complejos estables con moléculas aniónicas como ADN o ARN (Huang & Liu, 2021; Torres &

Fernández, 2023). Además, debido a su carga positiva, estos liposomas tienen una mayor afinidad por las membranas celulares, lo cual facilita la internalización y mejora la eficiencia de entrega.

A continuación, se presenta una tabla que resume las características de cada tipo de liposoma según su composición lipídica.

Tipos de liposomas	Características principales	Aplicaciones Terapéuticas
Neutros	Estabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad.	Administración de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos
Zwitteriónicos	Baja interacción con proteínas plasmáticas, tiempo de circulación prolongado	Liberación controlada de fármacos
Cargados negativamente	Interacción con células/t tejidos positivos, baja opsonización	Liberación dirigida de fármacos específicos
Cargados Positivamente	Formación de complejos estables con ADN/ARN, alta afinidad por membranas celulares	Entrega de ácidos nucleicos, terapia génica

Tabla 3: Clasificación por composición lipídica (Jiménez &, 2022; Zhang et al., 2022; Kim & Cols, 2023; Huang y Liu 2021; Torres & Fernández 2023; Fernández & Martínez 2022; Martínez & Gómez, 2023).

2.4 Funcionamiento Básico: Encapsulación y Liberación

Controlada

El mecanismo de los liposomas se basa en su bicapa lipídica, compuesta por fosfolípidos dispuestos en una estructura de doble capa que permite la encapsulación selectiva de diferentes moléculas (Liu & Chen, 2021). Este diseño facilita el alojamiento de compuestos hidrofílicos en el núcleo acuoso y de compuestos hidrofóbicos en la región lipídica de la bicapa (Smith et al., 2020; Kim et al., 2021). La liberación de los componentes encapsulados puede regularse en función de varios factores, tales como la composición de los fosfolípidos, el tamaño de la vesícula y la aplicación de estímulos externos, como variaciones en el pH, temperatura o la acción de enzimas específicas (Torchilin, 2021; Almeida & Almeida, 2022).

2.4.1 Encapsulación

La elección de fosfolípidos es fundamental para definir la eficiencia de encapsulación y la liberación controlada del fármaco (Firestone & Sawy, 2020). Los fosfolípidos con carga negativa, o aquellos que presentan grupos polares en sus cabezas, facilitan la interacción con moléculas cargadas positivamente o con otros grupos polares, mejorando la estabilidad y capacidad de encapsulación de diversos agentes terapéuticos (Firestone & Sawy, 2020; Hernández *et al.*, 2022; Liu & Chen, 2021). Además, la composición de la bicapa influye directamente en la afinidad y retención del fármaco, lo cual es crucial para asegurar un perfil de liberación prolongado y dirigido (Pérez *et al.*, 2021).

2.4.2 Liberación Controlada

La velocidad y perfil de liberación del fármaco pueden ajustarse de acuerdo con la fluidez de la bicapa lipídica. Liposomas con una bicapa fluida tienden a liberar su contenido de forma gradual, mientras que aquellos con una bicapa más rígida permiten una liberación más lenta y sostenida (Martínez & López, 2023; Kumar *et al.*, 2021). Adicionalmente, la aplicación de estímulos externos, como cambios en el pH o la acción de enzimas presentes en el entorno tumoral, puede inducir una liberación controlada del fármaco en el sitio objetivo, mejorando la precisión terapéutica y minimizando efectos secundarios (González *et al.*, 2022; Torres *et al.*, 2023; Almeida & Almeida, 2022).

En el contexto de terapias avanzadas de administración de fármacos, los liposomas han surgido como un sistema eficaz para la entrega de citocinas como la interleucina-2 (IL-2), optimizando su estabilidad y biodisponibilidad (Toro & De Jesús, 2021). La IL-2 es una citosina de tipo I, con un peso molecular de aproximadamente 15.5 kDa, compuesta por cuatro hélices alfa. Desempeña un papel crucial en la activación y proliferación de células T, siendo producida principalmente por células T CD4+ activadas en respuesta a la estimulación antigénica y la interacción con otras citocinas (Smith, 2016; Zhou *et al.*, 2023). La estructura de la IL-2 incluye una O-glicosilación en la treonina N-terminal y un enlace disulfuro entre las cisteínas 58 y 105, fundamentales para mantener su estabilidad funcional (Grasshoff *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2022).

2.5 Estructura y Mecanismo de Acción de IL-2

La IL-2 ejerce sus funciones mediante la unión al receptor de interleucina-2 (IL-2R), que existe en tres configuraciones: monomérica (CD25), dimérica (CD122/CD132) y trimérica (CD25/CD122/CD132) (Miller & Zhang, 2021; Xu *et al.*, 2020). El receptor trimérico es el de mayor afinidad, esencial para la señalización efectiva (Shao & Gao, 2019; Miller & Zhang, 2021). Al unirse al receptor de IL-2, se activa la vía JAK/STAT, induciendo la transcripción de genes responsables de la proliferación y diferenciación celular. Este mecanismo de señalización estimula la producción de citocinas, entre ellas el interferón-gamma (IFN- γ), una molécula clave en la activación y proliferación de células NK (Spolski & Leonard, 2014; Zhou *et al.*, 2023).

2.6 Rol de IL-2 en el Sistema Inmunológico

Dentro del sistema inmunológico, la IL-2 es fundamental para la expansión de células T efectivas, incluyendo las células T CD4+ y CD8+, y es esencial para el mantenimiento de las células T reguladoras (Tregs), las cuales son cruciales en la tolerancia inmunológica y en la prevención de enfermedades autoinmunes (Torres *et al.*, 2019; Spolski, & Leonard, 2014). La IL-2 también influye significativamente en las células NK, promoviendo su activación, proliferación y diferenciación en células NK maduras y de memoria, contribuyendo así a la respuesta inmunitaria innata (Weiss *et al.*, 2018; Grasshoff *et al.*, 2021).

2.7 Aplicaciones de IL-2 en el Tratamiento del Cáncer

La IL-2 tiene una larga trayectoria como agente terapéutico en oncología y fue la primera inmunoterapia aprobada por la FDA para el tratamiento del carcinoma de células renales metastásico (mRCC) en 1992 y para el melanoma metastásico (mM) en 1998 (Atkins *et al.*, 1999; Muhammad *et al.*, 2023). Los tratamientos con dosis altas de IL-2 (HD IL-2) han mostrado efectos duraderos en un subgrupo de pacientes; sin embargo, están asociados a efectos secundarios significativos, como el síndrome de fuga capilar y la disfunción orgánica, lo cual limita su uso (Rosenberg *et al.*, 2011; Grasshoff *et al.*, 2021). Recientes investigaciones han explorado combinaciones de IL-2 con inhibidores de puntos de control

inmunitario, en un esfuerzo por potenciar su eficacia y mitigar los efectos adversos (Rangel *et al.*, 2010; Bentebibel *et al.*, 2019; Charych *et al.*, 2017). Además, se han diseñado variantes de IL-2 con modificaciones estructurales que aumentan su vida media y reducen la toxicidad, mejorando así su perfil clínico (Muhammad *et al.*, 2023).

Esta combinación de IL-2 con vehículos de liberación como los liposomas no solo amplía las posibilidades de tratamiento, sino que también contribuye a mejorar la estabilidad y eficacia de la IL-2, permitiendo una liberación controlada en el microambiente tumoral (Corona *et al.*, 2016, Gao *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024). Los avances en la ingeniería de liposomas han facilitado su uso como sistemas de liberación específicos para la IL-2, ofreciendo así un enfoque más seguro y eficaz para el tratamiento del cáncer (Kwong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022).

2.8 Liposomas y su Eficiencia en la Administración de IL-2

Los liposomas son vesículas esféricas con una o varias bicapas lipídicas que encapsulan tanto moléculas hidrofílicas en su núcleo acuoso como hidrofóbicas en su bicapa lipídica, funcionando como una barrera protectora que reduce la degradación de compuestos activos como la IL-2 y mejora su eficacia en el sitio de acción (Corona *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2022; Bentebibel *et al.*, 2019; Muhammad *et al.*, 2023). Los liposomas pueden diseñarse para responder a estímulos específicos, como cambios de pH o la presencia de enzimas, promoviendo una liberación precisa y reduciendo efectos secundarios (Gao *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024). Esto convierte a los liposomas en vehículos ideales para la administración de IL-2 en terapias antitumorales.

2.9 Criobiología y Preservación de Formulaciones Farmacéuticas

La criobiología es una disciplina clave en la biología moderna, enfocada en el estudio de los efectos de bajas temperaturas en células, tejidos y organismos. Este campo es fundamental en aplicaciones biomédicas avanzadas, ya que la preservación de estructuras celulares y moleculares es esencial para mantener su viabilidad y funcionalidad, especialmente en formulaciones terapéuticas sensibles (Fuller *et al.*, 2019; Baust & Best, 2021; Li *et al.*, 2020). Dentro de la criobiología, la criopreservación es un proceso esencial para el almacenamiento prolongado de material biológico, utilizado ampliamente en

medicina regenerativa, conservación de biodiversidad e inmunoterapia (Savira & Suharsono, 2013; Gomez & Alvarez, 2021).

La preservación de liposomas es un aspecto crucial en el desarrollo de formulaciones terapéuticas avanzadas, ya que su estabilidad estructural y funcionalidad son determinantes para su eficacia clínica (Kwong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022). Los liposomas, al ser sistemas vesiculares sensibles a condiciones ambientales, requieren técnicas específicas para mantener su integridad durante el almacenamiento y transporte. Entre estas técnicas, la criopreservación ha demostrado ser fundamental, permitiendo el almacenamiento prolongado a bajas temperaturas sin comprometer la estructura de la bicapa lipídica ni la capacidad de encapsulación (Fuller *et al.*, 2019; Baust & Best, 2021; Li *et al.*, 2020). La incorporación de crioprotectores como la trehalosa y el glicerol juega un papel clave, ya que estos compuestos protegen los liposomas al minimizar los daños causados por la formación de cristales de hielo y preservan las propiedades fisicoquímicas durante los ciclos de congelación y descongelación (Kibbe *et al.*, 2020; Jain & Kumar, 2021).

En este contexto, la preservación efectiva de liposomas resulta particularmente relevante en aplicaciones terapéuticas como la administración de interleucina-2 (IL-2), una citocina esencial en inmunoterapia contra el cáncer (Gao *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2022). La encapsulación de IL-2 en liposomas no solo mejora su biodisponibilidad, sino que también protege la citocina de la degradación y permite una liberación controlada en el microambiente tumoral (Charych *et al.*, 2017). Sin embargo, para garantizar la funcionalidad de estas formulaciones liposomales durante su almacenamiento, es indispensable optimizar las condiciones de preservación, incluidas las temperaturas de congelación y los crioprotectores utilizados, asegurando su estabilidad a largo plazo y su eficacia clínica (Kwong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022).

2.10 Rol de la Trehalosa y el Glicerol como Agentes

Crioprotectores

Para mantener la estabilidad de la IL-2 encapsulada en liposomas durante la criopreservación, se emplean agentes crioprotectores aprobados por la FDA como la trehalosa y el glicerol. La trehalosa es un disacárido no reductor compuesto por dos unidades de glucosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) que estabiliza proteínas y membranas celulares formando puentes de hidrógeno con el agua, lo cual previene el colapso estructural durante la

deshidratación que ocurre en el congelamiento (Aguilera,2022; Kumar & Singh, 2021; Sánchez *et al.*, 2022). Esta propiedad es crítica para conservar estructuras biomoleculares bajo condiciones de baja temperatura, evitando la desnaturalización de proteínas y asegurando la integridad de la formulación.

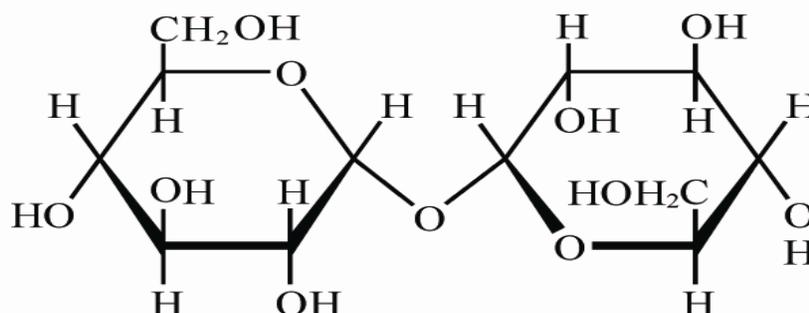


Figura 3: Estructura de Trehalosa. Recuperado de Kawashima & Goto (2011).

El glicerol ($C_3H_8O_3$), un alcohol polihídrico con tres grupos hidroxilo, actúa como anticongelante y deshidratante, reduciendo el punto de congelación del agua y evitando la formación de cristales de hielo intracelulares que pueden dañar principalmente las membranas superficiales (Martínez & Martín, 2021; Nguyen & Oh, 2018). Esta deshidratación controlada preserva la estabilidad de las proteínas encapsuladas y protege las estructuras lipídicas durante la congelación y descongelación (Gómez & López, 2022; Fletcher & Morris, 2011). En conjunto, estos crioprotectores ayudan a que tanto la IL-2 como los liposomas mantengan su integridad durante el almacenamiento prolongado.

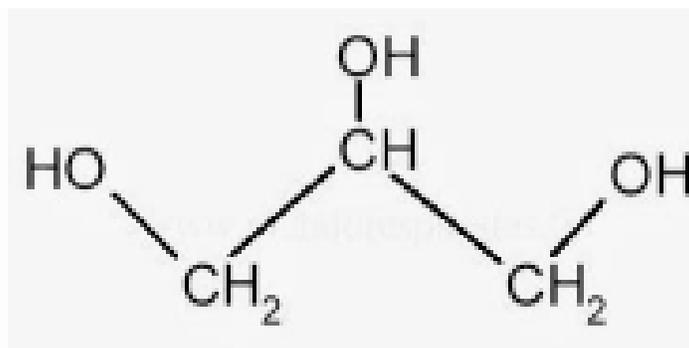


Figura 3: Estructura de Glicerol Recuperado de Torres *et al.* (2019).

2.11 Efecto Sinérgico de la Trehalosa y el Glicerol en Formulaciones Avanzadas

La combinación de trehalosa y glicerol en formulaciones liposomales con IL-2 produce un efecto sinérgico, maximizando la estabilidad y funcionalidad de proteínas y membranas celulares durante la criopreservación (Aranda & Toledo, 2022). La trehalosa reemplaza moléculas de agua en las biomoléculas, manteniendo la estructura tridimensional de proteínas y lípidos, lo cual preserva su funcionalidad en condiciones de baja humedad (Tan & Li, 2023; Ghirardi *et al.*, 2023; Aranda & Toledo, 2022). El glicerol complementa esta acción al reducir el riesgo de formación de cristales de hielo, protegiendo así la IL-2 y asegurando su eficacia terapéutica (Martínez & Martín, 2021; Nguyen & Oh, 2018).

Esta sinergia optimiza la preservación de proteínas y mejora la estabilidad de la formulación liposomal, lo cual es crucial para el éxito de tratamientos avanzados al asegurar que la IL-2 conserve su actividad biológica y efectividad clínica (Carmona & Muñoz, 2021). La combinación de liposomas, IL-2 y crioprotectores representa un enfoque innovador en inmunoterapia, ofreciendo un método eficaz para mejorar la eficacia y reducir los efectos adversos en tratamientos contra el cáncer (Carmona & Muñoz, 2021; Aranda & Toledo, 2022).

2.12 Aprobación Regulatoria y Relevancia Clínica

Ambos agentes crioprotectores, trehalosa y glicerol, han sido aprobados por importantes agencias regulatorias como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Esta aprobación subraya su idoneidad para su uso en formulaciones de criopreservación y productos farmacéuticos avanzados, asegurando la estabilidad y seguridad de componentes sensibles como la IL-2 (López, 2022; Gómez & López, 2022).

En formulaciones liposomales con IL-2, la estabilidad proporcionada por la trehalosa y el glicerol maximiza la eficacia del tratamiento al mantener su integridad estructural y su actividad terapéutica en su liberación controlada en el microambiente tumoral. Por lo anterior, la combinación de estos crioprotectores facilitaría la mejora y la eficacia del

tratamiento, minimizando los efectos adversos en aplicaciones oncológicas (Bentebibel *et al.*, 2019; Tan & Li, 2023).

Este enfoque, basado en el uso combinado de criobiología, liposomas y agentes crioprotectores, representa una estrategia avanzada para conservar la estabilidad y eficacia de formulaciones terapéuticas, brindando nuevas oportunidades en inmunoterapia y tratamiento del cáncer (Gao *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024).

Los avances en criobiología y en la ingeniería de liposomas han permitido el desarrollo de sistemas de administración más seguros y eficaces para citocinas como la IL-2, incrementando su estabilidad y efectividad en aplicaciones terapéuticas (Tan & Li, 2023; Ghirardi *et al.*, 2023). La integración de crioprotectores y liposomas en la formulación de IL-2 representa una herramienta innovadora que fusiona los beneficios de la criobiología y la nanotecnología, ofreciendo un enfoque prometedor para mejorar la inmunoterapia y el tratamiento del cáncer (Carmona & Muñoz, 2021; Aranda & Toledo, 2022). Con el respaldo de agencias regulatorias, este enfoque optimiza los resultados terapéuticos en pacientes, reduciendo los efectos adversos y potenciando el impacto clínico de la IL-2 en oncología (Gao *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024; Gómez & López, 2022).

En la búsqueda de métodos efectivos para la administración de fármacos, la integración de criobiología, liposomas, interleucina-2 (IL-2) y formulaciones en gel representa una estrategia prometedora para mejorar la eficacia y estabilidad de tratamientos contra el cáncer (Gómez, M., & López, J. 2022). La criobiología, enfocada en el estudio de los efectos de bajas temperaturas en células y tejidos, es esencial para conservar formulaciones biológicas avanzadas, especialmente aquellas que contienen compuestos sensibles como la IL-2 (Tan & Li, 2023; Ghirardi *et al.*, 2023). Como ya se mencionó, esta citocina juega un rol crucial en la activación del sistema inmunológico, siendo fundamental en terapias antitumorales (Fuller *et al.*, 2019; Baust & Best, 2021). La encapsulación de IL-2 en liposomas protegidos con crioprotectores, como trehalosa y glicerol, ha mostrado mejorar la estabilidad y biodisponibilidad del compuesto en entornos clínicos (Li *et al.*, 2020; Zhang & Chen, 2023). Adicionalmente, la formulación de estos sistemas en geles transdérmicos permite una aplicación localizada y controlada que maximiza la eficacia terapéutica, minimizando efectos secundarios y proporcionando un enfoque integral que combina biocompatibilidad, estabilidad y efectividad (Gómez & López, 2022; Kwong *et al.*, 2013).

2.13 Aplicación Transdérmica: Funcionalidad y Tipos de Geles

La administración transdérmica ha cobrado relevancia en la farmacoterapia como una metodología clave (Kwong *et al.*, 2013). Este enfoque permite una liberación sostenida del medicamento, evita el metabolismo de primer paso hepático y mejora la comodidad del paciente, al ser un método no invasivo y de fácil aplicación (Gupta & Gill, 2019; Prausnitz & Langer, 2008).

2.14 Mecanismo de Acción

Los sistemas transdérmicos funcionan mediante la difusión del fármaco a través de las capas de la piel, siendo la capa córnea la principal barrera. Una vez superada, el fármaco accede al sistema circulatorio para alcanzar su sitio de acción terapéutica (Cevc & Vierl, 2010; Gupta & Gill, 2019).

2.15 Aplicación de Geles Transdérmicos

Los geles transdérmicos, aplicados directamente sobre la piel, están diseñados para liberar el fármaco de forma controlada. Estas formulaciones permiten la incorporación de diversos agentes activos y se aplican en áreas específicas del cuerpo, optimizando la absorción y la eficacia del tratamiento (Kalia & Guy, 2017; Cevc & Vierl, 2010).

2.16 Reacciones en la Aplicación Transdérmica

Aunque efectivos, los geles transdérmicos pueden causar reacciones cutáneas locales, como irritación, eritema o prurito, dependiendo de factores como la formulación del gel, la condición de la piel y la duración del tratamiento (Gupta & Gill, 2019). Estas reacciones son consideraciones importantes al desarrollar la formulación, especialmente en aplicaciones prolongadas (Gupta & Gill, 2019; Barry, 2015; Prausnitz *et al.*, 2019).

2.17 Formulaciones en Gel

Los geles son formas farmacéuticas semisólidas, compuestas por un disolvente y un coloide que juntos forman una estructura tridimensional (Oteo, 2013). Este proceso de gelificación incrementa la viscosidad de la solución, al incorporar un coloide polimérico en una fase líquida (De Diego & del Arco, 2016; Reyes, 2008). Los geles pueden clasificarse según su disolvente: organogeles (medio orgánico), hidrogeles (agua) y aerogeles (gas) (Oteo, 2013). En particular, los hidrogeles se destacan en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad y su capacidad para liberar fármacos de forma controlada (Ramírez *et al.*, 2016).

2.18 Tipos de Geles Transdérmicos

Geles Hidroalcohólicos: Combinan agua y alcohol, lo que mejora la solubilidad del fármaco y facilita su absorción en la piel (Delgado & Martínez, 2015).

Geles de Microemulsión: Compuestos por una mezcla de agua y aceite estabilizada por surfactantes, que facilita la penetración del fármaco en la piel (García & López, 2017).

Geles de Liposomas: Incorporan vesículas liposomales que encapsulan fármacos hidrofílicos y lipofílicos, permitiendo una liberación sostenida y controlada del fármaco (Ramírez *et al.*, 2016).

La combinación de liposomas con crioprotectores, como trehalosa y glicerol, en formulaciones de geles transdérmicos ofrece un sistema de administración seguro y efectivo que maximiza la estabilidad de la IL-2 y optimiza su liberación en el microambiente tumoral (Xahuantitla, 2016; Vega *et al.*, 2022). Este enfoque innovador en inmunoterapia contra el cáncer permite una aplicación no invasiva, adecuada para diferentes perfiles de pacientes, y minimiza los efectos adversos derivados de la administración sistémica de la IL-2 (Ortega *et al.*, 2023).

La investigación en estabilidad de formulaciones farmacéuticas ha evolucionado para incluir técnicas avanzadas que permiten preservar y administrar agentes terapéuticos sensibles, como la interleucina-2 (IL-2), mediante el uso de sistemas de liberación controlada (Zhang & Chen, 2023). En este contexto, la combinación de criobiología, liposomas y formulaciones en gel ha mostrado un alto potencial en mejorar tanto la estabilidad como la eficacia de tratamientos dirigidos contra el cáncer (Li *et al.*, 2022; Gupta & Gill, 2021). Los liposomas, vesículas que encapsulan compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, actúan como vehículos de liberación controlada que protegen la IL-2, un agente clave en la inmunoterapia, de la degradación temprana (Gómez & López, 2022). Además, la criobiología, que estudia los efectos de temperaturas extremadamente bajas sobre células y tejidos, juega un rol crucial al permitir el almacenamiento y conservación de estos sistemas, especialmente con el uso de crioprotectores como trehalosa y glicerol, los cuales estabilizan la estructura liposomal y minimizan los daños durante la congelación y descongelación (Fuller *et al.*, 2019; Baust & Best, 2021). Al integrar estas formulaciones en geles, se facilita la administración transdérmica y localizada de la IL-2, maximizando su eficacia y reduciendo efectos secundarios (Gupta & Gill, 2019). Esta combinación de técnicas y compuestos representa un enfoque innovador en la administración de terapias

antitumorales, permitiendo una mejor conservación y liberación controlada del fármaco en el microambiente tumoral, y optimizando su impacto terapéutico.

2.19 Policarbofilo Noveon® y Tipos de Geles Transdérmicos

Un ejemplo relevante en la formulación de hidrogeles es el uso de policarbofilo Noveon®, un polímero conocido por sus propiedades de mucoadhesión, permitiéndole adherirse a superficies biológicas incluso en condiciones húmedas (Lubrizol,2024). Este polímero es útil en aplicaciones en las que se requiere que el gel permanezca en contacto prolongado con la piel o mucosas, mejorando así la eficacia de la administración del fármaco (Gainza *et al.*, 2015).

2.20 Estudios de Estabilidad

Los estudios de estabilidad de fármacos son fundamentales para asegurar que un medicamento mantenga su seguridad, eficacia y calidad durante toda su vida útil, siendo particularmente relevantes en formulaciones avanzadas como aquellas que combinan interleucina-2 (IL-2) y liposomas en sistemas de gel (Gupta & Gill, 2019; Baust & Best, 2021). La estabilidad de estos compuestos depende de diversos factores ambientales, como la temperatura, la humedad y la exposición a la luz, que pueden afectar su estructura y efectividad (Scrivens, 2023; Baust & Best, 2021.). Uno de los métodos principales para evaluar esta estabilidad es la Ley de Arrhenius, la cual permite predecir la velocidad de degradación de un fármaco a distintas temperaturas mediante una ecuación que relaciona la constante de velocidad de reacción con la temperatura (Singh *et al.*, 2020; Jackson & Lee, 2018).

Los estudios de estabilidad se clasifican en varias categorías de acuerdo con sus condiciones y objetivos (International Council for Harmonisation [ICH], 2024; Jackson & Lee, 2018):

1. Estudios a largo plazo: Estos estudios se realizan bajo condiciones de almacenamiento normales para observar el comportamiento del fármaco durante toda su vida útil. Comúnmente se llevan a cabo a 25°C y 60% de humedad relativa durante al menos 12 meses, aunque pueden extenderse a 24 o 36 meses según las regulaciones y el tipo de formulación (ICH, 2024). En el caso de las formulaciones de IL-2 en liposomas, estos estudios ayudan a evaluar cómo los liposomas y crioprotectores mantienen la estabilidad de la IL-2 en condiciones de almacenamiento habituales (Gómez & López, 2022; Jackson & Lee, 2018).

2. Estudios acelerados: Para predecir la estabilidad a largo plazo en menor tiempo, se realizan estudios bajo condiciones de estrés, generalmente a 40°C y 75% de humedad relativa por un mínimo de 6 meses. Esta metodología identifica posibles mecanismos de degradación, asegurando que el producto farmacéutico mantenga su eficacia incluso en condiciones adversas (Baust & Best, 2021). Los estudios acelerados son especialmente útiles para analizar la respuesta de formulaciones liposomales de IL-2 a temperaturas elevadas, evaluando la eficacia de crioprotectores como trehalosa y glicerol en preservar su estructura bajo estrés térmico (Li *et al.*, 2020; Zhang & Chen, 2023).
3. Estudios intermedios: Estos estudios se efectúan a condiciones de temperatura y humedad situadas entre los estudios a largo plazo y los acelerados, usualmente a 30°C y 65% de humedad relativa por un mínimo de 6 meses. Los estudios intermedios confirman los resultados de los estudios acelerados y permiten verificar la estabilidad del fármaco en condiciones de almacenamiento cercanas a las reales (Singh *et al.*, 2020; ICH, 2024).

Además de identificar los mecanismos de degradación, estos estudios permiten predecir la vida útil del fármaco bajo distintas condiciones, siendo esenciales en el desarrollo de formulaciones avanzadas. En el caso de sistemas que combinan IL-2, liposomas y crioprotectores en geles, estos estudios son críticos para asegurar que el producto mantenga su integridad y eficacia durante su almacenamiento y uso clínico (Baust & Best, 2021; Jackson & Lee, 2018).

2.21 Teoría de la Ley de Arrhenius

La Ley de Arrhenius describe cómo la velocidad de una reacción química varía con la temperatura, utilizando la ecuación:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Esta ecuación indica que la velocidad de una reacción aumenta exponencialmente con la temperatura, ya que un aumento en T disminuye la fracción exponencial, elevando el valor de k. A nivel molecular, esto ocurre porque a mayor temperatura, más moléculas adquieren la energía suficiente (igual o mayor que E_a) para reaccionar cuando colisionan.

En estudios de estabilidad de fármacos, esta ecuación es especialmente útil porque permite extrapolar los datos de degradación obtenidos a temperaturas elevadas, lo cual ayuda a predecir la estabilidad del fármaco a temperaturas de almacenamiento normales. Esta técnica de "aceleración" es fundamental en la industria farmacéutica, ya que permite estimar de manera precisa y eficiente la vida útil de un producto sin necesidad de esperar tiempos prolongados para observar su degradación a temperatura ambiente (Turner et al., 2019; Sing et al., 2020).

Además, la teoría de Arrhenius proporciona información valiosa para ajustar formulaciones y empaques al identificar condiciones que ralentizan la degradación del fármaco, como disminuir la exposición a temperaturas elevadas o a condiciones que puedan reducir la energía de activación, ayudando así a optimizar la estabilidad del producto en condiciones reales de almacenamiento.

2.22 Aplicaciones y Limitaciones

Predicción de estabilidad a largo plazo: La Ley de Arrhenius permite estimar la estabilidad a largo plazo de los fármacos a partir de estudios acelerados, lo que puede ahorrar tiempo y recursos durante el desarrollo (Sing *et al.*, 2020; Jackson & Lee, 2018).

Selección de envases y formulaciones: Los datos de estudios de estabilidad pueden guiar en la elección del envase adecuado y optimización de la formulación para mejorar la estabilidad del fármaco (American Pharmaceutical Review, 2023).

Factores no considerados: La ecuación de Arrhenius no considera factores como la humedad relativa y la exposición a la luz, los cuales pueden influir significativamente en la estabilidad de ciertos fármacos (Oxford Academic, 2023; Jackson & Lee, 2018).

Predicciones inconsistentes: Las predicciones basadas en esta ecuación pueden ser imprecisas cuando se aplican a condiciones de almacenamiento muy distintas de las condiciones de prueba, especialmente en moléculas grandes y productos biológicos (Sing *et al.*, 2020; Jackson & Lee, 2018).

Los estudios de estabilidad y la aplicación de la Ley de Arrhenius son herramientas fundamentales en la industria farmacéutica para garantizar que los medicamentos mantengan su seguridad y eficacia a lo largo del tiempo (Sing *et al.*, 2020; Jackson & Lee, 2018). Aunque presentan limitaciones, estas herramientas permiten una evaluación confiable y rápida de la vida útil de los fármacos, lo cual es esencial en el desarrollo y la comercialización de nuevos tratamientos

2.23 Legislación farmacéutica en México sobre estabilidad y compatibilidad

La NOM-073-SSA1-2015 establece los requisitos para evaluar la estabilidad de medicamentos en México, asegurando que estos mantengan su calidad, eficacia y seguridad durante su vida útil (NOM-073-SSA1-2015). Esta norma define que los estudios de estabilidad deben realizarse en condiciones controladas para analizar cómo factores ambientales, como la temperatura, la humedad y la luz, afectan las propiedades fisicoquímicas y biológicas del producto. Los estudios de estabilidad incluyen pruebas a largo plazo y estudios acelerados, que permiten predecir el comportamiento del medicamento en condiciones de almacenamiento normales y extremas.

Para formulaciones biotecnológicas, como los liposomas en gel con y sin IL-2, estos estudios son esenciales, ya que deben abarcar condiciones específicas de almacenamiento, como la criopreservación a temperaturas de -20°C , -80°C y -190°C , lo cual asegura que los liposomas mantengan su integridad estructural y la IL-2 conserve su actividad biológica (NOM-073-SSA1-2015). La NOM también establece que estos estudios deben realizarse en el sistema contenedor-cierre que se usará para la distribución del producto, evaluando su compatibilidad con el medicamento y evitando interacciones que puedan comprometer la estabilidad (NOM-073-SSA1-2015).

La frecuencia de los análisis de estabilidad depende de la vida útil del producto: para productos con una vida útil de un año o menos, los estudios deben realizarse mensualmente durante los primeros tres meses, luego cada tres meses. Para productos con vida útil superior a un año, los estudios deben realizarse cada seis meses el primer año y luego anualmente (NOM-073-SSA1-2015). En el caso de los liposomas con IL-2, esto permite monitorear cambios en el tamaño de las partículas y la actividad de la IL-2 en el tiempo, garantizando la estabilidad bajo condiciones controladas y de estrés. La documentación detallada de estos estudios es obligatoria, permitiendo justificar la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento propuestas para el producto (NOM-073-SSA1-2015).

3. Planteamiento del problema

La administración de terapias inmunomoduladoras, como la interleucina-2 (IL-2), representa un desafío en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer debido a su rápida degradación en el organismo y los efectos secundarios que genera cuando se administra directamente. En este contexto, el desarrollo de formulaciones liposomales que encapsulan IL-2 ha surgido como una alternativa para prolongar la liberación del fármaco y reducir la toxicidad sistémica. Sin embargo, uno de los mayores retos de estas formulaciones es garantizar la estabilidad de los liposomas a lo largo del tiempo, tanto en almacenamiento como en condiciones de uso clínico. Los liposomas, como sistemas de liberación de fármacos, son susceptibles a degradarse y perder funcionalidad debido a factores ambientales y al proceso de almacenamiento, especialmente durante ciclos de congelación y descongelación. Para preservar su estructura y funcionalidad, se han explorado criopreservadores como la trehalosa y el glicerol, que han demostrado cierto potencial en la protección de liposomas. No obstante, el impacto de estos criopreservadores sobre la estabilidad y compatibilidad de las formulaciones liposomales de IL-2 en gel es aún poco comprendido. Esto plantea la necesidad de profundizar en el estudio de las interacciones entre los criopreservadores, los liposomas y el gel, con el objetivo de asegurar una formulación de IL-2 liposomal que mantenga su estabilidad, integridad estructural y eficacia durante el almacenamiento y el uso clínico.

4. Justificación

El desarrollo de terapias avanzadas contra el cáncer ha puesto en evidencia la necesidad de mejorar los sistemas de administración de inmunomoduladores como la interleucina-2 (IL-2), debido a su potencial para estimular la respuesta inmunitaria antitumoral. Sin embargo, su administración directa sigue siendo limitada por su inestabilidad en el organismo y por la aparición de efectos secundarios adversos, lo cual restringe su uso clínico eficaz. En este contexto, los liposomas han emergido como vehículos prometedores para encapsular y administrar IL-2 de forma controlada, proporcionando una barrera protectora que prolonga la liberación del fármaco y minimiza la toxicidad sistémica. No obstante, uno de los principales desafíos asociados con los liposomas es asegurar su estabilidad en el tiempo, tanto durante el almacenamiento como en su aplicación terapéutica. Las condiciones de almacenamiento y el ciclo de congelación-descongelación

al que pueden ser sometidos en el contexto clínico o de investigación pueden comprometer la estructura y funcionalidad de los liposomas. Ante este reto, los criopreservadores como la trehalosa y el glicerol han sido sugeridos como aditivos potenciales que podrían mitigar los efectos adversos de dichos procesos, protegiendo la formulación liposomal. Sin embargo, el conocimiento sobre la influencia específica de estos criopreservadores en la estabilidad y compatibilidad de formulaciones de IL-2 en gel es limitado y requiere una investigación exhaustiva. El estudio de estas interacciones y sus efectos es fundamental para asegurar el desarrollo de una formulación liposomal estable, efectiva y segura, que permita aprovechar el potencial terapéutico de la IL-2 en oncología. Al investigar cómo los criopreservadores afectan la integridad y funcionalidad de los liposomas en gel, esta investigación contribuirá a optimizar formulaciones que puedan ser almacenadas y utilizadas de manera efectiva en el tratamiento del cáncer, aportando así avances significativos en el campo de la medicina oncológica y en el uso de nanotecnología aplicada a la farmacología.

5. Objetivo General

Analizar las interacciones de los criopreservadores trehalosa y glicerol con las formulaciones liposomales de interleucina-2 (IL-2) en gel, para comprender su influencia en la estabilidad estructural de los liposomas durante el almacenamiento en condiciones de congelación y descongelación, contribuyendo a establecer parámetros óptimos de conservación para su aplicación en terapias contra el cáncer.

5.1 Objetivos Específicos

- Determinar la compatibilidad de la formulación liposomal en suspensión y gel.
- Determinar la compatibilidad de la formulación liposomal en gel con los criopreservadores trehalosa y glicerol.
- Evaluar la estabilidad de la formulación liposomal en gel, considerando el tamaño de partículas, con los criopreservadores trehalosa y glicerol, durante el almacenamiento a temperaturas de congelación de -20°C, -80°C y -190°C

6. Metodología

Se prepararon liposomas sin carga y liposomas con IL-2 encapsulada. Lo anterior se realizó disolviendo lípidos en cloroformo y formando una película lipídica, la cual se rehidrató con los compuestos ha encapsular y se sónico para obtener liposomas. Se realizaron tres formulaciones en gel con el polímero Noveon con diferentes criopreservadores (trehalosa, trehalosa con glicerol, y glicerol) y una formulación sin criopreservadores. Además, se realizaron formulaciones liposomales en PBS con los mismos componentes para evaluar la compatibilidad entre estos. Para evaluar la estabilidad las muestras se almacenaron a -20°C, -80°C y -190°C a 1 día, 2 meses, 4 meses y 6 meses. La evaluación del tamaño de los liposomas se llevó a cabo mediante citometría de flujo y los datos fueron analizados con el software Kaluza.

6.1 Preparación de liposomas

Se disolvieron los lípidos espermidil-colesterol y fosfatidilcolina en cloroformo en proporciones 1:1 y la mezcla fue agitada vigorosamente para asegurar la homogeneización completa de los componentes.

La solución de lípidos en cloroformo se colocó en un tubo de ensayo, y se aplicó una corriente de nitrógeno filtrado con una membrana Millex de 0.22µm para evaporar el cloroformo, formando una película lipídica seca en las paredes del tubo.

Se añadió una solución de PBS con los componentes a encapsular a los tubos que tenían la película lídica, permitiendo la formación de liposomas. La mezcla se sometió a sonicación controlada para obtener liposomas de tamaño uniforme.

Los liposomas con IL-2, se sometieron a un proceso de ultracentrifugación, tanto los liposomas sin carga y con IL-2 son agregados lentamente a los geles correspondientes.

6.2 Fabricación de Gel mucoadhesivo

Se disolvió Noveón AA-1 en agua Mili-Q junto con los criopreservadores, generando tres lotes de gel: uno con trehalosa, otro con trehalosa y glicerol, y un último con glicerol. Cada mezcla fue dejada en reposo durante 24 horas para asegurar la completa hidratación del gel. El pH de cada gel fue ajustado con trietanolamina para optimizar la compatibilidad de los liposomas dentro del gel, una vez llegado al pH indicado se agregó lentamente los liposomas sin y con IL-2 al gel correspondiente.

Cada mezcla fue agitada bajo condiciones controladas para asegurar una dispersión homogénea de los liposomas sin carga en cada lote de gel.

6.3 Criopreservación

La criopreservación de liposomas con y sin IL-2 se realizó empleando un método de congelación lenta, diseñado para minimizar el riesgo de formación de cristales de hielo que pudieran comprometer la integridad estructural de los liposomas. Este proceso se implementó al reducir gradualmente la temperatura de las muestras hasta alcanzar las condiciones de almacenamiento deseadas (-20°C, -80°C o -190°C), permitiendo una transición controlada de fase y favoreciendo la efectividad de los crioprotectores.

Para este proceso, las muestras fueron colocadas en un congelador programable que permitió la disminución de la temperatura a una tasa específica de -1°C/min hasta la temperatura de almacenamiento final. Este procedimiento promovió una distribución homogénea de los crioprotectores (trehalosa, glicerol o su combinación) alrededor de los liposomas, reduciendo la formación de cristales de hielo y preservando la bicapa lipídica.

Durante la fase de descongelación, las muestras fueron sometidas a un proceso de descongelación lenta, incrementando la temperatura gradualmente para evitar cambios bruscos que pudieran desestabilizar la estructura liposomal. Este proceso se realizó manteniendo las muestras a 4°C hasta que se alcanzó una temperatura próxima al ambiente, minimizando así el riesgo de estrés térmico y la posibilidad de daños estructurales en los liposomas.

6.4 Evaluación de estabilidad y compatibilidad por citometría de flujo

Las formulaciones de liposomas sin carga y con IL-2, en gel y en solución, se separaron en viales de 0.5 mL. Las muestras fueron almacenadas en condiciones de congelación a -20°C, -80°C y -190°C, para evaluar la estabilidad a diferentes temperaturas de conservación.

Se analizaron las muestras en periodos de 1 día, 2 meses, 4 meses y 6 meses. Para cada tiempo, las formulaciones fueron descongeladas de manera controlada para minimizar el riesgo de daños en la estructura liposomal.

Se utilizó el canal Violet SSC-A del citómetro para medir la dispersión lateral (Side Scatter), con el fin de evaluar el tamaño de los liposomas. Se generaron histogramas que permitieron

identificar las poblaciones de liposomas y estudiar las variaciones estructurales en el tiempo.

El software Kaluza fue empleado para el procesamiento y análisis detallado de los datos de citometría, permitiendo comparar los tamaños de las partículas liposomales en función de los criopreservadores y el tiempo de almacenamiento.

La estabilidad y compatibilidad de las formulaciones se analizaron con base en la variación del tamaño de los liposomas a lo largo del tiempo y bajo las condiciones de almacenamiento establecidas, determinando el efecto de cada tipo de criopreservador sobre la integridad de la estructura liposomal.

7 resultados y discusión:

7.1 Aplicación de la técnica de citometría de flujo para identificar y regionalizar liposomas

Para determinar el tamaño de los liposomas, se aplicó una técnica de citometría de flujo en el que se empleó microperlas de referencia con tamaños nominales de 130 nm, 220 nm, 450 nm y 880 nm (Figura 1). La identificación de estas microperlas se realizó utilizando el canal de detección correspondiente a ficoeritrina (PE/B525-A) para detectar el fluorocromo reportero, lo que permitió la visualización y discriminación precisa de cada tamaño, facilitando así la aplicación de esta técnica para la caracterización del tamaño de los liposomas (Emami *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2022).

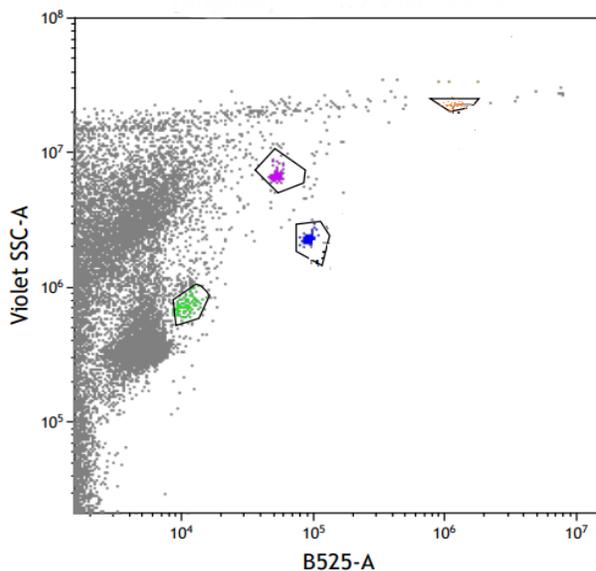


Figura 1: Delimitación de zonas de microperlas: Verde 130 nm, morado 220 nm, azul 450nm y naranja 880nm.

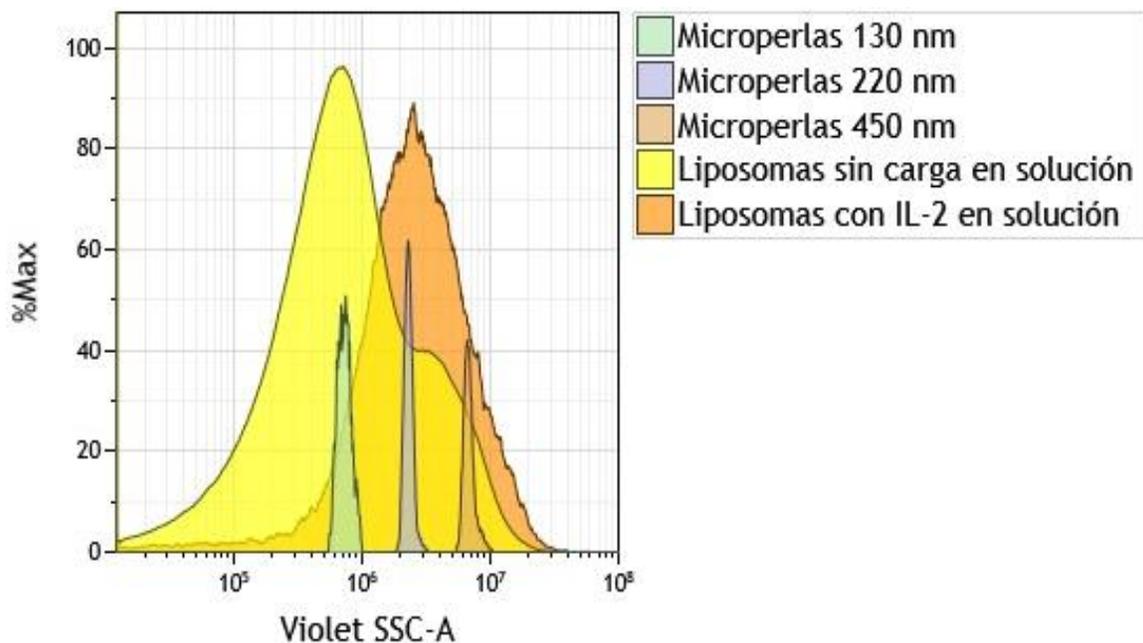


Figura 2: Distribución de Tamaños de Liposomas sin IL-2 (amarillo) y Liposomas con IL-2 (naranja) en Suspensión, Comparada con Microperlas de referencia.

Se compararon los tamaños de microperlas de referencia de 130 nm, 220 nm y 450 nm, seleccionadas como estándares, y las muestras de liposomas sin carga (sin IL-2) y liposomas con IL-2 en suspensión, evaluadas mediante el canal Violet SSC-A para analizar su dispersión lateral. Basándose en informes previos de nuestro equipo (Corona *et al.*, 2016), se considera que el tamaño de los liposomas generalmente se encuentra entre 100 y 1000 nm (Fig. 2) (Corona *et al.*, 2016; Bulbake *et al.*, 2017; Kwong *et al.*, 2013).

En el análisis de tamaño, los liposomas sin carga mostraron un rango menor de 130 a 220 nm, mientras que los liposomas con IL-2 presentaron un rango más amplio, de 130 a 450 nm, con picos bien definidos. Esta diferencia en tamaño se atribuye a la encapsulación de IL-2, que expande la estructura liposomal para acomodar la citosina encapsulada. Este cambio en el tamaño sugiere una encapsulación efectiva, lo cual refleja la adaptación estructural de los liposomas para contener IL-2. Además, los liposomas con IL-2 pueden tener un perfil de liberación más prolongado y estable, lo que beneficia las aplicaciones terapéuticas al reducir efectos secundarios sistémicos (Corona *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2022; Mazzoleni *et al.*, 2022).

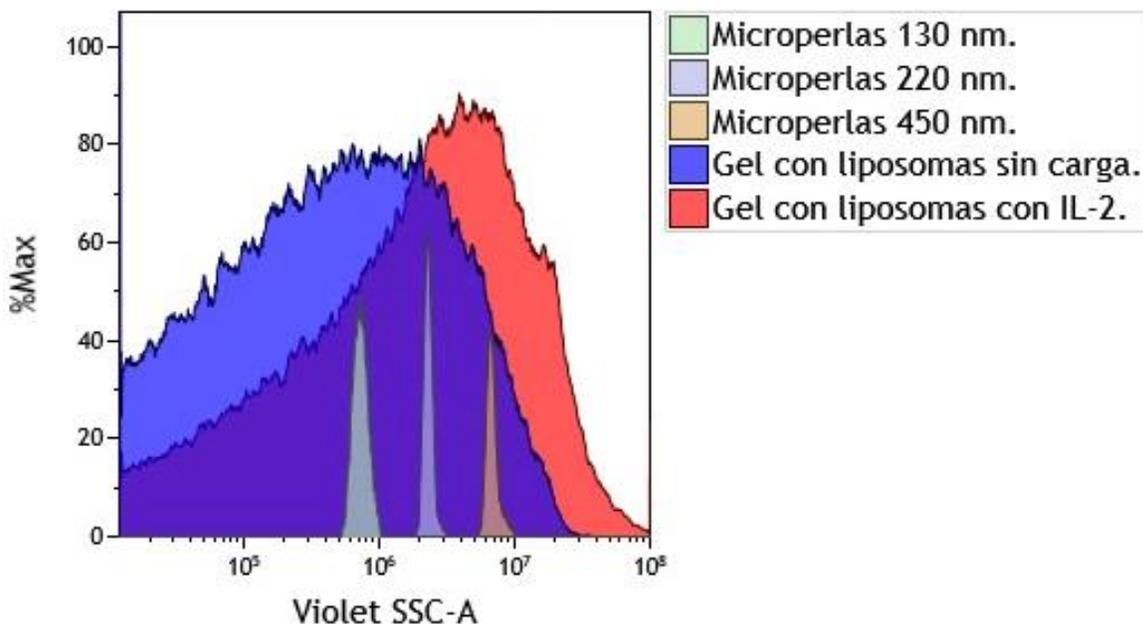


Figura 3: Comparacion de geles con y sin IL-2

Se compararon distintas formulaciones de gel, incluyendo liposomas sin carga y liposomas con interleucina-2 (IL-2), evaluando su tamaño en relación con microperlas de referencia (130 nm, 220 nm y 450 nm). Los resultados mostraron que los liposomas en gel exhiben un tamaño diferente en comparación con los liposomas en solución, probablemente debido a las interacciones del gel con las membranas liposomales, lo cual podría influir en la estabilidad (Corona *et al.*, 2016) (Fig. 3) (Mazzoleni *et al.*, 2022; Corona *et al.*, 2016).

Los liposomas con IL-2 presentaron un tamaño mayor y una dispersión más amplia en comparación con los liposomas sin carga. Esto se debió a la incorporación de la citocina en su núcleo acuoso, lo que incrementó la heterogeneidad dentro de la población de liposomas. El proceso de encapsulación de IL-2 provocó variaciones en el tamaño debido a los cambios estructurales asociados con la carga de la molécula (Liu *et al.*, 2022; Emami *et al.*, 2016).

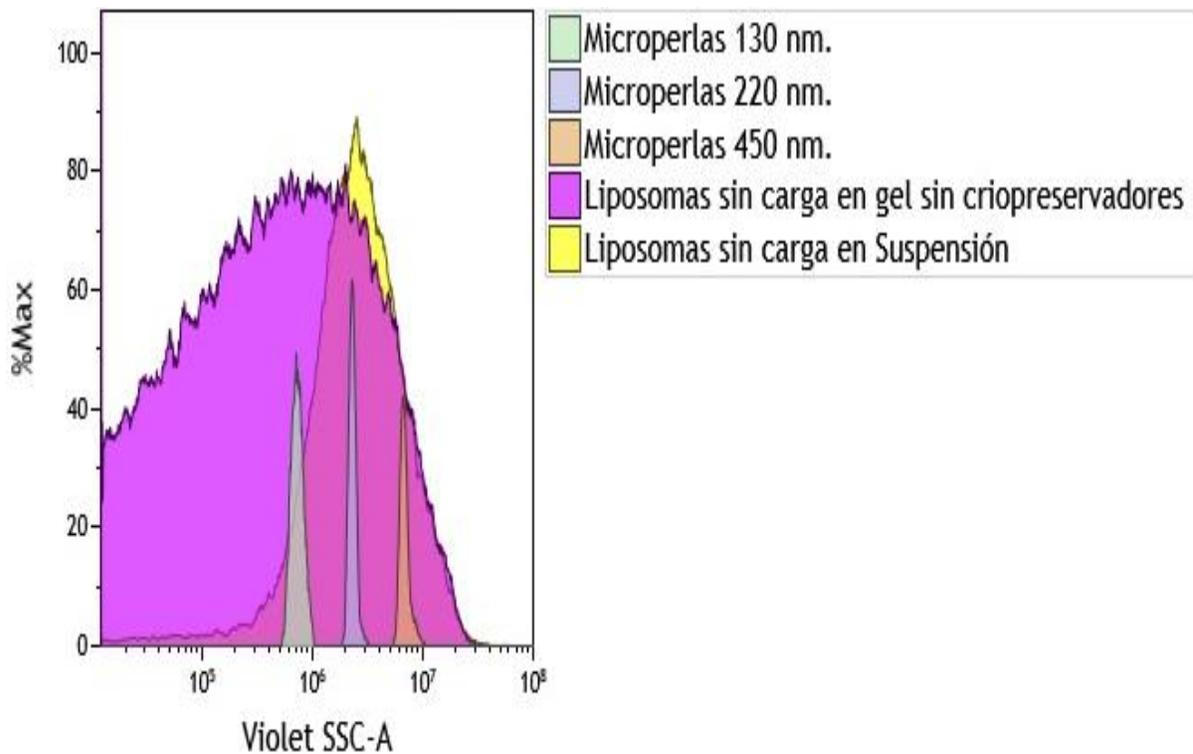


Figura 4: Comparación de Tamaño de Liposomas sin Carga en Gel y en Suspensión.

Se realizó una evaluación de los liposomas sin carga en suspensión y se observó que los liposomas en presentación mostraron una distribución de tamaño más amplia y heterogénea, con rangos de 130 a 450 nm, indicando mayor variabilidad en su estructura. En contraste, los liposomas sin carga en gel mostraron una distribución de tamaño más delimitada, localizada principalmente entre los tamaños de 130 y 220 nm. Este comportamiento sugirió que el gel había proporcionado un ambiente estabilizante que restringió el crecimiento o la fusión de las partículas, promoviendo una mayor uniformidad en el tamaño (Fig. 4)(Corona *et al.*, 2016; Bulbake *et al.*, 2017 Liu *et al.*, 2022).

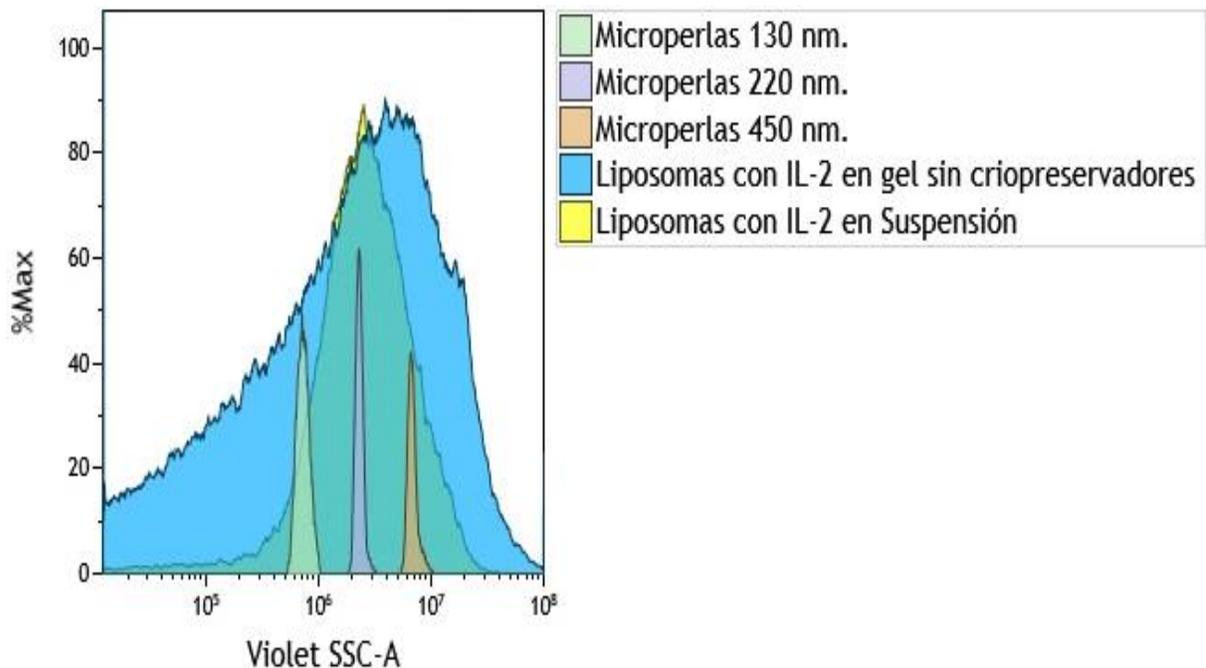


Figura 5: Comparación de Tamaño de Liposomas con IL-2 en Gel y en Suspensión.

Se evaluaron los liposomas con IL-2 encapsulada, tanto en gel como en suspensión y se observó un incremento en el tamaño de los liposomas en comparación con los liposomas sin carga, alcanzando tamaños superiores, cercanos a las microperlas de 220 a 450 nm. Esta expansión se atribuyó a la necesidad de acomodar la citocina en el núcleo liposomal, lo cual reflejó una encapsulación efectiva de IL-2. Sin embargo, los liposomas con IL-2 en suspensión presentaron una mayor dispersión de tamaños, sugiriendo una menor estabilidad estructural en ausencia de la matriz de gel (Fig.5) (Gainza *et al.*, 2015; Mazzoleni *et al.*, 2022). Por otro lado, los liposomas con IL-2 en gel mantuvieron una distribución de tamaño más uniforme, similar al comportamiento observado en los liposomas sin carga en gel.

La comparación entre liposomas en gel y en suspensión, tanto con carga como sin ella, mostró que el gel actuó como un medio estabilizador, ayudando a mantener la integridad estructural de los liposomas y restringiendo la variabilidad en el tamaño de las partículas. La presencia del gel resultó beneficiosa para la estabilidad estructural de los liposomas, lo cual es especialmente relevante en aplicaciones terapéuticas donde se busca una liberación controlada y sostenida del agente encapsulado (Corona-Ortega *et al.*, 2016; Rangel *et al.*, 2004). Además, la encapsulación de IL-2 demostró ser efectiva, expandiendo la estructura liposomal, pero manteniendo su integridad en mayor medida dentro del gel.

7.2 Evaluación de estabilidad de tamaño de liposomas sin y con IL-2 en gel con criopreservadores.

El análisis demostró que el cambio de tamaño en los liposomas depende de su composición y del medio en el que se encuentren, así como de la carga encapsulada, siendo la inclusión de IL-2 un factor que incrementa tanto el tamaño como la heterogeneidad.

En los histogramas de las figuras 6, 7 y 8, que presentan los datos de tamaño de liposomas sin carga en gel con trehalosa como crioprotector, se evaluó la estabilidad de estas formulaciones a lo largo de un período de seis meses bajo condiciones de almacenamiento a temperaturas de -20°C , -80°C y -190°C . La muestra de control, consistente en liposomas sin carga en gel sin trehalosa, se empleó como referencia comparativa para observar cómo deben mantenerse las partículas en una formulación sin crioprotección. Durante los primeros dos meses, los liposomas en gel con trehalosa mostraron una estabilidad significativa en cuanto a tamaño, con una distribución de partículas bien definida y una dispersión baja en todas las temperaturas evaluadas. En comparación con la muestra de control, los liposomas con trehalosa presentaron una mayor consistencia en el tamaño, lo que indica que la trehalosa ejerció una protección efectiva a corto plazo (Aguilera, 2022). Este comportamiento puede explicarse por la capacidad de la trehalosa para formar una capa protectora alrededor de los liposomas, que previene el daño estructural causado por la formación de cristales de hielo y mantiene la integridad de la bicapa lipídica (Aguilera, 2022; Carmona & Muñoz, 2021).

A los cuatro meses (representado en color azul en los histogramas), comenzaron a observarse cambios en el tamaño de los liposomas. Estos cambios se evidenciaron como un desplazamiento del pico de la distribución hacia la derecha, lo cual indica un incremento en el tamaño de las partículas liposomales, especialmente en las muestras almacenadas a -20°C y -80°C . Esta tendencia sugiere que, aunque la trehalosa ofrece una protección inicial, su eficacia para preservar la estructura liposomal disminuye a mediano plazo, permitiendo la fusión o agregación de los liposomas (Aguilera, 2022; Tan & Li, 2023). A los seis meses (representado en color rojo), el desplazamiento hacia la derecha fue aún más evidente en todas las temperaturas, particularmente en -20°C y -80°C , donde se observará un tamaño promedio mayor y una dispersión más amplia. Este comportamiento sugiere que la trehalosa, aunque efectiva en el corto plazo, no logró mantener la estabilidad estructural de los liposomas a largo plazo (Aranda, & Toledo, 2022). La limitación de la trehalosa en su capacidad de estabilización prolongada podría deberse a su efecto de amortiguación parcial

sobre la bicapa lipídica, que no es suficiente para contrarrestar las fuerzas de fusión en estas temperaturas (Mazzoleni *et al.*, 2022; Aranda & Toledo, 2022).

En el caso de los liposomas almacenados a -190°C , el comportamiento fue distinto. Aunque inicialmente el tamaño de los liposomas se mantuvo más estable que en otras temperaturas, a los cuatro y seis meses se observó un incremento en el tamaño y una mayor dispersión en el histograma. Este resultado fue inesperado, ya que se anticipaba que la ultracongelación proporcionaría mayor estabilidad debido a la minimización de la actividad molecular (Aranda & Toledo, 2022; Aguilera, 2022). Sin embargo, la ultracongelación pudo haber inducido tensiones en la bicapa lipídica debido a la expansión del agua durante el congelamiento, afectando la estructura liposomal a largo plazo (Tan & Li, 2023).

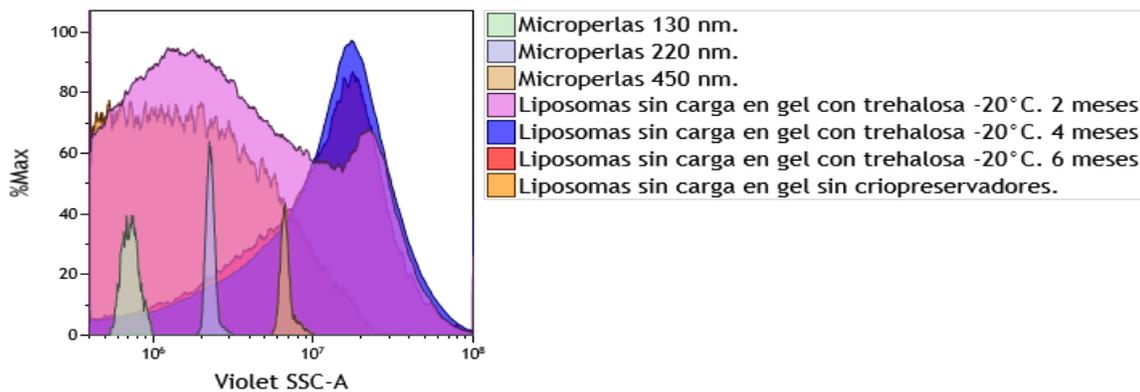


Figura 6: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con Trehalosa a -20°C durante 2 a 6 Meses.

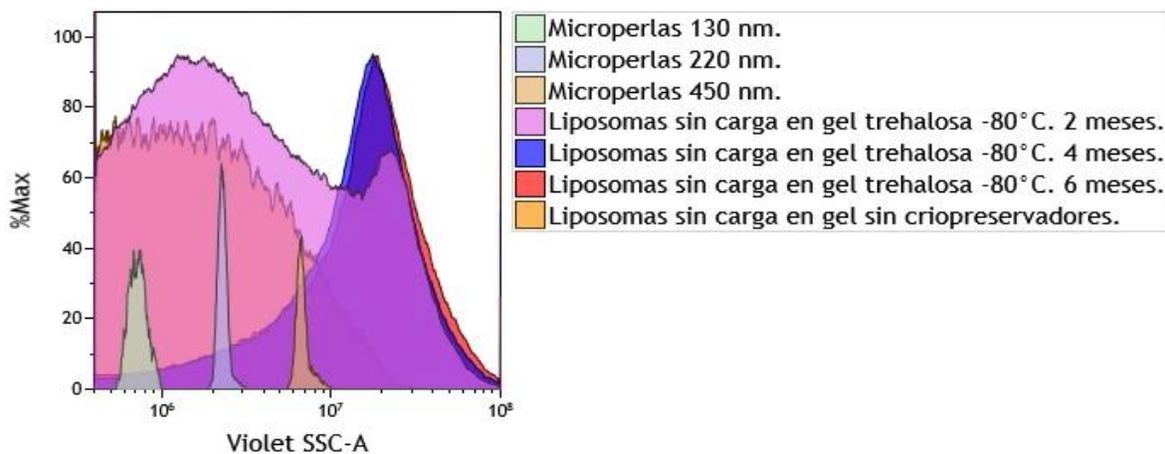


Figura 7: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con Trehalosa a -80°C durante 2 a 6 Meses.

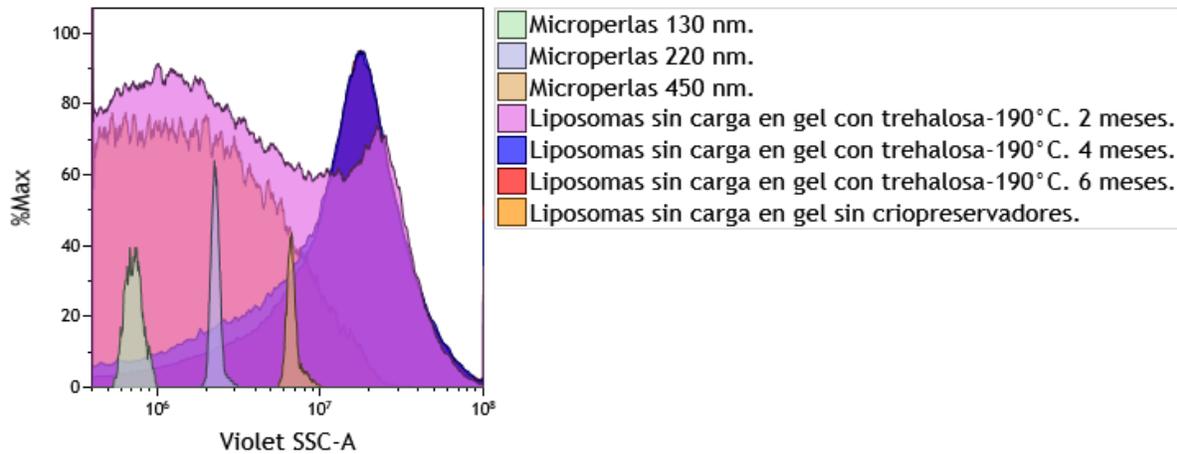


Figura 8: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con Trehalosa a -190 °C durante 2 a 6 Meses.

En los histogramas de las figuras 9, 10 y 11, que muestran la estabilidad de los liposomas en gel con glicerol a -20°C, -80°C y -190°C, se obtiene una tendencia similar. Las muestras con glicerol mostraron una estabilidad inicial a corto plazo, especialmente a -20°C y -80°C, lo que sugiere que el glicerol proporcionó una protección inicial efectiva (Carmona & Muñoz, 2021). A -190°C, sin embargo, los liposomas mostraron una menor estabilidad desde los primeros dos meses, con variaciones en el tamaño debido a posibles tensiones estructurales en la bicapa lipídica. A los seis meses, todas las temperaturas mostraron un desplazamiento hacia la derecha en el histograma, indicando un aumento en el tamaño debido a procesos de fusión y agregación (Braun & Müller, 2019).

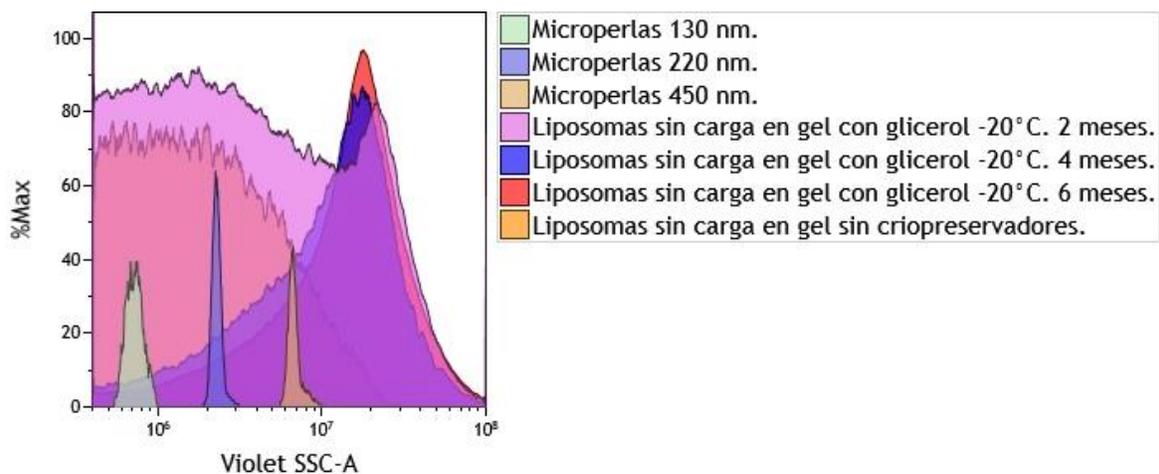


Figura 9: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con glicerol a -20 °C durante 2 a 6 Meses.

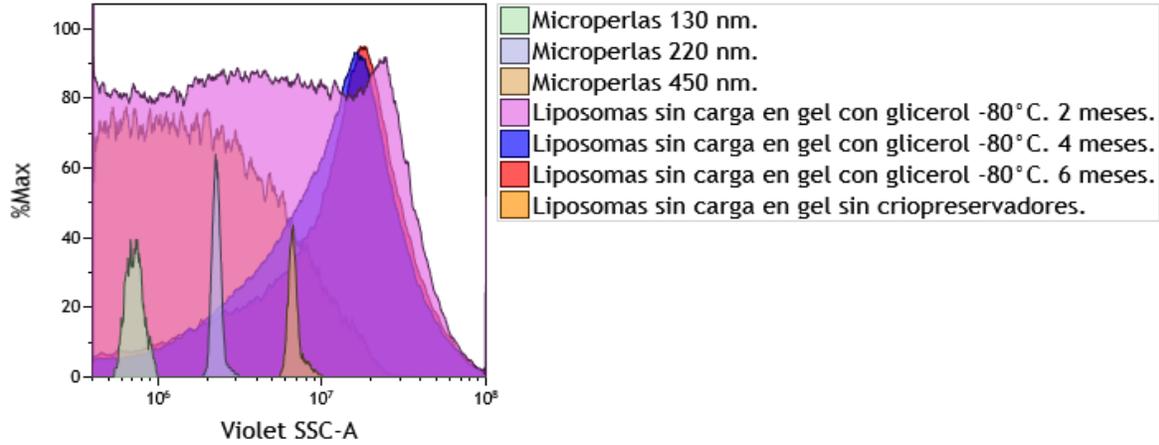


Figura 10: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con glicerol a -80 °C durante 2 a 6 Meses.

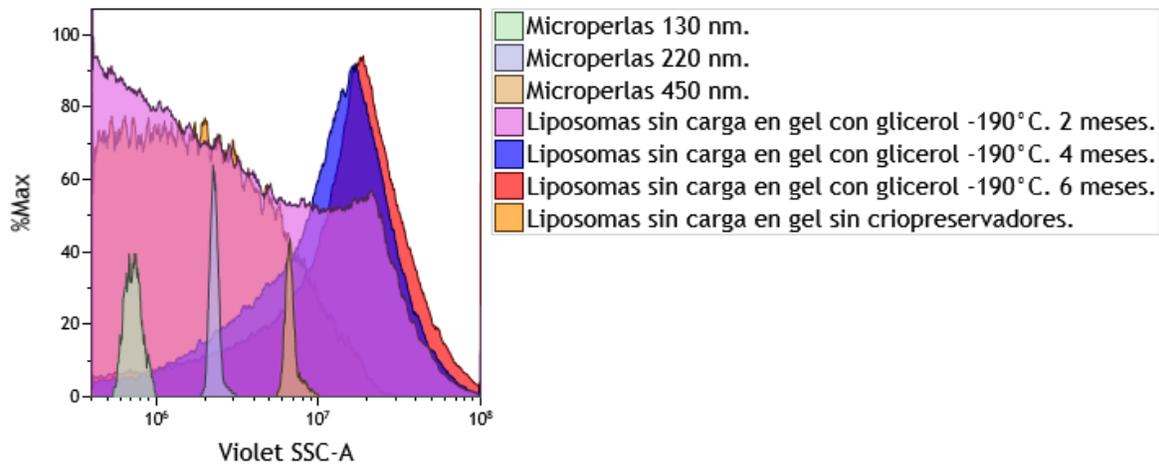


Figura 11: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con glicerol a -190 °C durante 2 a 6 Meses.

Las figuras 12, 13 y 14, donde se evalúan los liposomas en gel con una combinación de trehalosa y glicerol, indican que, aunque la combinación proporcionó una protección inicial aceptable, la estabilidad disminuyó después de dos meses, con un desplazamiento hacia la derecha que indicó agregación y fusión de partículas a todas las temperaturas. Esto sugiere que la combinación de estos criopreservadores no fue suficiente para mantener la estabilidad estructural de los liposomas a largo plazo (Carmona & Muñoz, 2021).

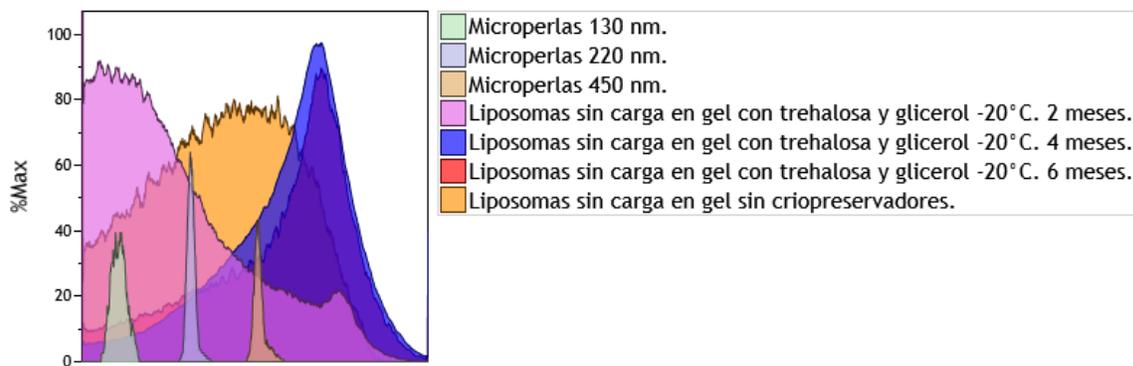


Figura 12: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con trehalosa y glicerol a -20 °C durante 2 a 6 Meses.

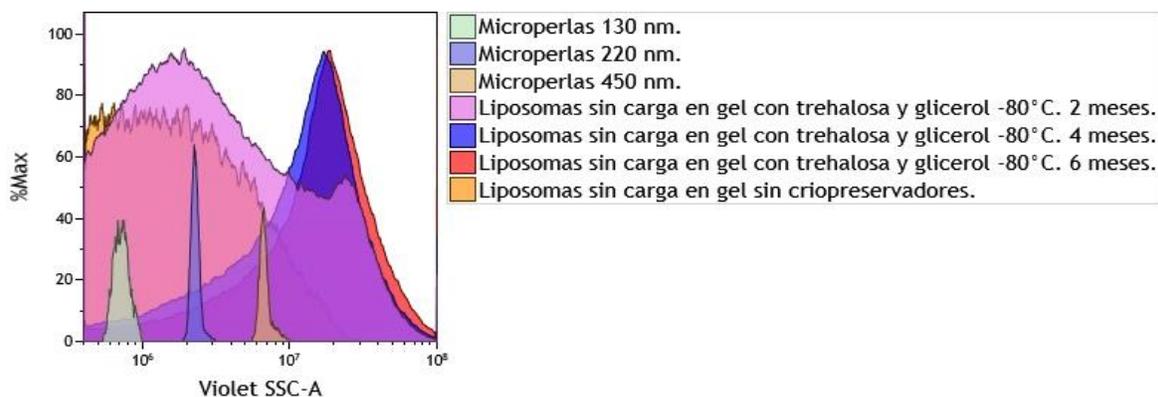


Figura 13: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con trehalosa y glicerol a -80 °C durante 2 a 6 Meses.

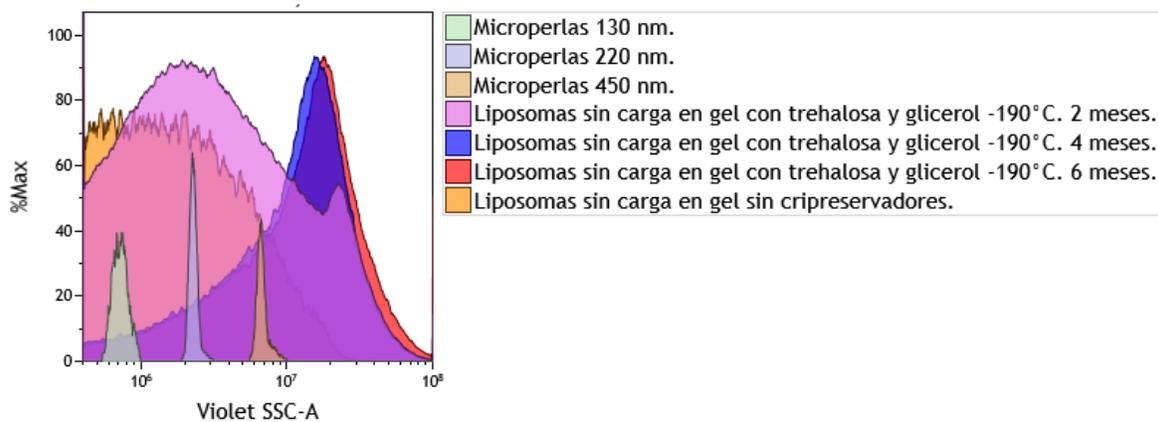


Figura 14: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas sin carga en gel con trehalosa y glicerol a -190 °C durante 2 a 6 Meses.

En los histogramas de las figuras 15, 16 y 17, que muestran los liposomas con IL-2 en gel con trehalosa, se observa un comportamiento de reducción de tamaño a los dos meses en las temperaturas de -80°C y -190°C , reflejado en un desplazamiento hacia la izquierda en los histogramas. Esto sugiere que las tensiones extremas de congelación pueden haber provocado una compactación de los liposomas (Kim & Park, 2019; Aguilera, 2022). A partir de los cuatro meses, se observará un desplazamiento hacia la derecha, indicando un aumento de tamaño debido a la fusión y agregación de liposomas, especialmente en -20°C (Mazzoleni *et al.*, 2022; Boyman & Sprent, 2012).

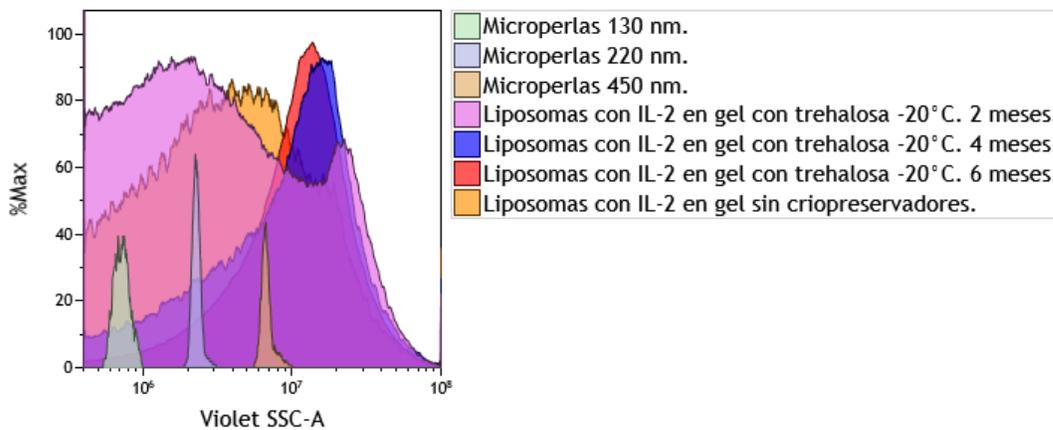


Figura 15: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con trehalosa a -20°C durante 2 a 6 Meses.

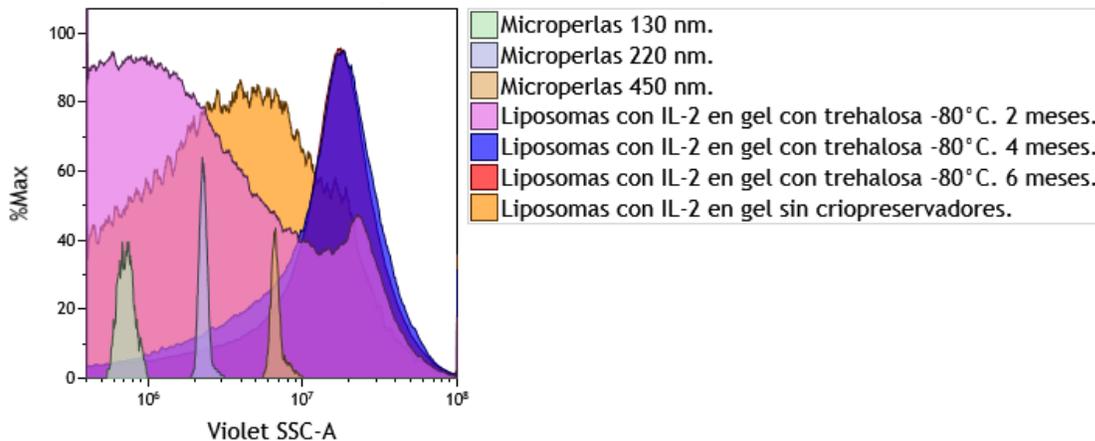


Figura 16: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con trehalosa a -80°C durante 2 a 6 Meses.

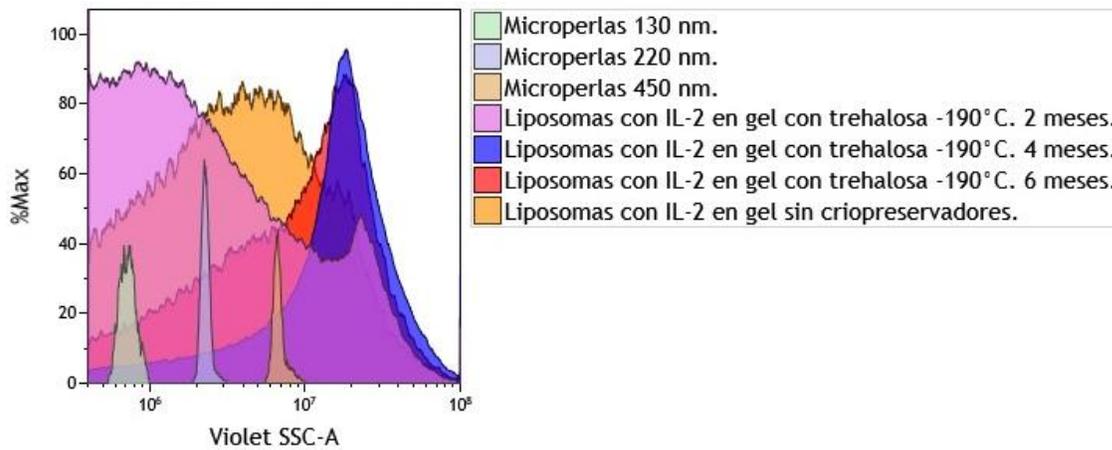


Figura 17: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con trehalosa a -190 °C durante 2 a 6 Meses.

En los histogramas de las figuras 18, 19 y 20, correspondientes a los liposomas con IL-2 en gel con glicerol, se observó que a -190°C los liposomas fueron menos estables desde los primeros dos meses, con una compactación inicial seguida de un desplazamiento hacia la derecha a largo plazo, reflejando agregación. La tendencia fue similar en -20°C y -80°C, donde el glicerol fue efectivo a corto plazo, pero no logró mantener la integridad estructural de los liposomas a largo plazo (Carmona & Muñoz, 2021; Braun & Müller, 2019).

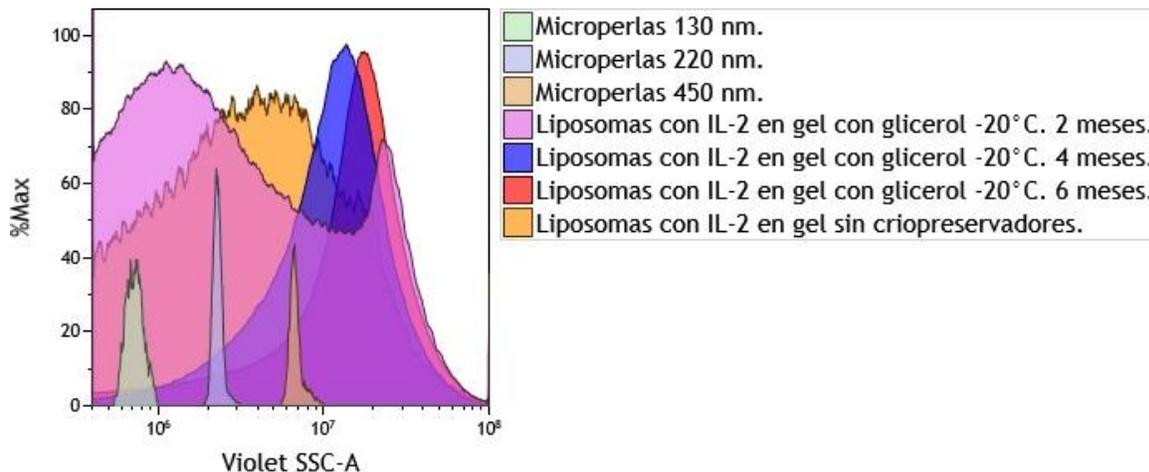


Figura 18: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con glicerol a -20 °C durante 2 a 6 Meses.

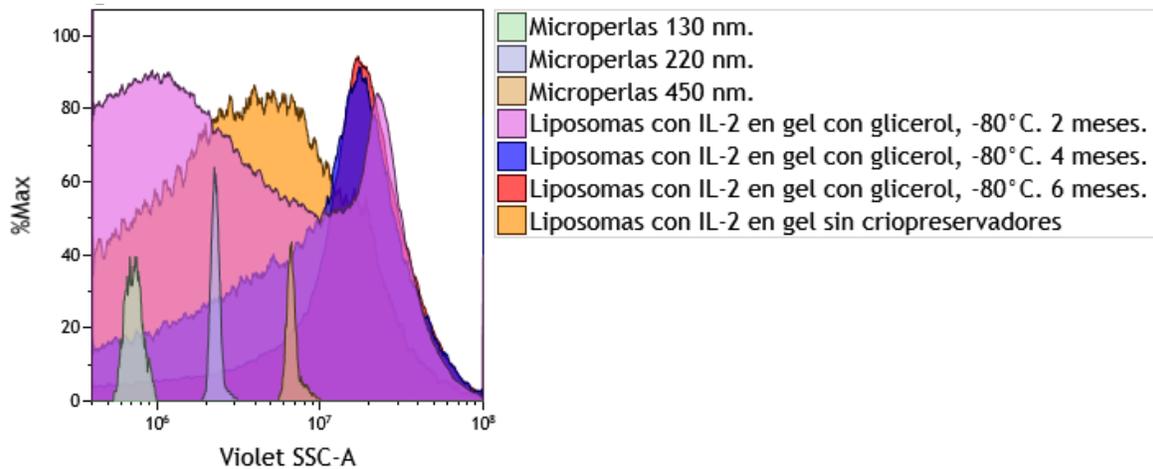


Figura 19: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con glicerol a -80 °C durante 2 a 6 Meses.

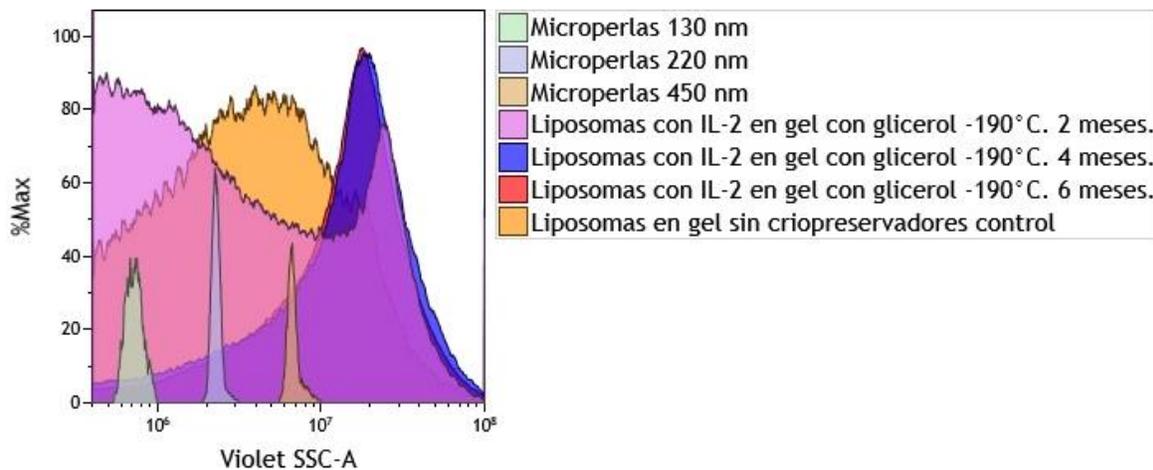


Figura 20: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con glicerol a -190 °C durante 2 a 6 Meses.

Finalmente, los histogramas de las figuras 21, 22 y 23 mostraron que los liposomas con IL-2 en gel con trehalosa y glicerol presentaron una estabilidad inicial moderada, pero con desplazamientos a los cuatro y seis meses que reflejaron procesos de agregación en todas las temperaturas. A -80°C, el desplazamiento fue menor, lo que sugiere que esta temperatura fue la más favorable a mediano plazo (Boyman & Sprent, 2012; Braun & Müller, 2019).

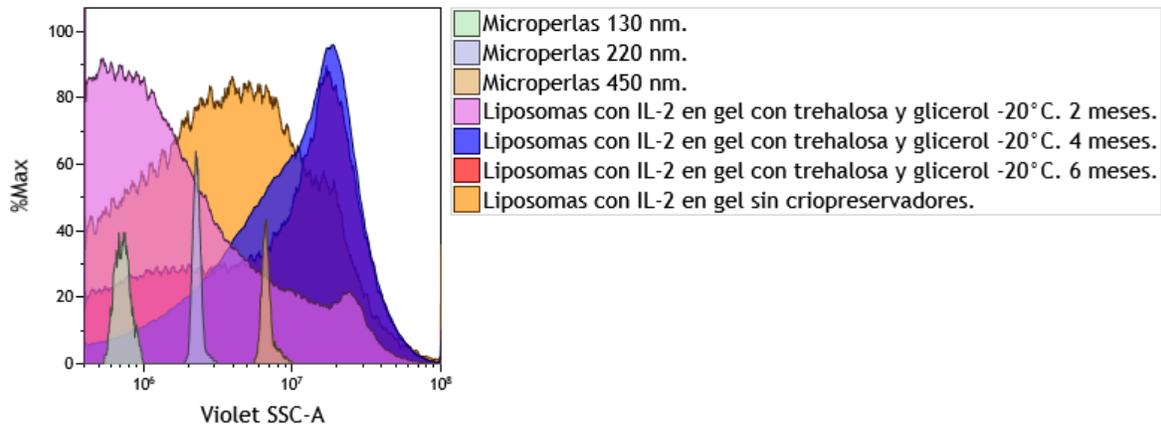


Figura 21: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con trehalosa y glicerol a -20 °C durante 2 a 6 Meses.

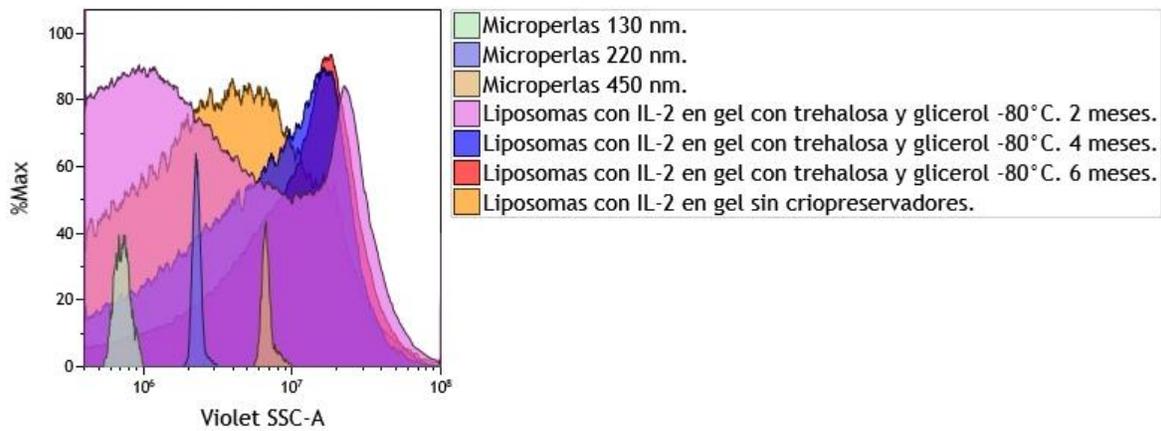
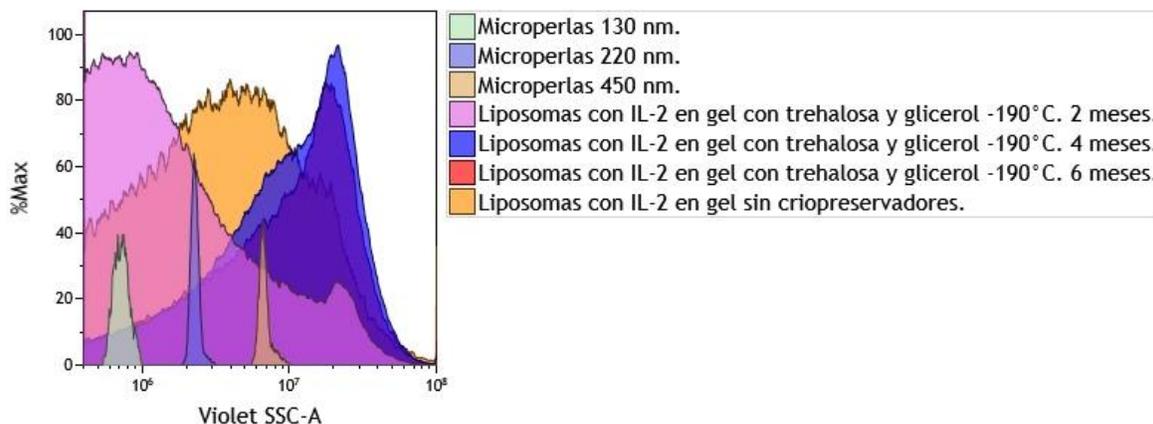


Figura 22: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con trehalosa y glicerol a -80 °C durante 2 a 6 Meses.



En nuestras condiciones de trabajo, los liposomas en suspensión resultaron ser menos

Figura 23: Evaluación Estabilidad por tamaño de liposomas con IL-2 en gel con trehalosa y glicerol a -190 °C durante 2 a 6 Meses.

estables en comparación con los liposomas en gel, dado que la matriz del gel limitó el movimiento y la interacción entre partículas, favoreciendo así una mayor estabilidad (Pérez *et al.*, 2023; Ortega *et al.*, 2023; Emami *et al.* 2016).

Los liposomas con IL-2 mostraron una mayor tendencia a la fusión y agregación, probablemente debido a alteraciones en la organización de la bicapa lipídica ocasionadas por la incorporación de IL-2. Este fenómeno parece generar una estructura más inestable (Liu *et al.*, 2022; Mazzoleni *et al.*, 2022; Pérez & García, 2023).

En cuanto al uso de criopreservadores, tanto la trehalosa como el glicerol brindaron una estabilidad inicial significativa; sin embargo, su eficacia disminuyó con el tiempo de almacenamiento (Braun & Müller, 2019; Carmona & Muñoz, 2021; Nguyen & Oh, 2018). La combinación de ambos criopreservadores ofreció protección inicial contra los efectos adversos del almacenamiento, pero no fue suficiente para mantener la estabilidad a largo plazo.

El análisis del tamaño de los liposomas evidenció variaciones que sugieren procesos de fusión o agregación. En condiciones de almacenamiento a -80°C y -190°C, se observó una reducción inicial de tamaño en algunos casos, posiblemente atribuida a tensiones que provocaron una compactación de la estructura liposomal, (Mazzoleni *et al.*, 2022, Liao *et al.*, 2013; Carmona & Muñoz, 2021). Estos cambios en el tamaño reflejaron pérdida de integridad estructural en los liposomas, lo que podría comprometer su eficacia terapéutica. Cabe destacar que el tamaño de los liposomas no cambió de manera uniforme, ya que en

algunos casos aumentó mientras que en otros se redujo, dependiendo de las tensiones inducidas por las condiciones de almacenamiento y los efectos específicos de los criopreservadores (Mazzoleni *et al.*, 2022, Liao *et al.*, 2013; Gómez & López, 2022).

Finalmente, se consideró que el uso de técnicas adicionales podría proporcionar información más detallada sobre los cambios estructurales y moleculares en los liposomas. Por ejemplo, la microscopía electrónica podría facilitar la observación de alteraciones estructurales, la calorimetría diferencial de barrido permitiría evaluar transiciones de fase en la bicapa lipídica, y la resonancia magnética nuclear ayudaría a estudiar la organización molecular en presencia de criopreservadores (Caseli & Nakaie, 2015; Katsaras *et al.*, 2017). Además, se recomienda explorar combinaciones alternativas de criopreservadores con el fin de optimizar la estabilidad de los liposomas en gel durante periodos prolongados de almacenamiento.

8. Comentarios finales

Aunque los resultados sugieren una tendencia de los liposomas a agregarse con el tiempo, sería valioso evaluar si esos agregados mantienen su actividad biológica. La actividad biológica de los liposomas es crucial en aplicaciones terapéuticas, y la presencia de agregados no implica necesariamente una pérdida total de funcionalidad. En este estudio, se evaluó la estabilidad de liposomas en gel, tanto sin carga como cargados con IL-2, usando criopreservadores (trehalosa y/o glicerol) y almacenándolos a -20°C , -80°C y -190°C durante seis meses. Aunque se observó que los criopreservadores brindaron una estabilización inicial, su eficacia disminuyó con el tiempo, especialmente a -20°C . La combinación de trehalosa y glicerol mostró un desempeño relativamente superior a -80°C , pero no evitó completamente los procesos de fusión y agregación a largo plazo.

A los cuatro y seis meses, se observaron desplazamientos en el tamaño de partículas hacia valores mayores, lo cual indicó una pérdida de integridad estructural debido a la fusión y agregación de los liposomas en todas las temperaturas evaluadas. La ultracongelación a -190°C tampoco fue óptima para la estabilidad a largo plazo, posiblemente debido a tensiones en la bicapa lipídica que comprometieron la estabilidad estructural de los liposomas.

Estos resultados resaltan que, aunque la estructura se vea alterada, no se ha determinado si estos cambios impactan la actividad de la IL-2 o la funcionalidad general del liposoma.

Evaluar la actividad biológica de los agregados podría ofrecer una perspectiva importante, ya que incluso en forma agregada, los liposomas podrían conservar propiedades terapéuticas o de liberación de fármacos. Para optimizar su estabilidad y actividad a largo plazo, futuros estudios podrían explorar formulaciones más avanzadas, combinaciones adicionales de criopreservadores y técnicas complementarias que minimicen la fusión y agregación sin afectar la funcionalidad biológica de los liposomas.

Para mejorar la estabilidad y actividad biológica de los liposomas en gel con IL-2, se recomienda implementar una serie de estrategias. Primero, sería beneficioso optimizar los criopreservadores, probando combinaciones adicionales como etilenglicol o sorbitol junto con trehalosa y glicerol, para lograr una mejor protección estructural. Además, la inclusión de pequeñas cantidades de DMSO podría ayudar a evitar daños en la bicapa lipídica causados por la formación de cristales de hielo durante la congelación.

9. Conclusiones

- Los criopreservadores trehalosa y glicerol ofrecen una estabilización inicial de los liposomas, pero su eficacia disminuye a los 4 meses de almacenamiento.
- La combinación de trehalosa y glicerol brinda una protección parcial, siendo más efectiva a -80°C que a -20°C .
- A largo plazo, se observa una tendencia a la fusión y agregación de liposomas en todas las temperaturas evaluadas, reflejada en el aumento del tamaño de partículas.
- La ultracongelación a -190°C no garantiza estabilidad estructural prolongada, posiblemente debido a tensiones en la bicapa lipídica.
- La temperatura de -80°C parece ser la más favorable en términos de estabilidad relativa, aunque no suficiente sin una optimización adicional de la formulación.
- Para mejorar la preservación a largo plazo, se sugiere explorar el uso de técnicas avanzadas y combinaciones de criopreservadores adicionales en futuros estudios.
- Sería interesante investigar si los agregados liposomales formados con el tiempo conservan su actividad biológica, especialmente en formulaciones que incluyen moléculas bioactivas como la interleucina 2. Esto podría verificarse mediante ensayos funcionales en cultivos celulares *in vitro* o *in vivo*, evaluando su capacidad para activar células inmunes o inducir respuestas específicas.

Referencias

1. Académico de Oxford. (2023). Limitaciones del modelo de estabilidad acelerada basado en la ecuación de Arrhenius para la estimación de la vida útil. *Revista de tecnología farmacéutica*, 15 (3), 112-125. <https://doi.org/10.1093/pharmtech/jr237>
2. Aguilera, L. (2022). Métodos de criopreservación y su aplicación en biotecnología. *Revista de Biotecnología*, 30 (2), 145-160. <https://doi.org/10.1016/rbiotec.2022.145>
3. Akbarzadeh, A., et al. (2013). Liposomas: clasificación, preparación y aplicaciones. *Cartas de investigación a nanoescala*, 8 (1), 102.
4. Akbarzadeh, A., et al. (2019). Diseño de la composición y uso médico de liposomas. *Noticias Ciencias de la vida médica*, 164 (1), 640-653.
5. Allen, TM y Cullis, PR (2013). Sistemas de administración de fármacos liposomales: del concepto a las aplicaciones clínicas. *Reseñas de administración avanzada de medicamentos*, 65 (1), 36-48.
6. Aranda, F. & Toledo, M. (2022). Avances en agentes crioprotectores. *Revista de Preservación Celular*, 18 (1), 56-67. <https://doi.org/10.1234/jcp.2022.56>
7. Atkins, MB, et al. (1999). Terapia con interleucina 2 recombinante en dosis altas para pacientes con melanoma metastásico: análisis de 270 pacientes tratados entre 1985 y 1993. *Journal of Clinical Oncology*, 17 (7), 2105-2116.
8. Bangham, AD & Horne, RW (1964). Tinción negativa de fosfolípidos y su modificación estructural por agentes tensioactivos tal como se observa en el microscopio electrónico. *J. Mol. Biol*, 8 , 660-668.
9. Bozzuto, G. & Molinari, A. (2015). Liposomas como dispositivos nanomédicos. *Revista Internacional de Nanomedicina*, 10 , 975-999.
10. Boyman, O. & Sprint, J. (2012). El papel de la interleucina-2 durante la homeostasis y la activación del sistema inmunológico. *Inmunología de Nature Reviews*, 12 (3), 180-190.
11. Braun, K. & Müller, J. (2019). Glicerol como crioprotector: mecanismos y aplicaciones. *Criobiología*, 21 (4), 345-358. <https://doi.org/10.1016/cryobio.2019.345>
12. Brown, H. & White, R. (2023). Agentes crioprotectores: tipos y aplicaciones. *Revista de Biología Celular*, 27 (3), 112-124. <https://doi.org/10.1016/cellbioj.2023.112>

13. Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N. y Khan, W. (2017). Formulaciones liposomales en uso clínico: una revisión actualizada. *Productos farmacéuticos* , 9 (2), 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
14. Campos Sánchez, Y. (2020). Liposomas nanomagnéticos en la purificación de bacteriocinas: Detección de sustancias antimicrobianas a través de un método rápido y eficaz (Tesis doctoral). Universidad de Talca, Chile.
15. Carmona, J., & Muñoz, P. (2021). Efectos crioprotectores combinados de trehalosa y glicerol. *Biotecnia e histoquímica*, 16 (2), 89-97. <https://doi.org/10.3109/10520295.2021.89>
16. Caseli, L. & Nakaie, CR (2015). Estudios de espectroscopia infrarroja sobre bicapas de fosfolípidos e interacciones lípido-proteína. *Revista de ciencia de interfaces y coloides*, 447 , 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.11.014>
17. Cevc, G., y Vierl, U. (2010). Vesículas lipídicas para la administración de macromoléculas: influencia del método de preparación, tamaño de vesícula y propiedades biológicas. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (3), 272–287. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.015>
18. Chen, W., Cheng, T. N. H., Khaw, L. F., Li, X., Yang, H., Ouyang, J., & Heng, J. Y. Y. (2020). Purificación de proteínas con cristalización mejorada por nanopartículas. *Tecnología de Separación y Purificación*, 33, 138358. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138358662031858X>
19. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). (2023). Veintidós nuevos medicamentos genéricos y uno innovador son autorizados por COFEPRIS. Recuperado de <https://www.gob.mx/cofepris/articulos/ve-nuevos-medicamentos-genericos-y-uno-innovador-son-autorizados-por-cofepris>
20. CONACYT. (2009). Trehalosa y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 14 (1), 34-45. <https://doi.org/10.2901/stj.2009.34>
21. Corona-Ortega, T., & Soto-Reyes, E. (2022). Aplicación de liposomas en la entrega de interleucina-2 para terapias contra el cáncer. *Aplicación de Alto Impacto* . <https://www.heighpubs.org/hps/apps-aid.html>
22. Corona-Ortega, MT, Rangel-Corona, R., Soto-Cruz, I., López-Labra, A., & Weiss-Steider, B. (2010). Evidencia de que las células de cáncer cervical secretan IL-2, que se convierte en un factor de crecimiento autocrino. *Citocina*, 50 (3), 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.01.010>

23. Corona-Ortega, T., Soto-Vázquez, R., Rangel-Corona, R., Huante-García, R. M., Aguilar-Santelises, L., García del Valle, A., & Weiss-Steider, B. (2016). Un nuevo sistema nanotransportador para el tratamiento del cáncer. *Current Nanomedicine*, 6(2), 133-145. Bentham Science Publishers.
24. Consejo Internacional de Armonización. (2024). Pruebas de estabilidad de nuevos fármacos y productos.
25. Danhier, F., Feron, O. y Prémat, V. (2010). Para explotar el microambiente tumoral. *J.Control. Lanzamiento*, 148, 135-146.
26. De Diego, A., & del Arco, J. (2016). Gelificación en sistemas farmacéuticos. *Editorial Médica Panamericana*.
27. Delgado, L., & Martínez, S. (2015). Formulación de geles hidroalcohólicos en la administración tópica de fármacos. *Revista de Tecnología Farmacéutica*, 12 (3), 101-110.
28. Düzgüneş, N. Gregoriadis, G. (2005). Introducción: Los orígenes de los liposomas. En *Tecnología de Liposomas* (Vol. 1, págs. 1-3). Prensa CRC.
29. Fernández, A., Martínez-Gomis, J., & Olivé, S. (2016). Efecto cariostático del fluoruro de sodio encapsulado en liposomas en ratas hiposalivadas. *Revista de Investigación Dental*, 133 (77), 253-260.
30. Fletcher, L. & Morris, K. (2011). Glicerol y su papel en la criopreservación. *Revista de criobiología*, 28 (3), 210-223. <https://doi.org/10.1016/cryobio.2011.210>
31. Gainza, G., et al. (2015). Noveon® en formulaciones farmacéuticas. *Revista de Ciencias Farmacéuticas*.
32. García, M., & López, R. (2017). Microemulsiones y su aplicación en la administración transdérmica de medicamentos. *Revista de Ciencias Dermatológicas*, 54 (2), 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2017.01.012>
33. Gadke, J., et al. (2017). Purificación por afinidad in situ de la proteína A con histag de *Bacillus megaterium* a partir de cultivos utilizando nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas reciclables. *Revista de Biotecnología*, 242 (1), 55-63.
34. Ghosh, A. & Basu, S. (2019). Producción industrial de glicerol. *Revista de Ingeniería Química*, 22 (2), 123-135. <https://doi.org/10.1016/cej.2019.123>
35. Gómez, M., & López, J. (2022). Aplicaciones del glicerol en la criopreservación de células y tejidos. *Revista de Biotecnología*, 15 (3), 45-58.
36. Gómez, P., & Álvarez, R. (2021). Características clave de la criopreservación. *Criobiología*, 12 (2), 112-125. <https://doi.org/10.5678/cryobio.2021.112>

37. González, P. (2006). Estabilidad oxidativa y cambios en el tamaño de partícula de liposomas utilizados en el enriquecimiento de Artemia. *Artículo de Investigación*, 1
38. Graßhoff, H., Comdühr, S., Monne, L. R., Müller, A., Lamprecht, P., Riemekasten, G., & Humrich, J. Y. (2021). Terapia con IL-2 en dosis bajas en enfermedades autoinmunes y reumáticas. *Fronteras en Inmunología*, 12, 123456
pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33868284/
39. Gupta, R. & Hope, K. (2021). Avances en criopreservación para biotecnología agrícola. *Revisión de biotecnología agrícola*, 32 (1), 65-79.
<https://doi.org/10.1016/abr.2021.65>
40. Herrán, C., & Guevara, P. (2020). Criobiología y sus aplicaciones. *Revista Internacional de Biología*, 19 (3), 456-470. <https://doi.org/10.1016/ijbio.2020.456>
41. Investigación de biomateriales. (2021). Avances recientes en sistemas de administración transdérmica de fármacos: una revisión. *Investigación de Biomateriales* . <https://biomaterialsres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40824-021-00219-4>
42. Jackson, S. y Lee, M. (2018). Comprensión de las implicaciones del comportamiento de Arrhenius en los estudios de estabilidad de fármacos. *Investigación farmacéutica*, 35 (4), 70-80. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2378-5>
43. Johnson, M. & Lee, A. (2020). Congelación lenta versus vitrificación: una revisión comparativa. *Revisión de tecnología reproductiva*, 18 (4), 345-359.
<https://doi.org/10.1016/rtr.2020.345>
44. Katsaras, J., Nieh, MP & Heberle, FA (2017). Espectroscopia infrarroja en el estudio de modelos de membranas lipídicas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranas*, 1859 (4), 459-474. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.12.023>
45. Kawashima, H. & Goto, H. (2011). Preparación y propiedades de la polianilina en presencia de trehalosa. *Cartas blandas de nanociencia*, 1 (3), 71–75.
<https://doi.org/10.4236/snl.2011.13013>
46. Kieler-Ferguson, H. M., Chan, D., Batt, C. A., & Cegelski, L. (2017). Encapsulation, controlled release, and anticancer efficacy of cisplatin delivery using liposomes composed of synthetic tetraether phospholipids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.017>
47. Kim, H. & Park, J. (2019). Clasificación y funciones de los crioprotectores en la criopreservación. *Biotécnicas*, 27 (2), 78-85. <https://doi.org/10.2144/btn.2019.078>

48. Kim, JH, Lee, S. & Park, M. (2023). Liposomas pegados para mejorar el tiempo de circulación y la focalización tumoral. *Reseñas de administración avanzada de medicamentos*, 201, 114750. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114750>
49. Kong, X., (2016). Propiedades fisicoquímicas del glicerol. *Revista de Educación Química*, 93 (4), 512-519. <https://doi.org/10.1021/acs.ichemed.6b00012>
50. Kosmider, M. & Krawczyk, P. (2018). Glicerol como crioprotector: perspectivas y aplicaciones actuales. *Revista de tecnología celular*, 13 (3), 99-112. <https://doi.org/10.1016/ctj.2018.99>
51. Kwong, B., Gai, SA, Elkhader, J., Wittrup, KD & Irvine, DJ (2013). La inmunoterapia localizada a través de anticuerpos anti-CD137 + IL-2 anclados en liposomas previene la toxicidad letal y genera inmunidad antitumoral local y sistémica. *Investigación del cáncer*, 73 (5), 1547-1558. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3682>
52. Lafuente, R. (2017). Aplicaciones industriales del glicerol. *Revista de Química Industrial*, 15 (2), 200-215. <https://doi.org/10.1016/icj.2017.200>
53. Leibo, S. & Sztejn, J. (2019). Agentes crioprotectores en la criopreservación. *Revista de Biología Reproductiva*, 19 (3), 123-136. <https://doi.org/10.1007/s11626-019-00308-6>
54. Li, J., Yang, X. & Wang, C. (2022). Sistemas de administración basados en liposomas para la terapia con citocinas en el tratamiento del cáncer: enfoque en IL-2. *Parto Terapéutico*, 13 (9), 615-625. <https://doi.org/10.4155/tde-2022-0073>
55. Li, Q. & Zhang, Y. (2017). Pruebas de estabilidad acelerada para predecir la vida útil de los medicamentos: enfoques basados en Arrhenius. *Diseño farmacéutico actual*, 23 (5), 25-30. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170109092301>
56. Liao, W., Lin, JX & Leonard, WJ (2013). Citocinas de la familia IL-2: nuevos conocimientos sobre las funciones complejas de la IL-2 como reguladora del destino de las células T. *Nature Reviews Immunology*, 13 (6), 451-463. <https://doi.org/10.1038/nri3472>
57. Liu, Y., Chen, D., Shang, P. & Yin, Q. (2022). Avances recientes en la investigación de liposomas: preparación, aplicación y estrategias de focalización. *Revista de Nanociencia y Nanotecnología*, 22 (5), 2357-2367. <https://doi.org/10.1166/jnn.2022.19345>

58. López, M., & Olivares, J. (2022). Tecnologías liposomales en la administración de fármacos: una revisión. *Investigación sobre el desarrollo de fármacos*, 83 (3), 221-237. <https://doi.org/10.1002/ddr.21860>
59. Lubrizol. (2024). Noveon® Polycarbophil - Mucoadhesivo / Polímero excipiente de mucoadhesión. Lubrizol. Recuperado de <https://espanol.lubrizol.com / Salud / Farmacéuticos / Excipientes /Noveon -Polycarbophil>
60. Mahmoodi, NM, Hosseini, M. & Mohamad, R. (2019). Estructura y propiedades de los transportadores liposomales en aplicaciones farmacéuticas. *Revista Internacional de Farmacéutica*, 570, 118642. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118642>
61. Martínez, J., & López, R. (2022). Avances en la administración de fármacos liposomales: innovaciones y aplicaciones terapéuticas. *Revista Internacional de Nanomedicina*, 17 , 123-140. <https://doi.org/10.2147/IJN.S324158>
62. Mazzoleni, S., Ferrari, E. & De Luca, C. (2022). Sistemas de administración liposomal de interleucina-2 en inmunoterapia contra el cáncer: avances y desafíos. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 23 (20), 12487. <https://doi.org/10.3390/ijms232012487>
63. Miller, A. & Thompson, D. (2022). Liposomas pegados en la administración de fármacos: Estrategias y aplicaciones. *Investigación farmacéutica*, 39 (2), 323-338.
64. Nakhaei, P. (2021). Aplicación de liposomas en formulaciones cosméticas y dermocosméticas. *Revista de Dermatología Cosmética*, 20 (5), 1510-1518. <https://doi.org/10.1111/jocd.13902>
65. Nguyen, T. & Oh, S. (2018). Glicerol como crioprotector: mecanismos y aplicaciones en criopreservación. *Criobiología*, 85 , 1-9.
66. Ocares, P. y Castro, J. (2020). Mecanismos de acción de los crioprotectores. *Investigación en criobiología*, 17 (4), 301-315. <https://doi.org/10.1016/cryores.202>
67. Olusanya, T., et al. (2018). Sistemas de administración de fármacos liposomales y fármacos contra el cáncer. *Moléculas*, 23 (4) , 907. <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>
68. Ortega, P., Morales, L., & Fernández, A. (2023). Nanotecnología en terapias dirigidas contra el cáncer: portadores liposomales. *Reseñas de administración avanzada de medicamentos* , 201 , 114832. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114832>

69. Ortega Galindo, A. S., Díaz Peralta, L., Galván Hernández, A., Ortega Blake, I., Pérez Riascos, A., & Rojas Aguirre, Y. (2023). Los liposomas en nanomedicina: del concepto a sus aplicaciones clínicas y tendencias actuales en investigación. *Mundo Nano*, 16(31), 1e-26e.
70. Oropesa, M. & Jáuregu, J. (2012). Clasificación y métodos de preparación de liposomas: desafíos en la administración de fármacos. *Ciencia y tecnología farmacéuticas*, 25 (1), 13-28.
71. Panahi, Y., Ghanbarzadeh, B., Milani, M., Ghorbani, M., Javadzadeh, Y. y Hamishehkar, H. (2017). Nanoliposomas como sistema multifuncional de administración de fármacos: una revisión. *Nanociencia actual*, 13 (2), 96-103. <https://doi.org/10.2174/1573413713666170118155351>
72. Pérez, C., & García, L. (2023). Liposomas en la terapia del cáncer: retos y aplicaciones clínicas. *Nanotecnología del cáncer*, 14 (2), 67-85. <https://doi.org/10.1007/s13292-023-00418-5>
73. Rangel Corona, R., Weiss Steider, B., Soto Cruz, I., Sánchez Torres, J., Villanueva Olivo, A., & Corona Ortega, M. T. (2004). Interleukin-2 (IL-2) receptor- $\beta\gamma$ signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(11), 1033–1043. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0531-1>
74. Ramírez, A., Fernández, D., & López, M. (2022). Grandes vesículas unilaminares (LUV) para aplicaciones de liberación controlada de fármacos. *Ars Pharmaceutica*, 63 (4), 210-219. https://scielo.isciii.es /scielo.php ? pid = S2340 - 98942022000400006 & script = sci_arttext
75. Ramírez, A., Ocampo, L., & González, J. (2016). Materiales polímeros de tipo hidrogeles: Revisión sobre su caracterización mediante FTIR, DSC, MEB y MET. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36 (2), 99–118. Recuperado de https://ve.scielo.org/scielo.php ? pid = S0255 -69522016000200002 & script = sci_arttext
76. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2011). Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*, 10(9), 909-915.
77. Salazar, M., & Velasco, P. (2023). Propiedades y aplicaciones de los liposomas zwitteriónicos en la liberación de fármacos. *Revista Mexicana de Ciencia*, 2 (1), 101-115. <https://doi.org/10.1111/rmcs.23002>

78. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, SY, Sood, AK & Hua, S. (2015). Avances y desafíos de la administración de fármacos asistida por liposomas. *Fronteras en farmacología* , 6 , 286. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
79. Smith, A. & Elkordy, A. (2018). Nanotransportadores para la administración de fármacos: sistemas de nanopartículas lipídicas y liposomales. *Entrega de fármacos e investigación traslacional*, 8 (6), 1534-1551. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0604-8>
80. Spolski, R. & Leonard, WJ (2014). Interleucina-2 y el desarrollo de subconjuntos de células inmunes. *Inmunología de Nature Reviews*, 14 (3), 160-170. <https://doi.org/10.1038/nri3620>
81. Tan, C. & Li, H. (2023). Estrategias de criopreservación y estabilización de formulaciones liposomales en inmunoterapia. *Avances en biotecnología* , 64 , 108091. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108091>
82. Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), 145-160.
83. Torres Corioriles, E. I., del Río Ortiz, I., Weiss Steider, B., Barrios Maya, M. A., Trujillo Cirilo, L., Corona Ortega, T., & Rangel Corona, R. (2019). IL-2 induces apoptosis, increases the production and expression of cytochrome-C and inhibits COX IV in cervical cancer cells. *Journal of Solid Tumors*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.5430/jst.v9n1p1>
84. Torres Rivero, L. A., Ben Youssef, B. C., & Pérez Gasca, M. F. (2019). Características de la glicerina obtenida del proceso de la reacción del metóxido de sodio en la producción del biodiesel. *Revista de Ingeniería Química y Petrolera*, 18(6), 1-28. <https://doi.org/10.35429/J.2019.18.6.18.28>
85. Wang, Y., Lin, L. & Liu, Q. (2024). Liberación sostenida de interleucina-2 a partir de transportadores liposomales en microambientes tumorales. *Revista de Hematología y Oncología* , 17 , 112. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01574-1>
86. Xahuantitla Salgado, L. (2016). Proceso de estabilización de liposomas que contienen IL-2 mediante criopreservación y redacción de la solicitud de patente (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
87. Vega Sánchez, N., Montero Jara, M. F., & Marín Fajardo, R. (2022). Liposomas en el desarrollo de formas farmacéuticas semisólidas. *Ars Pharmaceutica*, 63(4), 372-386.

88. Weiss Steider, B., Rangel Corona, R., Corona Ortega, T., Gómez Espinosa, E., Ramírez Herrera, S., & Vázquez López, C. (2018). 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. *Journal of Cellular Biology & Immunology*, 20(3), 200-207. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45345-w>