



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



**ESTUDIO DE ESTABILIDAD BIOLÓGICA *IN VIVO* EN
RATONES ATÍMICOS DE LA CEPA NUNU DE UN PRODUCTO
ANTINEOPLÁSICO CONFORMADO POR IL-2 EN UN SISTEMA NANOACARREADOR**

AREA: ONCOLOGÍA

Director: M. en C. Rosalva Rangel Corona

Asesor: Dra. María Teresa Corona Ortega

**L-4 Laboratorio de Oncología Celular. Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Experimentación Zaragoza.**

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

P R E S E N T A :

JULIO ALFONSO ACOSTA GUTIÉRREZ



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.

DEDICATORIA

A mí mamá por todo el apoyo que he recibido a lo largo de mi trayectoria escolar, por brindarme toda su confianza y por todo el legado que has dejado en mí, gracias por mamá te amo.

A mí papá que también apoyó mis sueños, por formarme como un hombre responsable y que me diste la libertad de elegir mi camino, gracias papá te amo.

A mí hermana que adoro y que siempre me arrancado una sonrisa en cualquier momento, gracias güera.

A la M. en C. Rosalva Rangel Corona y Dra. María Teresa Corona Ortega por su confianza y apoyo para realizar este trabajo y formar parte de su grupo de trabajo, gracias, tengo la seguridad de que seguirán cosechando grandes éxitos.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIE-Z) FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y la asesoría de la Dra. María Teresa Corona Ortega. Financiado por los proyectos ICyT PIUTE 10-100 y DGAPA-PAPIIT IN228111

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	8
Cáncer Cérvico Uterino.....	8
Virus del Papiloma Humano.....	8
Sistema Inmunológico.....	11
Interleucina 2 (IL-2).....	13
Liposomas.....	17
Estudios de Estabilidad.....	20
Pruebas Preclínicas	26
Características del ratón de Laboratorio	29
Ratón nu/nu.....	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVO PARTICULAR	37
HIPÓTESIS	37
MATERIAL Y MÉTODO	38
RESULTADOS	43
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57
CONCLUSIONES	63
APENDICE	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMEN

En los últimos años se ha evidenciado mediante pruebas preclínicas, que la inmunoterapia ha resultado exitosa en el tratamiento del cáncer cérvico uterino, ovárico, gástrico, renal entre otros. Dentro de este contexto la interleucina 2 (IL-2) ha mostrado ser eficaz contra células cancerosas. Sin embargo, la administración de IL-2 en forma libre provoca severos efectos secundarios como daño hepático, hipotensión y fallo renal, por lo que su uso en forma libre se ve limitado.

El grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología celular ha demostrado que los ensayos *in vitro* con IL-2 redujeron el crecimiento tumoral de células de CaCu. La administración intraperitoneal, por cinco días consecutivos, de 100 UI/mL de esta citocina también demostró reducir las masas tumorales de CaCu inducidas en ratones de la cepa CBA hasta en un 85%. Sin embargo, el ensayo *in vitro* mostró graves efectos secundarios atribuibles a IL-2. Por esta razón, se fabricó un sistema nanoacarreador lipídico para transportar la citocina hasta el crecimiento tumoral y reducir los efectos adversos, además el acarreador posee una alta afinidad por células epiteliales, como es el caso del carcinoma de cérvix. Dado que los acarreadores lipídicos han mostrado ser eficientes transportadores de IL-2, es importante conocer la estabilidad de éstos, por lo que se sometieron a condiciones exageradas de almacenamiento (25°C y 65% de humedad relativa), que constituye el estudio de estabilidad acelerado. Para probar esta eficacia se diseñó un modelo biológico *in vivo* de inducción tumoral utilizando la cepa de ratones hembra nu/nu, administrando el tratamiento (IL-2 encapsulada en liposomas) proveniente del estudio de estabilidad.

Finalmente, podemos decir que el acondicionamiento del sistema nanoacarreador en frascos viales de 2 mL le confirió protección frente al ambiente oxidante propio del oxígeno, manteniendo la eficiencia biológica de IL-2.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud el cáncer cérvico uterino (CaCu), es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres de todo el mundo. Cada año aproximadamente 493,000 nuevos casos son diagnosticados y 27,400 mueren a causa de esta patología. El factor de riesgo más importante se asocia a la presencia de un oncogén, producido por el virus de papiloma humano (VPH). Por lo cual, esta patología se convierte en un problema de salud pública de índole mundial.

En México muere una mujer cada 2 horas a causa del cáncer cérvico uterino. Este evento se presenta con más frecuencia en mujeres con bajos recursos, que habitan en una zona rural indígena y que cuentan con poco o ningún acceso a los servicios de salud. En América Latina y el Caribe mueren 33 000 mujeres al año por este cáncer.¹

En 1925, Buschke y Lowenstein describieron un tumor peculiar del área genital, de tipo verrugoso, histológicamente bien definido y con características macro y microscópicas de un condiloma acuminado gigante. Esta lesión finalmente se transformaba en tumor maligno.

Desde hace más de 20 años se ha señalado que el carcinoma cervicouterino, por su presentación en pacientes con características epidemiológicas especiales, se comporta como una enfermedad de transmisión sexual.

Es en 1976 cuando zur Hausen planteó su hipótesis en la cual propone al virus del papiloma humano como el agente sexualmente transmitido, responsable de la transformación neoplásica en el cuello uterino. Esta hipótesis ha sido validada, tanto por estudios epidemiológicos como por la evidencia molecular de que el ADN del virus del papiloma está integrado en las células neoplásicas en más del 90% de los carcinomas cervicales, con lo que se puede asegurar que es el agente causal en el desarrollo del cáncer genital.

En 1985, Kreider y cols. Demostraron la capacidad transformadora del virus del subtipo 11, al lograr reproducir los cambios condilomatosos presentes en un fragmento de cérvix normal sembrados debajo de la cápsula renal de un ratón atómico, junto con un fragmento de tejido con lesión condilomatosa producidas por este subtipo. Estos hallazgos demostraron una asociación significativa y causal de ciertos subtipos del virus del papiloma humano y el cáncer cervical.²

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

La biotecnología abre la posibilidad de suministrar dosis de medicamentos más bajas al paciente para conseguir los mismos efectos, al mejorarse la termoestabilidad, el tiempo de vida y la protección de estos medicamentos frente a los tradicionales. La formulación de fármacos en forma nanoestructurada aumenta su solubilidad y eficacia, por lo que ya existen en el mercado más de cien fármacos de este tipo y muchos otros están en desarrollo. Además, este tipo de formulación permite utilizar rutas de administración más efectivas (oral, transcutánea y pulmonar) y alcanzar localizaciones en el cuerpo que tradicionalmente han sido difíciles, tales como el cerebro.

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

En el presente trabajo se utilizó como fármaco a Interleucina 2 (IL-2) debido a que ha demostrado tener una fuerte actividad inmunorreguladora y antitumoral; sin embargo, debido a que sus efectos adversos pueden resultar muy graves, proponemos el uso de un sistema nanoacarreador que consiste en nanoliposomas de 50 nm de diámetro promedio que encapsulan y exponen IL-2 como una alternativa segura y eficaz para el tratamiento del cáncer cérvico uterino. Por lo que en este estudio de estabilidad se evaluó durante un periodo de 4 meses, en condiciones aceleradas a IL-2 encapsulada, para comprobar si ésta es capaz de reducir e inhibir el crecimiento de tumores de carcinoma de cérvix inducidos en ratones hembras atímicos de la cepa nu/nu.

MARCO TEÓRICO

Cáncer

Crecimiento tisular que es producido por la proliferación continúa de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, por lo que se manifiesta como un conjunto de enfermedades, que se clasifican en función del tejido y célula de origen. Existen tres subtipos: *Los sarcomas* que 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 así como tejidos glandulares como de la mama y próstata. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas y los que tienen estructura glandular se denominan adenocarcinomas. Por último, se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas.

Por lo general los cánceres forman tumores, de los cuales podemos diferenciarlos en dos, los de tipo benigno que se caracterizan por poseer un crecimiento localizado, suelen estar separados de los tejidos vecinos por una cápsula, tienen un crecimiento lento y una estructura similar al tejido del que proceden además de no poner en peligro la salud. Mientras que los de tipo maligno tienen la capacidad de diseminarse fuera de su lugar de origen, invadiendo tejidos vecinos por extensión o infiltración, produciendo crecimientos secundarios conocido como metástasis.⁴

Virus del papiloma humano (VPH)

En México, el 90% de los carcinomas cervicales presenta algún tipo viral. El VPH 16 se encuentra en el 50% de los casos; el VPH 18 en el 15%, mientras que el VPH 31, 33, y 35 representan el 12 %.

Para que este virus pueda iniciar el proceso infeccioso, necesita entrar en contacto con las células basales de los epitelios (Figura 1). Una vez que han infectado las células blancas se inicia la replicación viral en las células espinosas. El ensamble de los viriones se lleva cabo en estratos superiores de los epitelios cuando las células se han diferenciado (células granulares), ya que es necesario este evento para la maduración y diferenciación de la célula. Por último, en las células escamosas, los viriones son expulsados y pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.⁵

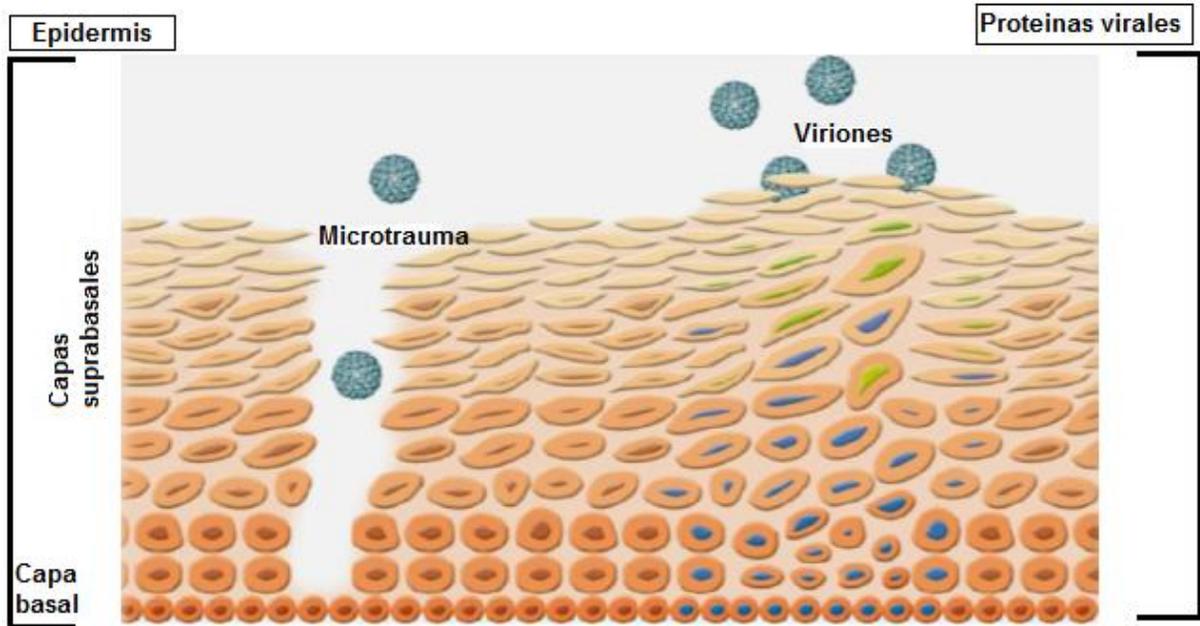


Figura 1. Proceso infeccioso del virus del papiloma humano (VPH), el cual infecta a las células epiteliales basales donde se encuentran células madre y otras células de larga vida. Los microtraumatismos producidos a las células de la epidermis supra basal, le permiten al virus infectar a las células de la capa basal. La replicación viral se lleva a cabo en capas supra basales y está vinculado al proceso de diferenciación epidérmica, causando anomalías morfológicas en el epitelio como papilomatosis, paraqueratosis y coilocitosis⁶

Además de la invasión local, el carcinoma cervical puede diseminarse por vía de los ganglios linfáticos o del torrente sanguíneo. La diseminación tumoral está en función de la extensión e invasión de la lesión local.

Se ha descrito que el proceso puede ser lento, ya que 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 los pacientes, las lesiones pueden progresar de *in situ* a invasoras en períodos inferiores a un año.^{7,8}

Por otra parte, es importante mencionar a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia que se reunió en Diciembre de 1988 para adoptar una nomenclatura para clasificar las diferentes etapas del cáncer de cérvix (Véase tabla 1).

ETAPA	Descripción
I	Es el carcinoma limitado al cérvix; no se debe tener en cuenta la extensión al cuerpo uterino
IA: Carcinoma invasivo diagnosticado por microscopio	IA1: Invasión medida del estroma > de 3 mm de profundidad y < 7 de mm de diámetro. IA2: Invasión medida del estroma > de 3 mm pero < 5 mm de profundidad y no > 7 mm de diámetro.
IB: Lesiones clínicas limitadas al cuello uterino o lesiones preclínicas de mayor extensión que la etapa IA	IB1: Lesiones clínicas < a 4 cm. IB2: Lesiones clínicas > a 4 cm.
II	Implica que el carcinoma se extiende más allá del cérvix, pero no se ha extendido a la pared pélvica. El carcinoma afecta a la vagina
II A	No hay complicación obvia del parametrio, hasta dos tercios de la parte superior de la vagina se encuentran afectados.
II B	Complicación obvia del parametrio, sin llegar a la pared pélvica.
III	El carcinoma se ha extendido a la pared pélvica. No hay espacio libre entre el tumor y la pared pélvica
III A	Sin extensión a la pared pélvica, pero si al tercio inferior de la vagina.
III B	Extensión a la pared pélvica, hidronefrosis o insuficiencia renal.
IV	Implica que el carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis o ha afectado la mucosa rectal o vaginal
IV A	Propagación del tumor a órganos adyacentes a la pelvis.
IV B	Propagación a órganos distantes

Tabla 1. Clasificación de las etapas del cáncer de cérvix de acuerdo con la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). En esta nomenclatura se acordó adoptar una nueva nomenclatura.⁹

Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico tiene la capacidad de distinguir lo propio (como componentes inherentes al organismo) de lo extraño (invasores como bacterias, virus o parásitos) haciendo uso de diferentes mecanismos de defensa y reconocimiento celular. La necesidad de estos mecanismos inmunológicos conduce a la reacción de tipo celular y humoral. La reacción inmunológica humoral requiere de la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, mientras que en la tipo celular participan diferentes subpoblaciones de linfocitos T, que reconocen y destruyen células con antígenos de superficie extraños.

Linfocitos B

Estas células se vuelven inmunocompetentes en la médula ósea y en el proceso cada célula elabora de 50,000 a 100,000 moléculas de inmunoglobulinas. Una vez que el antígeno se une al anticuerpo que se encuentra en la superficie del linfocito B, éste se activa, entra en mitosis y genera dos tipos celulares: células plasmáticas productoras de anticuerpo y células B de memoria. Estos anticuerpos se liberan hacia la sangre y la linfa, por ello la reacción se conoce como respuesta inmunológica humoral. En la reacción inicial (reacción inmunológica humoral primaria) se crean anticuerpos de clase M, pero en contacto posterior con el antígeno se forman anticuerpos de clases G, A o E (respuesta inmunológica secundaria).

Linfocitos T

Estos maduran y salen del timo expresando los fenotipos característicos: $CD4^+/CD8^-$, $CD4^-/CD8^+$, y $CD4^-/CD8^-$. Así pues los linfocitos se clasifican como cooperadores (Th), citotóxicos (Tc) y células asesinas naturales (NK). Por otro lado, virtualmente todas las células que expresan un receptor de célula Tc (Tcr) expresan un fenotipo $CD4^-/CD8^+$, es decir son cooperadores o citotóxicas, mientras que las $CD4^-/CD8^-$, las NK no presentan receptor.

Los linfocitos T llevan a cabo el reconocimiento de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y de antígenos extraños presentes en las células, bacterias o virus. Existen dos clases de MHC: Clases I y II. Las Primeras se expresa en todas las células nucleadas del organismo, mientras que las segundas son características de las células presentadoras de antígenos.

Las células Th se clasifican en Th₁ y Th₂ y sólo se diferencian por el patrón de sustancias que secretan (citocinas), así las Th₁ secretan interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ) reguladoras de la reacción inmune celular, en tanto que las Th₂ liberan interleucina 4 y 6 que funcionan como reguladoras de la reacción inmune humoral. Las células asesinas pueden reconocer la región Fc de los anticuerpos y eliminan de manera preferente a las células cubiertas con éstos; a este proceso se le conoce como citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.

Sistema de células dendríticas presentadoras de antígenos

Se caracterizan por tener aspecto dendrítico, expresar en la membrana plasmática grandes cantidades de MHC y ser pobremente fagocíticas. Las diferentes células se muestran en el cuadro 1.

Células	Localización
De langerhans	Epidermis y otros epitelios
Veladas	Linfa en vasos linfáticos aferentes
Interdigitantes	Timo y zona dependiente de T de ganglio linfático
Dendríticas	Zona dependiente de T del bazo
Dendríticas tisulares	Intersticio de corazón, pulmón, riñón, hígado y otros

Cuadro 1. Localización de las diferentes células dendríticas presentadoras de antígeno

Sistema monocitomacrófago

Los monocitos representan entre el 3% y el 8% del total de leucocitos circulantes en sangre. No realizan ninguna función esencial en la sangre: Son una reserva móvil para la formación de macrófagos. Estos permanecen en la sangre periférica durante 24 a 48 horas y se desplazan más tarde a través de las vénulas poscapilares hasta alcanzar el tejido conectivo, donde se transforman en macrófagos tisulares. Comparados con los monocitos tienen un tamaño de cinco a diez veces mayor y su capacidad fagocítica es aproximadamente 18 veces mayor

La IgG y las proteínas del complemento se unen a la superficie de las bacterias (opsonización) y los macrófagos pueden fagocitarlas por el proceso llamado fagocitosis mediada por receptor.

Por otro lado, los macrófagos sintetizan interleucina 1 y factor de necrosis tumoral alfa, que ejercen una amplia gama de efectos sobre el sistema inmunológico.¹⁰

Interleucina 2 (IL- 2)

Descripción y propiedades.

Representa al miembro más estudiado de la familia de las interleucinas. Es producida exclusivamente por los linfocitos T (específicamente las células T-helper) activándose en respuesta a un antígeno y mitógenos.

La IL-2 Humana es una cadena polipeptídica que contiene 133 aminoácidos. Es una glicoproteína, en donde el enlace O-glicosídico, esta enlazado a un residuo de treonina en la posición número tres. Los análisis de difracción de rayos X muestran que es una proteína de estructura globular que consiste de 4 α -hélices estrechas interrumpidas por curvas y bucles. Aparece desprovista de cualquier conformación β y contiene un solo puente disulfuro que estabiliza a la cisteína en la posición 58 y 105 (Figura 2).

La IL-2 también sirve como un factor de crecimiento para la activación de los linfocitos B, además mejora la producción y secreción de anticuerpos. De esta manera potencia eficazmente la respuesta inmune humoral.

Otra actividad importante que desempeña esta citocina es la de promover el crecimiento de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés), promoviendo su diferenciación formando los linfocitos asesinos activados (LAK por sus siglas en inglés), los cuales exhiben una mayor habilidad para eliminar células tumorales o células infectadas por virus.

Los experimentos realizados a principios de 1980 demostraron que los linfocitos incubados *in vitro* con IL-2, podrían matar a una amplia gama de líneas celulares tumorales, incluyendo el melanoma y células tumorales de colon. Los estudios clínicos se han enfocado en que esto es efectivo en los humanos, ya que se han tomado células LAK de la propia sangre de los pacientes y activada *in vitro* usando IL-2 reintrociéndola en los pacientes, lo que promovió la regresión tumoral en el 10% de los pacientes que padecían melanoma o cáncer renal.¹¹

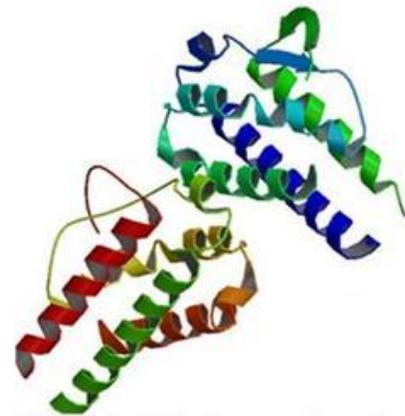


Figura 2. Estructura globular de Interleucina 2.¹²

Receptor de IL-2

El receptor está conformado por un complejo de 3 cadenas polipeptídicas (α , β , γ) que atraviesan la membrana (Figuras 2a y 2b). La IL-2 se une con baja afinidad a la cadena α , con un enlace que se caracteriza por rangos de asociaciones – disociaciones. La cadena γ no interactúa directamente con la IL-2, mientras que la cadena β es fosforilada en un residuo específico de tirosina, una vez que la IL-2 se une a dicha cadena.

Por otra parte los heterodímeros $\alpha\gamma$ o $\beta\gamma$ se unen con una afinidad intermedia y solo el complejo heterotrimérico $\alpha\beta\gamma$ tiene una alta afinidad por la IL-2.¹¹

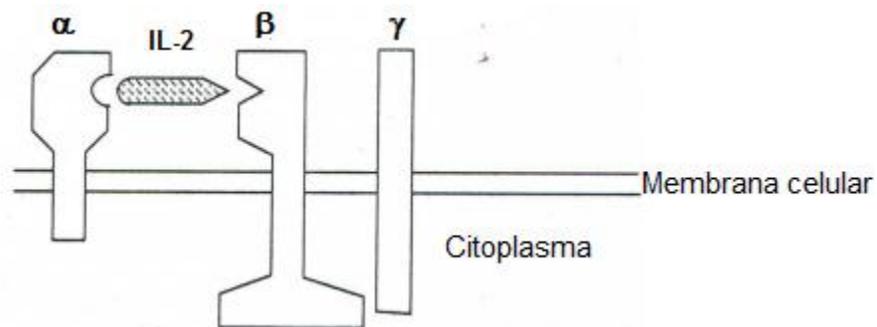


Figura 3. Diagrama del receptor de IL-2 que está formado por 3 subunidades α , β , γ .¹¹

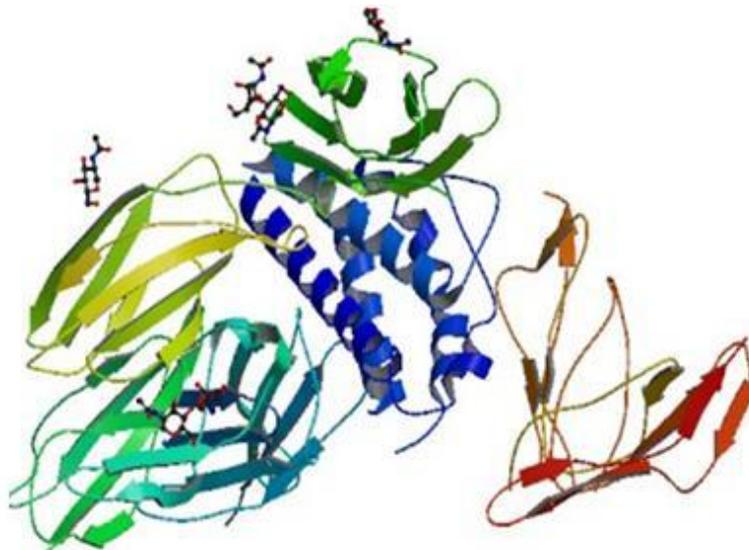


Figura 4. Estructura cuaternaria de IL-2 con sus receptores α , β , γ .¹²

Cabe mencionar que existen diferentes tipos de células, que expresan el receptor de IL-2. (Tabla 2).

Linfocitos T	Linfocitos B
Natural Killers	Células LAK
Monocitos	Macrófagos
Oligodendrocitos	

Tabla 2. Gama de células que expresan el receptor de superficie de IL-2. ¹¹

Características de las 3 subunidades que conforman al receptor de IL-2

Subunidad α (p55)

Originalmente la subunidad p55 se describió con un peso molecular de 33 kD pero, por modificaciones postraduccionales entre las que se encuentran N y O-glucosilaciones, su peso molecular pasa a ser de 55 kD. La región intracitoplasmática de esta subunidad tiene 13 aminoácidos destacando la presencia de serina y treonina. Esta secuencia puede ser sustituida por la correspondiente región del receptor de insulina sin afectar la capacidad del receptor de alta afinidad para transmitir señales mediadas por IL-2. Esto conlleva a demostrar que p55 no está implicado directamente en la transmisión de señales.

La presencia de niveles elevados de p55 soluble en suero puede ser utilizada como un indicador de una posible enfermedad o anomalía, ya que se ha comprobado que individuos con determinadas enfermedades autoinmunes y neoplasias presenten niveles anormales en la expresión del receptor de IL-2.

Subunidad β (p70)

Su región extracelular de esta proteína tiene 214 aminoácidos, de tamaño comparable con la subunidad p55 (219 aminoácidos). Ambas subunidades reconocen epítopes distintos de la molécula de IL-2. La transfección de esta subunidad en células que no responden a la IL-2 y expresan la subunidad p64 permite la recuperación de la capacidad de proliferación en respuesta a la IL-2.

La transfección de la subunidad p70 en células linfoides pero no en fibroblastos reconstituye el receptor de afinidad intermedia, demostrando la especificidad celular de la subunidad p64.

Subunidad γ (p64)

Tiene un peso molecular de 40 kD y tiene 347 aminoácidos. La región extracitoplasmática (254 aminoácidos) incluye 6 sitios posibles de glucosilación y la secuencia consenso que la incluye dentro de la familia de receptores para factores de crecimiento. La región intracitoplasmática tiene 86 aminoácidos y está implicada en la transmisión de señales junto con la subunidad p70. Esta subunidad participa en la formación del receptor de alta afinidad, así como en los procesos de internalización y es capaz junto con la subunidad p70 de unir IL-2

Distribución celular del receptor de IL-2

La mayoría de las células T, células B y monocitos en reposo no expresan la subunidad p55. Sin embargo cuando las células T se activan con anticuerpos anti CD3, con antígeno o lecitinas empiezan a expresar receptores para IL-2. La subunidad p55 del receptor de IL-2 también se expresa en células B activadas, leucemias de células B, linfomas, monocitos y macrófagos. En lo que se refiere a la subunidad p70 se ha comprobado que se expresa en células B y en monocitos activados, así como en determinadas líneas celulares que no expresan la subunidad p55.¹³

Propiedades fisicoquímicas de IL-2

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

Acción farmacológica.

- Factor de crecimiento de células T citotóxicas.
- Activación de linfocitos y células NK (natural killers).
- Potencia la liberación de interferón gama, IL-1 y granulocitos (factores de necrosis tumoral).
- Promueve secreción de inmunoglobulinas.
- Aumenta la actividad antitumoral de macrófagos.

Toxicidad

- Dosis mayores a 100,000 Unidades/Kg cada 8 horas están asociados a efectos adversos.
- Hipotensión, edema periférico y fallo renal, ataque al sistema nervioso central, retención de líquidos y debilidad capilar entre otros.
- Las dosis mayores a 600,000 Unidades/Kg cada 8 horas, requiere la administración de agonistas β -adrenérgicos.
- Provocan daño hepático, fallo renal (insuficiencia renal) y cuando no se tratan estos efectos adversos pueden provocar una congestión pulmonar e incluso la insuficiencia cardíaca congestiva.¹⁴

Liposomas

Los liposomas son vesículas concéntricas compuestas por una o varias bicapas de lípidos anfipáticos, los cuales delimitan uno o varios compartimentos acuosos, también son definidos como, estructuras esféricas cerradas, formadas por uno o varios lípidos concéntricos que contienen una fase acuosa (Figura 3).

Los liposomas pueden clasificarse de acuerdo al número de vesículas que presenten, de esta manera se tienen:

1. Vesículas multilaminares: Su tamaño va de 500 a 5000 nm y está constituido por varias bicapas concéntricas.
2. Vesículas largas unilaminares: Tienen un tamaño de 200 a 800 nm.
3. Vesículas pequeñas unilaminares: Tienen un tamaño de 100 nm. Conformada por una sola bicapa.

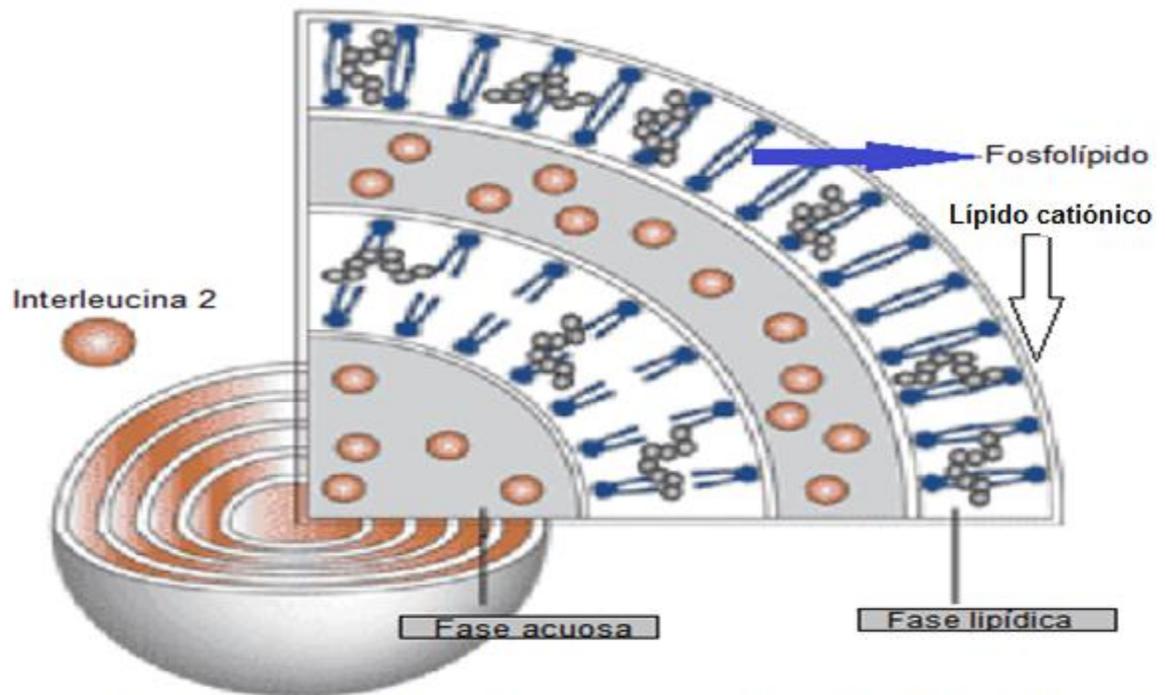


Figura 5. Estructura interna de un liposoma, el cual se encuentra formado por lípidos anfipáticos los cuales delimitan compartimentos acuosos, mostrando la internalización de IL-2.¹⁶ "Modificado por Julio Alfonso Acosta Gutiérrez".

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

- Son biocompatibles.
- Pueden contener fármacos hidrofílicos o fármacos hidrofóbicos.
- Protegen al fármaco de inactivación en condiciones extremas.
- Evitan reacciones no deseadas.
- Proveen la única posibilidad de liberar el fármaco dentro de la célula/ componentes internos (Figura 4).

El tamaño, la carga y las propiedades de su superficie pueden ser fácilmente cambiadas por la adición de una nueva mezcla de sustancias antes de su fabricación y/o variando los métodos de fabricación.

Los liposomas son el vehículo que mejor se ha estudiado para la liberación de fármacos en el tratamiento del cáncer, poseen la capacidad de aumentar la concentración de fármaco en tumores sólidos. Así como también exhiben una farmacocinética favorable comparada con el fármaco en forma libre.¹⁵

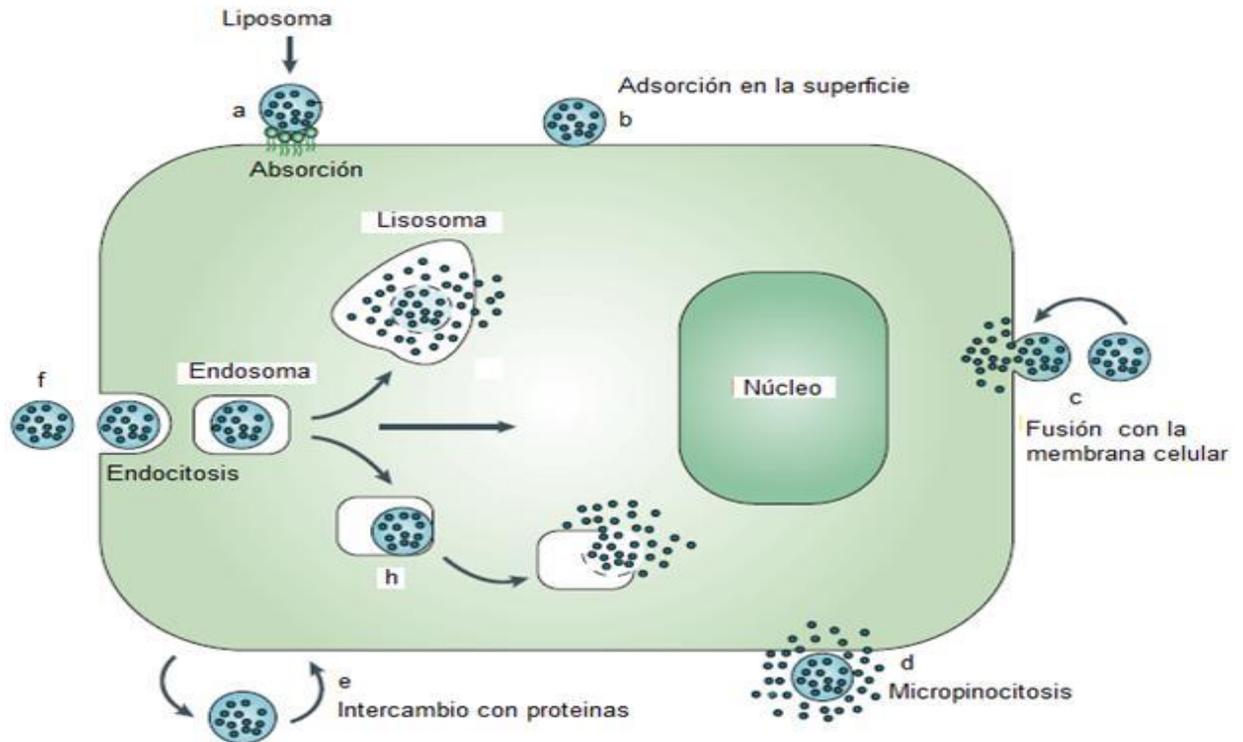


Figura 6. Se muestra la liberación del fármaco contenido en el liposoma para depositarlo en la célula blanco. (a) Pudiendo ser específico como la absorción o (b) no específico, adsorción en la superficie celular. (c) El liposoma puede fusionarse con la membrana celular y liberar su contenido en el citoplasma o puede ser desestabilizado por componentes de la membrana celular, cuando es adsorbido en la superficie (d) la liberación es vía micropinocitosis. (e) El liposoma puede ser sujeto de una endocitosis no específica. (f) Si es el caso, el liposoma puede ser entregado por esta ruta en el lisosoma liberando el contenido en el citoplasma.¹⁷

Una característica importante de los liposomas es su capacidad para acumularse en los tumores, debido a que aumentan su permeabilidad y efecto de retención. Esto se debe principalmente a la vascularización entre un tumor y un órgano/tejido sano, ya que los vasos sanguíneos de los tumores se encuentran más fenestrados.

Los liposomas que poseen un diámetro de entre 400-600 nm son capaces de difundir fuera de los vasos sanguíneos y acumularse en los tejidos tumorales, pero no en los tejidos sanos.¹⁸

Liposomas catiónicos

Estos son capaces de retener los fármacos en la zona vascular del tumor y facilitar de esta forma la interacción de los liposomas con receptores subcelulares. Una característica común que existe entre todas las preparaciones de liposomas catiónicos utilizados en la administración del fármaco, es que deben ser optimizados para liberarlo en el endotelio del tumor.¹⁹

Estudios de estabilidad

Para desarrollar un estudio de estabilidad a un fármaco o medicamento, es necesario cumplir con la regulación sanitaria que marca cada País. En nuestro caso la Secretaria de Salud por medio de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios es quien dictamina los requisitos de los estudios de estabilidad que deben efectuarse a los fármacos y/o medicamentos.

De acuerdo a la **NOM-073-SSA1-2005. Estabilidad de fármacos y medicamentos** *El objetivo de los estudios de estabilidad* es proporcionar evidencia documentada de cómo la calidad de un fármaco o medicamento varía con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales. Los estudios de estabilidad permiten establecer las condiciones de almacenamiento, periodos de re-análisis y periodo de caducidad.

Debido a que en el presente proyecto se evaluará la estabilidad biológica de un producto antineoplásico constituido por Interleucina 2 encapsulada en liposomas, es necesario retomar algunas definiciones. Ya que el estudio está diseñado para llevar a cabo una estabilidad acelerada del sistema nanoacarreador.

Definiciones.

Calidad de un fármaco o de un medicamento. Cumplimiento de las especificaciones establecidas que garantizan la identidad, pureza, potencia y cualquier otra propiedad química, física o biológica que asegure su aptitud de uso.

Condiciones de almacenamiento. Las que se indican en la etiqueta del medicamento.

Envase primario. Elementos del sistema contenedor-cierre que están en contacto con el fármaco o el medicamento.

Envase secundario. Elementos que forman parte del empaque en el cual se comercializa el fármaco o medicamento y no estén en contacto directo con él.

Especificación de estabilidad. Requerimientos físicos, químicos, biológicos o microbiológicos que un fármaco o medicamento debe cumplir a lo largo de su vida útil.

Estabilidad. Es la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil.

Estudio de estabilidad. Los estudios de estabilidad comprenden aquellas pruebas que se le realizan a un fármaco o un medicamento por un tiempo determinado, bajo la influencia de temperatura, humedad o luz en el envase que lo contiene.

Estudios de estabilidad acelerada. Estudios diseñados bajo condiciones exageradas de almacenamiento para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco o medicamento.

Fármaco. Toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.

Fármaco conocido. Al fármaco que ha sido utilizado previamente en el país.
Fecha de caducidad. Fecha que indica el fin del periodo de vida útil de un medicamento.

Forma farmacéutica. Es la mezcla de uno o más fármacos con o sin aditivos, que permita su administración.

Lote. A la cantidad de un fármaco o medicamento que se produce en un ciclo de fabricación y cuya característica esencial es su homogeneidad.

Lote piloto. Lote elaborado por un procedimiento representativo que simule al de producción.

Medicamento. Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y que se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas.

Método analítico indicativo de estabilidad. Método analítico cuantitativo para un fármaco o medicamento capaz de distinguir cada ingrediente activo de otras sustancias y de sus productos de degradación.

Protocolo de estabilidad. Diseño del estudio relativo a pruebas y criterios de aceptación, características del lote, manejo de las muestras, condiciones del estudio, métodos analíticos y materiales de envase.

Sistema contenedor-cierre. Al conjunto de materiales de empaque que contienen y protegen a la forma farmacéutica. Incluyen tanto el envase primario como el secundario, si este último cumple la función de proporcionar protección adicional al producto.

Validación. Evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso en específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

Vida útil. Es el intervalo de tiempo en el que un medicamento o fármaco permanece dentro de las especificaciones establecidas, bajo las condiciones de almacenamiento indicadas en la etiqueta, en el envase de comercialización.²⁰

Ya que el sistema nanoacarreador (IL-2 encapsulado en liposomas) pertenece a la categoría de los productos biotecnológicos, es necesario basarse en las recomendaciones de la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH)* en su apartado Q5C (*Pruebas de estabilidad para productos biotecnológicos/biológicos*)

Generalidades

Los análisis de la actividad biológica deben formar parte de los estudios de estabilidad de referencia. Los métodos fisicoquímicos, bioquímicos e inmunológicos para el análisis de la entidad molecular y la cuantificación de los productos de degradación deben formar parte de este estudio, siempre que la pureza y características moleculares del producto permitan el uso de estas metodologías.

Se debe de aplicar un estudio en las condiciones a las cuales se puedan afectar la potencia, pureza y calidad del producto, además debe estar basado en un estudio a largo plazo, en tiempo real y en condiciones reales de estabilidad.

Este tipo de estudios comprende aquellos productos como lo son: citocinas (interferones, interleucinas, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral), eritropoyetinas, activador del plasminógeno, hormona de crecimiento, insulina, anticuerpos monoclonales y vacunas que consistan en proteínas o polipéptidos bien caracterizados.

La selección de lotes para llevar a cabo el estudio, deberán ser aquellos que se manufacturen en una escala representativa al de producción, se sugiere utilizar al menos 3 lotes. Para fármacos que se almacenen por menos de 6 meses la cantidad mínima de estabilidad al inicio de este debe ser determinado con base a cada caso.

Los estudios deben llevarse a cabo en el mismo sistema contenedor cierre o representativo al propuesto para su almacenamiento y distribución, o en su defecto se deberá usar aquel envase utilizado en el proceso de manufactura. Se recomienda llevar a cabo la producción con diferentes lotes de diferentes proveedores. La calidad del sistema contenedor-cierre en los estudios clínicos y preclínicos debe ser representativa de los estudios de estudios de estabilidad.

Selección de la muestra.

Cuando un producto está distribuido en lotes que difieren en su llenado (e.g. 1 mL, 2 mL), en unidades (e.g. 10 unidades, 20 unidades), o en masa (e.g. 1 mg, 2 mg) las muestras deben de integrarse en un programa de estabilidad basado en un sistema factorial fraccionado o en diseño por categoría.

Perfil indicativo de estabilidad

No existe un ensayo o parámetro particular indicativo de estabilidad para realizar un perfil de estabilidad que caracterice un producto biotecnológico/biológico. Como consecuencia de esto el fabricante debe proponer un perfil indicativo de estabilidad que asegure que los cambios en la identidad, pureza y potencia de un producto puedan ser detectados.

Para que lo anterior pueda ser aplicado, se debe de contar con métodos validados que incluyan un perfil indicativo de estabilidad.

Aunque no se tiene una guía, en la que incluyan todas pruebas que deban aplicarse a dichos productos, que demuestren la estabilidad del mismo.

Protocolo

El protocolo debe de incluir toda la información necesaria que demuestre que la estabilidad de un producto biotecnológico/biológico no se modifica, a través de la proposición de una fecha de caducidad, especificación e intervalos de análisis.

Potencia

Cuando se intenta evaluar la estabilidad de un producto con actividad biológica definida y cuantificable, el análisis de la potencia debe ser parte fundamental del estudio. Bajo este contexto, se entiende como potencia, a la habilidad específica o la habilidad de un producto de lograr su efecto. La determinación de la potencia se debe de realizar a través de un método cuantitativo confiable.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la potencia, deberán ser reportados en unidades de actividad biológica estandarizadas, que sean reconocidas nacional o internacionalmente. Cuando no existan tales referencias, el resultado del análisis debe ser reportado en base a unidades internas de referencia.

Pureza y caracterización molecular

La pureza de un producto biotecnológico/biológico es difícil de determinar. Para ello se debe calcular por más de un método y el valor de está es dependiente del método.

El uso de metodologías analíticas fisicoquímicas, bioquímicas e inmunológicas debe proveer una caracterización del fármaco o producto final (e.g. Tamaño de la molécula, carga, hidrofobicidad) así como una detección exacta de cambios en la degradación que pueden resultar de una desaminación, oxidación, sulfoxidación, agregación o fragmentación durante el almacenamiento.

Cuando ocurran cambios significativos en la calidad o cantidad, en la formación de productos de degradación detectados durante un estudio a largo plazo, o en un estudio acelerado, debe considerarse el potencial peligro para la salud que esto representa. Por lo que se requiere caracterizar y cuantificar el producto de degradación, así como establecer límites de aceptación que sean justificados.

Para las sustancias que no pueden caracterizarse satisfactoriamente o productos para los cuales no se pueda determinar su pureza a través de métodos analíticos de rutina. Se deben proponer y justificar procedimientos alternos de análisis.

Condiciones de almacenamiento

Las condiciones de almacenamiento en un estudio de estabilidad a un tiempo-real/ temperatura-real deben estar limitadas a las propuestas a la temperatura de almacenamiento.

Humedad

Cuando pueda demostrarse que el sistema contenedor (y las condiciones de almacenamiento) asegura una suficiente protección en contra de una alta y baja humedad, el estudio de estabilidad a diferentes humedades relativas puede ser omitido.

Condiciones aceleradas y de estrés

Se sugiere llevar a cabo estudios de estabilidad acelerado para los fármacos y producto terminado. Este tipo de estudios pueden proveer un soporte para establecer la fecha de caducidad.

Los estudios bajo condiciones de estrés, pueden ser usados para determinar si una exposición accidental a otras condiciones distintas a las propuestas (e.g. durante la transportación) están deteriorando el producto y también para evaluar cuales parámetros específicos pueden ser mejores indicativos de estabilidad del producto. Los estudios de exposición de fármacos o producto terminado a condiciones extremas pueden ayudar a revelar patrones de degradación.

Sistema contenedor/cierre

Pueden ocurrir cambios en la calidad del producto por la interacción entre la formulación biotecnológica/biológica y el sistema contenedor/cierre.

Los estudios de estabilidad deben incluir muestras, colocadas en posición invertida u horizontal (e.g. En contacto con la tapa) así como en la posición con la tapa orientada hacia arriba, para determinar los efectos del contacto con la tapa en la calidad el producto.

Debe demostrarse que el sistema de cierre de un vial, con múltiples dosis es capaz de resistir la inserción repetida para retirar producto del contenedor, así como conservar toda su potencia, pureza, y calidad por un periodo máximo especificado en el instructivo para su uso en el contenedor.

Frecuencia de Análisis

El periodo de vida de anaquel de un producto biotecnológico/biológico puede variar de unos días hasta algunos años. Es difícil elaborar una guía que sea uniforme para el estudio de estabilidad y la frecuencia de análisis que aplique a todos los tipos de productos biotecnológico/biológico.

Cuando el periodo de vida de anaquel propuesto sea de un año o menos, el estudio de estabilidad en tiempo-real debe conducirse mensualmente los primeros 3 meses, y después en intervalos de 3 meses.

Especificaciones

Cada producto debe tener sus especificaciones dentro de límites establecidos para la seguridad, pureza, y potencia propuestos a través del periodo de vida de anaquel.

Etiquetado

Debe especificar con precisión la temperatura de almacenamiento recomendada. Así como aquellos productos que no deben ser congelados y las condiciones apropiadas de luz/humedad deberán aparecer en el contenedor de acuerdo a los requerimientos de etiquetado nacional/regional.

Debido a que el sistema nanoacarreador es un producto biotecnológico dirigido al tratamiento del CaCu, es necesario garantizar la eficacia biológica a través del tiempo mediante un estudio *in vivo* en ratones hembras atímicos, homocigotos de la cepa nu/nu, evaluando la inhibición del crecimiento tumoral.

De acuerdo con lo anterior, por ley, la seguridad y eficacia de los fármacos debe definirse antes de que éstos puedan comercializarse. Gran parte de los efectos biológicos de una molécula (en este caso el sistema IL-2 encapsulado en nanoacarreadores) deben de estudiarse en animales (pruebas preclínicas) antes de poder iniciar las pruebas en humanos.

Con la aprobación regulatoria, estas pruebas en humanos deben realizarse en tres fases (fase I, fase II y fase III) convencionales antes de que pueda considerarse la aprobación del fármaco para uso general. Además de una cuarta fase que trata sobre la vigilancia y seguridad al momento de comenzar a ser comercializada.²¹

Pruebas preclínicas de seguridad y toxicidad

El objetivo de estas pruebas consiste, en estimar el riesgo asociado con la exposición del fármaco candidato, considerarlo en el contexto de las necesidades terapéuticas y la duración de posible uso del fármaco. Las pruebas de seguridad involucradas son: la toxicidad aguda, toxicidad subaguda, toxicidad crónica, efecto sobre la reproducción, potencial carcinógeno, potencial mutagénico y toxicología de investigación. Además es conveniente efectuar diferentes estimaciones como: *la dosis sin efecto, dosis letal mínima, dosis mortal media (DM₅₀)*. Estas dosis se utilizan para calcular la dosis inicial de prueba en humanos que, por lo general, es de 1/100 a 1/10 de la dosis sin efecto en animales.

Pruebas clínicas: IND y NDA

Cuando se considera que un fármaco se encuentra listo para ser estudiado en humanos, se registra un aviso de exención para la investigación de un nuevo fármaco (*IND, Investigational New Drug*) ante la FDA. Este documento incluye: 1) Información sobre la composición y origen del fármaco, 2) Información química y sobre su elaboración, 3) Todos los datos obtenidos en animales, 4) Planes y protocolos clínicos, 5) Nombres y acreditación de los médicos que realizarán las pruebas clínicas y 6) Una compilación de los datos clave relevantes al estudio del fármaco en humanos disponible para los investigadores y sus consejos de revisión institucionales.

En la Fase I se determinan los efectos del fármaco en función de la dosis, a un número pequeño (25 a 50) de voluntarios sanos. Estas pruebas se efectúan para determinar si los humanos y los animales muestran respuestas significativamente distintas al fármaco y para establecer los límites probables de valores de dosis clínicas seguras. Muchas toxicidades predecibles se detectan en esta fase, así como también las determinaciones farmacocinéticas.

En la Fase II el fármaco se estudia por primera vez en pacientes con la enfermedad por tratar, para determinar su seguridad y eficacia. Se analiza un número pequeño de pacientes (de 100 a 200), y con frecuencia se utiliza un diseño ciego simple, con un placebo inerte y un fármaco activo conocido (control positivo).

Después en la Fase III el fármaco se evalúa a un número mayor de pacientes con la enfermedad blanco, a veces millares. En esta fase se diseñan pruebas para minimizar los errores ocasionados por el efecto de placebo, usando técnicas con diseño doble ciego y cruzado. Los estudios de esta fase suelen ser muy costosos debido al gran número de pacientes y la cantidad de datos que debe recopilarse y analizarse.

Cuando los resultados en la fase 3 son positivos, se solicita autorización para introducir la nueva sustancia en el mercado. El proceso para obtener la aprobación para venta requiere la presentación de una solicitud Aplicación de un nuevo fármaco (*NDA, New Drug Application*). El número de sujetos estudiados en apoyo a la NDA en promedio es de 5000 pacientes para fármacos nuevos de estructura novedosa. Las aprobaciones prioritarias están diseñadas para productos que representen mejoras significativas comparadas con los productos comercializados; en 2004 el tiempo promedio de aprobación era de seis meses.

Cuando se obtiene la aprobación para su venta se inicia la Fase IV, que se refiere a una vigilancia continua de la seguridad del nuevo fármaco en las condiciones reales de uso en un gran número de pacientes.

La importancia de informes de toxicidad cuidadosos y completos, por médicos antes de comenzar la comercialización del fármaco, puede apreciarse al observar que muchos efectos importantes inducidos por fármacos tienen incidencia de 1:10 000 o menos y que algunos efectos secundarios pueden ser más evidentes después de administrarlo en forma crónica.

Reacciones adversas a los fármacos

Es una respuesta dañina y no deseada. Las reacciones adversas a los fármacos son la cuarta causa de muerte, excediendo las enfermedades pulmonares, SIDA, accidentes y muertes por accidente de autos.

Durante los estudios IND y de fase clínica 1 a 3 y antes de la aprobación de la FDA, todos los eventos adversos (serios, que amenazan la vida, son discapacitantes, razonablemente relacionados al fármaco o inesperados) se deben informar.

Factores de confusión en pruebas clínicas.

A. Presencia de otras enfermedades y factores de riesgo

Las enfermedades conocidas o desconocidas pueden influir en los resultados de un estudio clínico. Los intentos por evitar este riesgo se basan por lo general en la técnica del diseño cruzado (siempre que es posible) y aplicar métodos aleatorios estadísticos para distribuir a los pacientes en los diversos grupos del estudio.

B. Sesgo del paciente y del observador

La manifestación de este fenómeno en el sujeto es la respuesta al placebo, y puede reproducir cambios objetivos de tipo fisiológico y bioquímico. La respuesta al placebo suele cuantificarse al administrar un material inerte, que tenga la misma apariencia física, olor, consistencia, que la dosis de la forma activa. También se produce un efecto adverso y “toxicidad” de placebo, pero sus efectos suelen ser subjetivos.

Los efectos del sesgo del sujeto pueden cuantificarse y restarse de la respuesta que se mide durante el tratamiento por medio de un diseño ciego simple. Se utiliza un placebo o medicina falsa, el cual se administra a los mismos sujetos en un diseño cruzado, de ser posible, o a un grupo separado de sujetos control. Los sesgos del medicamento pueden considerarse ocultando la identidad del medicamento que se usa, placebo o forma activa, tanto a los sujetos como al personal que evalúa la respuesta (diseño doble ciego).^{22, 23, 24}

Características del ratón de laboratorio (Nombre científico: *Mus musculus*)

El ratón de laboratorio es un roedor cuyo ancestro es el ratón común o ratón casero y su taxonomía es la siguiente.

Clase: Mamifera
Orden: Rodentia
Suborden: Miomorfa
Familia: Murinae
Género: *Mus*
Especie: *musculus*

Todas las cepas de ratones de laboratorio se han desarrollado a través de cruzamientos selectivos. Un atributo para elegir al ratón para la investigación, es su corto ciclo de vida (1-3 años), lo que permite el estudio de muchas generaciones en un lapso de pocos años (Tabla 3).

Por otra parte el peso de un ratón en el nacimiento va desde de los 0.5 gramos hasta los 1.5 gramos, alcanzando un peso en la etapa adulta de 40 gramos dependiendo del genero (Tabla 4).

Dato		Referencia
Ciclo de vida	1 – 3 años	Andress et al; 1992
	1 – 5 años	Harkness et al; 1989
		Jacoby et al; 1984
	2 – 3 años	Holmes, 1987
Número de cromosomas	40	Andress et al; 1992
		Harkness et al; 1989
		Jacoby et al; 1984
		Romero et al; 1983
Abertura de los ojos	12 – 13 días	Jacoby et al; 1984
Consumo de alimento	4 – 5 g/día	Andress et al; 1992
	15 g / 100g / día	Harkness et al; 1989
	5.0 g / 8 semanas de edad	Jacoby et al; 1984
Consumo de agua	5 – 8 mL / día	Andress et al; 1992
	15 mL / 100 g / día	Harkness et al; 1989
	6.7 mL / 8 semanas de edad	Jacoby et al; 1984
Tiempo de tránsito		
Gastrointestinal	8 – 14 horas	Harkness et al; 1989
Edad del destete	16 – 21 días	Andress et al; 1992
	21 – 28 días	Harkness et al; 1989
	19 – 28 días	Holmes, 1987
	21 días	Jacoby et al; 1984

Tabla 3. Datos generales del ratón *Mus musculus* en donde se muestran características como el consumo de agua, consumo de alimento, edad de destete entre otros.²⁵

Etapa	Peso en gramos	Referencia
Nacimiento	1.5	Andress et al; 1992
	0.75 – 2	Harkness et al; 1989
		Lane, 1976
	0.5 – 1	Romero et al; 1983
Destete	10 – 12	Holmes, 1987
	11 – 12	Lane, 1976
	9 – 11	Romero et al; 1983
Adulto	18 – 35	Dyban et al; 1991
Machos	20 – 40	Andress et al; 1992
		Harkness et al; 1989
		Jacoby et al; 1984
		Romero et al; 1983
Hembras	18 – 40	Andress et al; 1992
	25 – 40	Harkness et al; 1989
		Romero et al; 1983
	18 – 35	Jacoby et al; 1984

Tabla 4. Peso promedio en diferentes etapas de desarrollo del ratón *Mus musculus*, en donde se describe el peso en gramos de acuerdo con diferentes datos recabados por algunos autores.²⁵

Variedades disponibles

Los ratones que se utilizan en la investigación biomédica pueden clasificarse en dos grandes categorías en función de sus características:

1. Microbiológicas (incluyen otras especies de animales)

- a) *Axénicas*: Libres de gérmenes y de cualquier organismo detectable.
- b) *Gnotobióticos*: Animales con flora conocida y controlada.
- c) *SPF*: Libres de patógenos específicos.
- d) *Convencionales*: Todos los que no encuadran en los grupos anteriores.

2. Genéticas

- a) *Animales de reproducción abierta*: Los apareamientos ocurren al azar entre machos y hembras de camadas diferentes.
- b) *Animales de reproducción cerrada o animales consanguíneos*: Son el resultado del apareamiento entre hermanos o de padres con su descendencia. Para establecer una cepa consanguínea son necesarios 20 o más generaciones de apareamientos entre hermanos o padres con su descendencia.
- c) *Híbridos*: Son la progenie del apareamiento entre dos cepas consanguíneas.

Alojamiento

Los ratones requieren de un material de cama que absorba la orina, la humedad de la jaula y que les permita hacer sus nidos. Es importante considerar el tipo de cama en estudios teratológicos, ya que ciertos materiales pueden estar contaminados con pesticidas u otras sustancias químicas que pueden alterar la exactitud del experimento.

En los cuartos que se alojan a los animales debe existir un estricto control de la humedad, la temperatura y el fotoperiodo. La humedad debe ser entre 40 y 70 %, la temperatura de 20 a 25 °C y generalmente, el fotoperiodo de 12 horas de luz por 12 horas de obscuridad (Tabla 5).

Alimentación

Los preparados comerciales del alimento para el ratón, generalmente en forma de bloques sólidos y secos, llamados pellets, satisfacen las necesidades de mantenimiento y producción. Además de agua que es necesaria para la lubricación del alimento seco. Los ratones adultos consumen de 6 a 7 mL de agua por día.²⁵

El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia

En el ratón existen más de 4000 genes que están asignados a localizaciones específicas, muchos de los cuales fueron identificados, debido a que originan mutaciones espontáneas que producen características físicas distintivas. Los ratones mutantes que portan una mutación simple se han convertido en modelos animales importantes para su utilización en la experimentación científica. Una de estas mutaciones espontáneas simples es la denominada *nude* (*nu*). Este alelo mutante homocigota recesivo pertenece al grupo *linkage* VII del cromosoma 11 y aparece por primera vez en el año 1966 en una colonia exocriada de ratones en un laboratorio en Glasgow, Escocia.

En el año 1968, se descubre que el ratón *nude* homocigoto, además de presentar su fenotipo desnudo o sin pelo característica que le dio el nombre a la mutación, carecía de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechazan tejidos alo y xenotransplantados.

El hecho de que acepten el trasplante de tumores humanos ha sido uno de los descubrimientos más importantes que ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo a estos individuos en el primer modelo de animal de experimentación inmunodeficiente.

Los ratones heterocigotos (*+/nu*), son fenotípicamente normales e inmunocompetentes, mientras que los homocigotos para el gen *nude* (*nu/nu*) son los inmunocomprometidos. Estos últimos son indispensables para las investigaciones biomédicas en estudios de oncología, inmunología, enfermedades infecciosas, estudios del sistema inmune, rechazo de tejidos transplantados, infecciones y crecimiento de tumores.

Dentro de las investigaciones en el campo de la oncología para las cuales se han utilizado estos ratones como modelo se deben resaltar los hallazgos obtenidos en quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, interferones, interleucinas y pruebas de carcinogenicidad entre otros.²⁶

Controles ambientales	Utilización de filtros absolutos (HEPA)
Condiciones físicas	Buen sistema de ventilación, control de temperatura y humedad relativa, $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$, 40% - 60% respectivamente. Con un fotoperiodo de luz/oscuridad 14/10 h.
Instalaciones	Deberá contar con barreras efectivas entre animales y medio exterior, área de lavado, esterilización.
Alimentación	El alimento debe ser estéril (autoclave o irradiación) así como el agua de bebida.

Tabla 5. Condiciones de alojamiento óptimas de los ratones homocigotos nu/nu en donde se establece la temperatura, humedad y fotoperiodo requerido por esta cepa.²⁶

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud cada año se diagnostican 493,000 nuevos casos de cáncer cérvico uterino. Tan solo en México muere una mujer cada 2 horas a causa de este tipo cáncer, presentándose con más frecuencia en mujeres de bajos recursos que no cuentan con algún servicio de salud¹. Por lo anterior, resulta necesario contar con tratamientos que resulten efectivos y con pocos efectos adversos. La biotecnología abre la posibilidad de suministrar dosis de medicamentos más bajas al paciente para conseguir mayor efectividad y menores efectos adversos. El presente trabajo aporta un primer estudio de la estabilidad de la actividad biológica de un sistema nanoacarreador que contiene IL-2 que promete ser segura y eficaz.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la estabilidad biológica del sistema nanoacarreador con IL-2, utilizando un modelo biológico de ratones atímicos de la cepa nu/nu.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Fabricar un lote de nanoacarreadores con IL-2 a una concentración de 70 UI / mL.
- Acondicionar el sistema nanoacarreador en viales de 2 mL.
- Someter el sistema nanoacarreador a una temperatura de 25°C / 60% Humedad Relativa (HR) durante un periodo de tiempo de 5 meses.
- Establecer el modelo biológico de crecimiento tumoral en la cepa de ratones nu/nu.
- Evaluar la reducción en el tamaño de los tumores inducidos después del tratamiento.

HIPÓTESIS

Si la potencia biológica del sistema nanoacarreador sometido a condiciones de estabilidad acelerada (25°C y 65% humedad relativa), no presenta una variación mayor al 5% con respecto a la potencia inicial, entonces la administración del sistema nanoacarreador inhibirá el crecimiento tumoral en los ratones hembras atímicos nu/nu.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

- Modelo tumoral establecido en la cepa de ratones atómicos nu/nu a partir de la línea celular INBL (Estadio IV B metastásico)
- Suero Fetal Bovino (SFB)
- Medio RPMI 1640 con mycokill[®]

Reactivos

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)
- Solución salina de Verseno
- Etanol al 70%
- Azul tripano al 0.01%
- Solución Bouin

Material no biológico

- Tubos cónicos estériles de 15 mL
- Tubos cilíndricos estériles de 50 mL
- Puntas estériles de 200 μ l y 1 mL
- Tubos cónicos estériles de 200 mL
- Tubos cónicos estériles de 1.5 mL
- Jeringas insulínicas de 1 mL
- Cámara de Neubauer
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm
- Tanque de Nitrógeno.
- Tubos cónicos de 1,5 mL
- Jeringa de 50 μ L
- Pipeta dosificadora
- Ultracentrífuga
- Cronómetro
- Botellas de Cultivo de 25, 75 y 125 cm²

Equipos

- Micropipetas de 200 μ L y 1 mL
- Microscopio invertido
- Microscopio óptico
- Centrifuga
- Campana de Flujo laminar
- Engargoladora
- Incubadora
- Balanza analítica
- Báscula para ratones
- Sonicador

Material de Bioterio

- Jaulas con rejilla y filtro HEPA
- Agua y alimento estéril
- Estuche de disección
- Campana de flujo laminar

Fabricación y acondicionamiento del lote de liposomas LOC-09/2011

Los liposomas catiónicos se prepararon mezclando un fosfolípido y un lípido catiónico utilizando una proporción molar 1:1. Ambos se colocaron en cloroformo hasta que se formó una solución homogénea. Se evaporó con un flujo de Nitrógeno y se agregó la Interleucina 2 a la concentración necesaria para obtener 70 UI. Se procedió a sonicar para realizar la encapsulación en varios ciclos de sonicación, lo que no alcanzó a encapsularse se eliminó por ultracentrifugación y finalmente se resuspendió en una solución amortiguadora de pH 7.4. Por último, se acondicionó en frascos viales estériles de 2 mL, haciendo uso de la campana de flujo laminar, administrando Nitrógeno filtrado después del llenado y por último sellando el vial con tapones de neopreno y casquillos de aluminio utilizando una engargoladora para cerrar los viales, toda esta operación fue realizada en condiciones dinámicas de trabajo.²⁷

Acondicionamiento de la cámara de estabilidad.

- a) Se acondicionó la cámara de humedad saturando un medio acuoso con cloruro de sodio hasta alcanzar $65\% \pm 5\%$ de humedad relativa y 25°C con ayuda de un termohigrómetro.
- b) Después se dejó un lapso de tiempo para que la humedad se estabilizara.
- c) Finalmente se monitoreó la temperatura y la humedad relativa en cada tiempo de muestreo.

Cultivo de la línea celular INBL

Se cultivó la línea celular INBL en botellas de capacidad de 25cm^3 , 75cm^3 y 200cm^3 hasta que alcanzaran una proliferación no menor al 80% en fase exponencial de crecimiento. Para ello se les adicionó Medio RPMI 1640 con Suero Fetal Bovino al 10% para su crecimiento y nutrición e incubándolas a una temperatura de 36.5°C y 5 % de CO_2 .²⁸

Ya estando en su fase exponencial a estas células se les adicionó de 5 a 40 mL de solución salina de verseno (dependiendo del volumen de la botella de cultivo) y se les dejó incubar durante 10 minutos, procediendo así a despegar las células, una vez hecho esto se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos, formándose un botón de células, del cual se tomó una alícuota de 20 μL y se colocó en un tubo cónico de 200 μL , adicionando 20 μL de azul tripano, procediendo a contabilizar las células en la cámara de Neubauer. Debido a la gran concentración celular de los cultivos, fue necesario diluir la muestra para el conteo en una dilución 1:10

Inducción de tumores en ratones hembras homocigotas de la cepa nu/nu, mediante inyección intraperitoneal de la línea celular INBL.

Para la evaluación de la estabilidad biológica del sistema nanoacarreador, se utilizaron un total de 15 ratones hembras homocigotas nu/un de 5 semanas de edad, durante un periodo de 5 meses. Los animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum*, en sus jaulas con rejillas y filtros HEPA previamente esterilizados, a temperatura controlada entre 21 a 25 °C.

Para conseguir la aparición de tumores se procedió a inocular mensualmente tres animales con dos inyecciones de 6×10^6 células de la línea celular INBL, separados por un lapso de cinco días. Se esperaron 19 días después de la última inoculación para la aparición de masas tumorales. Los tres ratones de cada mes constituyeron un ensayo cada uno.

Cada ensayo incluyó dos grupos experimentales, en el llamado grupo UNO se utilizó un ratón al que sólo se le administró vehículo y fue el control positivo, mientras que en el grupo DOS se usaron dos ratones a los que se les administró tratamiento con el sistema nanoacarreador.

Estudio de estabilidad acelerado de IL-2 encapsulado en nanoacarreadores.

De manera paralela se llevó a cabo el estudio de estabilidad acelerado del lote de fabricación de nanoacarreadores con IL-2 llamado LOC-09/2011 acondicionado en viales de 2 mL. Para lo anterior se usó una cámara de humedad a $65\% \pm 5\%$ de humedad relativa y 25°C donde fueron almacenados los viales de 2 mL, durante un periodo de 5 meses.

De manera mensual se muestrearon 2 viales de la cámara de estabilidad, los cuales se destinaron para la administración del tratamiento del grupo experimental número DOS, correspondiente a cada ensayo mensual del modelo biológico de inducción de tumores en ratones de la cepa nu/nu.

Evaluación del efecto de los nanoacarreadores en la disminución de tumores inducidos en ratones de la cepa nu/nu.

Una vez inyectada las dos dosis de la línea celular INBL y transcurridos 19 días para la aparición de los tumores, mensualmente al ratón del grupo UNO se le administró por vía intraperitoneal 300 μ L de PBS por 5 días consecutivos y a los dos ratones del grupo DOS se les administraron 300 μ L de nanoacarreadores conteniendo IL-2.

Al finalizar la administración de ambos tratamientos se procedió a examinar exteriormente a los ratones en busca de crecimientos tumorales. Posteriormente se realizó la disección y exploración de ambos grupos experimentales, en busca de masas tumorales. Las masas tumorales encontradas fueron medidas con ayuda de un vernier y se colocaron en una solución fijadora de bouin para almacenarlos a 4°C hasta su uso para inclusión en parafina.

RESULTADOS

Evaluación del efecto de los nanoacarreadores con IL-2 obtenidos de la cámara de estabilidad en los tumores inducidos en ratones nu/nu.

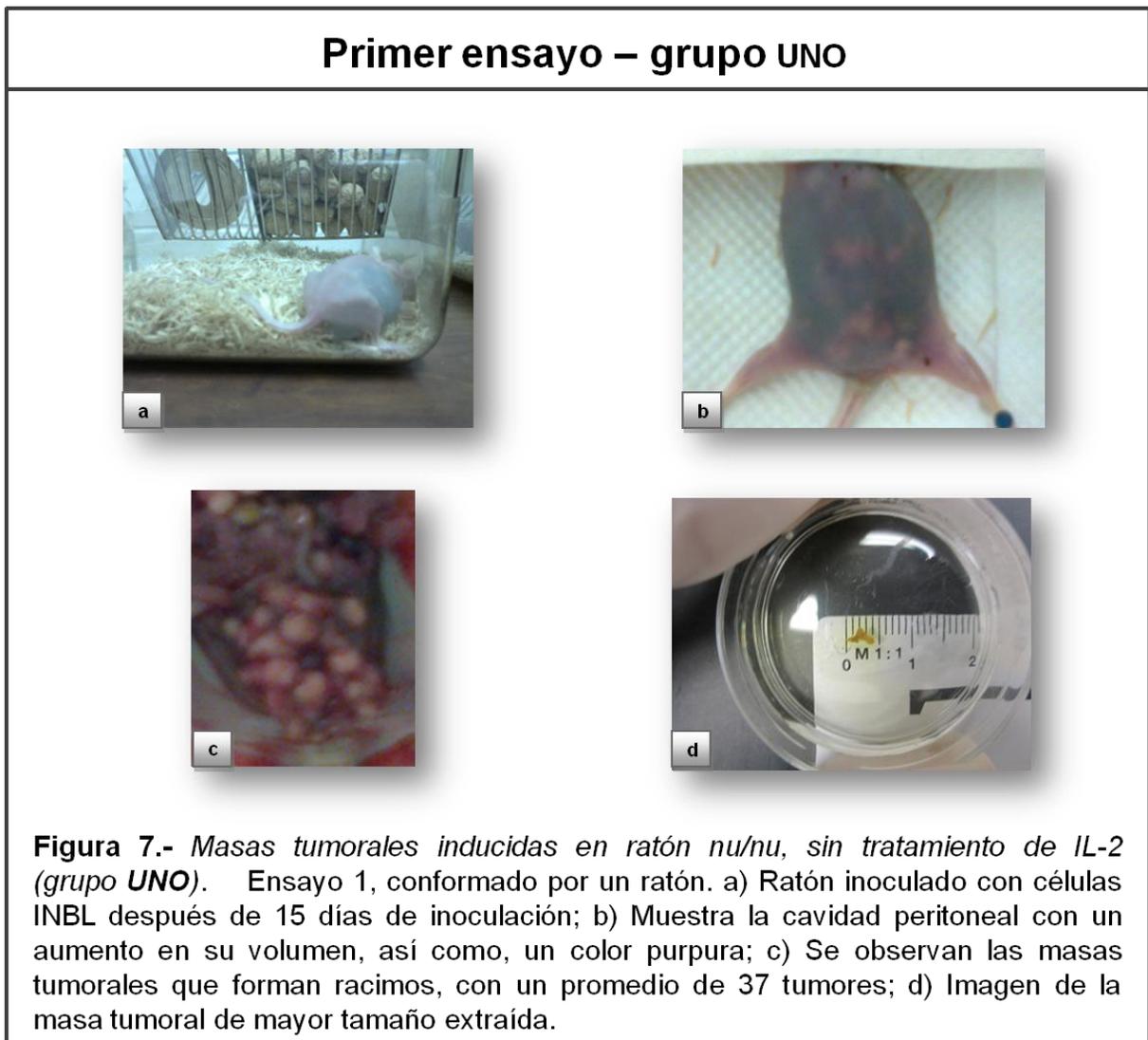
Con la finalidad de evaluar el efecto biológico de los nanoacarreadores conteniendo IL-2, se fabrico el lote LOC-09/2011 que fue sometido a estabilidad acelerada por un periodo de 5 meses. Cada mes se muestrearon dos viales que se utilizaron para dar tratamiento a dos ratones homocigotas de la cepa nu/nu a los que se les indujeron masas tumorales mediante la inyección de células INBL.

Después de concluir el tratamiento los animales fueron examinados exteriormente en busca de crecimientos tumorales. Posteriormente fueron sacrificados para realizar una exploración cuidadosa en cada uno de ellos en busca de masas tumorales, las cuales fueron extraídas, medidas con vernier y fijadas para su posterior inclusión en parafina.

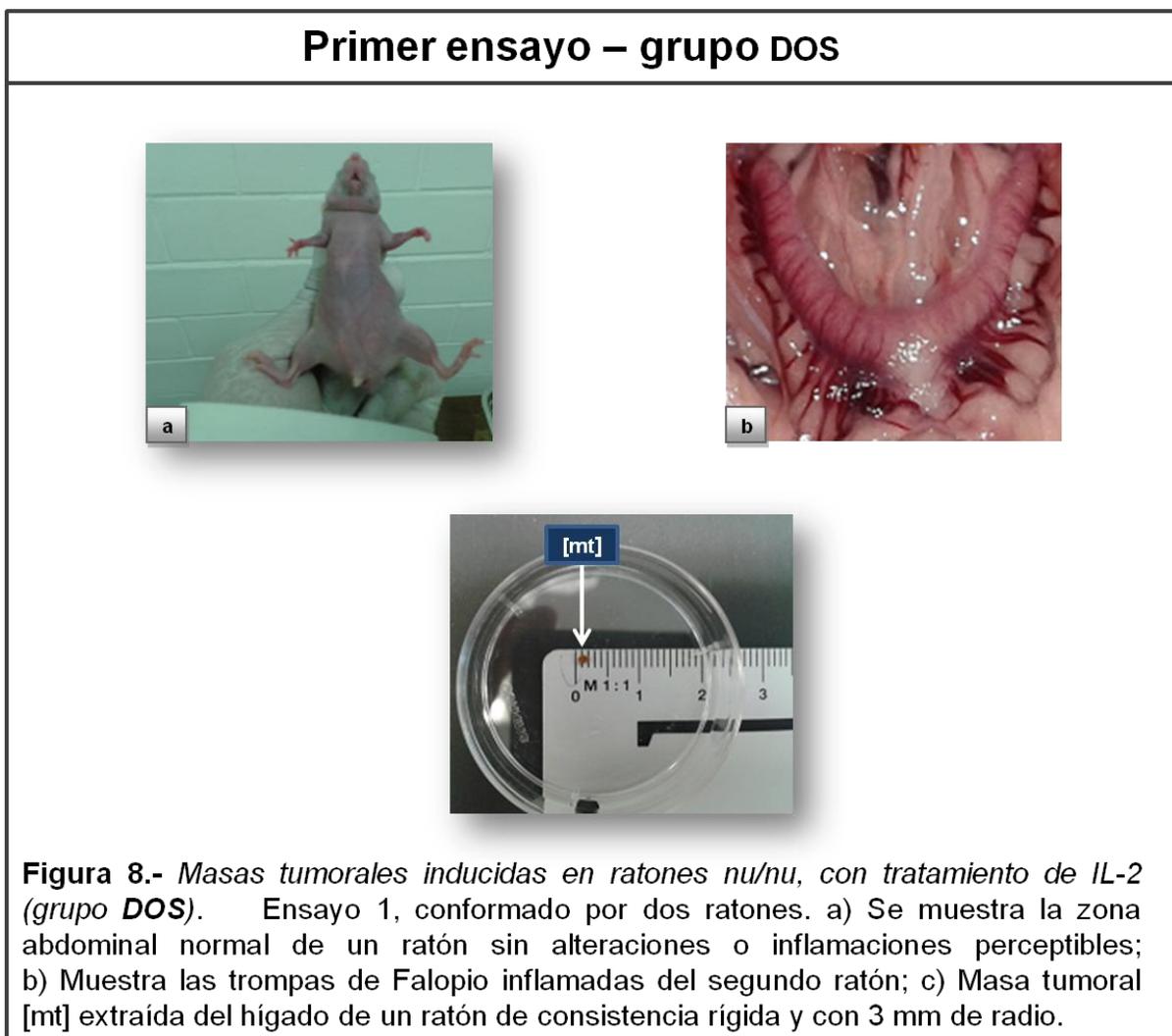
Nuestros datos muestran que los ratones control, que no recibieron tratamiento con IL-2 (grupo UNO) presentaron formación de tumores en 4 de los 5 ensayos realizados. Las masas tumorales obtenidas fueron extraídas y medidas cuidadosamente, la suma de sus volúmenes sirvió de comparación para los ratones bajo tratamiento con IL-2 encapsulada en nanoacarreadores y de esta manera establecer el porcentaje de reducción de masa tumoral. Es importante mencionar que en un ensayo observamos un crecimiento que invadió toda la cavidad peritoneal, obteniendo la mayor masa y volumen tumoral en este trabajo, a este respecto deseamos comentar que aunque a primera vista parecería metástasis sería muy difícil afirmarlo y más aún Giovanella B.C. informa que suele ser difícil generar metástasis en sistemas de inducción de tumores *in vivo*.

Resultados del tratamiento de IL-2 encapsulada

En un primer ensayo, para el caso del grupo **UNO** se encontró un gran número de tumores los cuales ocupaban la región del peritoneo, en forma de racimo (Figuras 7a; 7b; 7c). En promedio había 37 tumores de los cuales sólo se extrajeron 3, los más representativos; dos de ellos correspondieron a la región peritoneal con dimensiones de 6 mm y 10 mm de radio y uno más extraído del hígado con un radio de 5 mm. Esto se hizo para realizar el cálculo de volumen tumoral total para peritoneo de 5092.8 mm^3 . Cabe mencionar que el ratón del grupo UNO, murió a los cuatro días del tratamiento.

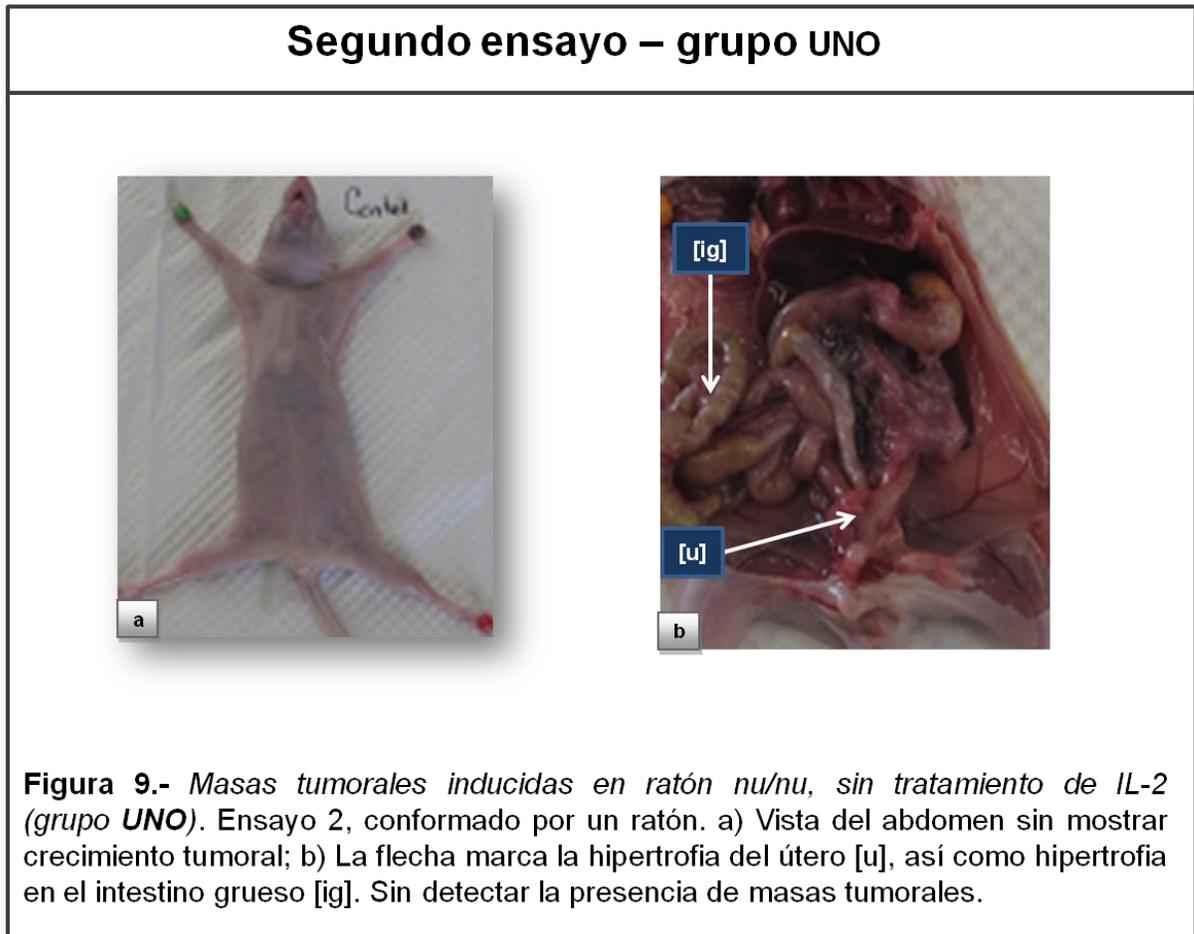


Por otra parte en el grupo **DOS** en un ratón se encontró un tumor de 3 mm de radio ubicado en el hígado con un volumen total de 113.1 mm^3 (Figura 8c) mientras que en el otro se observó una atrofia en las trompas de Falopio (Figura 8b).

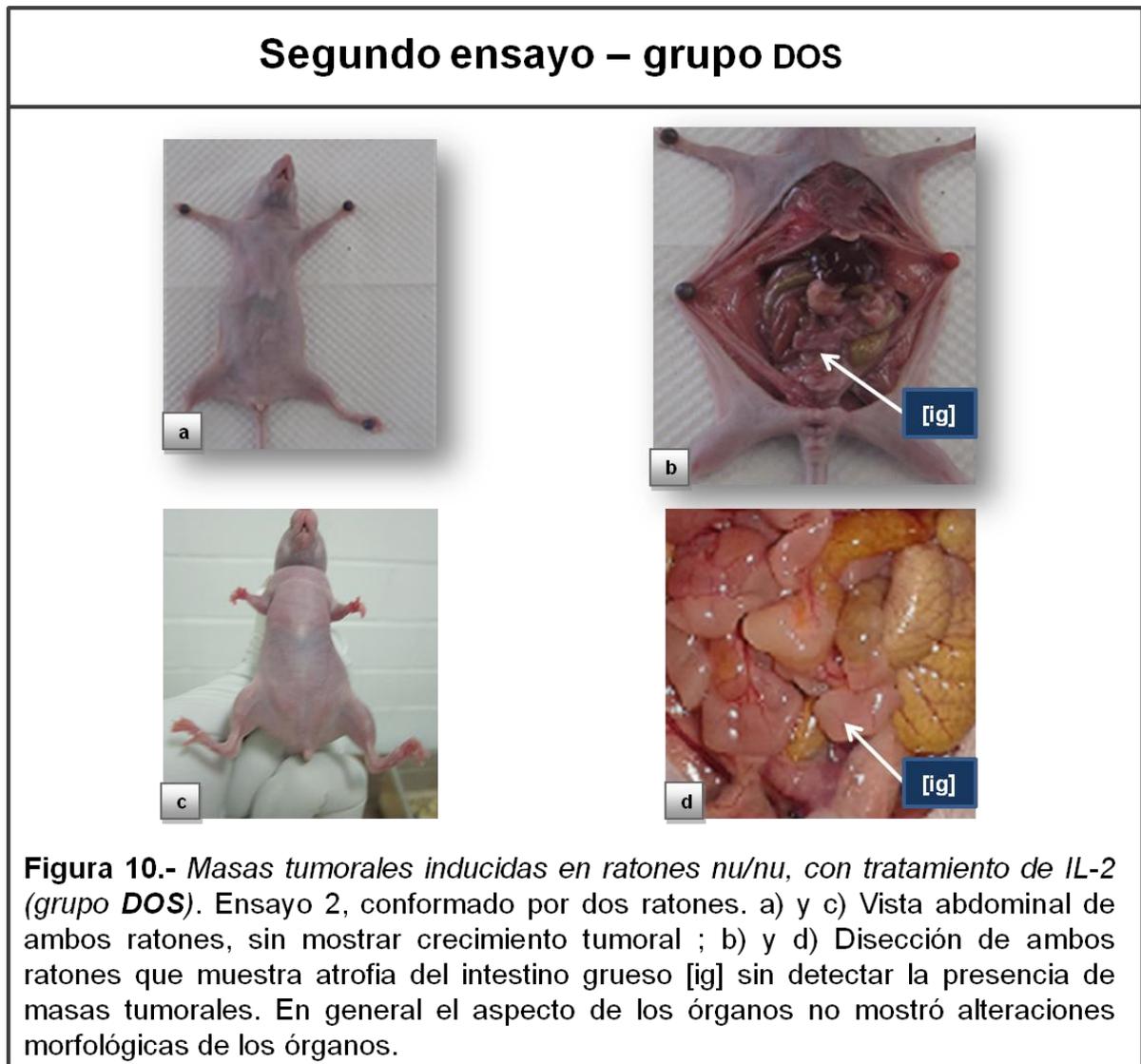


Resultados del primer mes de tratamiento de IL-2 encapsulada

En un segundo ensayo los resultados no muestran crecimiento tumoral. En el grupo **UNO** solo se observó hipertrofia del aparato reproductor (Figuras 9a; 9b).

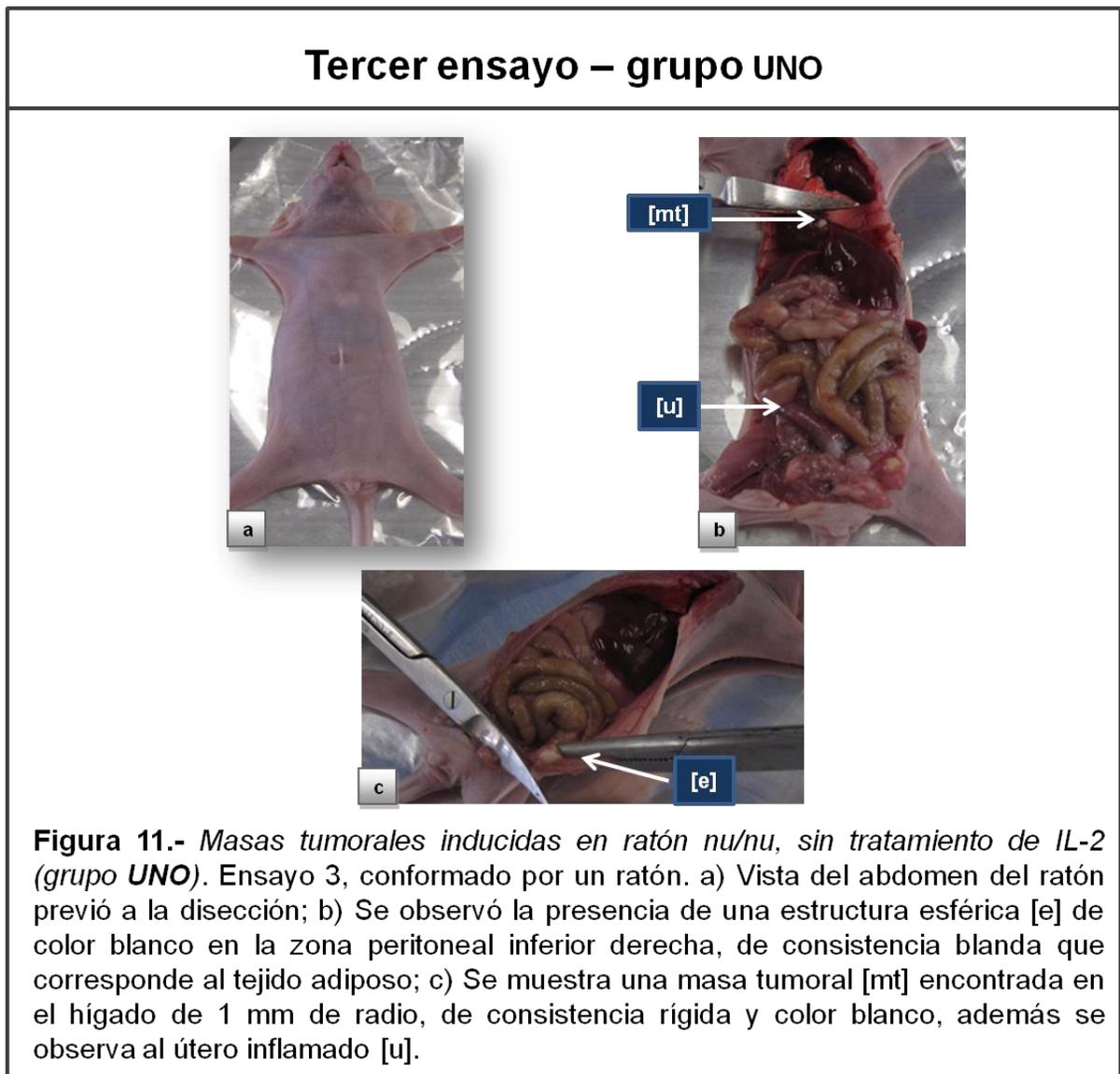


En el grupo **DOS**, en un ratón se encontró hipertrofia del intestino grueso, siendo la única alteración perceptible (Figura 10b). Mientras en el otro ratón se encontró la presencia de grasa en la zona del útero e hipertrofia del intestino grueso (Figura 10d).

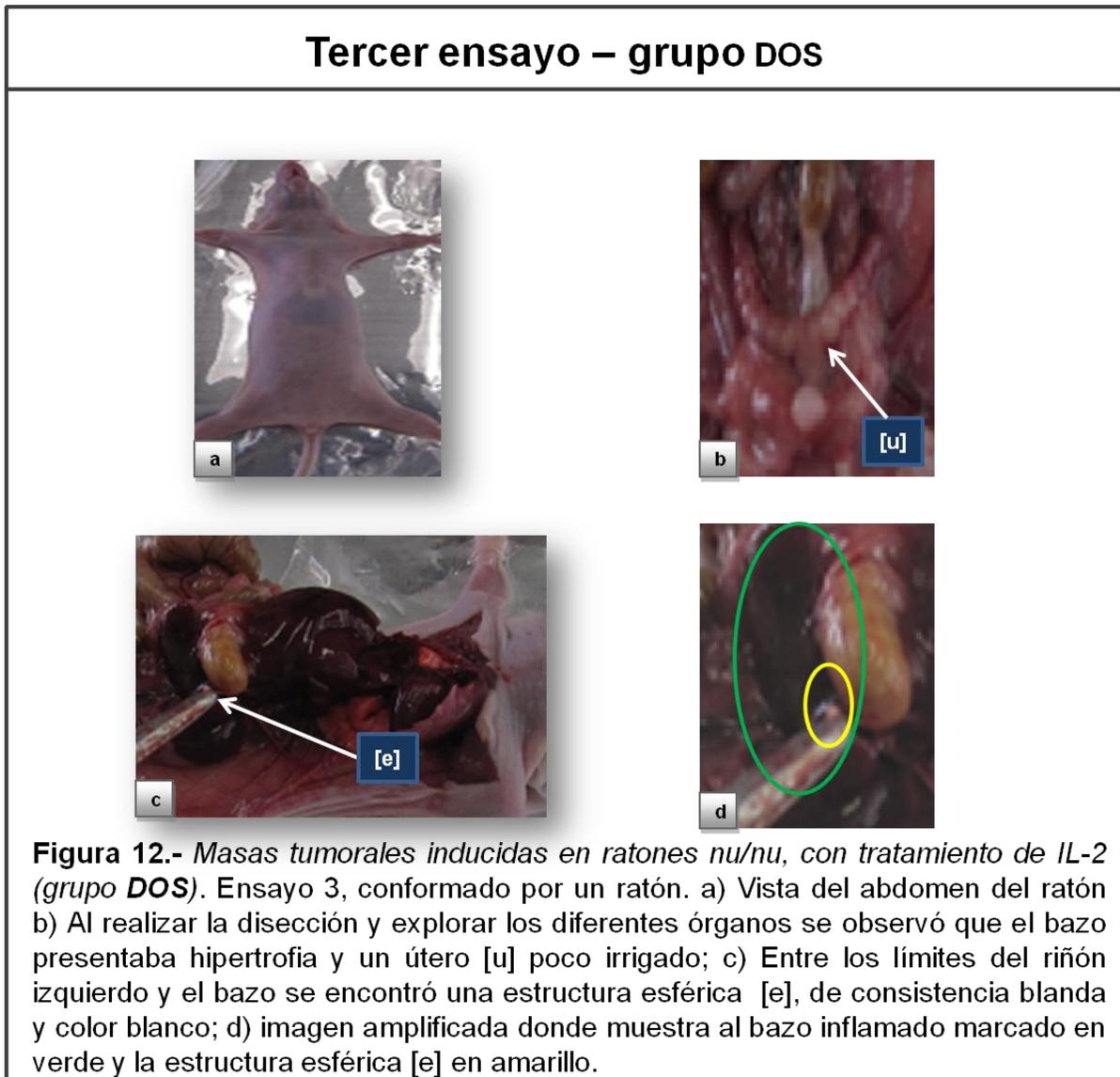


Resultados del segundo mes de tratamiento de IL-2 encapsulada

En el tercer ensayo en el ratón del grupo **UNO**, se localizó en la parte posterior del hígado un tumor de 1 mm de radio con un volumen de 4.2 mm^3 (Figura 11c). Además se encontró la presencia de grasa en el extremo inferior derecho del peritoneo (Figura 11b).

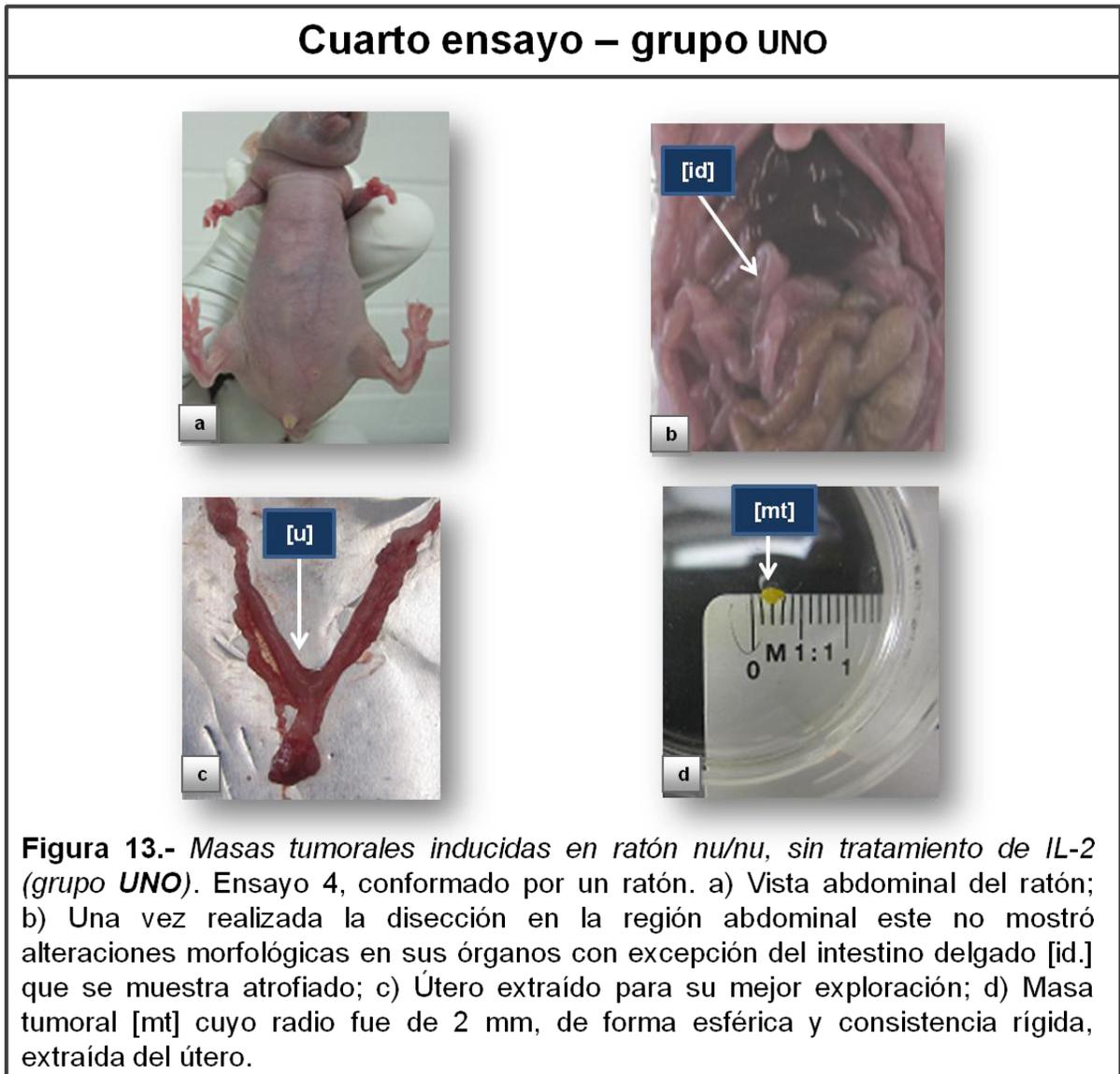


Mientras en los ratones del grupo DOS se perdió un animal por muerte prematura. El ratón que quedó del segundo grupo presentó acumulación de grasa e hipertrofia del bazo y con un útero muy irrigado (Figura 12b).

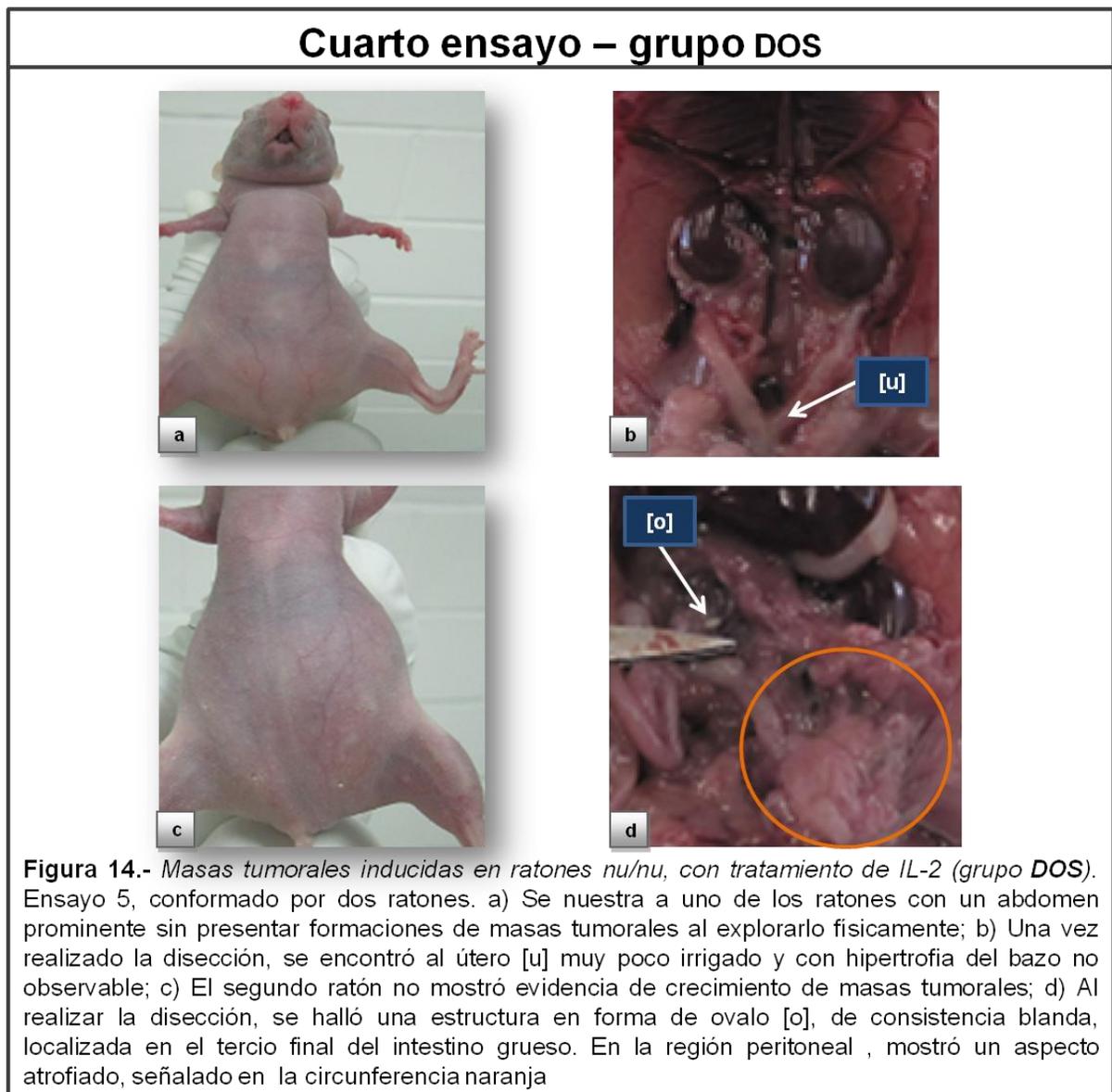


Resultados del tercer de tratamiento de IL-2 encapsulada

Para el cuarto ensayo, en el grupo **UNO**, se encontró que el intestino delgado presentaba atrofia (Figura 13b). Por otra parte se localizó detrás del útero una masa tumoral de forma esférica y consistencia rígida con una dimensión de 2 mm de radio y un volumen tumoral de 33.5 mm^3 (Figura 13d).

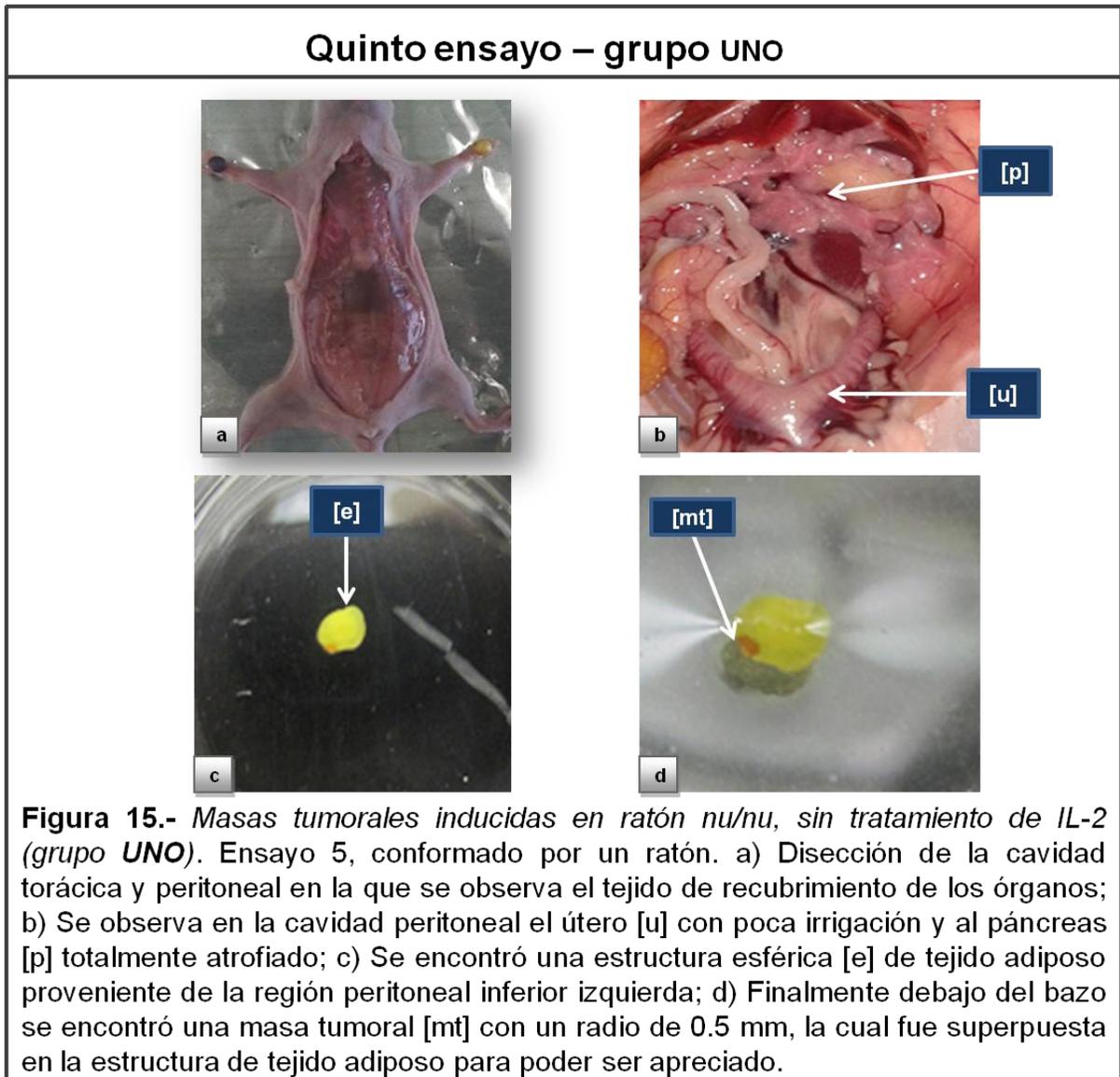


En lo que respecta al grupo **DOS**, ambos ratones mostraron hipertrofia del bazo (no observable). En uno de los ratones se encontró que el útero [u] presentó una irrigación muy pobre (Figura 14b), mientras que en el otro ratón se halló una estructura de consistencia semirrígida localizada entre el intestino delgado y el tercio final del estómago. En este mismo ratón se observó la región peritoneal de manera anormal, con una apariencia atrofiada (Figura 14d).

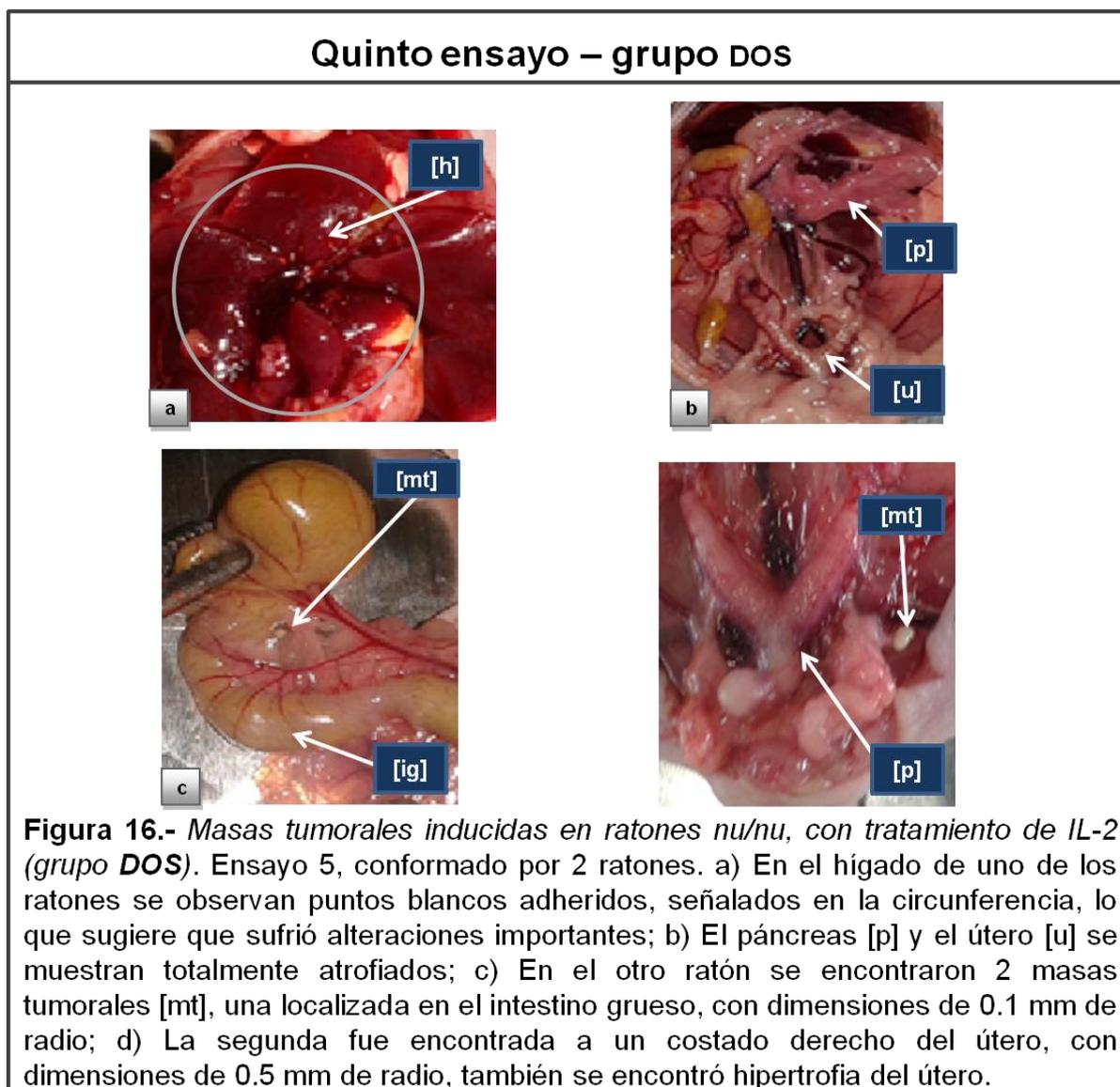


Resultados del cuarto mes de tratamiento de IL-2 encapsulada

En el quinto ensayo, grupo **UNO** se observó que el estómago y el páncreas tenían un aspecto atrofiado (Figura 15b) además se encontró una estructura esférica de tejido adiposo (Figura 15c). Por otra parte se localizó un tumor debajo del bazo con una dimensión de 0.5 mm de radio y un volumen tumoral de 0.524 mm^3 .



En lo que respecta al grupo **DOS**, en un ratón se encontró crecimiento tumoral, sin embargo presentó alteraciones en hígado. Además el páncreas y útero mostraron atrofia (Figuras 16a y 16b). En lo que respecta al otro ratón se encontraron 2 tumores, uno de ellos, localizado en el útero con dimensiones de 1 mm de radio con un volumen tumoral de 4.189 mm³ y uno más ubicado en el intestino grueso con dimensiones de 0.1 mm de radio, con un volumen tumoral de 0.004 mm³ (Figuras 14c; 14d).



Para efectos prácticos a continuación se resume en la tabla 5 y 6 los resultados obtenidos de los ensayos de inducción de masas tumorales después de 24 días (19 correspondientes a la inducción de masas tumorales y 5 días para el tratamiento con IL-2 encapsulada en nanoacarreadores o bien PBS), en donde se reporta el número de tumores encontrados por grupo, el radio y volumen de cada tumor, así como el porcentaje de regresión tumoral.

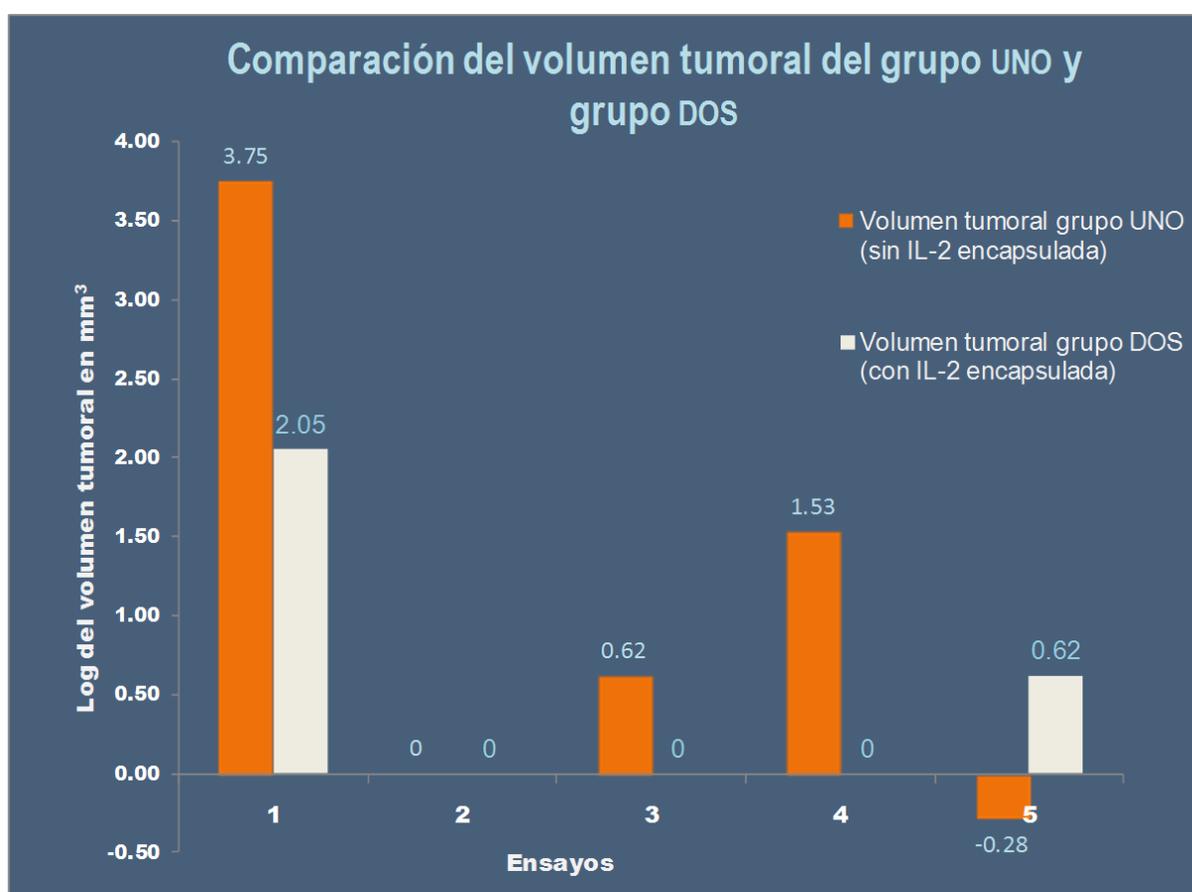
Número de ensayo	Grupo experimental	Ratones homocigotos nu/nu	Número de tumores encontrados	Radio del tumor (mm)	Volumen del tumor (mm ³)	Volumen total en mm ³	Porcentaje de regresión tumoral
1	UNO	Ratón 1	20	6	904.779	5617.17	97%
				10	4188.79		
				5	523.599		
	DOS	Ratón 2	0	0	113.097		
		Ratón 3	1	3		113.097	
2	UNO	Ratón 1	0	-----	-----	0	Ausencia de tumoración
	DOS	Ratón 2	0	-----	-----		
		Ratón 3	0	-----	-----		
3	UNO	Ratón 1	1	1	4.189	4.189	100%
	DOS	Ratón 2	0	0	0		
		Ratón 3	0	0	0	0	
4	UNO	Ratón 1	1	2	33.51	33.51	100%
	DOS	Ratón 2	0	0	0		
		Ratón 3	0	0	0	0	
5	UNO	Ratón 1	1	0.5	0	0.524	No existió reducción tumoral
	DOS	Ratón 2	0	0	0	4.193	
		Ratón 3	2	1	4.189		
				0.1	0.004		

Tabla 5. Resultados del crecimiento de volumen tumoral y porcentaje de regresión tumoral después de haber sido aplicado el tratamiento. Grupo UNO (Solución salina de fosfatos); Grupo DOS (IL-2 encapsulada en nanoacarreadores).

Volumen total para el placebo	Volumen total para IL-2 Liposomas	Porcentaje de regresión tumoral total
5655.39 mm ³	117.29 mm ³	97.92 %

Tabla 6. Resultado del crecimiento de volumen tumoral y porcentaje de regresión tumoral, después de aplicar la IL-2 encapsulada en nanoacarreadores al Grupo UNO y PBS al Grupo 2. Considerando el ensayo de manera global.

Con la finalidad de comparar el efecto del tratamiento con IL-2 encapsulada y la solución salina de fosfatos (PBS) en la reducción del volumen tumoral entre el grupo **UNO** y el grupo **DOS** se comparó el desarrollo de las masas tumorales entre los 5 diferentes ensayos, a partir de los volúmenes tumorales calculados. En donde se observa claramente como el volumen tumoral del grupo **UNO** (Barras de color naranja, gráfica 1) fue mayor en comparación con el volumen tumoral del grupo **DOS** (Barras en color blanco) que corresponden a los ratones tratados con la IL-2 encapsulada. Esto se observó a lo largo del estudio, con excepción del último ensayo, en donde el volumen tumoral del grupo **UNO** fue menor (Gráfica 1).



Gráfica 1. Comparación del crecimiento del volumen tumoral, en donde se aprecia claramente que el volumen tumoral del grupo UNO (Barra naranja) es mucho mayor que el del grupo DOS (Barra blanca).

Resultados del estudio de estabilidad acelerado

Los resultados del lote LOC-09/2011 mostraron que el sistema contenedor/cierre constituido por viales de 2 mL con tapa de neopreno y casquillo de aluminio (Figura 17) protegieron al sistema nanoacarreador de fuentes de contaminación viables y no viables como son el crecimiento por bacterias, hongos o bien partículas de polvo. De esta manera se mantuvo la integridad del sistema nanoacarreador a lo largo del estudio.

La apariencia de la suspensión del nanoacarreador permaneció con un aspecto homogéneo hasta el segundo mes de almacenamiento (25°C y 65% de humedad relativa). Sin embargo a partir del tercer mes el sistema nanoacarreador, presentó cambios en su apariencia, ya que se observó presencia de lípido adherido a las paredes del vial, sin que esto comprometiera el efecto biológico de los nanoacarreadores administrados a los ratones nu/nu del grupo DOS, ya que siguió mostrando resultados satisfactorios, como lo demuestra el ensayo 4.

Para el cuarto mes de almacenamiento se encontró que los nanoacarreadores ya habían perdido su efecto en la reducción de las masas tumorales, observándose un efecto contrario al mostrado en los ensayos anteriores.

Es así como el acondicionamiento de interleucina 2 encapsulado en liposomas y acondicionado en viales de 2 mL, permitió que la administración se llevará a cabo de manera segura y eficiente, ya que cada vial contenía la dosis completa para aplicar el tratamiento por cinco días consecutivos, evitando la exposición del sistema al medio ambiente.



Figura 17. Sistema contenedor cierre del lote del sistema nanoacarreador LOC-09/2011

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con datos de la Organización mundial de la salud el cáncer cérvico uterino (CaCu) es el segundo carcinoma de mayor incidencia en las mujeres de todo el mundo. En México el número de defunciones en 2006 por esta enfermedad fue de 4000 mujeres, siendo los estados de Chiapas, Colima y Veracruz los de mayor incidencia con un 26.4 %, 23.3% y 22% respectivamente.²⁹

En los últimos años se ha evidenciado mediante pruebas preclínicas, que la inmunoterapia ha resultado exitosa en el tratamiento del cáncer cervicouterino, ovárico, gástrico, renal entre otros. Dentro de este contexto la Interleucina 2 (IL-2) encapsulada en liposomas catiónicos (nanoacarreadores) ha mostrado ser eficaz contra células cancerosas, al estimular la producción de linfocitos T, linfocitos B y células asesinas naturales (Natural Killers) debido a que poseen el receptor para IL-2.³⁰

Cabe destacar que la IL-2 administrada en forma libre conlleva a muchos efectos adversos como hipotensión, daño hepático, edema e incluso insuficiencia renal por lo que la encapsulación en liposomas catiónicos confiere protección contra efectos adversos y capacidad para liberar al fármaco de manera específica, favoreciendo así la farmacocinética y su acumulación en el microambiente tumoral por la fenestración de los vasos sanguíneos.

Dado que los acarreadores lipídicos han mostrado ser eficientes transportadores de IL-2, es importante conocer su estabilidad. Por esta razón, es importante determinar cómo afectan los factores ambientales como la humedad y temperatura a la calidad del producto a través del tiempo y de esta forma establecer las condiciones óptimas de almacenamiento, así como definir un periodo de caducidad.

Para probar esta eficacia se diseñó un modelo biológico *in vivo* utilizando la cepa de ratones homocigotas hembras nu/nu. Se utilizó este modelo experimental del ratón ya que desde 1969 Rygard y Povlsen demostraron que el trasplante de un adenocarcinoma humano de colon en un ratón atímico es exitoso.³¹ Desde entonces el trasplante de tumores humanos en ratones desnudos (nu/nu) o en ratones fenotípicamente normales combinado con inmunosupresión, se ha cubierto la inducción de los diferentes tipos de tumores más importantes y representan la base de los estudios preclínicos para analizar *in vivo* los medicamentos desarrollados para combatir el cáncer.

Tal es así, que la EMEA (Agencia Europea Evaluadora de Medicamentos) por sus siglas en inglés, ha incentivado el uso de modelos biológicos de injertos heterólogos para el estudio preclínico de medicamentos anticancerosos ^{32,33}. Por esta razón, en este estudio utilizamos el modelo de ratones nu/nu para inducir el crecimiento de masas tumorales de células de la línea de CaCu INBL. Con el propósito de evaluar la efectividad de IL-2 encapsulada en nanoacarreadores lipídicos que fueron sometidos a condiciones exageradas de almacenamiento siguiendo las recomendaciones de las normas ICH Q5C y NOM-073-SSA1-2006.

Este trabajo se basa en investigaciones previas del Laboratorio de Oncología Celular, en las cuales se demuestra que las células de CaCu expresan el receptor para IL-2, el cual está conformado por las 3 subunidades polipeptídicas α , β , γ que tienen una alta afinidad por la IL-2 al igual que los linfocitos T, entre otros. También han informado que concentraciones de 10 UI/mL de IL-2, favorecen la proliferación de las células de la línea de CaCu INBL. ³¹ y que concentraciones de 100 UI/mL de IL-2 detienen por completo su proliferación a diferencia de lo que sucede con leucocitos de sangre periférica en donde una concentración de 100 UI/mL promueven su proliferación y diferenciación de linfocitos T que ejercen un efecto citotóxico sobre células tumorales *in vitro*.³⁴

Además, Rangel et al, demostraron que IL-2, evaluada *in vitro* sobre células INBL, es capaz de reducir su. La administración intraperitoneal, por 5 días consecutivos, de 100 UI/mL de esta citocina también, demostró reducir las masas tumorales de CaCu inducidas en ratones inmunodeprimidos de la cepa CBA, hasta en un 85%. Sin embargo, el ensayo *in vivo* mostró graves efectos secundarios atribuibles a IL-2. Por esta razón se fabrico un sistema nanoacarreador lipídico para transportar la citocina hasta el crecimiento tumoral y reducir los efectos adversos. El nanoacarreador resulto ser muy eficiente no solo para transportar IL-2 sino también para exponerla en su superficie lo que favorece la activación de linfocitos de sangre periférica en células citotóxicas con actividad antitumoral.³⁵

Dado que se ha demostrado que los nanoacarreadores son muy eficientes para transportar a IL-2 y al ser administrados tienen una importante reducción de masas tumorales, en este trabajo se propuso como objetivo establecer las condiciones de almacenamiento del sistema nanoacarreador que aseguren su aptitud de uso, como un inmunoregulador biológico en un sistema *in vivo*.

Para este estudio se decidió utilizar ratones atímicos como un mejor modelo experimental, a los cuales se les indujo el crecimiento de tumores a partir de la inoculación de células INBL. La cepa de ratones nu/nu tienen como característica principal el hecho de carecer de linfocitos T, responsables de la respuesta inmunológica celular. Por ello este tipo de modelo biológico es ideal para inducir crecimientos tumorales y evaluar el efecto de agentes antineoplásicos ya que representa de manera natural un sistema inmunológico deprimido. Lo anterior permitió evaluar el efecto de IL-2 encapsulada, en los tumores de CaCu inducidos en hembras de la cepa nu/nu.

La inducción de tumores de CaCu en la cepa nu/nu fue satisfactoria ya que se obtuvieron resultados similares a los reportados por Rangel et al, para la cepa de ratones CBA. No obstante en un ensayo no se obtuvo inducción de tumor, lo cual atribuimos a que las células INBL utilizadas para dicho ensayo no se encontraban en fase exponencial de crecimiento lo que impidió la formación de tumor. Lo anterior se apoya en investigaciones que indican que en ocasiones, las características de crecimiento suelen ser muy lentas o presentar inconsistencia con el tiempo, afectando de esta forma el establecimiento de la masa tumoral tal y como ocurrió en este ensayo³³. Por lo anterior se estableció un mejor control en el crecimiento de la línea celular INBL, asegurando que se encontraran en plena fase exponencial, garantizando de esta manera la inducción tumoral una vez inoculada en los ratones nu/nu como sucedió en los tres ensayos posteriores.

Nuestros datos muestran que los ratones control, que no recibieron tratamiento con IL-2 (grupo UNO) presentaron formación de tumores en 4 de los 5 ensayos realizados. Las masas tumorales obtenidas fueron extraídas y medidas cuidadosamente, la suma de sus volúmenes sirvió de comparación para los ratones bajo tratamiento con IL-2 encapsulada en nanoacarreadores y de esta manera establecer el porcentaje de reducción de masa tumoral. Es importante mencionar que en un ensayo observamos un crecimiento que invadió toda la cavidad peritoneal, obteniendo la mayor masa y volumen tumoral en este trabajo, a este respecto deseamos comentar que aunque a primera vista parecería metástasis sería muy difícil afirmarlo y más aún Giovanella B.C³⁶. informa que suele ser difícil generar metástasis en sistemas de inducción de tumores *in vivo*.

Las alteraciones morfológicas frecuentemente observadas fueron la presencia de tejido adiposo (Figuras, 11; 12; 14; 15) en diferentes órganos como hígado, intestinos y útero en forma de estructura esférica, además de la hipertrofia del útero y del bazo. Dichas alteraciones pueden estar relacionadas con la presencia de células INBL inoculadas.

En lo que respecta a los ratones que recibieron tratamiento con IL-2 encapsulada (grupo DOS), estos presentaron formación de masas tumorales en 2 de los 5 ensayos. La reducción del volumen de los tumores, fue de un 97% en promedio y de manera individual la reducción tumoral fue del 100% en tres ensayos. Cabe mencionar que la mayor eficiencia en la reducción de masas tumorales, se presentó en el ensayo uno, en el cual se observó la mayor reducción de masas tumorales, ya que de un volumen de 5617 mm³, se redujo a 113 mm³ después de recibir el tratamiento con IL-2 encapsulado.

Realizando el análisis de resultados considerando cinco ensayos de manera general podemos decir que después de la administración de IL-2 encapsulada en nanoacarreadores almacenados hasta por cuatro meses, muestran tener una gran eficiencia en la reducción de las masas tumorales. Esta reducción se atribuye al efecto antineoplásico de IL-2 sobre las células de CaCu, los resultados aquí presentados son de gran relevancia ya que demostramos que las condiciones a las cuales fueron almacenados los nanoacarreadores por estos cuatro meses no modifican la eficiencia antitumoral de IL-2.

Sin embargo, los nanoacarreadores utilizados al cuarto mes de su almacenamiento, mostraron tener un efecto contrario al observado previamente, es decir hubo incremento de 8 veces, en el volumen tumoral con respecto al control (Grupo UNO) en los animales tratados con nanoacarreadores. Esta respuesta antagónica de IL-2 se puede atribuir al hecho de que la IL-2 contenida en el acarreador haya perdido actividad y no se capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales. Esta hipótesis se basa en los resultados del estudio de la valoración química de IL-2 contenida en acarreadores provenientes del estudio de estabilidad acelerada obtenidos por Velasco Lomas, quien indica que las condiciones de almacenamiento a 25°C y 65% de humedad relativa, provocan que los nanoacarreadores pierdan el 22.7% de potencia química al primer mes y al cuarto pierde 64%. La cuantificación mensual de IL-2 obtenida a través del estudio de estabilidad acelerada indica que, la cantidad de IL-2 encapsulada en el nanoacarreador disminuye considerablemente en función del tiempo de almacenaje llegando a ser de 26.5 UI/mL en el quinto mes (Velasco Lomas, Tesis de Licenciatura, 2012).

Estos resultados en conjunto implican que el producto puede estar almacenado y expuesto a 25°C, sin embargo perderá un 22.7% de la concentración inicial en el primer mes, para perder alrededor del 70% al cabo de cinco meses. Resulta interesante el hecho, de que la pérdida de potencia química no implica la pérdida similar de la actividad biológica, que para el caso de la IL-2 puede ser dual, a concentraciones por encima de 50 UI inhibe la proliferación de células, mientras que por debajo de esta promueve su proliferación. Esto se puede relacionar con el porcentaje de regresión tumoral obtenida en los primeros tres meses del estudio que llego a ser del 97%. O bien en la inducción del crecimiento tumoral en el cuarto mes de estudio en el que posiblemente la IL-2 se encontraba en una baja concentración, presentándose un volumen tumoral 8 veces mayor que el calculado en el ratón que no recibió tratamiento. Este crecimiento de masas tumorales por bajas concentraciones de IL-2, concuerda con los datos reportados por Rangel et al, obtenidos en ratones de la cepa CBA.³¹

Podemos decir que el acondicionamiento del sistema nanoacarreador (IL-2 encapsulada) en viales de 2 mL, fue satisfactorio ya que mantuvo la integridad de la Interleucina 2 para que esta ejerciera su efecto, a pesar de las condiciones de temperatura y humedad bajo las cuales permanecieron durante 4 meses que duro el estudio. También la sinergia que ejerció el sistema nanoacarreador, contribuyendo a proteger y hacer específica la interacción de IL-2 con las masas tumorales. De esta manera dicho sistema facilitó el mecanismo de acción de IL-2, reduciendo a su vez las posibles reacciones adversas que conlleva el uso de esta citocina en forma libre.

Por otro lado la selección de este material de empaque permitió que la manipulación y extracción del sistema nanoacarreador para su administración a los ratones, fuera eficiente y segura. Además protegió a los nanoacarreadores de la oxidación, así como de partículas viables y no viables, optimizando así su uso.

Resumiendo, el sistema nanoacarreador que encapsula IL-2 muestra resultados satisfactorios al ser administrado en los primeros 3 meses a partir de su fabricación y es viable para ser utilizado como alternativa terapéutica para pacientes de CaCu.

Es importante mencionar que el estudio de estabilidad biológica en la cepa de ratones nu/nu, permitió evaluar de manera directa la respuesta de IL-2 encapsulada en nanoacarreadores sobre las masas tumorales inducidas, ya que esta cepa carece de linfocitos T, por lo que este modelo biológico tiene la ventaja de evaluar el efecto antineoplásico sin interferencias importantes atribuibles al sistema inmunológico; no obstante, este tipo de ensayos son de un costo mayor, comparado con otros modelos biológicos como son los ratones CBA. Además, el hecho de que los nanoacarreadores con IL-2 pierdan hasta el 50% de su potencia inicial en el

tercer mes de estudio en condiciones exageradas de almacenamiento (25° C y 65% de humedad relativa) implica una pérdida de potencia química en más del 5%, lo que se considera un cambio significativo dentro de los estudios de estabilidad acelerada de los nanoacarreadores, por lo que de acuerdo a la NOM-073-SSA1-2005 se debe realizar un estudio de estabilidad a largo plazo para determinar su estabilidad real.

Es de gran relevancia indicar que aún con la pérdida de hasta el 50% de actividad en el tercer mes, se sigue consiguiendo la reducción de las masas tumorales, lo que supera las expectativas de nuestra hipótesis de trabajo.

Finalmente este estudio puede ser considerado solo como una primera aproximación a un estudio preclínico, ya que es necesario utilizar un mayor número de animales o especies y la aplicación de pruebas de seguridad, para que pueda ser considerado como tal.

CONCLUSIONES

1. Se estableció un modelo biológico de crecimiento tumoral en una cepa de ratones atímicos que proporciona otra opción para evaluar la eficacia de medicamentos desarrollados contra el cáncer *in vivo*.
2. Proporcionamos información acerca de que la potencia biológica se mantiene a diferencia de la potencia química para ese sistema nanoacarreador.
3. El acondicionamiento del sistema nanoacarreador en viales de 2 mL, le confirió protección frente al ambiente oxidante propio del oxígeno, manteniendo la eficiencia biológica de IL-2 hasta por tres meses de almacenamiento a 25°C y 65%

APENDICE

I. Suero Fetal Bovino

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.

II. Solución salina de verseno

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

Tris (Sigma, Chem, USA)	3.04 g
KCl (Sigma, Chem, USA)	0.4 g
NaCl (Sigma, Chem, USA)	8.0 g
EDTA (Sigma, Chem, USA)	0.2 g

III. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Esta solución fue utilizada como placebo y vehículo para la preparación de liposomas. Para la preparación de un litro de solución se utilizan los siguientes reactivos:

MgCl (Sigma, Chem, USA)	0.10 g
CaCl (Sigma, Chem, USA)	0.10 g
NaCl (Sigma, Chem, USA)	8.0 g
KCl (Sigma, Chem, USA)	0.20 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma, Chem, USA)	2.16 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma, Chem, USA)	0.2 g

IV. Azul tripano

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

V. Medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640)

RPMI 1640 (Gibco BRL, EUA) 10.42 g
 NaHCO₃ (Sigma, Chem, USA) 2.0 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada, ajustando el pH a 7.2 con ácido clorhídrico 1 N y se afora a un litro con agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado al vacío a través de una membrana de poro de 0.47 µm y se almacena a 4°C

Composición	mg/L
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 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-hidroxipolina	20
L-isooleucina	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 pantetenato	0.3
Cloruro de colina	3
Ácido fólico	1
Inositol	35
Nicotinamida	1
Ácido p-aminobenzoico	1
Cloridrato de piridoxina	1
Rivoflavina	0.2
Tiamina HCl	1
Vitamina B ₁₂	0.005

Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud [sede web] Washington: OMS; 2008 [acceso 9 de marzo de 2011]. Vacuna contra el VPH: buscan superar obstáculos Disponible en: http://www.phao.org/spanish/DD/PIN/ahora03_jul08.htm.
2. Alonso de Ruíz, Cáncer cervicouterino (diagnóstico, prevención y control). México: Medica panamericana; 2000
3. Encourager l'utilisation de la technologie l'innovation et la société de l'information pour la compétitivité. Aplicaciones industriales de la tecnología. [Monografía en Internet]. 2008. Asturias: Estricc, [acceso 3 de Noviembre de 2011]. Disponible: http://www.idepa.es/sites/web/idepaweb/Repositorios/galeria_descargasidepa/Aplicacionesindustriales_Nanotecnologia.pdf
4. Rojas E. Inmunología de memoria. 2ª Ed. Argentina: Panamericana, 2001
5. Berumen J, Casas L, Segura E, Amescua JL, Garcia C. 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
6. Lowy R.D, Schiller J. Prophylactic human papillomovirus vaccines. J of clinical investigation 2006; 5: 1167-1173
7. Barber H. Incidence, prevalence and median survival rates of gynecologic cancer. In :Van Nagell JR, Barber H, eds. Modern concepts of gynecology oncology. Boston: Tohn Wright, 1982
8. Cramer D, Cutler S. Incidence and histopathology of malignancies of the female genital organs in in the United States. Am J Obstet Gynecol 1974; 118: 443-460
9. 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
10. Bloom, Fawcett. El sistema inmunitario. En: Tratado de histología, 12ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana 1995: 455

11. Walsh G. Biopharmaceuticals Biochemistry and Biotechnology. 2nd Ed. Great Britain: Wiley, 2003
12. National Center For Biotechnology Information [sede web] United States: National Library of Medicine [access 2011, Aug 8] Interleukine 2 molecular structure and receptor α, β, γ chains available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/?term=interleukin%202>
13. Silva A, Rebollo A. Estructura y función del receptor de IL-2. [revista en internet], 1994 Abril. [12 Septiembre de 2011]; 13 (2). Disponible: <http://revista.inmunologia.org/Upload/Articles/3/5/357.pdf>
14. Rho J; Lovie G. Handbook of Pharmaceutical Biotechnology, New York: Pharmaceutical Products Press; 2003.
15. Williams A, Transdermal and topical drug delivery (from theory to clinical practice). UK: Pharmceutical Press; 2003
16. J. M. Seddon, R. H. Templer. *Polymorphism of Lipid-Water Systems*: Handbook of Biological Physics. USA: Elsevier Science B.V, 1995
17. Torchilin P.V, Recent advances with liposomes as pharmaceuticals carriers. Drug discovery [Journal online] 2005, February 2005 [access 2011, Aug 22] available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db
18. Moshimi S. Passive targeting of solid tumors: Pathophysiological priciples and physicochemical aspects of delivery systems. In: Nanotechnology for cancer therapy. USA: CRC press, 2007: 12-16
19. Campbell B. Positively-charged liposomes for targeting tumor vasculature. In: Nanotechnology for cancer therapy. USA: CRC press, 2007: 614-22
20. NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos. Diario Oficial de la Federación, (03-08-1996).

21. International Conference On Harmonisation Of technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C; 4 version. Parent Guideline Dated November 30 1995.
22. Katzung B. Farmacología Básica y Clínica. 10ª Edición. México: Editorial el manual moderno ; 2007
23. Cook S. Clinical Studies Management a practical guide to success. USA: Interpharml CRC, 2004
24. Lee C. Development and Evaluation of drugs. USA: CRC Press LLC; 2003
25. Altamirano B. Manual de manejo de animales de laboratorio. México: Facultad de estudios superiores zaragoza; 1994
26. Cecilia Carbone, Fabricio Maschi. El ratón *nude (nu/nu)* como modelo animal de inmunodeficiencia. Química viva [revista en internet], 2006 Abril. [12 de Septiembre de 2011]; 1 (5). Disponible [http:// www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)
27. Corona M.T, Weiss S. B, Ibañez H. M, Baeza R. I, Rangel C. R, inventores; Ciudad de México. Composición de un Producto Antineoplásico e Inmunoregulador y su uso para el Tratamiento del Cáncer Cérvico Úterino. Patente Mexicana. Expediente: MX/a/2008/008681
28. Freshney R. Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique. 2nd Edition USA: Wiley-Liss, 1987: 57-78
29. Organización Mundial de la Salud. Encuesta Nacional de salud [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>] México: Mortalidad del Cáncer Cérvico Uterino y Mama [Actualizado 16 Mayo 2012; citado 2010]. [Aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: http://search.who.int/search?q=datos+del+cancer+cervico+uterino+en+mexico&ie=utf8&site=default_collection&client=es&proxystylesheet=es&output=xml_no_dtd&oe=utf8.

30. Nieves R. Enriqueta Reducción de tumores de carcinoma de cérvix inducidos en ratones singénicos de la cepa CBA/ca por la administración de IL-2 y proteínas de fusión encapsuladas en liposomas catiónicos [Tesis de Licenciatura]. México, D.F: FES Zaragoza, UNAM; 2002.
31. Polvsen, C.O. Status of Chemoterapy, Radioteraphy, Endocrine therapy and Immunotherapy studies of human cancer in the nude mouse. In "The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research" (J Fogh and B.C. eds.) New York: Academic Press, 1978.
32. European Medicines Agency [<http://www.ema.europa.eu/>] European Union: Agency of the European Union [Updated 2012 May 8]. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/landing/human_medicines_regulatory.jsp&mid=WC0b01ac058001ff89
33. Kelland L.R. "of mice and men": Values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. European J. of cancer. November 2003; (2004):827-35
34. Rangel-Corona R, Corona Ortega T, Soto-Cruz I, Arcos T, Torres-Guarneros, Weiss Steider B, et al. Evidence that cervical cancer secretes IL-2, which becomes an autocrine growth factor. J. of the International Cytokine Society. 2010; 50 (3): 273-277
35. Rangel-Corona R, Corona Ortega T, Ortiz I, Ramírez M, Bañuelos H, Tenorio O et al. Cationic liposomes bearing IL-2 on their external surface induced mice leucocytes to kill human cervical cancer cells *in vitro* and significantly reduced tumor burden immunodepressed mice. J, of drug targeting. 2010, (00): 1-7
36. Giovanella B.C, Yim S. O, Morgan A. C, Stehlin M.J, Williams L.J. Jr. Brief communication: Metastases of human melanomas transplanted in "nude" mice. JNCI, J. Natl. Cancer Inst. 1973, (50):1051