

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer Laboratorio de Oncología.

Efecto de la IL-2 encapsulada en liposomas neutros y aniónicos sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMAÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
ANTONIO AYALA ALPUCHE

Directora de tesis:
M. en C. Rosalva Rangel Corona
Asesora:
Dra. Teresa Corona Ortega

México, D.F. 2005

m 345415

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Te doy gracias Señor por haberme dado una Familia de la cual he recibido durante toda mi vida cariño, respeto, comprensión y apoyo. Por darme como compañera una mujer grandiosa y un bebé maravilloso y por haber puesto en mi camino a tantas personas que siempre han estado incondicionalmente conmigo.

A mi Familia

Papá, Mamá, Alex, Arlette, Eric Alejandro y Jorge Alberto les doy gracias por todo el apoyo que me han brindado durante toda mi formación académica, por estar siempre conmigo y confiar, dándome su apoyo y perdonando mis errores, gracias por que sin ustedes no sería la persona que ahora soy.

A mi esposa

Guadalupe este reconocimiento es también tuyo, por todo el apoyo que me has brindado, en esos momentos difíciles, en donde siempre estuviste ahí para alentarme, corregirme e impulsarme; por que esta es solo una meta más de las que hemos logrado y de las muchas más que tenemos por delante, por eso te doy las gracias.

A mis amigos

Gracias Ramón, Apolinar, Eduardo, Carlos, Alberto, Daniel Corona, Saúl, Moisés, Arturo Frías, Daniel Jiménez, Francisco, Adolfo, Karina, Gisela, Carmen, Olivia, Liliana, Miriam, Luis, Arturo Valle, Alejandro, etc. por hacer esta carrera más amena y compartir sus conocimientos y vivencias

A mis profesores

Gracias a la Maestra Rosalva Rangel Corona por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, permitiéndome adquirir nuevos conocimientos para desarrollarme profesional y personalmente; a la Dra. Teresa Corona Ortega por su valioso apoyo en la comprensión y elaboración de liposomas. Por su contribución con sus comentarios y correcciones para este trabajo le doy gracias a mis sinodales y profesoras Q.F.B Ma. del Rocío Breceda Hernández, Dra. Isabel Soto Cruz y la Q.F.B. Lourdes Vega Navarrete.

Gracias Don George por su gran apoyo técnico en la elaboración experimental de este trabajo.

INDICE

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
Cáncer	3
Cáncer Cérvico-uterino	3
Virus del Papilloma Humano (VPH)	4
Sistema Inmunológico	7
Citocinas	7
Interleucina 2 (IL-2)	9
Receptor para Interleucina 2 (RIL-2)	10
Liposomas	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVO PARTICULAR	16
HIPÓTESIS	17
MATERIAL Y MÉTODO	18
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
APÉNDICE	38
REFERENCIAS	45

RESUMEN

La IL-2 ha sido utilizada sola o en combinación en la inmunoterapia adoptiva tanto en animales como en humanos para inducir regresión de tumores en estadios avanzados mostrando una respuesta antitumoral; no obstante, su aplicación vía sistémica altera vías de regulación hematopoyéticas importantes y puede provocar serios efectos secundarios, por mencionar algunos; síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza e hipotensión, por lo cual su uso es limitado. De este modo la IL-2 no sería una buena alternativa para las pacientes con CaCU ya que para que la citocina inhiba la proliferación tumoral sería necesaria su administración vía sistémica en dosis elevadas con el inconveniente de los efectos tóxicos; ante esta situación, en la actualidad se buscan nuevas alternativas para la administración de esta citocina, una de las alternativas es encapsularla en liposomas.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que 100 UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de líneas celulares de CaCU *in vitro*. En particular se utilizan los liposomas catiónicos debido a que estos tienen mayor afinidad por células epiteliales (como las que conforman a los carcinomas), sin embargo, los lípidos catiónicos no existen en la naturaleza y para formar liposomas catiónicos es necesario incluir en la formulación lípidos como la espermidín-colesterol que por ser sintética incrementa el costo de los liposomas. Por esta razón se evaluó el efecto de la IL-2 encapsulada en liposomas neutros y aniónicos sobre la proliferación de líneas celulares de CaCU *in vitro*. Estos resultados se contrastaron con los obtenidos al evaluar los liposomas catiónicos. Los resultados demostraron que cualquiera de las dos formulaciones (aniónicos y neutros) de liposomas es adecuada para encapsular IL-2 sin modificar el efecto inhibitor sobre de las células de CaCU CALO e INBL; proponiendo así una posible alternativa terapéutica para este tipo de pacientes.

INTRODUCCIÓN

Se estima que el número de casos nuevos de cáncer cérvico uterino (CaCU) en el mundo pasó de 5.9 millones en 1975 a 10.3 millones en el año 2000.^{1,2} En México esta enfermedad es la responsable de aproximadamente el 25% de las muertes por cáncer en mujeres³. Este tumor está asociado fuertemente a muchos factores etiológicos pero quizá los más importantes son el Virus del Papilloma humano (VPH) y a la acumulación de múltiples defectos del sistema inmune en el sitio del tumor,⁴ por lo cual se piensa que podría ser un buen candidato para el uso de inmunoterapia con IL-2; Hemos encontrado que las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL poseen las tres cadenas del receptor para IL-2 (RIL-2) y que existe una expresión diferencial de las tres subunidades dependiendo del estadio del tumor; también se ha determinado que el RIL-2 expresado en las células tumorales es funcional y que la respuesta que se obtenga después de la unión al receptor depende de la concentración de IL-2 usada,⁵ ya que a concentraciones menores de 10 UI/mL la IL-2 tiene un efecto proliferador, mientras que a concentraciones a partir de 100 UI/mL se observa un efecto inhibitor, aunque su administración en altas dosis, vía sistémica, perturba vías de regulación hematopoyética y puede generar una serie de efectos secundarios adversos, como son: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas.⁶

Estos resultados obtenidos en nuestro laboratorio son muy alentadores, representan un avance relevante que contribuye con datos muy importantes en esta área del conocimiento; sin embargo, si lo que pretendemos es usar IL-2 como una alternativa terapéutica para las pacientes con CaCU, debemos de contar con una forma de administración que evite los graves efectos tóxicos producidos por IL-2 a altas dosis. La tecnología farmacéutica ha diseñado liposomas, que han servido como excelentes acarreadores de fármacos, ya que permiten disminuir la toxicidad de los mismos, prolongar su efecto terapéutico y en ocasiones aumentar su actividad⁷. Estos liposomas son vesículas lipídicas organizadas en forma esférica, compuestos de una capa (unilaminares) o varias bicapas lipídicas (multilaminares), las cuales se alternan con espacios acuosos, tienen un radio de aproximadamente 50 a 150 nm, pueden presentar diferentes cargas eléctricas superficiales dependiendo del tipo de lípido utilizado para su preparación⁸. Se ha demostrado que la administración por vía intraperitoneal de 100 UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos, puede reducir el tamaño promedio de los tumores de carcinoma de cérvix inducidos en ratones de la cepa CBA, disminuyendo el número e intensidad de efectos adversos. Sin embargo, es importante mencionar que los lípidos catiónicos no existen en la naturaleza por lo que es importante contrastar estos resultados utilizando liposomas neutros y aniónicos formados principalmente por fosfatidilcolilina y colesterol que son los más comunes en las membranas celulares normales por lo que se cree pueden ser útiles como acarreadores de IL-2, además de que resultan ser más económicos.

MARCO TEÓRICO

Cáncer

Crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. El cáncer que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen. Existen varios cientos de formas distintas, siendo tres los principales subtipos: los sarcomas proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. Estos factores ayudan a su clasificación.

Casi todos los cánceres forman tumores, pero no todos los tumores son malignos; la mayor parte son benignos (no ponen en peligro la salud). Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento localizado y suelen estar separados de los tejidos vecinos por una cápsula. Los tumores benignos tienen un crecimiento lento y una estructura semejante al tejido del que proceden. En ocasiones pueden producir alteraciones por obstrucción, compresión o desplazamiento de las estructuras vecinas, como sucede a veces en el cerebro. Algunos tumores benignos como los pólipos del colon son lesiones precancerosas.

El principal atributo de los tumores malignos es su capacidad de diseminación fuera del lugar de origen. La invasión de los tejidos vecinos puede producirse por extensión o infiltración, o a distancia, produciendo crecimientos secundarios conocidos como metástasis. La localización y vía de propagación de las metástasis varía en función de los cánceres primarios.⁹

Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico uterino es la segunda neoplasia más común en países en vías de desarrollo, donde se diagnosticaron el 80% de los casos. En el mundo se diagnosticaron 471 000 casos, en sus diferentes etapas clínicas, donde 213 000 muertes fueron secundarias a la enfermedad, por lo que ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad.^{10,11}

En México, el cáncer ha incrementado su participación en relación con la mortalidad general. En 1950, representó 3% del total de muertes, porcentaje que en 1999 se incrementó a 12.1%.^{12,13} En los últimos 10 años el cáncer se ha mantenido como la segunda causa de muerte con 53,662 defunciones.

Dentro del total de muertes por cáncer en la mujer, el cáncer cérvico uterino (CaCU) fue responsable de 8.5% del total de defunciones, con una tasa aproximada de incidencia ajustada a la edad de 45 a 54 años.¹⁴ El 70% de los casos son diagnosticados en etapas localmente avanzadas (Ib a IVA), y en más del 90% corresponden al tipo epidermoide.^{11,15} Los datos estadísticos obtenidos por la Secretaría de Salud, IMSS, INEGI y la CONAPO muestran que la mortalidad de 1980-1990 es mayor que la obtenida de 1990 a 2000, es decir, muestra una

disminución de 16.64 muertes por 100000 mujeres a 12.84 muertes por 100000 mujeres (fig 1); teniendo más incidencia en zonas rurales (Oaxaca, Chiapas y Puebla) que las urbanas (Cd. de México, Nuevo. León y Baja California Sur).^{16,17,18}

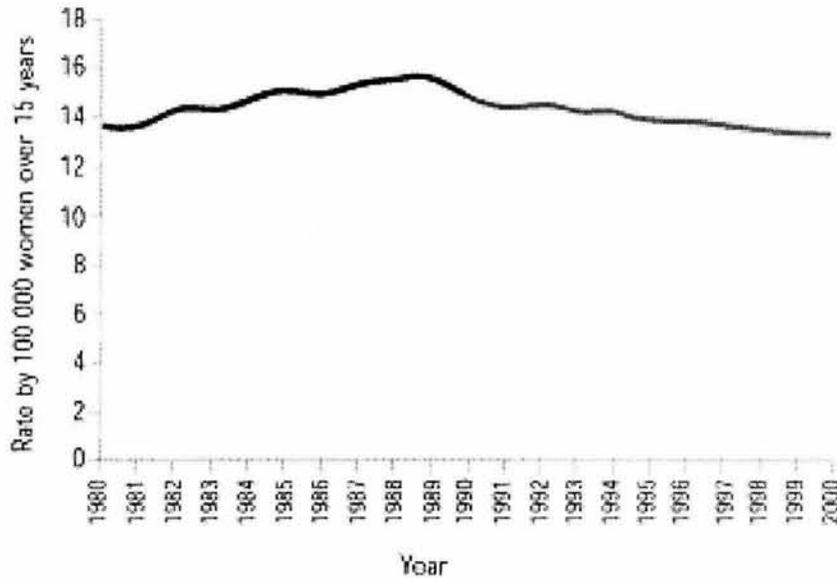


Fig. 1 Mortalidad por cáncer de cérvix en México 1980-2000.¹⁶

Virus del papiloma humano (VPH)

Los estudios epidemiológicos clásicos han demostrado el papel central del comportamiento sexual en el origen de las lesiones precursoras y el cáncer cérvico uterino invasor, el cual indica que un agente infeccioso transmitido por vía genital causa esta afección. Hace dos décadas la interacción de estudios epidemiológicos y moleculares demostró que la infección cervical persistente con VPH oncogénicos causaba la neoplasia intraepitelial cervical y el cáncer cérvico uterino.^{19,20} En la actualidad el conocimiento de la interacción de los factores del huésped y del virus en la patogénesis del cáncer cérvico uterino permite el entendimiento de la persistencia de la infección, su Carcinogénesis y la progresión tumoral.^{21,22} La prevalencia de la infección cervical por virus del papilloma humano en mujeres con actividad sexual es del 20 al 40%, aumenta en la segunda y tercera década de la vida, y decrece marcadamente después de los treinta. De acuerdo a la malignidad de las lesiones que producen se clasifican en:

- (1) virus de bajo riesgo; los que producen lesiones benignas (VPH tipo 6 y 11).
- (2) virus de alto riesgo, los que producen lesiones precancerosas y cancerosas (VPH 16,18,31,33,35,39,45,51,52,54,56,58,59,66,68 y 69).²³

En México, el 90% de los carcinomas cervicales se detecta algún tipo viral. El VPH 16 se encuentra en el 50% de los casos; el VPH 18, en el 15%; el VPH 31,33 y 35, en conjunto, en el 12%; y otros tipos virales, en el porcentaje restante.

Para que el Virus del Papilloma Humano pueda penetrar e iniciar un proceso infeccioso se requiere una continuidad de tejidos, de manera que el virus pueda ponerse en contacto con las células permisivas, que son *las células basales* de los epitelios. Una vez que han infectado las células blanco se inicia la replicación viral en las *células espinosas*. El ensamble de los viriones se lleva a cabo en estratos superiores de los epitelios cuando las células se han diferenciado (*células granulares*), ya que es un requisito para este evento la maduración y diferenciación de la célula. Finalmente en las *células escamosas* los viriones son expulsados y pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.²⁴(Fig.2).

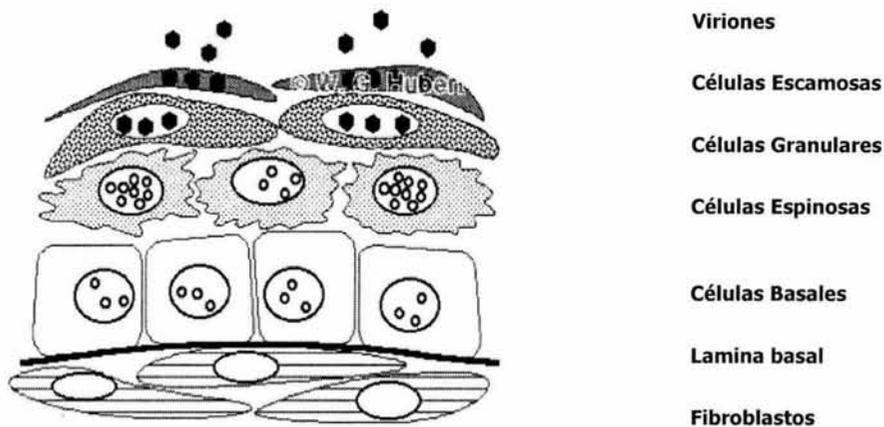


Figura 2. Ciclo de vida del virus del Papiloma Humano ²⁵

Este proceso puede ser muy lento. Algunos estudios longitudinales han revelado que pacientes con cáncer cervical *in situ* que no han sido tratadas, del 30% al 70% desarrollarán carcinoma invasor en un período de 10 a 12 años. Sin embargo, en alrededor del 10% de las pacientes, las lesiones pueden progresar de *in situ* a invasoras en períodos inferiores a un año. A medida que se hace invasor, el tumor irrumpe a través de la membrana basal e invade el estroma cervical. La extensión del tumor cervical puede manifestarse en último término como una ulceración, un tumor exofítico o la infiltración extensa del tejido subyacente incluyendo la vejiga o el recto.

Además de la invasión local, el carcinoma cervical puede diseminarse por vía de los ganglios linfáticos regionales o del torrente sanguíneo. La diseminación tumoral generalmente es una función de la extensión e invasión de la lesión local. A pesar de que, en general, el cáncer cervical progresa de manera ordenada, ocasionalmente se puede presentar un tumor pequeño con metástasis distante. Por este motivo, se debe evaluar cuidadosamente a las pacientes en búsqueda de enfermedad metastásica.

La primera nomenclatura descrita en la historia de la Ginecología fue la propuesta por Papanicolaou en 1928, después en 1967 Richart y otros describieron la clasificación que se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). En diciembre de 1988, se reunieron diferentes sociedades de patólogos-ginecólogos y acordaron una nueva nomenclatura conocida como sistema Bethesda.^{26,27,28,29} Tabla 2

Tabla 1 Nomenclatura en citología cervical.

Sistema PAP		Richart	Bethesta
Clase I	Normal		
Clase II	Normal		
	Displasia Leve	NIC I	HPV
Clase III	Displasia moderada	NIC II	Bajo grado
	Displasia severa	NIC III	Alto
		y/o	Grado
Clase IV	Cáncer <i>in situ</i>	Cáncer <i>in situ</i>	
Clase V	Cáncer invasor		

Sistema Bethesta

Bajo grado HPV, NIC I + HPV, NIC I sin HPV

Alto grado NIC II, NIC III, Cáncer *in situ*

Tabla 2. Clasificación de las etapas del cáncer de cérvix por de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (**FIGO**).^{26,27}

Etapa I Es el carcinoma estrictamente limitado al cérvix; no se debe tener en cuenta la extensión al cuerpo uterino.

Etapa IA: Carcinoma invasivo diagnosticados solo por microscopio.

Etapa IA1: Invasión medida del estroma de no más de 3 mm de profundidad y no más de 7 m de diámetro.

Etapa IA2: Invasión medida del estroma de más de 3 mm pero no de más de 5 mm de profundidad y no más de 7 mm de diámetro.

Etapa IB: Lesiones clínicas limitadas al cuello uterino o lesiones preclínicas de mayor extensión que la etapa IA.

Etapa IB1: Lesiones clínicas de no más de 4 cm de tamaño.

Etapa IB2: Lesiones clínicas de más de 4 cm de tamaño.

Etapa II Implica que el carcinoma se extiende más allá del cérvix uterino, pero no se ha extendido a la pared pélvica. El carcinoma afecta la vagina, pero no llega al tercio inferior.

Etapa IIA: No hay complicación obvia del parametrio, hasta dos tercios de la parte superior de la vagina se encuentran afectados.

Etapa IIB: Complicación obvia del parametrio, pero sin llegar a la pared pélvica lateral.

Etapa III El carcinoma se ha extendido a la pared pélvica. Acorde al examen rectal, no hay espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica.

Etapa IIIA: Sin extensión a la pared pélvica, pero si al tercio inferior de la vagina.

Etapa IIIB: Extensión a la pared pélvica, hidronefrosis o insuficiencia renal

Etapa IV Implica que el carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis misma o ha afectado clínicamente la mucosa vesical o rectal.

Etapa IVA: Propagación del tumor a órganos adyacentes a la pelvis.

Etapa IVB: Propagación a órganos distantes.

Sistema inmunológico

El sistema inmunológico surgió durante la evolución para combatir las infecciones causadas por virus, bacterias, protozoos, hongos y helmintos. Estos patógenos pueden ser responsables de infecciones intracelulares o extracelulares, para las cuales la respuesta inmune ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo.^{30,31}

La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones precoces de la inmunidad innata y por las reacciones tardías de la inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata (también denominada inmunidad natural o nativa) está constituida por mecanismos existentes antes de que se desarrolle la infección, capaces de establecer respuestas rápidas a los microorganismos y que reaccionan básicamente de la misma manera a infecciones repetidas. Los componentes principales de la inmunidad innata son: 1) barreras físicas y químicas, tales como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y células citotóxicas naturales (NK, del inglés natural killer); 3) proteínas sanguíneas, entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y 4) proteínas denominadas citocinas, que regulan o coordinan muchas de las acciones de las células que intervienen en la inmunidad celular.^{32,33}

En contraposición con la inmunidad innata, existen mecanismos de defensa mucho más evolucionados que son estimulados tras la exposición a agentes infecciosos, y cuya intensidad y capacidad defensiva aumenta después de cada exposición subsiguiente a un determinado microorganismo. Debido a que esta forma de inmunidad se desarrolla como una respuesta a la infección, recibe el nombre de inmunidad adaptativa.

Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, la inmunidad humoral y la inmunidad celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunológico y cuya función es eliminar diferentes tipos de microorganismos. En la inmunidad humoral participan moléculas presentes en la sangre, denominadas anticuerpos, que son producidas por unas células denominadas linfocitos B. En la inmunidad celular, también llamada inmunidad mediada por células, participan células llamadas linfocitos T. Los microorganismos intracelulares, tales como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular, que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas.^{34,35}

Citocinas

Son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Además de las células del sistema inmune, las citocinas son generadas por mononúcleos, linfocitos y otros tipos de células que actúan como mediadores intercelulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica.³⁶

Hasta la fecha se han identificado más de 100 citocinas estructuralmente distintas y sin relación genética; De las cuales las más estudiadas son cerca de 14, numeradas de la IL-1 a la IL-14, cuyos genes se han clonado y secuenciado. En su mayoría son péptidos o glucoproteínas con pesos moleculares de entre 6000 y 60000. Son compuestos muy potentes que actúan a concentraciones de 10^{-10} a 10^{-15} M, fijándose a superficies receptoras específicas en las células blanco.^{37, 38}

Las citocinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica y sirven para mediar y regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias. La secreción de las citocinas es breve, auto limitada. En general, las citocinas no se almacenan como moléculas pre-formadas, y su síntesis se inicia por una nueva transcripción genética. Esta activación suele ser transitoria, y los ARNm que codifican las citocinas suelen ser inestables. La combinación de un período corto de transcripción con un ARNm de vida corta, asegura que la síntesis de citocinas sea transitoria. Algunas citocinas pueden controlarse además por mecanismos post-traslacionales, como la liberación proteolítica de un producto activo a partir de un precursor inactivo. Una vez sintetizadas, las citocinas suelen secretarse con rapidez, lo que da lugar a un pico de liberación de citocinas cuando se necesita.

Algunas citocinas funcionan como hormonas del sistema inmune local o sistémico a muy bajas concentraciones sobre receptores específicos y son consideradas sustancias pleiotrópicas, es decir, que actúan sobre varias células en las que inducen múltiples efectos contradictorios. También son redundantes, lo que significa que muchos de los efectos de una citocina se solapan con los de otras³⁹.

Según sus funciones biológicas en el organismo, las citocinas se dividen en dos grupos: inmunorreguladores y proinflamatoria.(tabla 1)

Tabla 3. Clasificación de las citocinas

Clasificación	Citocinas
Inmunorreguladoras	IL-2
	IL-4
	IL-10
	IFN-gamma y alfa
Proinflamatorias	IL-1
	IL-6
	IL-8
	FNT-alfa

Interleucina 2 (IL-2)

La Interleucina-2 (IL-2), inicialmente denominada factor de proliferación de la célula T (TCGf, del inglés, T cell growth factor), factor mitogénico de timocitos (TMF), factor auxiliador de células asesinas o factor co-estimulador (KHF).es la principal citocina responsable de la progresión de los linfocitos T (LT) desde la fase G₁ a la "S" del ciclo celular.⁴⁰

La IL-2 secretada es una glucoproteína de 14-17 kD codificada por un solo gen del cromosoma 4 en los seres humanos. También presenta un rango de punto isoelectrico (PI) de 4-5 que la caracterizan. El tamaño heterogéneo de la proteína madura se debe a la extensión variable de la glucosilación de un polipéptido de aproximadamente 130 aminoácidos.. Aunque es una molécula glicosilada, los hidratos de carbono no son esenciales para ejercer sus efectos biológicos, dado que la IL-2 recombinante obtenida en células procarióticas es igualmente efectiva en la activación de los LT.

La IL-2 es producida por las células T CD4⁺, y en menor cantidad por las células T CD8⁺. La IL-2 actúa sobre la misma célula que la produce; es decir, funciona como un factor de proliferación autocrino. La IL-2 también actúa en los linfocitos T cercanos, incluidas las células CD4⁺ y CD8⁺, y por lo tanto también es un factor de proliferación paracrino. Durante las respuestas inmunitarias fisiológicas, la IL-2 no circula en la sangre para actuar a distancia, por lo que no se le considera factor de proliferación endocrino.

La IL-2 se pliega en una proteína globular que contiene dos grupos de hélices- α paralelas en parejas, estando orientadas cada hoja en una leve angulación respecto de la otra. Esta estructura plegada en hélice- α es común a todas las citocinas que interaccionan con receptores que tiene la secuencia WSXWS, incluida la IL-3, la IL-4, IL-5, La IL-6, el GM-CSF y el G-CSF. Normalmente, se transcribe, sintetiza y secreta por las células T sólo tras la activación por los antígenos. La síntesis de la IL-2 suele ser transitoria, con un pico precoz de secreción que se produce aproximadamente 4 horas después de la activación; la eliminación de la señal activadora conduce a una declinación de los valores de RNAm para IL-2, debido al cese de transcripción.

Las principales acciones de la IL-2 se ejercen sobre los linfocitos T, lo cual conduce a una expansión de la respuesta inmune cuya magnitud puede ser estimada por determinación de los niveles de IL-2. Sobre dichas células también posee actividad para inducir la síntesis de IFN γ y linfoxina (TNF β) y es capaz de programarlos hacia la apoptosis.

Actúa como factor de crecimiento y diferenciación para las células NK (del inglés Natural killers) y Linfocitos, puede activar a los macrófagos y neutrófilos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), actúa como inmunomodulador, favoreciendo el crecimiento de las células gliales. Las células NK son estimuladas cuando existen altos niveles de IL-2 capaces de unirse a receptores de tipo β,γ , lo que induce la producción de IFN γ y potencia la acción citolítica de estas células generando las llamadas células LAK (del inglés lymphokine activated killer cells).³⁹

Receptor para Interleucina 2 (RIL-2)

Las propiedades y efectos producidos por las citocinas se explican por la estructura y la distribución celular de los receptores de membrana capaces de unirlos específicamente. A pesar del hecho de que los mecanismos implicados en la traducción de señales no están aún aclarados, existe abundante información en relación a las estructuras de la mayoría de esto.

La acción de IL-2 es mediada por la unión no covalente de esta a su receptor (RIL-2). El receptor pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento hematopoyético, es de naturaleza multimérica ya que está compuesta por tres proteínas: la primera de 55 KD (p55), se presenta únicamente en células T activadas, y es por eso llamada antígeno Tac (para activación T). El Tac p55 o cadena α , une IL-2 con una baja afinidad Kd de aproximadamente 10^{-8} M. La unión de IL-2 a células que expresan solamente p55 no genera respuesta biológica detectable. Se ha observado producción de la cadena α , después de la activación antigénica de los linfocitos T. La segunda proteína que lo forma es identificada como una proteína de 70 a 75 KD (p70 o p75) denominada cadena β , cuya afinidad de unión a IL-2 es aproximadamente 10^{-9} M. La tercer unidad es la cadena γ del receptor que es una proteína de 64 KD la cual en conjunto con p55 y p75 pueden unir IL-2 con alta afinidad con un KD de aproximadamente 10^{-11} M.^{41,42} La expresión de diferentes combinaciones de estos tres componentes, genera varias formas del receptor para IL-2, cada una de ellas con diferentes afinidades de enlace (fig.3).

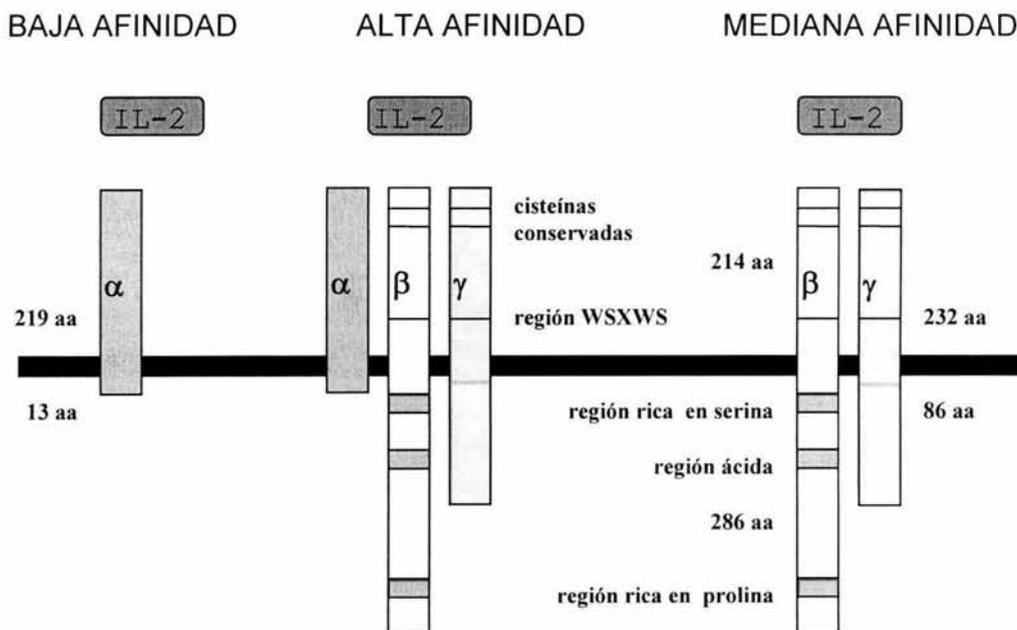


Fig.3 Receptor para IL-2, formada por un complejo proteico de tres subunidades o cadenas α (p55), β (p75) y γ (64).⁴³

Se ha encontrado que el receptor para IL-2 (RIL-2), no es exclusivo de células hematopoyéticas, como son linfocitos T, linfocitos B, células NK y monocitos; ya que se ha informado de su presencia en células de origen no linfoide tanto normales (páncreas y fibroblastos de pulmón) como neoplásicas (tumores sólidos humanos de pulmón, mama,

colorectal y melanoma) en donde que dichos receptores son funcionales y permiten la internalización de la citocina.⁴⁴

Durante las últimas décadas, se han administrado productos naturales y sintéticos con el fin de aumentar la respuesta inmune normal como interferón, interleucinas y factores de crecimiento hematopoyético, los cuales han mostrado beneficios clínicos sustanciales en infecciones virales crónicas y cánceres como sarcomas, linfomas y melanoma.⁴⁵ El control del crecimiento tumoral indudablemente debe involucrar un amplio espectro de funciones efectoras de naturaleza inmunológica o no inmunológica, sin embargo, aun no está claramente establecido, cuales de estas funciones efectoras son controladas por citocinas.⁴⁶ Varios grupos de investigadores han estudiado el efecto de las citocinas en el desarrollo de la inmunidad antitumoral, para detectar el potencial terapéutico de esas moléculas.⁴⁷ En trabajos realizados por nuestro equipo de trabajo, se sugiere de manera específica la dependencia de las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL, por IL-2, y que dicha línea compite por la citocinas con los linfocitos de sangre periférica normal (LSP), estando estos últimos en desventaja, ya que las células tumorales requieren entre 5-10 UI/mL de IL-2 para proliferar *in vitro*⁴⁸, mientras que los LSP en las mismas condiciones necesitan 100 UI/mL de esta citocina. Las células de ambas líneas de CaCU en presencia de 100 UI/mL de IL-2 inhiben su proliferación, lo cual resulta un hecho interesante ya que esta citocina se podría usar en una terapia para este tumor.

La IL-2 ha sido utilizada independiente o en combinación en la inmunoterapia adoptiva tanto en animales como en humanos para inducir regresión de tumores en estadios avanzados; mostrando una modesta respuesta antitumoral, no obstante, su aplicación vía sistémica altera vías de regulación hematopoyéticas importantes y puede provocar serios efectos secundarios, por mencionar algunos; síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza e hipotensión, por lo cual su uso es limitado.^{42,49,50} Por lo antes mencionado, la IL-2 no sería una buena alternativa para las pacientes con CaCU ya que para que la citocina inhiba la proliferación tumoral sería necesaria su administración vía sistémica en dosis elevadas con el inconveniente de los efectos tóxicos; ante esta situación, en la actualidad se buscan nuevas alternativas para la administración de esta citocina; una de las cuales es encapsularla en liposomas.⁵¹

Liposomas

Recientemente, la tecnología farmacéutica ha diseñado microvesículas esféricas llamadas liposomas, que han cobrado gran interés debido a que los investigadores han demostrado que la encapsulación de fármacos en liposomas puede aumentar su eficacia, reducir su toxicidad y prolongar su efecto terapéutico.^{52,53} Los liposomas son microvesículas formadas por lípidos anfipáticos, las cuales encierran dentro de sus membranas lipídicas compartimentos acuosos, presentan formas esféricas o ligeramente elongadas con diámetro de varios nanómetros.⁵⁴

Es importante mencionar que los lípidos anfipáticos en un medio acuoso, debido a la presencia de un extremo polar y uno no polar, se auto ensamblan espontáneamente en asociaciones moleculares específicas que satisfacen su doble carácter de hidrofobia e hidrófila. La formación de los liposomas depende del tipo y cantidad de los lípidos que las conforman, además de la temperatura y de la mezcla lípido-agua. Estas asociaciones moleculares específicas no requiere de energía, son termodinámicamente, espontáneas y estables.⁵⁵ (fig 4)

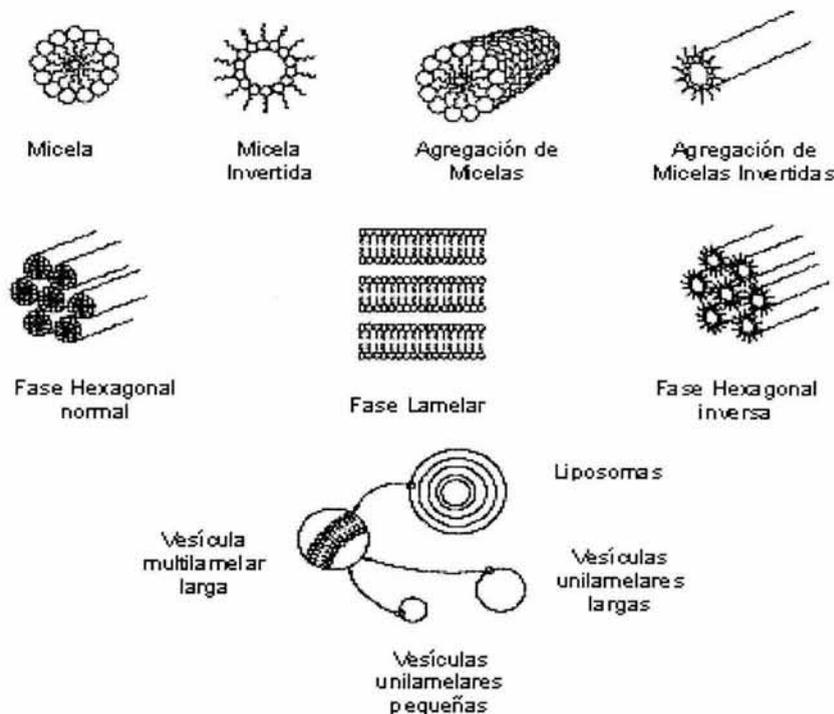


Fig 4 Auto agregación de lípidos para formar los diferentes tipos de micelas.⁸ Modificado por Antonio Ayala A.

Las bicapas son ensambladas por lípidos anfipáticos que tienen una forma molecular cilíndrica, como la fosfatidilcolina, en los cuales el diámetro de la región polar es muy parecido al de las cadenas hidrocarbonadas. Como los extremos de la bicapa lipídica quedarían expuestos a un ambiente acuoso, la bicapa se cierra y forma una vesícula llamada liposoma. Esta asociación molecular es la estructura básica de todas las membranas biológicas.⁵⁶ Es importante mencionar que el colesterol se integra a las bicapas lipídicas y su presencia provoca una disminución en la fluidez de la bicapa y en la permeabilidad a solutos hidrofílicos, por lo que confiere una gran estabilidad al liposoma.

En las micelas, la porción polar de los lípidos se encuentra en la periferia y la no-polar está hacia el centro de la estructura; los lípidos que dan esta fase tienen una forma molecular de cono invertido, en donde la porción más ancha corresponde a la región polar y la más estrecha a las cadenas hidrocarbonadas.⁵⁷

En la fase hexagonal (HII), los lípidos tienen una forma molecular cónica, en donde la base del cono corresponde a las cadenas hidrocarbonadas y el vértice a la región polar. Estudios de resonancia magnética nuclear, sugieren que los lípidos cónicos en las membranas celulares se encuentran formando micelas invertidas que se acomodan en el interior de las bicapas.⁵⁹ Los lípidos que forman la fase HII, constituyen del 35 al 40 % de los lípidos de las membranas celulares,^{60,61} algunos de ellos son la fosfatidiletanolamina polinsaturada, la cardiolipina y el ácido fosfatídico a pH 3 y en presencia de cationes divalentes.⁶² Cuando se modifican estas condiciones, la forma de lípido cambia a cilíndrica, con lo cual su asociación molecular cambia a la de bicapa.(fig.5) Este cambio de fase es de suma importancia en diversos procesos

metabólicos como en la formación de puntos de contacto entre membranas, en los procesos de fusión metabólicos como en la formación de puntos de contacto entre membranas, en los procesos de fusión membranal y en el transporte de cationes divalentes y de moléculas como lípidos, algunos péptidos y proteínas a través de la matriz lipídica membranal. Se ha demostrado que estas micelas invertidas aumentan entre mayor sea la actividad biológica de las membranas y que transportan iones, como el manganeso y calcio, a través de la estructura lipídica de los liposomas.^{62,63,64}

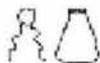
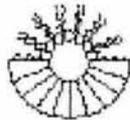
Especies	Forma	Organización	Fase
Jabón Detergentes Lisofosfolípidos			Isotrópico Hexagonal I
	Como invertido	Micelas	
Fosfatidilcolina Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Esfingomielina Dicetilfosfato DODAC			Lamellar Bilípidos
	Cilindro	Bicapa	
Fosfatidiletanolamina Ácido fosfatídico Colesterol Cardiolipín Lípido A			Hexagonal II
	Cónico	Micela Reversa	

Fig.5 Efecto de la forma molecular que poseen algunos lípidos. ⁸ modificado por Antonio Ayala A.

Los liposomas pueden ser vesículas multilaminares, vesículas unilaminares pequeñas o vesículas unilaminares grandes, dependiendo de su tamaño y número de bicapas lipídicas alrededor del compartimiento acuoso central; además, pueden presentar diferentes cargas eléctricas superficiales dependiendo del tipo de lípido utilizado para su preparación.⁵⁴ Los liposomas pueden acarrear fármacos de diferentes maneras: enlazándolos a su membrana, intercalándolos en la bicapa, disolviéndolos dentro de la bicapa, o atrapándolos en su interior acuoso; también, pueden formar complejos iónicos o hidrofóbicos con ácidos nucleicos y otras macromoléculas sin fijarlas físicamente.⁶³

La encapsulación liposomal de fármacos puede alterar fuertemente la distribución de principios activos en el cuerpo y su tasa de liberación, al mismo tiempo que los protege contra la hidrólisis catalítica. Las diferencias farmacocinéticas que provoca la encapsulación de fármacos en liposomas pueden provocar que éstos actúen en el órgano blanco, reduciendo la toxicidad y/o aumentando la eficacia del fármaco encapsulado, haciendo posible una mayor absorción del mismo.

Los liposomas pueden interactuar con las células de diferentes formas: fusión, absorción, endocitosis y fagocitosis. Dependiendo del tipo de liposoma y del tipo celular se producirá una u otra interacción. Se ha demostrado que las diferentes clases de interacción de los liposomas son altamente dependientes de la estructura liposomal y de la composición ⁶⁵(Fig 6).

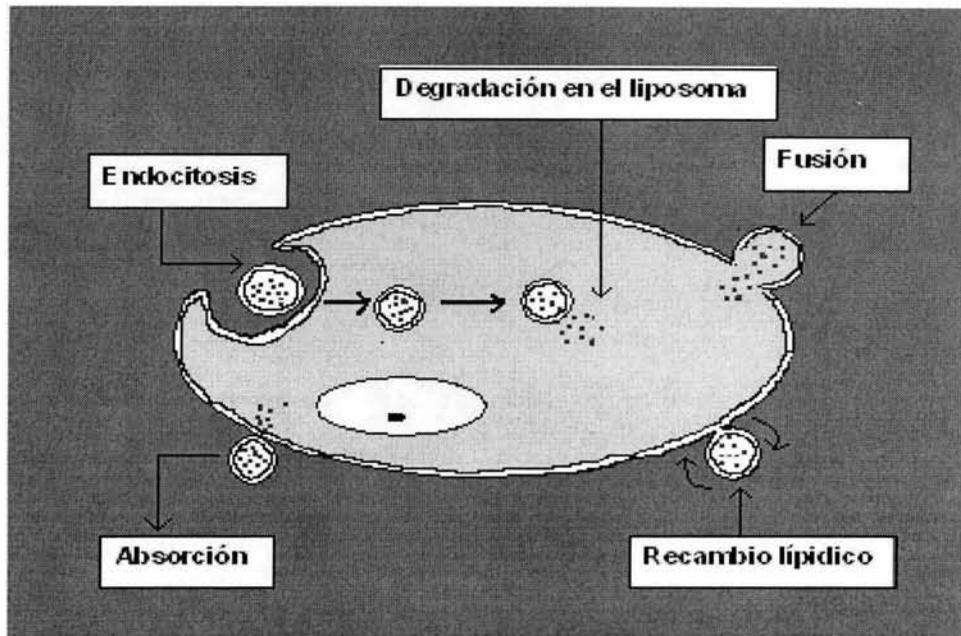


Fig.6 Diferentes formas de interacción de los liposomas con las células⁶⁶.Modificada por Antonio Ayala

Los liposomas se pueden considerar una excelente vía para la administración exógena de citocina que pueden ser tóxicas en el organismo, como la IL-2 esperando reducir los efectos adversos al administrarlas en altas concentraciones para activar la respuesta antitumoral a través de linfocitos y macrófagos contra distintos tipos de cáncer como el carcinoma de cérvix.^{58,64 67}

Los liposomas catiónicos en comparación con los neutros y aniónicos poseen más afinidad por los tumores sólidos; Aunque los liposomas con carga neutra y negativa pueden ser utilizados como excelentes acarreadores de fármacos.⁶⁵

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cérvico uterino (CaCU), es la principal causa de decesos por cáncer en mujeres mexicanas y otros países del tercer mundo.

En la actualidad se ha generado información relevante sobre aspectos inmunológicos del CaCU, que nos permiten proponer una alternativa terapéutica lógica capaz de inhibir el crecimiento tumoral y estimular la respuesta inmune del paciente oncológico sin causar efectos secundarios tóxicos.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que 100 UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de líneas celulares de CaCU. En particular se utilizan los liposomas catiónicos debido a que estos tienen mayor afinidad por células epiteliales (como las que conforman a los carcinomas), sin embargo, los lípidos catiónicos no existen en la naturaleza y para formar liposomas catiónicos es necesario incluir en la formulación lípidos como la espermidín-colesterol que por ser sintética incrementa el costo de los liposomas. Por esta razón el objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de diversas formulaciones de liposomas (neutros y aniónicos) para encapsular IL-2 sin modificar su efecto inhibitorio sobre la proliferación de células de CaCU, contrastarlos con los resultados obtenidos al usar liposomas catiónicos y proponerlos como una alternativa terapéutica para este tipo de pacientes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la proliferación de las líneas celulares INBL y CALO, en presencia de IL-2 encapsulada en liposomas neutros y aniónicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ∞ Determinar la concentración óptima de lípidos para elaborar liposomas neutros y aniónicos.
- ∞ Encapsular IL-2 en liposomas neutros y aniónicos.
- ∞ Realizar ensayos de proliferación *in vitro* con las líneas celulares de CaCU, INBL y CALO en presencia de IL-2 encapsulada y evaluar la proliferación utilizando la técnica de Cristal Violeta.

HIPOTESIS

Se ha demostrado que las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL presentan las cadenas α , β y γ del receptor para IL-2 (RIL-2) y que éste es funcional ya que se ha encontrado que existe respuesta ante el estímulo de IL-2; además se ha observado que la proliferación de ambas líneas celulares se ve inhibido en presencia de 100 UI/mL de IL-2 acarreada en liposomas catiónicos. También se sabe que los lípidos que conforman los liposomas neutros (fosfatidilcolina, fosfatidiletalonamina y colesterol) y los liposomas aniónicos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y colesterol) son más estables, además de ser los mas abundantes en la naturaleza, por lo que se piensa que al encapsular IL-2 en liposomas neutros y aniónicos se mantendrá el efecto inhibidor de IL-2.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

- *Línea celular de cáncer de cérvix CALO
- *Línea celular de cáncer de cérvix INBL
- Medio de cultivo celular RPMI con suero fetal bovino (SFB) desactivado al 10 % v/v.
- Liposomas neutros (fosfatidilcolina, fosfatidiletalona y colesterol)
- Liposomas aniónicos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y colesterol)

Material no biológico y equipo.

- Agua desionizada
- Solución salina de Verseno
- Solución amortiguadora de fosfatos
- Glutaraldehído 1.1 %
- Azul Tripiano 0.3 %
- Cristal Violeta 0.1 %
- Ácido acético glacial al 10 %
- Cloroformo
- Éter diétilico
- Placas de 96 pozos fondo plano
- Micropipetas 1000, 200, 100 y 20 mL
- Botellas para cultivo celular de 25 cm³
- Microscopio invertido
- Cámara de Neubauer
- Tubos eppendorf
- Matraz cónico de dos bocas
- Bomba de vacío
- Sonicador
- Centrifuga
- Tubos para centrifuga
- Campana de flujo laminar
- Incubadora (atmósfera de 5 % de CO₂, temperatura de 37° C y ambiente saturado de humedad relativa)
- Lector de placas

* El material biológico consistió en las líneas celulares de carcinoma de Cérvix (CaCU), INBL estadio IVb y CALO estadio clínico IIIB, de la reserva criopreservada en el laboratorio de Oncología de la unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer de la facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Preparación de liposomas

La preparación de los liposomas neutros y aniónicos se realizó mediante el método de Szoka,^{68,69} formados por 10 nmol de lípidos fosfatidilcolina (PC): Fosfatidiletalona (PE): colesterol (CH), 4:2:4 y PC:Fosfatidilserina (PS):CH 6:3:1, respectivamente) disueltos en 1 mL de cloroformo, los cuales se colocan en un matraz cónico de dos bocas de 50 mL de capacidad. El disolvente se evapora a presión reducida y se añade 1.2 mL de éter dietílico y 333 µL de medio de cultivo con o sin citocinas. Se agita con vortex durante 45 segundos a la

máxima velocidad y se procede a evaporar el solvente por 45 segundos más en agitación. La suspensión lechosa de liposomas se resuspende en 10 mL de medio de cultivo sin suero. Para eliminar la citocina no encapsulada se procede a lavar la suspensión por ultracentrifugación a 40,000 rpm por 45 minutos y la pastilla de liposomas se resuspende en 10 mL de medio de cultivo. Por último la suspensión se filtra en membranas Millipore (Millipore,USA) con poros de 0.45 μ m de diámetro para obtener la preparación estéril.

Los liposomas neutros y aniónicos con o sin citocina se mantuvieron a 4° C, hasta su utilización, estos se emplearon durante los primeros 7 días, evitando su degradación por hidrólisis y oxidación.^{70,71}

Cultivo de las líneas celulares CALO e INBL

Se cultivaron las líneas celulares INBL y CALO en botellas de capacidad de 25 cm³, hasta que alcanzaron una proliferación no menos del 80%; A estas células se les adiciono 5mL de verseno y se dejó reposar por 10 minutos; una vez despegadas se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos, se formo un botón de células al cual se le adiciono 3 mL de medio RPMI al 10% de SFB desactivado y se resuspendieron las células, se tomaron 0.3 mL y se colocaron en un eppendorf, a éste se adiciono 0.3 mL de azul tripano y se procedió a contabilizar las células en la cámara de Neubauer. De acuerdo a la cantidad de células se realizó el cálculo correspondiente para obtener 5X10³ células en 150 μ L de medio por pozo.

Evaluación de la proliferación celular

Una vez sembradas las células se dejó 6 horas para que se adhieran al fondo los pozos de la placa, después a los pozos problema se le retira el medio y se estimulan las células adicionando 30 μ L de los liposomas correspondientes por una hora, transcurrido el tiempo se retiran los liposomas, se lava con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se adiciona 150 μ L de medio RPMI al 10 % de SFB desactivado.

Una vez transcurrido el tiempo necesario las células se fijan con glutaraldehído 1.1% por 20 minutos, se lavan con agua desionizada y se deja secar la placa a temperatura ambiente, este procedimiento se realiza cada 24 horas. Una vez cumplidas las 96 horas se añaden 75 μ L de cristal violeta al 0.1% en cada pozo por 10 minutos con agitación (RED ROTOR, Hoefler Scientific Instruments, USA), transcurrido este tiempo se lava nuevamente con agua desionizada y se deja secar a temperatura ambiente. Se adiciona 100 μ L de ácido acético al 10% en cada pozo, posteriormente se mantienen por 20 minutos en agitación, para después leer la placa obtenida, a una absorbancia de 570 nm en un aparato de ELISA (BIO-TEK, Instruments, Inc. USA).

Análisis estadístico

Debido a que es conveniente sustentar los datos experimentales con alguna prueba estadística, se decidió utilizar la técnica estadística de Fisher conocida como análisis de varianza (ANAVA); para comparar las diferencias encontradas entre los controles y las cinéticas de proliferación obtenidas de los cultivos en presencia de las diferentes formulaciones de liposomas, esta técnica es una herramienta muy útil en investigaciones en las cuales se aplican la observación y la experimentación. La relación de varianzas o prueba de *F* indica realmente que la variabilidad entre las muestras (o, refiriéndose a experimentos, entre los tratamientos) no se debe al azar, si no a ciertas causas biológicas lo cual es equivalente a decir que las diferencias son significativas entre las medias de las poblaciones, estimadas por las medias de

las muestras. Sin embargo, la prueba de F no indica cuáles medidas son iguales o cuáles son diferentes, ya que puede suceder que en una serie de muestras la prueba de F indique diferencias en el conjunto, pero un par en particular sea igual; por ello con los datos del análisis de varianza se hacen las pruebas de significancia de las diferencias, o las comparaciones entre las medias de las muestras por medio del método de Tukey, (estadística no-paramétrica).

RESULTADOS

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que los liposomas catiónicos a una concentración de $15\mu\text{g}/\text{mL}$ de lípidos no son tóxicos para las células de líneas de carcinoma de cérvix (CaCU); por esta razón se utiliza esta concentración para evaluar el efecto sobre la proliferación de las líneas de CaCU de dos nuevas formulaciones de liposomas (neutros y aniónicos).

Para ello, se determinó la cinética de proliferación de las líneas celulares CALO e INBL, las cuales fueron incubadas por una hora con liposomas neutros y aniónicos vacíos, utilizando como controles células cultivadas con liposomas catiónicos y células sin liposomas (gráfica 1 a y b). Los resultados confirman que los liposomas catiónicos no modifican la proliferación normal de las células de carcinoma a diferencia de lo que sucede al utilizar los liposomas neutros y aniónicos. Por otro lado, el error estándar indica que a partir de las 72 hrs existe una diferencia significativa en las cinéticas de proliferación de las células que fueron cultivadas en presencia de liposomas aniónicos y neutros vacíos en comparación a los controles. Cabe destacar que a pesar de que los liposomas neutros y aniónicos fueron preparados con $15\mu\text{g}/\text{mL}$ de lípidos, como los liposomas catiónicos, esta cantidad de lípido en estas nuevas formulaciones resulta ser tóxica.

Al analizar los resultados con el método de Tukey, podemos observar que efectivamente no existe diferencia significativa entre la cinética de proliferación de células en ausencia de liposomas y las estimuladas con liposomas catiónicos. Sin embargo, para los casos en que se usan liposomas aniónicos o neutros preparados con $15\mu\text{g}/\text{mL}$ de lípidos se observa una diferencia significativa con respecto a las cinéticas de los controles.

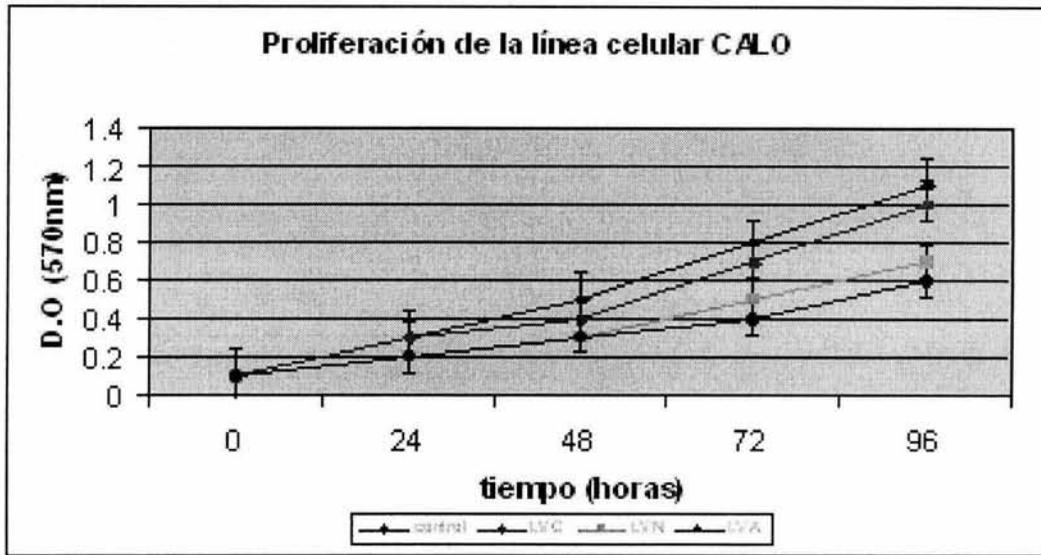
Debido a que la concentración de $15\mu\text{g}/\text{mL}$ de lípidos para preparar los liposomas neutros y aniónicos resulta ser tóxica para las células y esto no permitiría evaluar el efecto de la IL-2 se procedió a determinar la concentración de lípidos más adecuada para evitar este efecto tóxico. Para ello, se evaluó la proliferación de las líneas celulares cada 24 hrs por medio de la técnica de cristal violeta en presencia de diferentes concentraciones de lípidos. Con este ensayo se determinó que la concentración de lípidos para formular liposomas neutros sin que resulte tóxica para las células de las líneas CALO e INBL es de $7\mu\text{g}/\text{mL}$ (gráfica 2 a y b), mientras que para los liposomas aniónicos es de $5\mu\text{g}/\text{mL}$ de lípidos (gráfica 4 a y b). El análisis estadístico no-paramétrico indica que no hay diferencia significativa entre las cinéticas de proliferación de las líneas celulares en presencia de los liposomas, fabricados con estas nuevas concentraciones, y las cinéticas obtenidas en ausencia de liposomas.

Una vez establecidas las concentraciones de lípidos para los liposomas neutros y aniónicos que no son tóxicas para las células de CaCU, se realizaron los ensayos para determinar el efecto de IL-2 encapsulada en estas dos nuevas formulaciones de liposomas. Al evaluar el comportamiento de las líneas celulares de CaCU en presencia de $100\text{ UI}/\text{mL}$ de IL-2 encapsuladas en liposomas neutros (gráfica 3 a y b) se observa la inhibición de la proliferación de las dos líneas celulares a partir de las 48 horas. Observando el daño celular desde las 24 hrs (figura 1 y 2) y obteniendo a las 96 hrs un 76.37% y 77.27% de inhibición de la proliferación en las líneas celulares CALO e INBL respectivamente. Los datos fueron analizados con el método estadístico no-paramétrico (Tukey) confirmando que existe diferencia significativa.

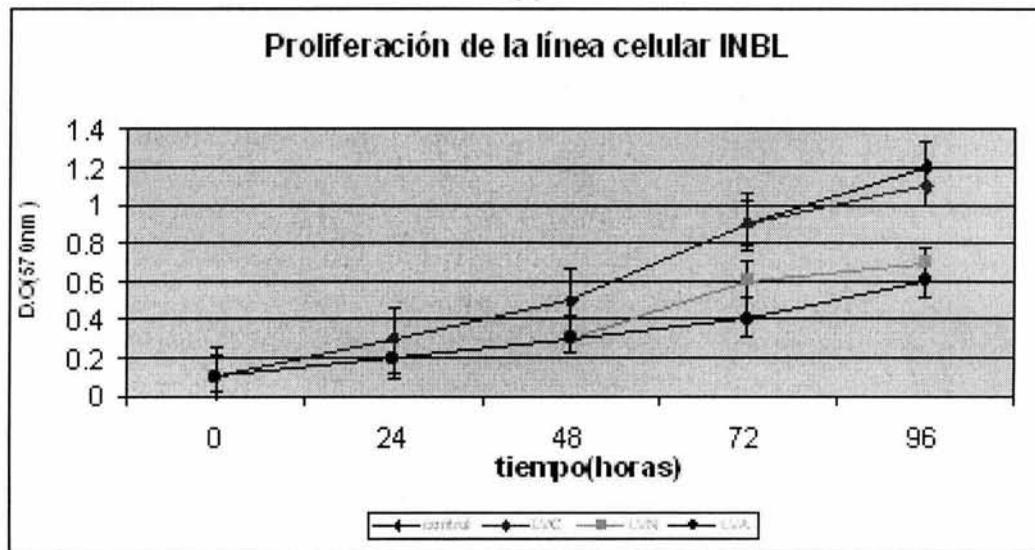
De la misma forma se observa un efecto inhibitorio de la proliferación de las líneas celulares CALO e INBL al ser estimuladas con $100\text{ UI}/\text{mL}$ de IL-2 encapsulada en liposomas aniónicos

(gráfica 5 a y b), este efecto inhibitor se presenta a partir de las 48 hrs, obteniendo a las 96 horas un porcentaje de muerte celular del 79.16% y 80.05% para la línea celular CALO e INBL respectivamente. Cabe destacar que las fotografías de los cultivos celulares a diferentes horas muestran un deterioro progresivo de la morfología celular, el tamaño de la célula se reduce, la membrana plasmática tiene un aspecto ondulado, núcleos en forma de onda y por último fragmentación celular (figura 3 y 4).

RESULTADOS

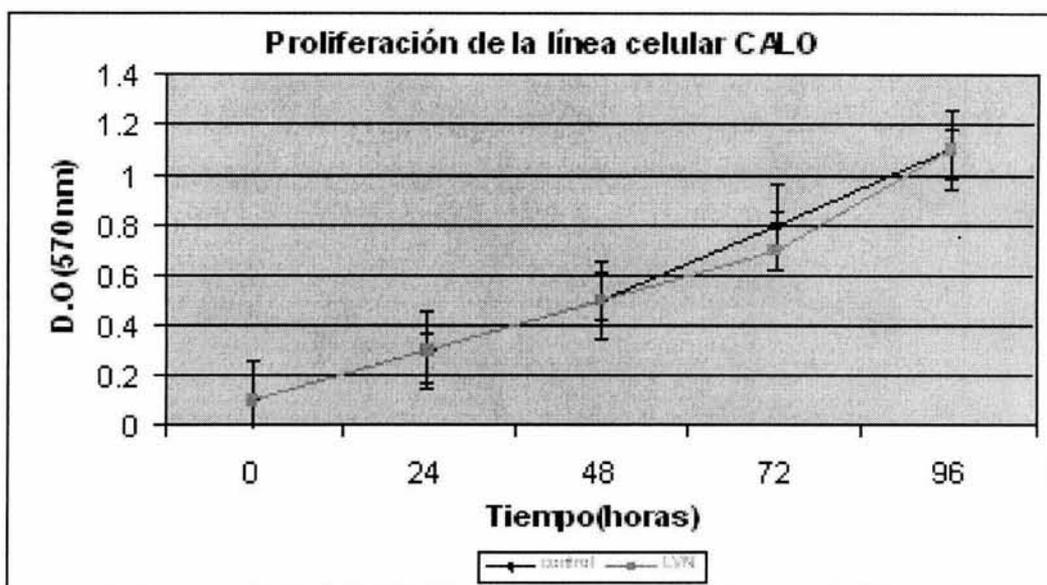


(a)

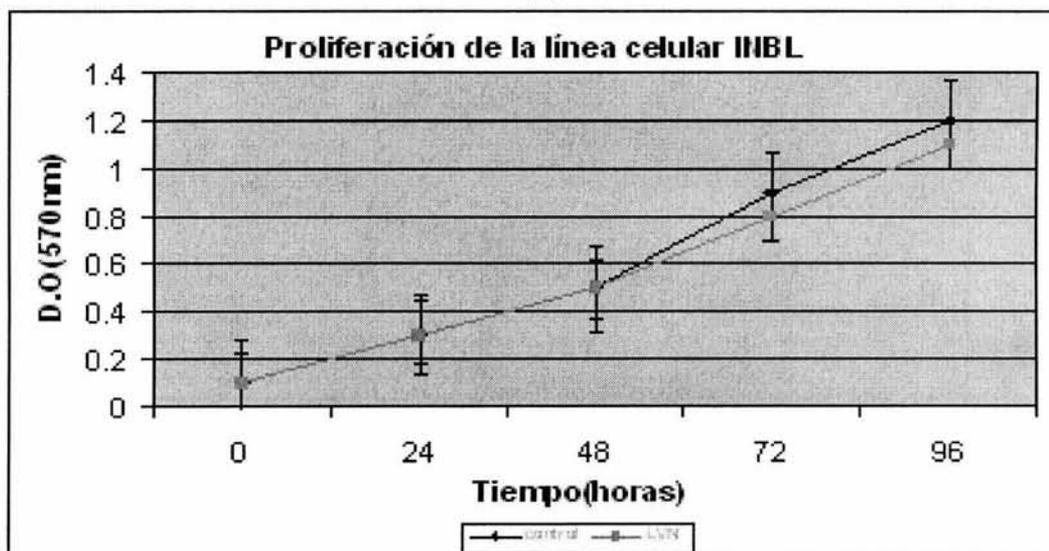


(b)

Gráfica. 1 Se cultivaron 5×10^3 células por pozo en una placa de 96 pozos y se evaluó la cinética de proliferación por 4 días cada 24 horas, por medio de la técnica de Cristal Violeta. Se observa el comportamiento de las líneas celulares CALO (a) e INBL (b) al ser estimuladas con liposomas catiónicos, neutros y aniónicos vacíos a una concentración de $15 \mu\text{g/mL}$ de lípidos. Donde (—●—) representa el control (células cultivadas sin liposomas), (---■---) liposomas catiónicos vacíos, (---▲---) liposomas neutros vacíos y (—◆—) liposomas aniónicos vacíos.

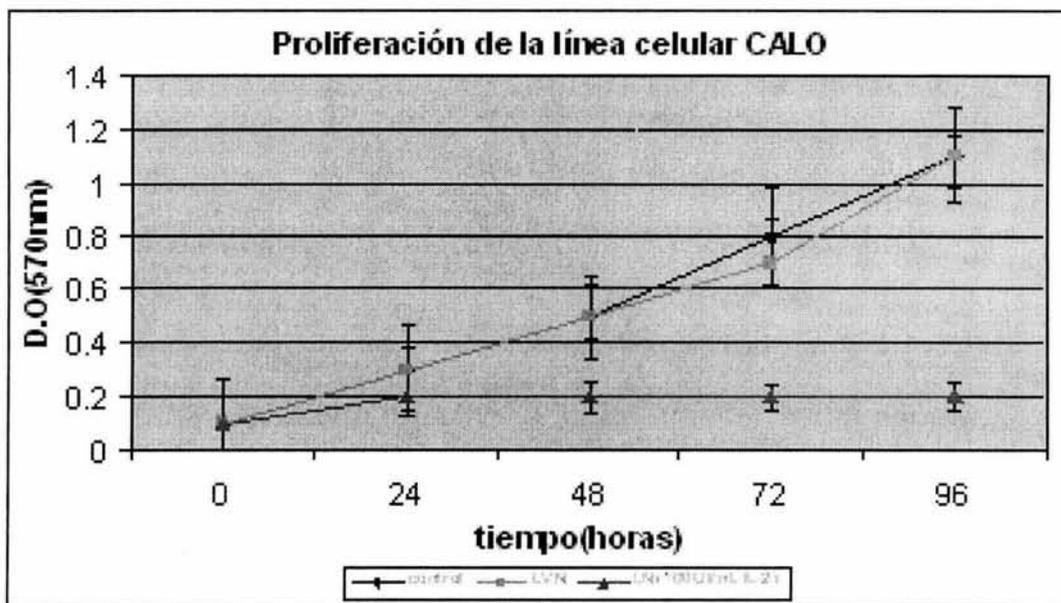


(a)

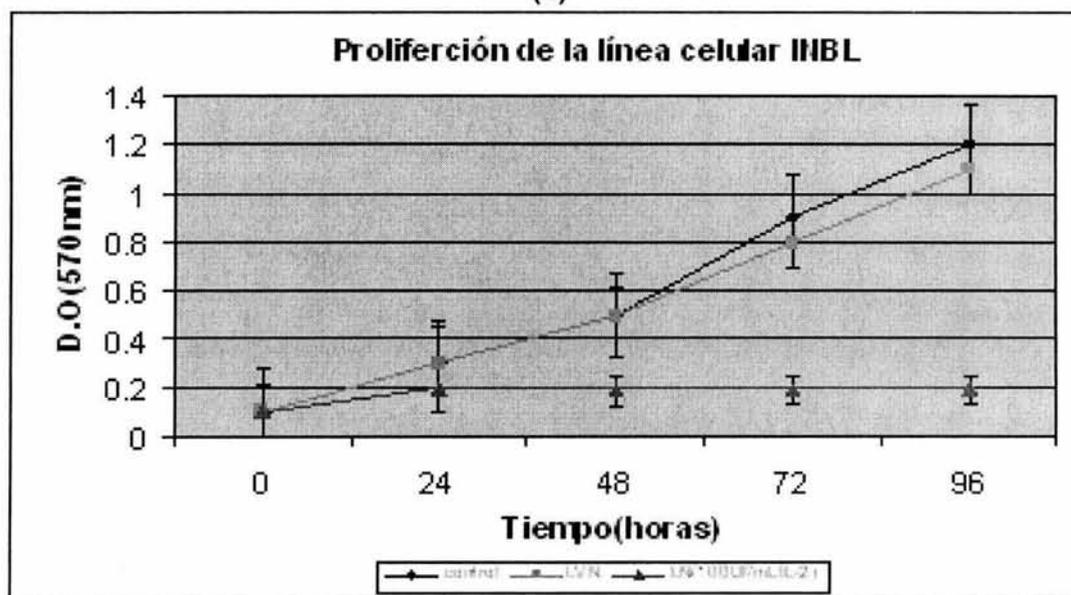


(b)

Gráfica 2 Se depositaron 5×10^3 células por pozo en una placa de 96 pozos y se evaluó la cinética de proliferación por 4 días cada 24 horas por medio de la técnica de Cristal Violeta. Se observa el comportamiento de las líneas celulares CALO (a) e INBL (b) al ser estimuladas con liposomas neutros vacíos a una concentración de $7 \mu\text{g/mL}$ de lípidos. Donde (\blacktriangle) representa el control (células cultivadas sin liposomas) y (\blacksquare) liposomas neutros vacíos.



(a)



(b)

Gráfica 3 Se depositaron 5×10^3 células por pozo en una placa de 96 pozos y se evaluó la cinética de proliferación por 4 días cada 24 horas por medio de la técnica de Cristal Violeta. Se observa el comportamiento de las líneas celulares CALO (a) e INBL (b) al ser estimularlas con IL-2 encapsulada en liposomas neutros a una concentración de $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ de lípidos. Donde (→) representa el control (células cultivadas sin liposomas), (←) liposomas neutros vacíos y (↔) la IL-2 encapsulada.

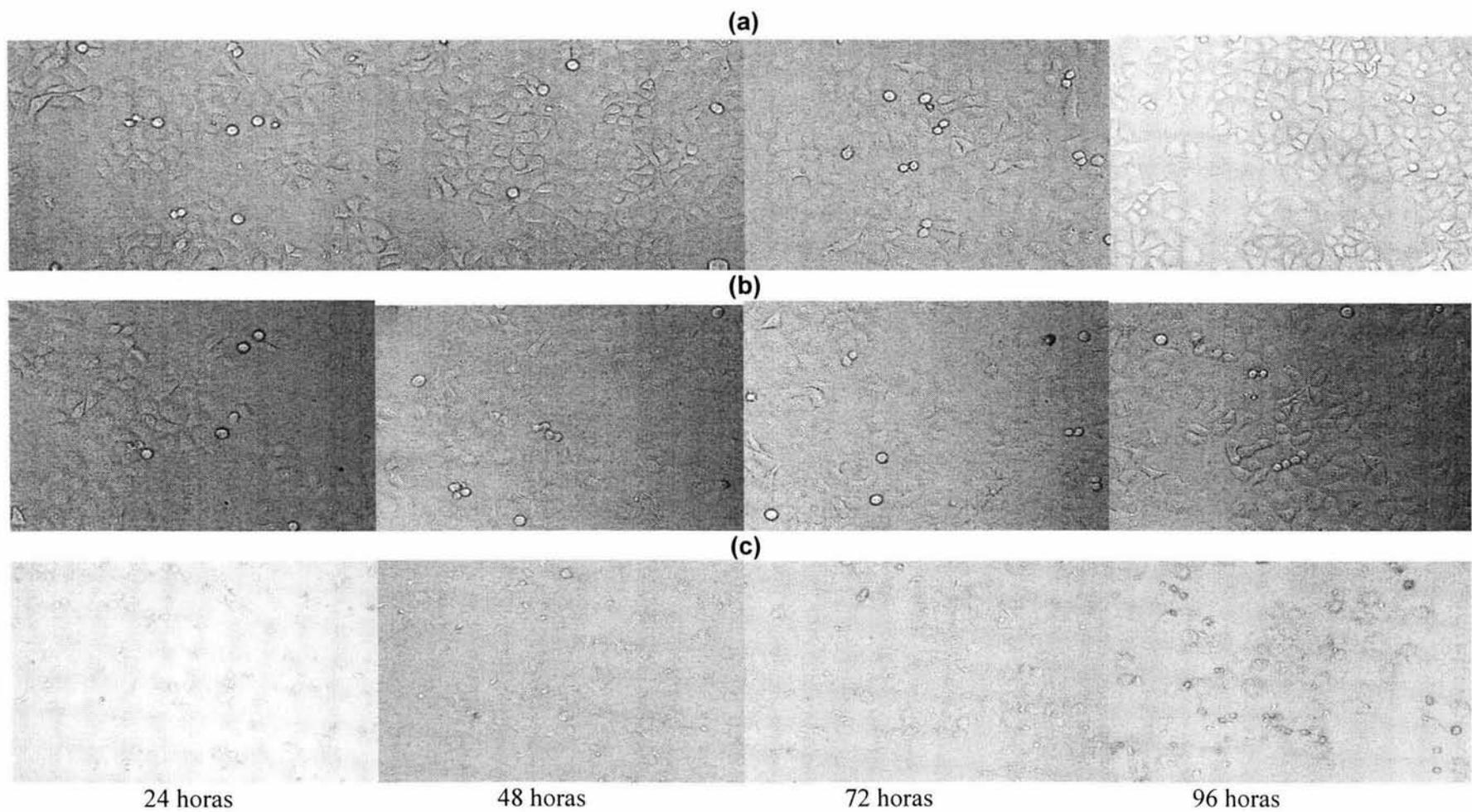


Fig. 1 Morfología observada durante la evaluación de la cinética de proliferación de la línea celular **CALO** donde **(a)** representa al control, **(b)** las células después de estimular durante una hora con liposomas vacíos neutros y **(c)** representa la morfología cuando es estimulada por una hora con 100UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas neutros.

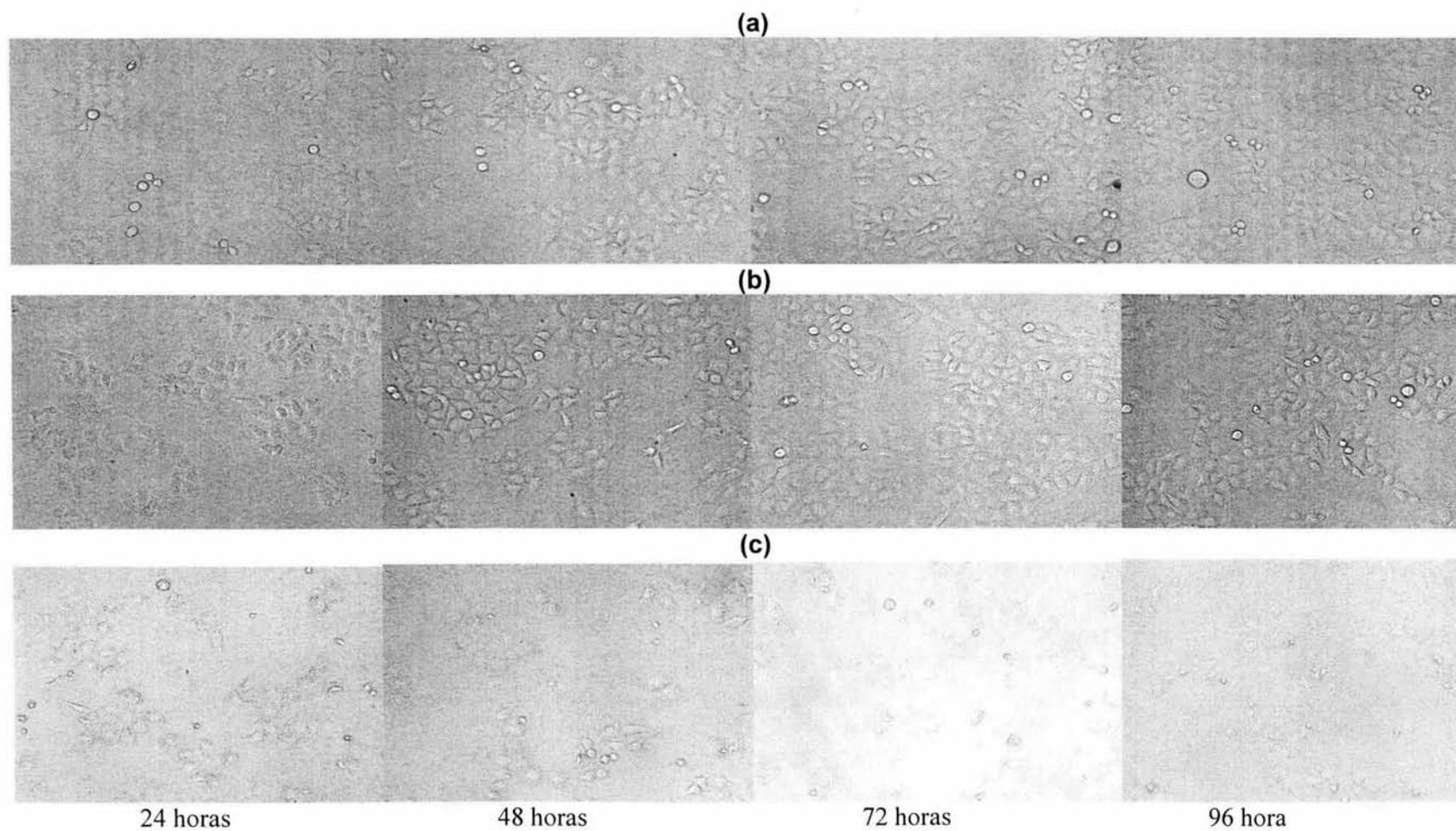
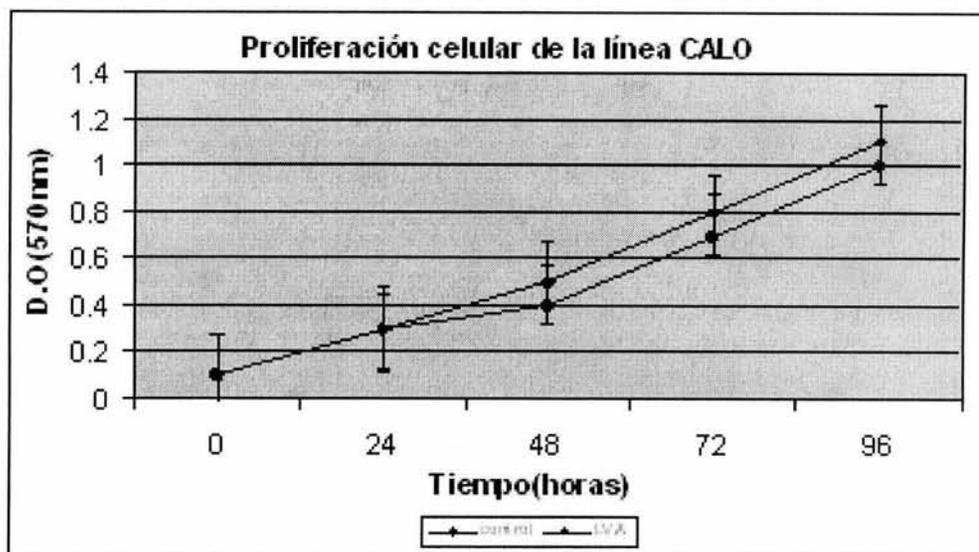


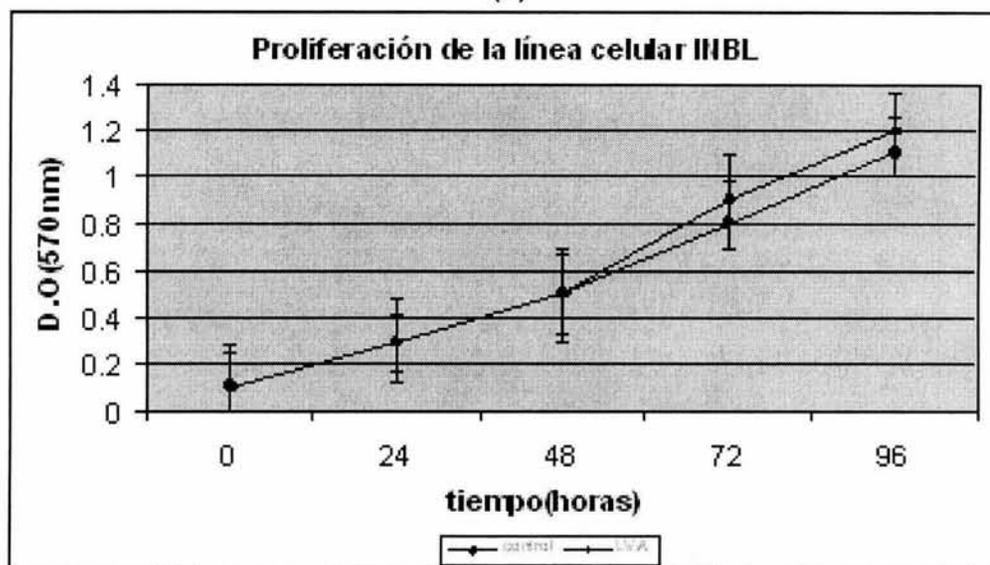
Fig. 2 Morfología observada durante la evaluación de la cinética de proliferación de la línea celular **INBL** donde **(a)** representa al control, **(b)** las células después de estimular durante una hora con liposomas vacíos neutros y **(c)** representa la morfología cuando es estimulada por una hora con 100UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas neutros.

Falta página

N° 28

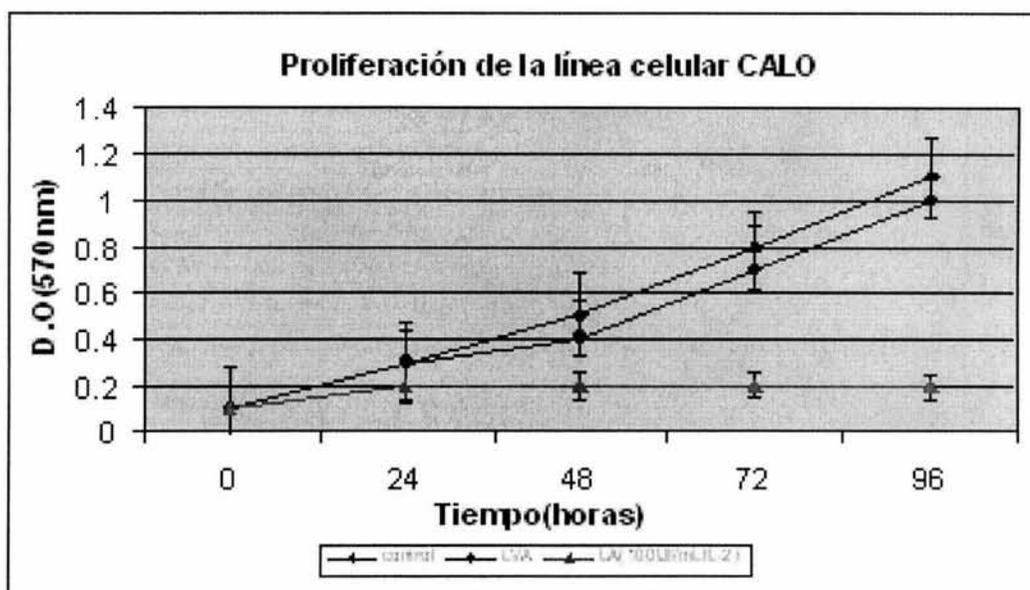


(a)

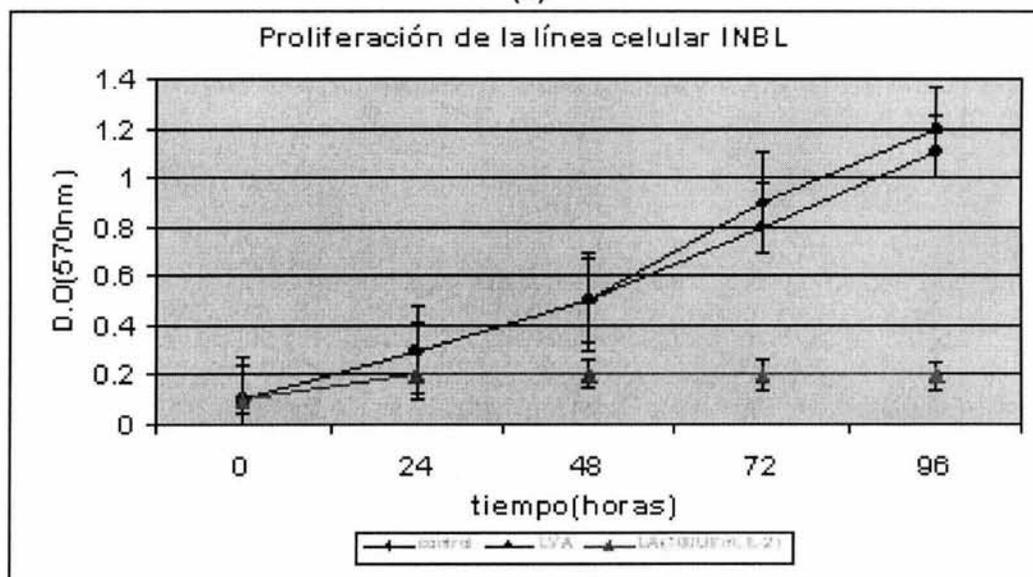


(b)

Gráfica 4 Se depositaron 5×10^3 células por pozo en una placa de 96 pozos y se evaluó la cinética de proliferación por 4 días cada 24 horas por medio de la técnica de Cristal Violeta. Se muestra el comportamiento de las líneas celulares CALO **(a)** e INBL **(b)** respectivamente al ser estimularlas con liposomas aniónicos vacíos a una concentración de $5 \mu\text{g/mL}$ de lípidos. Donde (\blacktriangle) representa el control (células cultivadas sin liposomas) y (\bullet) liposomas aniónicos vacíos.



(a)



(b)

Gráfica 5 Se depositaron 5×10^3 células por pozo en una placa de 96 pozos y se evaluó la cinética de proliferación por 4 días cada 24 horas por medio de la técnica de Cristal. Se observa el comportamiento de las líneas celulares CALO **(a)** e INBL **(b)** respectivamente al ser estimularlas con 100 UI/mL de IL-2 encapsuladas en liposomas aniónicos a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de lípidos. Donde (-) representa el control (células cultivadas sin liposomas), (-) liposomas aniónicos vacíos y (+) la IL-2 encapsulada.

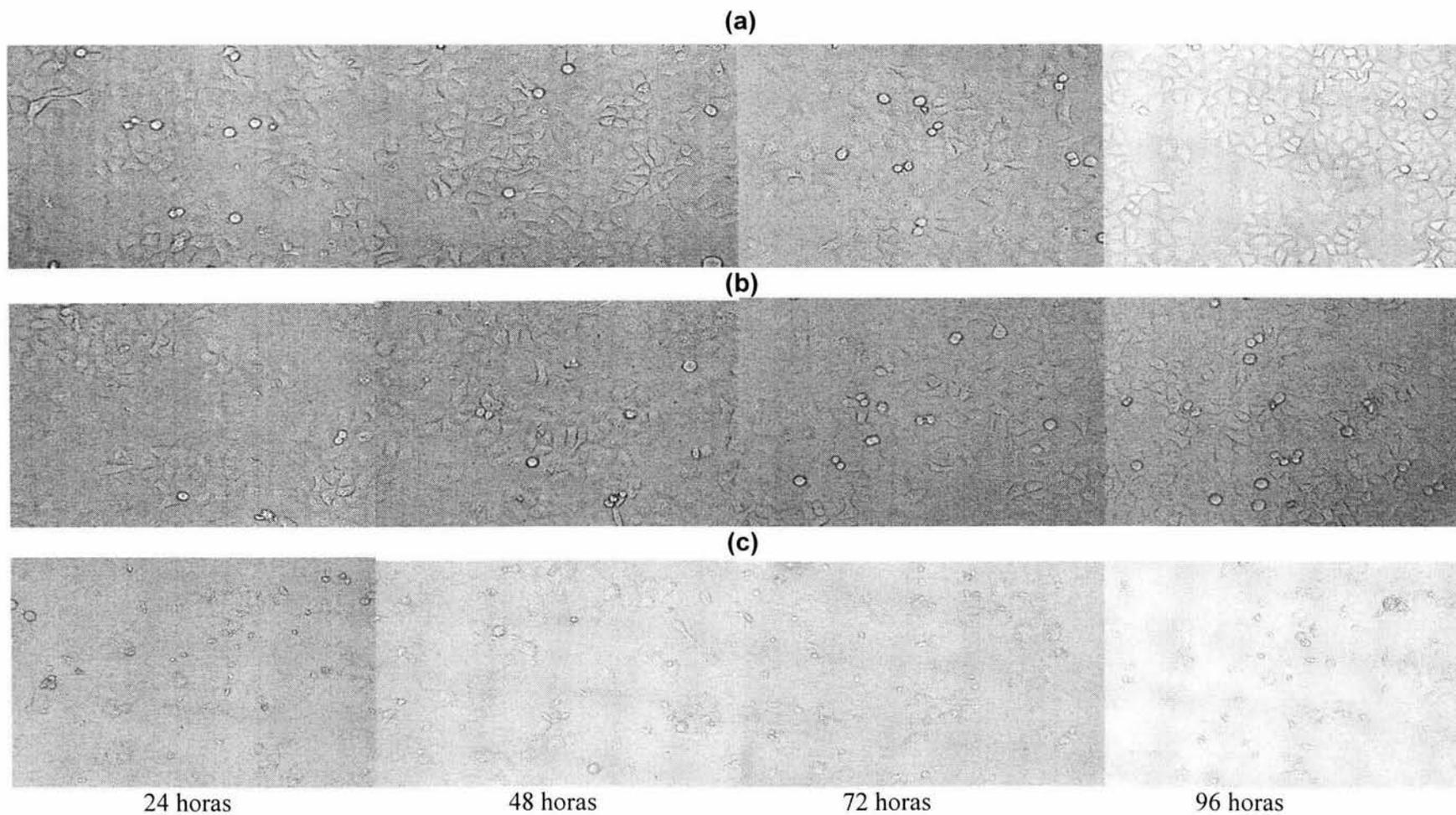


Fig. 3 Morfología observada durante la evaluación de la cinética de proliferación de la línea celular **CALO** donde **(a)** representa al control, **(b)** las células después de estimular durante una hora con liposomas vacíos aniónicos y **(c)** representa la morfología cuando es estimulada por una hora con 100UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas aniónicos.

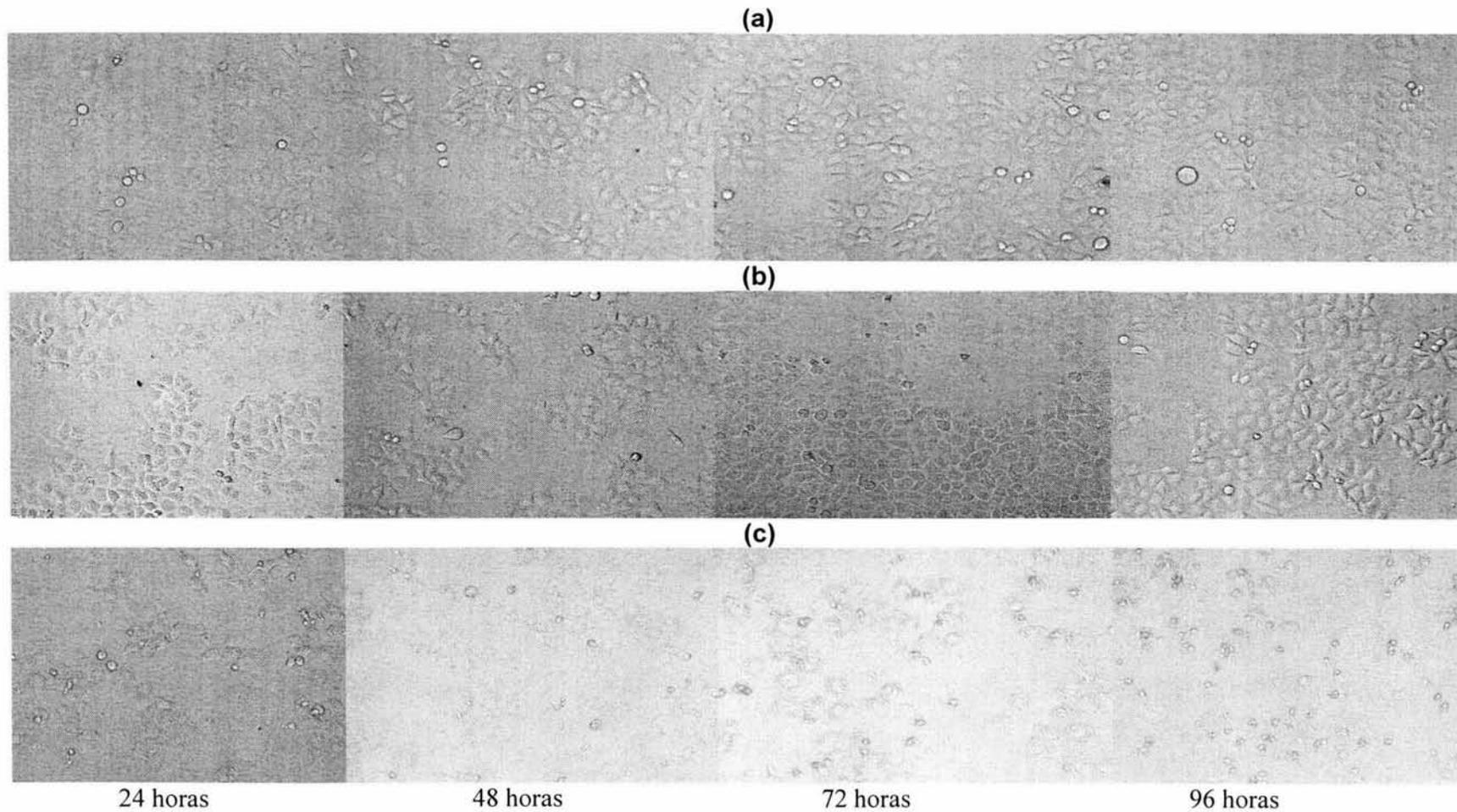


Fig. 4 Morfología observada durante la evaluación de la cinética de proliferación de la línea celular **INBL** donde **(a)** representa el control, **(b)** las células después de estimular durante una hora con liposomas vacíos aniónicos y **(c)** representa la morfología cuando es estimulada por una hora con 100UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas aniónicos.

DISCUSION DE RESULTADOS

El cáncer cérvico uterino (CaCU) en México, es el responsable de aproximadamente el 25% de las muertes por cáncer en mujeres³. En la actualidad se buscan nuevas alternativas terapéuticas para combatir este cáncer, desarrollándose vacunas profilácticas y terapéuticas⁴.

La IL-2 ha sido utilizada en la inmunoterapia, mostrando respuesta antitumoral, sin embargo, su aplicación vía sistémica altera vías de regulación hematopoyéticas y provoca reacciones adversas serias^{42,49,51}; por esta razón se han realizado diferentes estudios en los cuales se ha evaluado el efecto anti-tumoral de la IL-2 encapsulada en liposomas.^{72,73,74,75,76,77}

Los liposomas constituyen en la actualidad uno de los sistemas de administración de medicamentos y de productos biológicos más atractivos por su funcionalidad, versatilidad de empleo y sus perspectivas futuras⁷⁸.

Sin embargo, los liposomas presentan algunas desventajas como son baja eficacia de transfección, una expresión transitoria, pueden ser inhibidos por componentes séricos y sobre todo poseen un cierto grado de toxicidad celular⁷⁹

En general, la toxicidad de los lípidos, depende de la composición, concentración y tiempo de exposición, por lo que el potencial de toxicidad debe ser cuidadosamente considerado antes de utilizar liposomas como acarreadores de fármacos o productos biológicos^{80,81,82}

Una vez controladas la concentración y tiempo de exposición la encapsulación liposomal de fármacos puede alterar fuertemente la distribución de principios activos en el cuerpo y su tasa de liberación, al mismo tiempo que los protege contra la hidrólisis catalítica. Las diferencias farmacocinéticas que provoca la encapsulación de fármacos en liposomas pueden provocar que éstos actúen en el órgano blanco, reduciendo la toxicidad y/o aumentando la eficacia del fármaco encapsulado, haciendo posible una mayor absorción del mismo.

En nuestro caso particular pudimos observar que no todas las formulaciones de liposomas pueden ser elaboradas con la misma cantidad de lípido ya que en algunos casos pueden ser muy tóxicas. En este trabajo encontramos que no se puede utilizar la misma concentración de lípidos para la fabricación de diferentes tipos de liposomas. Se cree que el nivel de efecto tóxico se debe principalmente a su composición; los liposomas catiónicos, neutros y aniónicos tienen en común los lípidos fosfatidilcolina y/o colesterol y difieren en los lípidos espermidín-colesterol, fosfatidiletalonamina y fosfatidilserina respectivamente por lo que estos éstos dos últimos serían los que darían el grado de toxicidad por sus propiedades.

El determinar las concentraciones de lípidos mas adecuada para cada formulación de liposomas cobra gran importancia por que nuestro grupo de trabajo está evaluando en células de carcinoma de cérvix el efecto inhibitor de la proliferación de IL-2 encapsulada en diferentes formulaciones de liposomas y si la cantidad de lípidos que usamos para encapsularla es por si sola tóxica no podríamos observar el efecto de esta citocina.

Para determinar que formulación es la adecuada, es necesario realizar un balance entre los beneficios y el antagonismo de usar una u otra formulación. El efecto inhibitor de la IL-2 se mantiene en cualquiera de las tres formulaciones aunque se observa una mayor inhibición de la proliferación celular cuando es acarreada en liposomas neutros y aniónicos; se cree que es debido a que estos dos tipos de liposomas están fabricados con los lípidos

fosfatidiletalona y fosfatidilserina respectivamente los cuales por si mismo pueden tener un efecto tóxico que parece hacer sinergia con el efecto de IL-2. No existe evidencia documentada que sustente esta teoría por lo que se abre otra línea de investigación en donde se tendría que analizar a nivel molecular la interacción de la combinación de estos lípidos y la IL-2 con la membrana plasmática de las líneas celulares de CaCU

El hecho de buscar otras formulaciones para fabricar liposomas para encapsular IL-2 se da como una respuesta para poder disminuir costos de fabricación ya que hasta el momento hemos trabajado con liposomas catiónicos para encapsular IL-2. Pero a pesar de que los liposomas catiónicos mostraron ser buenos acarreadores de IL-2 reduciendo tumores de CaCU en ratones, su formulación incluye el lípido espermidín-colesterol que por ser sintético incrementa de manera considerable el costo de los liposomas; por esta razón es necesario probar otras formulaciones de lípido⁷⁸.

Por otro lado, los lípidos que conforman los liposomas neutros son los más abundantes en la naturaleza, es decir se presentan en todas las membranas biológicas⁷⁹, esta característica disminuye su costo, además presentan una gran estabilidad, posee una buena afinidad por las células epiteliales, como las que conforman los carcinomas. Estas propiedades indican que esta formulación posee las características más adecuadas para ofrecer un tratamiento efectivo.

Por su parte, los liposomas aniónicos por haber sido los más tóxicos, permiten reducir considerablemente la cantidad de lípido utilizada y por tanto disminuye el costo de su fabricación, ya que la fosfatidilserina es un lípido de elevado precio; el inconveniente que presenta esta formulación es que la fosfatidilserina es un lípido con una susceptibilidad a la oxidación muy grande⁸⁰, por lo que su uso es muy delicado y no sería un buen candidato para usarlos en el tratamiento con IL-2.

Sin embargo, esta formulación es de gran interés debido a que la fosfatidilserina es un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de las membranas biológicas, la cual es expuesta cuando las células se encuentran en apoptosis. Puede ser que el contacto de las células tumorales con la fosfatidilserina presente en los liposomas envíe una señal de muerte y que a esto se deba la gran toxicidad observada cuando se utilizan los liposomas aniónicos⁸¹.

Una vez discutido de que manera los lípidos de las diferentes formulaciones pueden afectar la proliferación celular por si mismos y que dicho efecto puede ser controlado por la cantidad de lípidos utilizados para su formulación nos queda discutir el efecto de la IL-2 encapsulada en liposomas neutros y aniónicos.

Al respecto podemos decir que la IL-2 encapsulada induce muerte celular ya que las fotografías de los cultivos celulares a diferentes tiempos muestran que las células parecen estar en apoptosis. Sin embargo, es conveniente que se realicen algunas pruebas como la reacción tunel para confirmar que las células en presencia de IL-2 encapsulada están en esta fase. Es importante mencionar que las características de la apoptosis son: condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelo (excepto mitocondrias y ribosomas), alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana, aunque no se rompa. Durante el proceso final ocurre fragmentación del DNA debido a una ruptura internucleosomal del DNA y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria⁸⁷.

Además, la muerte por apoptosis puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la misma membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca). La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), química (fármacos) o física (radiaciones o estrés), pudiendo un mismo estímulo generar efectos diferentes y hasta opuestos en distintos tipos celulares, e incluso en células del mismo tipo pero que se encuentren en diferente etapa de desarrollo⁸⁸.

Por lo antes mencionado, a pesar de no contar con datos de reacción Tunel, podemos decir que las células de las líneas celulares CALO e INBL en cultivos con IL-2 encapsulada se encuentran en apoptosis ya que muestran un morfología característica de células apoptóticas que dan un aspecto ondulado a la membrana plasmática tal como se aprecia en las fotografías obtenidas.

CONCLUSIONES

La aportación relevante de este trabajo fue determinar la concentración óptima de lípidos para las dos nuevas formulaciones de liposomas. Así como demostrar que una vez establecidas las concentraciones de lípidos para formular los liposomas se puede contar con un buen acarreador de IL-2 en tres formulaciones diferentes, sin que esto altere el efecto antiproliferativo de IL-2 en altas concentraciones sobre células tumorales. Por lo que los resultados obtenidos son de gran interés ya que se ha avanzado en el conocimiento básico de la formulación de liposomas para contar con una alternativa terapéutica adecuada para pacientes con cáncer de cérvix.

RECOMENDACIONES

Determinar a nivel molecular la interacción que presenta la IL-2 acarreada con los liposomas neutros y aniónicos con las células de las líneas celulares de CaCU.

Realizar las pruebas según se requiera de Electroforesis de DNA, Microscopia, Citofluorometría (detección de moléculas involucradas en la muerte apoptótica), inmunohistoquímica o la técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling), para determinar el tipo de muerte que ocasiona la presencia de la IL-2 acarreada en los diferentes formulaciones de liposomas.

Llevar acabo ensayos de proliferación tanto con las líneas celulares de cáncer de cérvix como con linfocitos de sangre periférica estimulados con IL-2 encapsulada en ambos tipos de liposomas para tener un panorama más claro de su comportamiento *in vivo*.

APÉNDICE

I.- Medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640).

<i>composición</i>	<i>RPMI 1640 (mg/l)</i>
CaCl ₂ .2H ₂ O	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	-
KCl	400
MgSO ₄ .7H ₂ O	100
NaCl	6000
NaHCO ₃	2000
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-
Na ₂ HPO ₄	800
D-glucosa	2000
Rojo de fenol	5
Piruvato sódico	-
L-arginina.HCl	-
L-asparagina.H ₂ O	50
Ácido L-aspártico	20
L-cistina	50
Ácido L-glutámico	20
L-glutamina	300
Glutation	1
Glicina	10
L-histidina.HCl.H ₂ O	-
L-histidina	15
L-hidroxiprolina	20
L-isoileucina	50
L-leucina	50
L-lisina.HCl	40
L-metionina	15
L-fenilalanina	15
L-prolina	20
L-serina	30
L-treonina	20
L-triptófano	5
L-tirosina	20
L-valina	20
Biotina	0.2
D-Ca panteonato	0.3
Cloruro de colina	3
Ácido fólico	1
i-inositol	35
Nicotinamida	1
Ácido p-aminobenzoico	1
Piridoxal.HCl	1
Riboflavina	0.2
Tiamina.HCl	1
Vitamina B ₁₂	0.005

II.-INACTIVACION DE SUERO FETAL DE BOVINO (SFB)

La botella de suero fetal bovino (SFB) se descongela a temperatura ambiente, posteriormente se coloca en un baño maría a 56° C durante 30 minutos, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular como son las proteínas del complemento, así como inactivar otras para mayor eficacia en la nutrición celular. Posteriormente se separa en alícuotas de 50 mL para su mejor manipulación, conservándose a una temperatura de 4° C.

III.- SOLUCIÓN SALINA DE VERSENO

Se emplea para despegar células tumorales adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan los siguientes reactivos:

Tris (Sigma, Chem,USA)	3.04g
KCl(Sigma, Chem,USA)	8.00g
NaCl(Sigma, Chem,USA)	0.40g
EDTA(Sigma, Chem,USA)	0.40g

IV.- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

La solución amortiguadora de fosfatos es utilizada para lavar las células después de ser estimuladas con los liposomas, manteniendo así las condiciones fisiológicas de las células; también es utilizada como vehículo para la preparación de los liposomas.

V.- AZUL TRIPANO

Se emplea para pruebas de viabilidad y conteo celular , se realiza una dilución del colorante azul tripano (Sigma, Chem.USA) al 0.3% en PBS y es filtra con papel filtro Whatman #2.

VI.-GLUTARALDEHÍDO AL 1.1%

Esta solución se utilizó para fijar las células en las placas de 96 pozos de fondo plano. Para preparar 500 mL al 1.1% se miden 11 mL de glutaraldehído (50% v/v Sigma, USA) y se le adiciona 489de agua destilada. Esta solución debe guardarse a 4° C.

VII.- SOLUCION DE CRISTAL VIOLETA

Para preparar 500 mL de cristal violeta a una concentración de 0.1%, se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH 6. posteriormente se adiciona el cristal violeta se diluye muy bien y por último se filtra en papel Whatman # 2.

Hidróxido de sodio (sigma,Chem.USA)	3.96g
Ácido fórmico(sigma,Chem.USA)	4.28 mL
Cristal violeta(sigma,Chem.USA)	1.00g

VIII.-ACIDO ACETICO AL 10%

La solución de ácido acético, que se utilizó fue una a una concentración de 10%. Está solución una vez preparada se guarda a temperatura ambiente.

Ácido acético (Sigma,Chem USA)	10 mL
Agua Milli Q (MilliQ Academic, USA)	90mL

IX.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO NO PARAMETRICO (TUKEY).

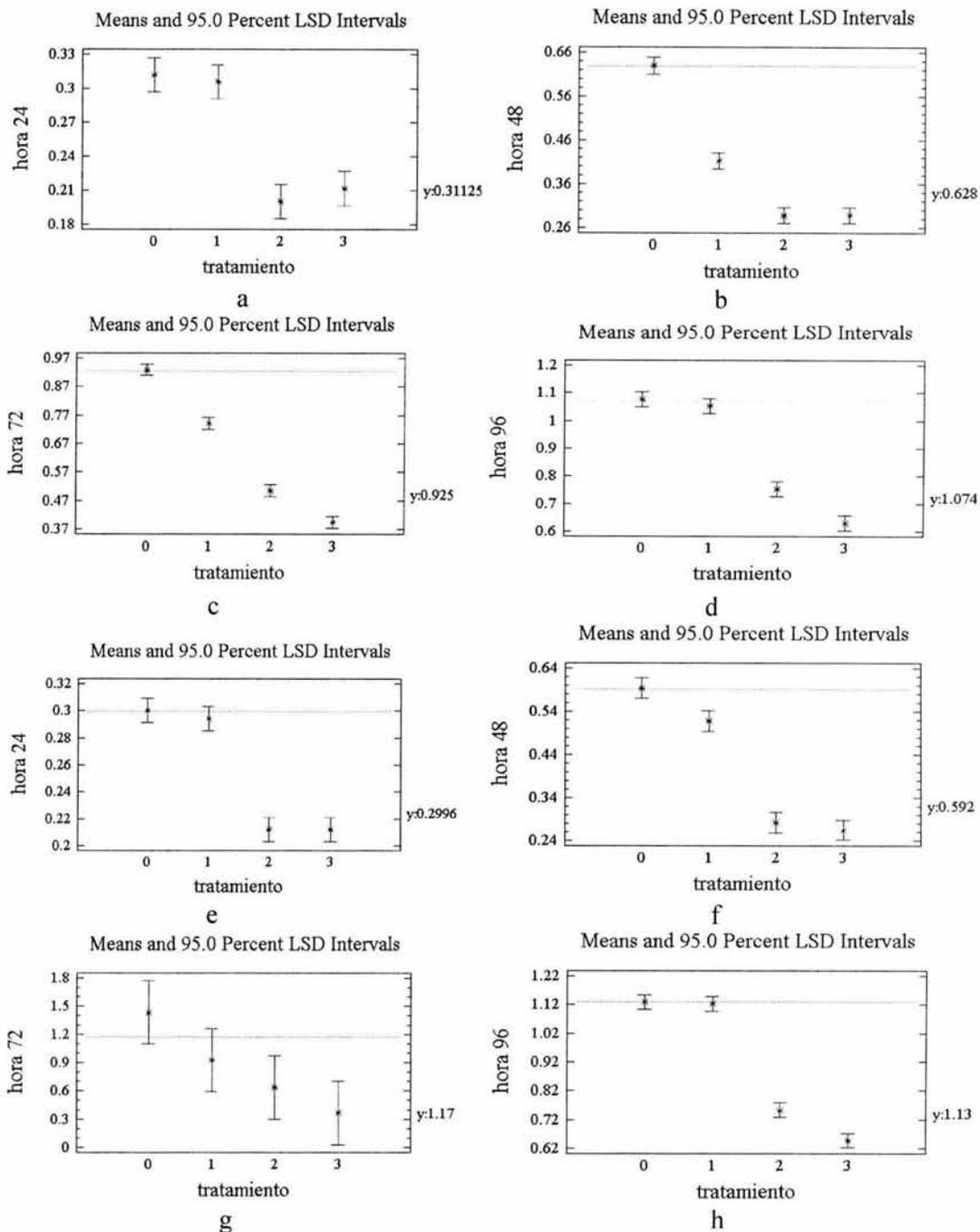


Fig. 6 Análisis estadístico no paramétrico (Tukey-comparación de promedios) donde **a**, **b**, **c** y **d** representan el comportamiento de la línea celular CALO cada 24 horas y **e**, **f**, **g**, y **h** el comportamiento de la línea celular INBL. El tratamiento (0) es la cinética mostrada por el control, el tratamiento (1),(2) y (3) constituyen la cinética de proliferación cuando las líneas celulares son estimuladas con liposomas vacíos catiónicos, liposomas vacíos neutros y liposomas vacíos aniónicos respectivamente a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

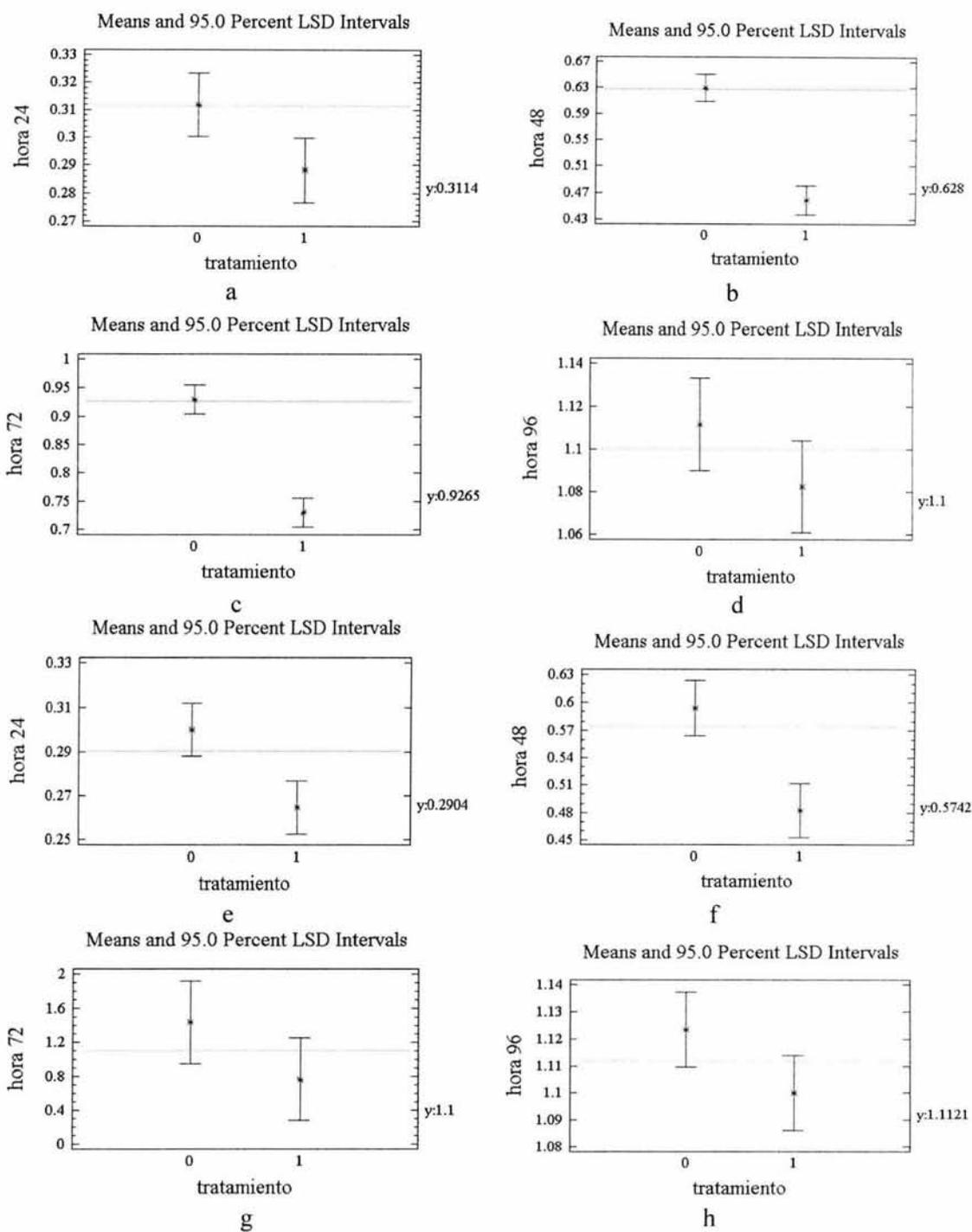


Fig. 7 Análisis estadístico no paramétrico (Tukey-comparación de promedios) donde **a**, **b**, **c** y **d** representan el comportamiento de la línea celular CALO cada 24 horas y **e**, **f**, **g**, y **h** el comportamiento de la línea celular INBL. El tratamiento (0) es la cinética mostrada por el control, el tratamiento (1) constituyen la cinética de proliferación cuando las líneas celulares son estimuladas con liposomas vacíos neutros por una hora a una concentración de 7 $\mu\text{g/mL}$.

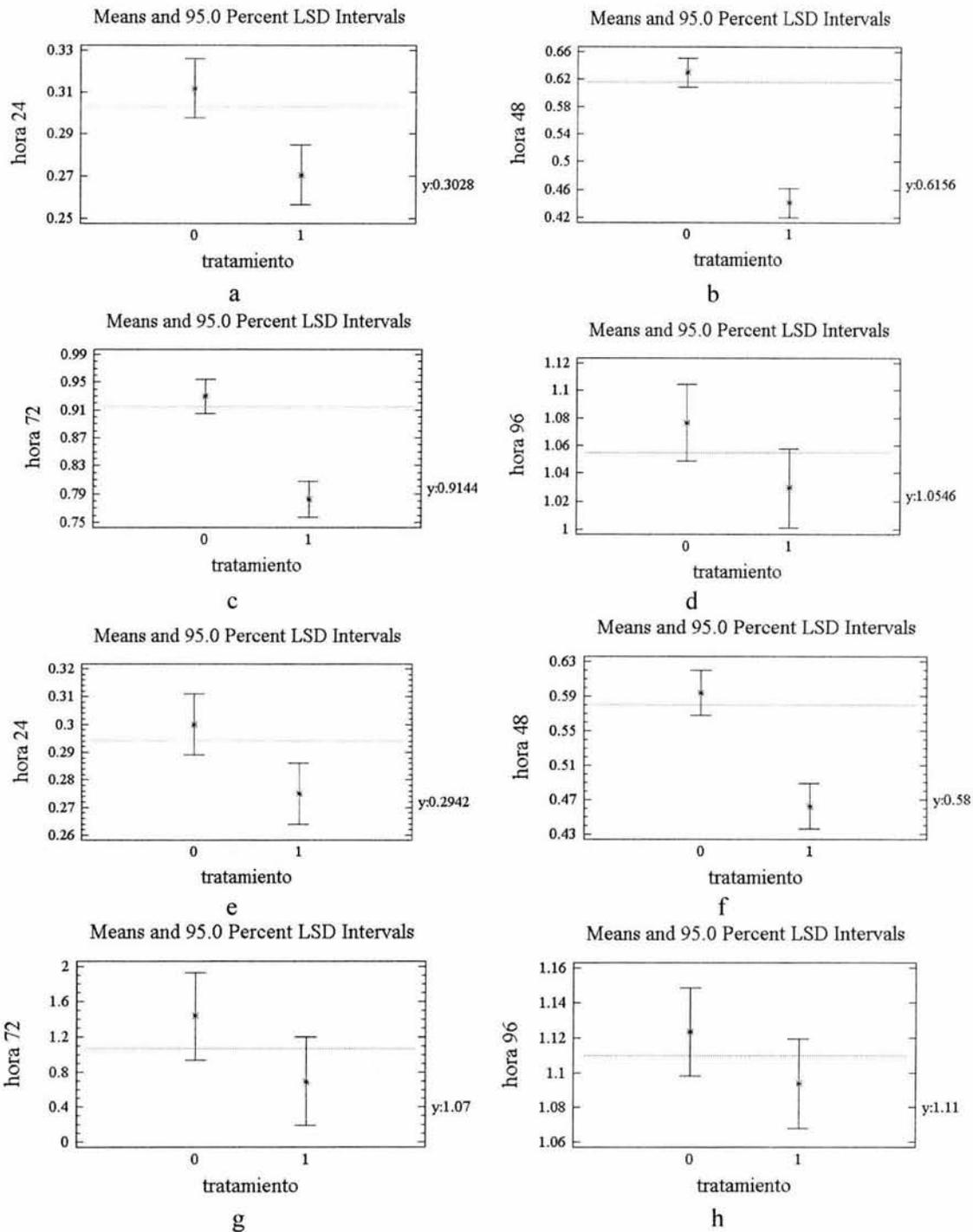


Fig. 8 Análisis estadístico no paramétrico (Tukey-comparación de promedios) donde **a**, **b**, **c** y **d** representan el comportamiento de la línea celular CALO cada 24 horas y **e**, **f**, **g**, y **h** el comportamiento de la línea celular INBL. El tratamiento (0) es la cinética mostrada por el control, el tratamiento (1) constituyen la cinética de proliferación cuando las líneas celulares son estimuladas con liposomas vacíos aniónicos por una hora a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

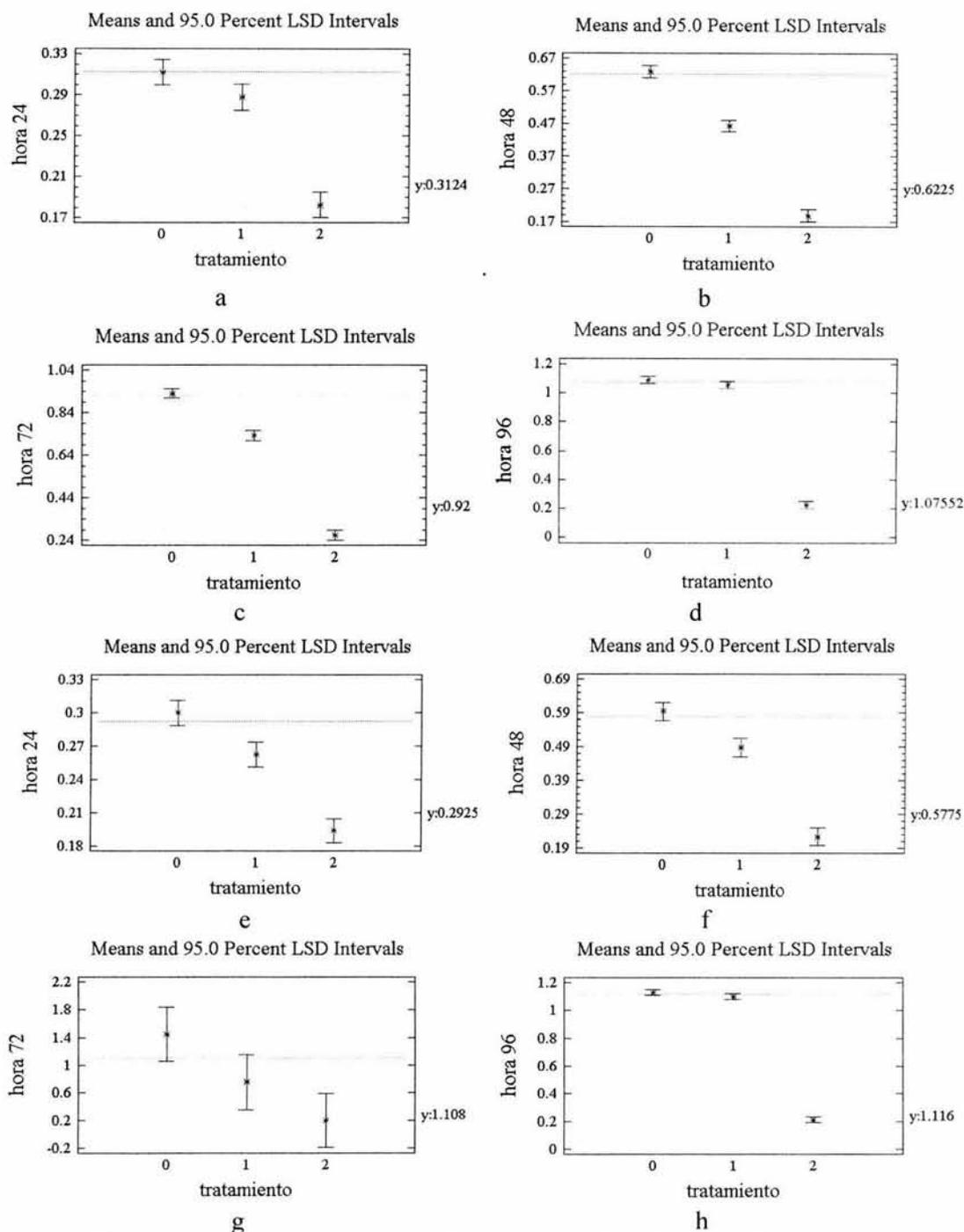


Fig 9 Análisis estadístico no paramétrico (Tukey-comparación de promedios) donde **a**, **b**, **c** y **d** representan el comportamiento de la línea celular CALO cada 24 horas y **e**, **f**, **g**, y **h** el comportamiento de la línea celular INBL. El tratamiento (0) es la cinética mostrada por el control, el tratamiento (1) constituyen la cinética de proliferación cuando las líneas celulares son estimuladas con liposomas vacíos neutros a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el tratamiento (2) establece el comportamiento de las líneas celulares después de ser estimuladas por una hora con 100 UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas neutros.

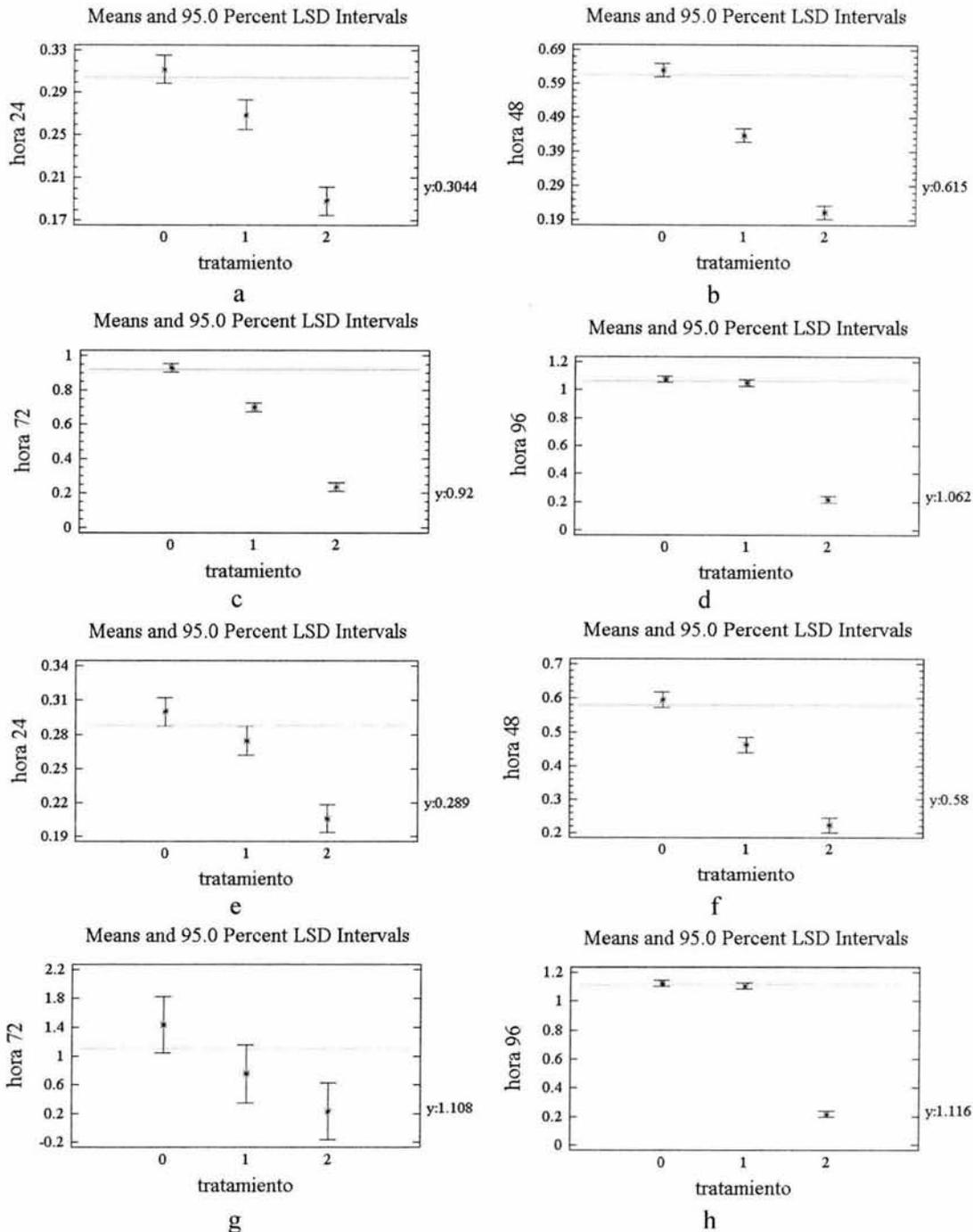


Fig. 10 Análisis estadístico no paramétrico (Tukey-comparación de promedios) donde **a**, **b**, **c** y **d** representan el comportamiento de la línea celular CALO cada 24 horas y **e**, **f**, **g**, y **h** el comportamiento de la línea celular INBL. El tratamiento (0) es la cinética mostrada por el control, el tratamiento (1) constituyen la cinética de proliferación cuando las líneas celulares son estimuladas con liposomas vacíos aniónicos a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el tratamiento (2) establece el comportamiento de las líneas celulares después de ser estimuladas por una hora con 100 UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas aniónicos.

REFERENCIAS

- 1.-Parkin DM. Cancer Incidence In: World Health Statistical Annual. OMS,Ginebra 1987; 1:125-148
- 2.-Boyle P. Global burden of cancer. Lancet 1997; 3491 (suppl.II): 23-6
- 3.-Hinojosa García L. M., Dueñas Gonzáles A. Papel de la quimioterapia en el tratamiento del carcinoma cérvico uterino. Revista del Instituto Nacional de Cancerología 2000; 46:47-57
- 4.-Berumen J, Villegas N. Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. Salud Pública Méx. 1997; 39:288-297
- 5.-Alvarado, M. J. A. Presencia de la cadena α y β del receptor para interlucina 2 (RIL-2) en células tumorales de cáncer cérvico uterino (CaCU) y el efecto proliferador inducido por IL-2 en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. FES-Zaragoza. UNAM. México, DF,1977.
- 6.-Smith A.K. Interleukin-2: Inception, impact and implications. Science 1988; 240: 1414-1423
- 7.-Medina, P.O., Söderlund T., Lakkonen J.L., Toumen J.K.E., Koivunen E., Kinnven J.K.P. Binding of novel reptide inhibitors of type IV collagenases to phospholipid membranes and use in liposomes targeting to tumor cells in vitro. Cancer. Research 2001; 61:3978-3985
- 8.-Dand. Lasic. Novel Applications of liposomes. Tibtech 1998 July; 16: 307-321.
- 9.-Rojas-Espinosa. Inmunología de memoria. 2ª ed. Buenos Aires Argentina: Panamericana, 2001: 289-307.
- 10.-Consensus Statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Cervical cancer *Gyn Oncol* 1997; 66:351-361
- 11.-Mohar B.A. Registro histopatológico de Neoplasias en México. México: Secretaría de Salud.1997; 2:311-9
- 12.-Torres JL, López M.S. Panorama epidemiológico de las enfermedades neoplásicas. En: Moreno AL, Güemez SC, López MS. Factores de riesgo en la comunidad III. Facultad de Medicina, UNAM México DF; 1990: 145-80
- 13.-Dirección General de estadística e informática. Principales resultados de las estadísticas sobre mortalidad en México en 1999. Salud Publica México. 2001;43:67-73
- 14.-González Villa V., Villegas Cortés V. Perspectivas actuales en el estudio y en la atención a pacientes con áncer cérvico uterino. Ginecol Obstet Mex 2004; 72:29:38
- 15.-Dirección General de Estadística e informática. Principales resultados de las estadísticas sobre mortalidad en México de 1998. Salud Pública México 2000; 42:155-61

- 16.-Lina Sofía Palacio-Mejía, Gudelia Rangel-Gómez, Mauricio Hernández-Avila Eduardo Lazcano-Ponce. Cáncer cervical, una enfermedad de la pobreza: diferencias en la mortalidad por áreas urbanas y rurales en México. *Salud pública México* 2003; 45:141-212
- 17.-Lazcano P.E, Moss S, Alonso B, Salmeron CJ, Hernández AM. Programa de detección oportuna de cancer de cuello uterino en países en vías de desarrollo. En: Alonso P, Lazcano PE, Hernández AM. *Cáncer cervicouterino, diagnostico, prevención y control*. México: editorial Panamericana 2000:155-74
- 18.-José Luis Torres-Cosme, José Ramón Tapía-Yañez, Javier Dorantes. Mortalidad de cáncer cervicouterino 1979-1999. *Permatol Reprod Hum* 2002; 16:35-42.
- 19.-Bosch FX, De San José S. H.Ppapillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl cancer Inst Mongr* 2003; 31:3-12
- 20.-Ho GY, Bieman R, Beardsley L. Natural history of cervico vaginal papilloma virus in young woman. *N Engl J Med* 1998; 338:423-28
- 21.-Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer. A review *Virus Res* 2002; 89:229-40
- 22.-Wang SS, Hidesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:35-40
- 23.-García Carranca A., P. Gargilio. Aspectos moleculares de los papillomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev Inc Clin* 1993; 45:85-92
- 24.-Berumen J. Casas L, Segura E, Amescua JL, García Carranca A. Genoma amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E₁/E₂ genes. *Int J. Cancer* 1994;56: 640-45.
- 25.-Berimen j. Unger E.R, Casas L, Figueroa P. Amplication of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer; *Hum Pathol* 1995;.26:676-681
- 26.-Barber HRK. Incidence, prevalence, and median survival rates of gynecologic cancer. In: Van Nagell JR, barber HRK, eds. *Modern concepts of gynecology oncology*. Boston: Tohn Wright PSG.1982; 1-19
- 27.-Cramer DW, Cutler SJ. Incidence and histopathology of malignancies of the female genital organs in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 118:443-460.
- 28.-International Federation of Gynecology and Obstetrics. Change in definitions of clinical staging for carcinoma of the cervix and ovary, *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:263-264.
- 29.- Cabezas Cruz E. Conducta frente a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC). *Rev Cubana Obstet Ginecol* 1998; 24(3):156-60.
- 30.-J.R. Regueiro González, C. López Larrea, S. González Rodríguez, E. Martínez Naves. *Inmunología biología y patología del sistema inmune*. 3ª. ed. España: Panamericana, 2003: p.1-9

- 31.-Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober. Inmunología celular y molecular. 4ta. ed España: Mc Graw-Hill Interamericana, 2002.p. 1-17
- 32.-Fleisher TA, Bleesing JJ. Immune function. *Pediatr Clin North Am* 2000; 47:1197-209.
- 33.-Medzhitov R, Janeway C Jr. Advances in immunology: Innate immune recognition: mechanisms Immunity. *N Eng J Med* 2000; 343:338-44.
- 34.-Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; 2000; 173:89-97.
- 35.-Miguel A., Anabell A. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev biomed* 2001; 12:272-280.
- 36-Brynskan J. Nielsen OH, Ronne IA, Bendtzen K. Cytokines immunoinflammatory hormones and the natural regulation in inflammatory bowel disease (crohn's disease and ulcerative colitis): a review. *Dig Dis* 1994; 12:290-304
- 37.-Danil P. stites, MD, Abba I. Terr, MD, Tristram G. Parslow, MD, PhD. Inmunología básica y clínica. 8ª. ed. España: El manual moderno 1994; p.133-154
- 38.- Piñol Jiménez F, Panjagua Estévez M. Citocinas, gastritis crónicas y helicobacter pylori. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemater* 2000; 16(3):184-89
- 39.- Anibal Margani R. Inmunología e Inmunoquímica. 5ª ed. España: Panamericana;1996 p.240-244
- 40.-Aggarwal B, B, Gutterman J. U. Human cytokines: handbook for basic and clinical research. Blackwell Scientific publications 1992; 1:123-249
- 41.-Taniguchi T.,Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview cell. *N Eng J Med* 1993; 73:5-8.
- 42.-Mire-Sluis A.,Thorpe R. Biological response modifiers: interferons,interleukins, recombinant products, liposomal products. *Vet. Clin. North Am Small Anim. Pract.* 1998; 28(2): 269-95
- 43.-Valle Mendiola Arturo. Estudio de las proteínas activadas por la unión de IL-2 a su receptor en líneas de carcinoma de cervix CALO e INBL en comparación c linfocitos normales. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. Méx. DF, 2001.
- 44.-Mcmillan D.N., Kernohan N.M. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localización in human solid tumor cells in situand in vitro: evidence for a direct role in the regulación of tumor cell proliferation. *Int J. Cancer* 1995; 60:776-812.
- 45.-Kruth, S.A Biological response modifiers: interferons, interleukins, recombinant products, liposoma, *SmallAnim.Pract.*1998; 28(2): 269-95
- 46.-Torres G.C.F. Las líneas celulares de carcinoma de cervix CALO e INBL secretan las citocinas IL-2. IL-3 e IL-6 en la fase G1 del ciclo celular y estas son utilizadas por ambas líneas para inducir su proliferación. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México DF, 2000.

- 47.-Hassuneh, M.R., Nagarkatti,P. S., Nagarkatti, M. Evidence for the participation of interleukin (IL-2) and IL-4 in the regulation of autonomous growth and tumorigenesis of transformed cell of lymphoid origin.blood. *Int J. Cancer* 1997; 89: 610-620.
- 48.- Rangel-Corona, L Rodríguez-Cruz,G. Flores-Flores, C. Gómez-Ruíz,I. Soto-Cruz,J.F. Mendoza-Rincon, B.Weiss-Staider 1998. Differential expression of the two componets of the interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors* 1998;(3):1239-1243.
- 49.- Maas A.R., Dullens J.F.H, Otter D.W. Interleukin-2 in cancer treatment: disappointing or (still) promising?. A review. *Cancer inmunol immunother* 1993; 36:141-148.
- 50.-Khanna,C., Anderson,P. M., Hasz,D., Neville, M., Klausner, J. S. Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmory metastases. *Cancer* 1997; 79(7):1409-1421
- 51.-Betageri G.V. Liposomal encapsulation and stability of dideoxyinosine triphosphate. *Drug development and Ind.Pharm* 1993;19 (5): 531- 539.
- 52.-Medina, P., Söderlund T., Lakonen J., Tuomine J., Koivunen E. Y Kinnunen J. Binding of novel peptide inhibitors of type IV collagenases to phospholipid membranes and use in liposome targeting to tumor cells in vitro. *Cancer Research* 2001; 61:3978-3985.
- 53.-Shargel Y., Yu A.B.C. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 3a edition.Ed. Appleton and Lange 1993; p. 260-274
- 54.-Tanford C. *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes*. John Wiley and Sons. New York, London, Sydney and Toronto 1973; 1:158-186
- 55.-Singer S., Nicolson G. The Fluid mosaic model of the structure of mambranes. *Science* 1972; 175:720-731.
- 56.-Szoka,F y Papahadjopoulus, D. procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *ProcNatl Acad Sci USA* 1978; 75: 4194-4198.
- 57.-Ibañez M. *Transferencia de genes por medio de liposomas*. Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México, DF.1993.
- 58.-Cullis P., Hope M. Physical properties and funtional roles of lipids in membranes.En: *biochemistry of lipids and membranes*. En: Vance, D. y Vance, J, (Eds) Benjamin/cummings Publ. Co. Menlo Park 1985; 2:446-497.
- 59.-DeKruijff B. polymorphic regulation of membrane lipid composition. *Nature* 1987; 329: 587-588.
- 60.-Baeza I, Ibañez M, Santiago j, Wong C y Oro J. Difusión of Mn²⁺ ions into liposomes mediated by phosphatidate and monitored by the activation of an encapsulated enzymatic system. *J Mol Evol* 1990; 31:453-461.

- 61.-Ibañez, M., Gariglio, P., Chávez, P., Santiago, R., Wong, C., and Baeza, I. Spermidine-condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and expression of exogenous DNA transfer by liposomes. *Biochem. Cell. Biol.* 1996; 74: 633-643.
- 62.-Lasic, D.D. Liposomes. *Science and medicine* 1996; May/ june: 34-43.
- 63.-Rangel-Corona R., Corona-Ortega T., Soto-Cruz I, Penichet M., Weiss- Steider B. Inducción a la proliferación y citotoxicidad de linfocitos de sangre periférica por anticuerpos bioespecíficos. *Revista de la sociedad Mexicana para el estudio de la Hematología* 2001; 4:6-14.
- 64.-Enriqueta Nieves R. Reducción de tumores inducidos por el uso de TAPW, FES Zaragoza, UNAM; tesis licenciatura.2002.
- 65.-Gregory G. Liposomes as drug carriers. John Wiley and Sons Ltd. 1988; 2:45-62
- 66.-<http://www.transtechinics.com/formulación.htm>
- 67.-Szoka F., Papahadjopoulus D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann Rev Biophys. Acta.*1980; 1129: 161-165.
- 68.-Corona T. Inducción a la aparición de receptores Fc y a la secreción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales de ratón, utilizando liposomas como acarreadores de las citocinas IL-1 β e INF γ tesis doctoral. FES-Zaragoza. UNAM. México DF.2000.
- 69.-Janoff S.A. Liposomes Rational Design. Marcel Dekker, Inc. USA 1999; p 1-12, 63-87 y 159-179.
- 70.-Hicks, J.J. 2000. Bioquímica. 2da. Ed. Mc. Graw Hill. México, 2000:158-174
- 71.-Zaudiman N.J., Gouw M., Barenholz Y., Crommelin, D. Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: The role of lysophospholipids and fatty acids. *Biochemical et Biophysica Acta.* 1995; 1240:101-110.
72. Yann Pellequer, Michel Ollivon, Gillian Barratt. Formulation of liposomes associated with recombinant interleukin-2 : effect on interleukin-2 activity. *PubMed National Library of Medicine Biomedicine and Pharmacotherapy* 2004; 58: 162-167
73. Bergers JJ, Den Otter W, Dullens HF, Kerkvliet CT, Crommelin DJ. Interleukin-2-containing liposomes: Interaction of interleukin-2 with liposomal bilayers and preliminary studies on application I cancer vaccines. *PubMed National Library of Medicine Pharm Res* 1993; 10 (12): 1715-21
74. Konno H, Yamashita A, Tadakuma T, Sakaguchi S. Inhibition of growth of rat hepatoma by local injection of liposomes containing recombinant interleukin-2. *Antitumor effect of IL-2 liposome.* *PubMed National Library of Medicine Biotherapy* 1991; 3(3): 211-8
75. Neville M.E, Boni L.T, Pflug L.E, Popescu M.C, Robb R.J. Biopharmaceutics of liposomal interleukin-2, Oncolipin. *PubMed National Library of Medicine Elsevier Science* 2000; 12 (11) : 1691-701

76. Skubitz K.M, Anderson P.M. Inhalational interleukin-2 liposomes for pulmonary metastases: phase I clinical trial. PubMed National Library of Medicine Anticancer Drugs 2000; 11(7): 555-63
77. Mary E. Neville, Richard J. Robb, Mircea C. Popescu. In situ vaccination against a non-immunogenic tumour using intratumoural injections of liposomal interleukin-2. PubMed National Library of Medicine Cytokine 2003; 16(6): 239-250
78. Dinorah Granada Cortada. Liposomas en dermatoterapia. Revista Cubana de Farmacia 1996; 30 (2):1-8
79. Allen T.M. Toxicity and systemic effects of phospholipids. En: Cevc G, ed. Phospholipids handbook. New York: Mercel Dekker 1993; 1:608-13.
80. Mayhew E, Ito M, Lazo R. Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells. PubMed National Library of Medicine Exp Cell Res. 1987; 171 (1): 195-202
81. Allen TM, McAllister L, Mausolf S, Gyorffy E. Liposome-cell interactions. A study of the interactions of liposomes containing entrapped anti-cancer drugs with the EMT6, S49 and AE1 (transport-deficient) cell lines. PubMed National Library of Medicine Biochim Biophys Acta 1981; 643 (2): 346-62
82. Filion M.C, Phillips N.C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulate with cationic lipids toward immune effector cells. PubMed National Library of Medicine Biochim Biophys Acta 2001; 1329 (2): 345-56
83. Alberto Roseto, Horacio A., Repto Exeni. Las membranas celulares. Los canales iónicos y nefrología molecular. Arch. Argent. Pediatr 2003; 101 (49): 320-343
84. Feola M, Simoni J, Tran R, Lox C.D, Canizaro P.C. Toxic factors in the red blood cell membrana. PubMed National Library of Medicine Trauma 1989; 29(8): 1065-75
85. Gordeeva A.V, Labas Y.A, Zvyagilskaya R.A. Apoptosis in Unicellular Organisms: Mechanisms and Evolution. PubMed National Library of Medicine Biochemistry 2004; 69(10): 1055-1066
86. Enrique J. de la Rosa, Begoña Díaz. Muerte Celular Programada: Un proceso clave en fisiología y patología. Ciencia al Día Internacional 2000; 3(3): 1-13
87. María del Carmen Arango Prado, Leticia Lanes Fernández. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. Revista Cubana de Oncología 1997; 13(2):126-134
88. Luvia Enid Sánchez-Torres, F. Diosdado Vargas. Apoptosis: El Fenómeno y su determinación. Téc Pecú Méx 2003; 41(1):49-62