



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“Efecto de SabuCh en una vesícula liposomal sobre tumores de
Carcinoma de Cérvix, en un modelo murino.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

GLORIA ADALERI GONZÁLEZ AGUILAR

DIRECTORA DE TESIS :

M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA

MÉXICO, CDMX 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) Lab-4 P.B., de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Bajo la dirección de la Dra. Rosalva Rangel Corona y la asesoría de M en C. Edgar Ivan Torres Corioriles y M en C. Leonardo Trujillo Cirilo

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del Programa PAPIIT-IN222118 de la DGAPA, UNAM.



“Nadie puede construir un mundo mejor sin mejorar a las personas, cada uno debe trabajar para su propia mejora”

Marie Curie

Hasta siempre

Te acompañare hasta cuando nos duelan los pies de bailar....

...O hasta que la vida apague esta canción.

Edisson A.

IN MEMORIAM

Jorge Enrique González Mirraji

Enrique González López



Agradecimientos institucionales

A la Dra. Rosalva Rangel, por todos los conocimientos que compartió conmigo, por su paciencia y dedicación para sacar a flote este barco, por su entrega y compromiso para que cada uno de sus alumnos alcancen siempre el éxito.

A el M. en C. Leonardo Trujillo y al M. en C. Edgar Torres, dos extraordinarias personas, que me han ayudado a desarrollar cada parte de este trabajo, excelentes maestros y grandes amigos.

A el M. en C. Adrian Vargas, que me enseñó todos los conocimientos del equipo ratón y que siempre me acompañó y supervisó a lo largo de mi trabajo.

A el Dr. Benny Weiss Steider y a la Dra. Teresa Corona, dos ejes centrales en el funcionamiento del laboratorio, que me han brindado su apoyo y asesoría.

A la Dra. Adriana Altamirano y a todo el personal del bioterio, con quienes compartí mucho tiempo durante el desarrollo de este proyecto y que siempre estuvieron en la mejor disposición de ayudarme y enseñarme todo lo que necesitaba.

A la UNAM y especialmente a la FES Zaragoza que me formaron como estudiante y ahora como profesionista.

Al apoyo del Programa PAPIIT-IN222118 de la DGAPA, UNAM.



Agradecimientos

A mi Padre, Jorge González, el motor de cada sueño o meta que me propongo, a tantos desvelos y sacrificios que durante años hizo, a todas esas platicas y consejos para no rendirme a pesar que todo pueda parecer perdido, a cada momento que pasamos juntos, por tanta sabiduría y experiencia compartida, a todos los días que diste un poco más de ti por mi, a todas esas risas compartidas y también esas llamadas de atención que poco a poco me convirtieron en la mujer que soy. Gracias por tanto amor, “..la fe fuerte y hasta el final”.

A mi Madre, Carmen Aguilar, la luz de mis ojos, a tanta fortaleza y dedicación que demostraste conmigo y con mis hermanos, a tu paciencia y amor con la que nos fuimos encaminando para ser hombres y mujeres de bien, por ser mi mejor amiga y consejera de vida, por cada risa que hemos compartido, por todos tus sacrificios y tu entrega. La confidente de cada decisión que tomo, por ser la razón de seguir adelante cada día, gracias por ser mi motivación para realizar todo aquello que parece imposible, gracias por creer en mí.

A mi Papá grandote, a mi abuelito, Enrique González, gracias mi general por ser la primer persona que confió en mí para llegar muy lejos, por compartir conmigo esa hambre de conocimiento y aprender siempre uno del otro, por compartir la voz de la experiencia conmigo en esas largas charlas, a cada risa que compartimos. Gracias sobre todo por aquel último baile, en el que fuimos uno, sin importar lo que estaba pasando. Gracias por tanto amor, “...lo que mi hija tiene de chaparrita lo tiene de inteligente”.

A mi hermano, Jorge González, el hombre que nació para esto, por ser quien levantó la mano para dar la cara por los que fueron sus compromisos, que a pesar del dolor estás honrando la promesa de cuidar lo suyo, que no te has rendido aun cuando el peso es mucho y el apoyo es poco, gracias por tu esfuerzo y tu silencioso pero grande amor. Ya le demostraste que eres un hombre.

A mi hermana, Mireya González, la mujer que me inspira para ser mejor cada día, mi apoyo constante que cree en mí y en lo que hago, que compartimos risas, llantos y enojos, mi compañera de aventuras, la mujer que no me deja rendirme incluso cuando ella tampoco puede, juntas como los dedos de una sola mano.



A mis sobrinos, Alondra, Mabel y Uziel, las tres estrellas que alumbran mi mundo, que sacan la mejor versión de mí y me roban las más genuinas sonrisas, por creer en mí y verme con esas inocentes miradas de inspiración al creer que lo se todo, gracias por ser mis almas gemelas. Nos amamos con el corazón.

A mi cuñado, Gustavo Martínez, el mejor compañero no solo para mi hermana, sino para toda la familia, gracias por todo el apoyo que a lo largo de los años nos has brindado, por estar para mi como si fuera una hermana para ti, por las enseñanzas que hemos compartido, por las risas y las lágrimas que hemos derramado juntos, gracias por creer en mí.

A mis abuelitos que han partido años atrás. A mi tesoro Gloria Miraji, quien me lleno de amor y enseñanzas para entregar todo de mí en cualquier cosa que hiciera, por estar segura de que en mi se escondía la futura licenciada en la familia. A mi abuelita Tomasita Bonilla y a mi abuelito Agustín Aguilar, que sentaron las bases de mi educación con amor y ternura, que siempre me acompañan a cada paso.

A mi Miguelito y a su fiel escudera mamá Juanita, simplemente gracias por existir, por todas sus enseñanzas y pase lo que pase no dejarnos solos.

A mi compañero, Juan Pablo Monsivaiz, al incansable en cada batalla, que día con día has estado conmigo al pie del cañón, listo para enfrentar lo que se venga, que me recuerdas quien soy y motivas para llegar a ser la profesionista que siempre he soñado, por toda tu dedicación, entrega y devoción que me muestras. Gracias por este amor.

A mis amigas de esta hermosa carrera, Layla, Ingrid y Jessica, que día a día partimos con la mirada puesta en la misma meta, que nos apoyamos, aconsejamos y motivamos para dar siempre lo mejor de nosotras, por todas las enseñanzas académicas y de vida que hemos compartido. Lay, por mostrarme que con esfuerzo y dedicación puedes lograr todo lo que tengas en mente; Ingrid, por mostrarme que un nuevo comienzo es siempre posible y no tener miedo a los cambios; Jess, por mostrarme que la belleza está en cada persona sin buscar ser algo que no se es, por aprender a decir no, cuando es necesario. Hay que estar siempre juntas.



A mi cómplice en este cometido, Gabriela Zacarias, una mujer incansable, que con su gran hambre de aprender sin darse cuenta me ayudó más de lo que yo pude ayudarla, gracias por todo.

A los compañeros que forman el L-4, Rayadan (Ray), Adriana Guadalupe, Víctor, Janneth, personas increíbles que hicieron siempre ameno e interesante el laboratorio.



Dedicatorias

Este trabajo, todo el esfuerzo y años de dedicación que hay detrás, son en memoria y reconocimiento del hombre más importante en la vida de cualquier ser humano, papá como tú me enseñaste, las promesas se cumplen, hoy te entrego este compromiso, que tus enseñanzas en mi prevalezcan a través de los años, poder cumplir una a una todas las promesas que tenemos, para que el día que nos volvamos a ver, pueda mirar de nuevo tus ojos y decirte, lo logramos. Hoy a ti mi gran inspiración que aun con tu ausencia me sigues enseñando cual es el camino a seguir, te dedico este y todos mis logros. A todos los días que hoy nos separan, pero pronto nos volverán a unir. A ti amor mío, Jorge Enrique González Mirraji.

A mi mamá, todo lo que sembramos con tanto amor y dedicación, hoy nos entrega su primer fruto, todo en tu honor y en tu nombre.



ÍNDICE



Agradecimientos institucionales	4
Agradecimientos	5
Dedicatorias	8
1.RESUMEN	12
2. INTRODUCCIÓN	14
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1. Carcinoma de Cérvix (CC)	19
3.2. Virus del papiloma humano (VPH)	21
3.3. Muerte Celular	22
3.4. Apoptosis	23
3.5. Tratamientos contra el Cáncer	24
3.5.1. Terapias dirigidas	24
3.5.2. Inmunoterapia	24
3.5.3. Terapia hormonal	25
3.6. Productos Antiproliferativos naturales	25
3.7. Productos Antiproliferativos naturales marinos	26
3.8. Sargassum	27
3.9. Liposomas	31
3.10. Ratones Nude (nu/nu)	34
3.11. Perfil hepático y renal	35
3.12. Transaminasas	36
3.12.1. AST, Aspartato aminotransferasa	37
3.12.2. ALT, Alanina Aminotransferasa	37
3.12.3. Creatininas	37
3.13. Diagnóstico	38
3.14. Valores de referencia	38
4. Hipótesis	40
5. Objetivo	43
5.1. General:	44
5.2. Particulares:	44
6. METODOLOGÍA	45
6.1. Cultivo celular	46
6.2. Resiembra celular	46
6.3. Material Biológico	46
6.4. Disoluciones de Sargassum buxifolium (Chauvin) M. J. Wynne (SabuCh)	47
6.5. Cinética de proliferación	48
6.6. Síntesis de Liposomas	48



6.7. Modelo in vivo de tumores de CC	49
6.8. Sacrificio	50
7. Resultados	51
7.1. Obtener cultivos celulares de la línea INBL para un total de 72 x 10 ⁶ cel.	52
7.2. Estabilidad de la fracción 2 de SabuCh	53
7.3. Inducción de tumores en ratones hembra de la cepa nu/nu	54
7.4. Síntesis de liposomas catiónicos que encapsulan la fracción 2 del extracto de SabuCh.	56
7.5. Dosis de liposomas cargados con la fracción 2 de SabuCh en ratones hembra con inducción tumoral.	57
7.6. Efecto de los liposomas con la fracción 2 de SabuCh sobre las masas tumorales inducidas.	58
7.6.1. Grupo A: Testigo	59
7.6.2. Grupo B: Tumoral	59
7.6.3. Grupo C: LipVac.	60
7.6.4. Grupo D: LipSabuCh.	61
7.6.5. Grupo E: SabuCh.	62
7.7. Densidad tumoral	63
7.8. Perfil hepático y renal	65
7.9 Diagnóstico	69
8. Análisis de resultados	70
9. Conclusiones	76
Lista de figuras	78
Lista de gráficas	79
Lista de tablas	80
10. Referencias	81
Anexos	91
Preparación de reactivos y soluciones	92
Medio de cultivo RPMI 1640 (Roswell park memorial institute 1640)	92
Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)	93
Solución fisiológica de Verseno	93
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)	94
Azul Tripano	94
Cristal violeta al 0.1%	94



1.RESUMEN



El carcinoma de cérvix (CC) es la octava neoplasia más frecuente en la población mundial y la cuarta más frecuente entre las mujeres. En México el CC es la tercer causa de muerte femenil (Globocan, 2018) . La alta incidencia y mortalidad del CC requiere la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para tratar esta enfermedad. Los extractos de origen natural son una alternativa novedosa con un alto potencial terapéutico, en especial los extractos de diversos tipos de algas han mostrado resultados prometedores, las algas pardas se han caracterizado por tener efecto antifúngico, antibacteriano y antitumoral. Resultados previos del grupo de investigación del Laboratorio de Oncología Celular de la FES ZARAGOZA han demostrado que los extractos de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne. (SabuCh) tienen actividad antitumoral en líneas celulares CALO e INBL de CC. El extracto de SabuCh promete ser una alternativa terapéutica contra diferentes tumores, se requieren más estudios sobre su actividad y estrategias para mantener su estabilidad y administración. Una manera de mantener la estabilidad y la eficacia de diferentes moléculas antitumorales es el uso de liposomas.

Por tanto, en el presente trabajo se analizará el efecto de la fracción 2 del extracto de SabuCh encapsulado en liposomas catiónicos en un modelo *in vivo* de tumores inducidos con células de CC en ratones inmunodeprimidos de la cepa Nu/NU. El estudio de la actividad antitumoral de la fracción 2 del extracto de *Sargassum* encapsulado en liposomas nos permitirá demostrar la eficiencia en la regresión tumoral y su utilización como una alternativa terapéutica contra el cáncer.



2. INTRODUCCIÓN



El cáncer es la principal causa de mortalidad en el mundo, Globocan reportó que en el año 2020 se registraron 19, 292, 789 nuevos casos de cáncer (todos los tipos) de los cuales 9, 958, 133 fueron fatales. México se posicionó como el primer país con más muertes de América latina y el riesgo de padecer esta enfermedad ha ido incrementando considerablemente en los últimos años.

El término Cáncer hace referencia a cerca de 200 tipos de neoplasias establecidas en distintas entidades del cuerpo. El cáncer se define como un trastorno que causa un desequilibrio entre la proliferación celular y los mecanismos normales de muerte celular, el desequilibrio orientado hacia la proliferación puede llegar a formar masas tumorales destruyendo los tejidos adyacentes, así como diseminándose a órganos distantes deteriorando su funcionamiento y conduciendo a la muerte. (Granados, Rodríguez e Hinojosa, 2016).

El carcinoma de cérvix (CC) es una neoplasia multifactorial provocada por la transformación del epitelio escamoso-columnar del cuello uterino (D-zul, 2004). Es la cuarta más frecuente en la población mundial femenina, solo detrás del cáncer de mama, pulmón y colorrectal. Para el 2020 se reportó una incidencia de 604,127 nuevos casos de los cuales 341,831 fueron fatales (Globocan, 2020). En México el CC es la quinta neoplasia más frecuente en toda la población, la segunda más frecuente en la población femenina y también la tercer causa de muerte por cáncer entre las mujeres (Globocan, 2020). Por ello encontrar un tratamiento para esta enfermedad es de suma importancia.

Las terapias más comunes contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, estas últimas consisten en administrar un fármaco que tenga la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y/o provocar la muerte celular, el principio de acción de la mayoría de estos compuestos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula cancerosa en comparación con el de la células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no cancerosas que crecen y se dividen rápidamente como lo son las de la sangre (Loraine Schlaepfer & Mendoza-Espinoza José Alberto, 2010). Si la neoplasia es detectada a tiempo, tomando en cuenta otros factores como el sitio del tumor y el agente quimioterapéutico, el éxito de este tratamiento llega a ser del 20-60 % aunque hay tumores más quimiosensibles donde la eficacia se eleva hasta 80%



(Arango, 2018). Sin embargo, el daño a células sanas causa efectos físicos adversos; como la pérdida de cabello o la mutilación de partes del cuerpo (por ejemplo la pérdida de los senos en el cáncer de mama) y psicológicos: como el estado emocional, autoconcepto, autoestima y relaciones sociofamiliares en los pacientes (Mendez Villarraga, 2020). No obstante, no son las únicas estrategias contra el cáncer, en los últimos años han surgido más opciones que incluyen la terapia dirigida, la inmunoterapia, terapia hormonal y el uso de productos naturales antiproliferativos (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2019).

Los productos naturales antiproliferativos, parten de la obtención de compuestos químicos extraídos de plantas, que puedan tener efecto terapéutico y actúen específicamente en células tumorales, deteniendo su proliferación e induciendo muerte por la vía apoptótica, reduciendo así los efectos secundarios en el organismo; las plantas han sido y seguirán siendo una posible alternativa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que sirvan de base en el desarrollo de nuevos fármacos y México es una fuente interesante de estos recursos (Loraine Schlaepfer & Mendoza-Espinoza José Alberto, 2010).

El desarrollo de nuevos fármacos con origen en productos naturales, no solo consta en aislar los componentes activos, también busca un vehículo eficiente para transportarlos, los liposomas son nanovehículos usados para transportar sustancias ya que su composición está íntimamente relacionada con la de las membranas celulares. Los lípidos que los constituyen pueden ser de origen natural o sintético, y se caracterizan por presentar una parte polar y otra parte hidrófoba, que les confieren la capacidad de encapsular en su centro o portar en su superficie compuestos hasta su lugar de destino (Iturbe, 2018). Los liposomas se han administrado a través de todas las vías médicas, en este caso la vía intravenosa e intraperitoneal son las más usadas, pero suponen un paso forzoso por el hígado, así que para comprobar la estabilidad de la composición es necesario estudiar su toxicidad a través de un diagnóstico hepático y renal.

En este sentido las algas pardas, específicamente del género *Sargassum* han demostrado anteriormente tener propiedades antiproliferativas, la fracción 2 el extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (SabuCh) detiene el ciclo celular en la fase G1 e induce la expresión de los genes proapoptóticos



SMAC/DIABLO y bcl-2 para inducir la apoptosis de células de CC, lo que nos sugiere seguir estudiando este compuesto como potencial tratamiento contra el CC en un modelo *in vivo* usando como vehículo una composición liposomal.



3. MARCO TEÓRICO



3.1. Carcinoma de Cérvix (CC)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el 2018 hubo 570 000 nuevos casos de CC, que representaron el 7,5% de mortalidad por cáncer. De las 311,000 defunciones por CC que se registran cada año, más del 85% se producen en las regiones menos desarrolladas. El control integral del CC consiste en la prevención primaria; la vacunación contra los virus del papiloma humano (VPH), secundaria, detección y tratamiento de las lesiones precancerosas y terciarias, diagnóstico y tratamiento del CC invasivo y los cuidados paliativos. El CC es una enfermedad curable si se diagnostica en estadios tempranos.

En México el CC es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres (Globocan, 2020), presentándose principalmente entre mujeres con una vida sexual activa, con una mortalidad elevada en mujeres de edad avanzada. El CC es una enfermedad multifactorial de transmisión sexual aunque no exclusiva, el principal agente etiológico es el VPH (Zur Hausen, 1994; Lizano y García, 1997).

El CC es una enfermedad neoplásica maligna, resultado de una transformación celular en la unión escamocolumnar en el epitelio del cuello uterino (D-zul, 2004). La historia natural del CC implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras llamadas lesiones precursoras o pre malignas, las cuales son estrictamente intraepiteliales, es decir, se encuentran por encima de la membrana basal que separa el epitelio escamoso del estroma (D-zul, 2004). Se han determinado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo del CC, como el número de parejas sexuales, el inicio temprano de vida sexual activa, la multiparidad, etc. Sin embargo, el factor etiológico más importante para el desarrollo del CC son las infecciones persistentes con VPH, asociado en un 97.7 % de los tumores (Vázquez, 2005).

Una correcta evaluación del estadio en el que se encuentra el cáncer, es crucial para la elección y planificación de un tratamiento adecuado, por lo que el sistema TNM de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha sido integrado a los estadios aceptados por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (Álvarez, 2012).



Tabla 1: Estadificación de cáncer de cuello uterino de acuerdo a los criterios unificados de la AJCC y FIGO Tumor Primario (T)

Categoría TNM	Estadio FIGO	
TX		El tumor primario no puede evaluarse.
T0		No hay evidencia de tumor primario.
Tis*		Carcinoma <i>in situ</i> (carcinoma preinvasivo).
T1	I	Carcinoma cervical confinado al útero (la extensión al cuerpo no debe ser tomada en cuenta).
T1a**	IA	Carcinoma invasor diagnosticado sólo mediante microscopía. Invasión del estroma con una profundidad máxima de 5 mm y una extensión horizontal \leq a 7 mm. El compromiso del compartimento vascular, venoso o linfático no afecta la clasificación.
T1a1	IA1	Invasión estromal \leq 3 mm en profundidad y \leq 7 mm de extensión horizontal.
T1a2	IA2	Invasión estromal $>$ 3 mm y \leq 5 mm en profundidad, con una extensión horizontal \leq a 7 mm.
T1b	IB	Lesión clínicamente visible confinada al cuello uterino o lesión microscópica mayor que T1a/IA2.
T1b1	IB1	Lesión clínicamente visible \leq 4 cm en su mayor diámetro.
T1b2	IB2	Lesión clínicamente visible $>$ 4 cm en su mayor diámetro.
T2	II	Carcinoma cervical que invade más allá del útero, pero no compromete la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
T2a	IIA	Tumor sin invasión de parametrios.
T2a1	IIA1	Lesión clínicamente visible \leq 4 cm en su mayor diámetro.
T2a2	IIA2	Lesión clínicamente visible $>$ 4 cm en su mayor diámetro.
T2b	IIB	Tumor con invasión de parametrios, sin llegar a la pared pelviana.
T3	III	Tumor que se extiende a la pared pélvica y/o compromete el tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis o alteración de la función renal.
T3a	IIIA	El tumor compromete el tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica.
T3b	IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o alteración de la función renal.
T4	IVA	El tumor invade la mucosa de la vejiga o del recto y/o se extiende más allá de la pelvis (el edema buloso no es suficiente para clasificar un tumor como T4).

*FIGO ya no considera el estadio 0 (Tis). ** Todas las lesiones visibles macroscópicamente, aun con invasión superficial, son consideradas como T1b/IB.

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. Es por ello que se han implementado una amplia variedad de técnicas y métodos de diagnóstico clínico, como son la histopatología y métodos citológicos como el Papanicolaou, que buscan cambios en las células de la zona de transformación (Santiago-Cruz, 2014).



3.2. Virus del papiloma humano (VPH)

El VPH es un virus ADN de doble cadena que induce la proliferación de células epiteliales. Existen más de 100 tipos diferentes de VPH, alrededor de 40 son capaces de infectar el tracto genital. Cada tipo viral varía en cuanto a una porción de su genoma, permitiendo dividirlos en dos grupos; VPH de bajo riesgo, asociados a cambios benignos tales como condilomas, y los VPH de alto riesgo o también conocidos como oncogénicos. Los VPH de alto riesgo se han reportado en el 99% de las neoplasias cervicales intraepiteliales (NIC) y CC. Los VPH oncogénico más frecuentes son el VPH tipo 16 (50%), seguido por el VPH tipo 18 (12%), el VPH tipo 45 (8%) y el VPH tipo 31 (5%) (Alonso, et. al., 2000; Nazzal, et. al., 2006).

Los VPH oncogénicos incorporan su ADN dentro del genoma de las células humanas y bloquean la capacidad celular para reparar o destruirse (Figura 1).

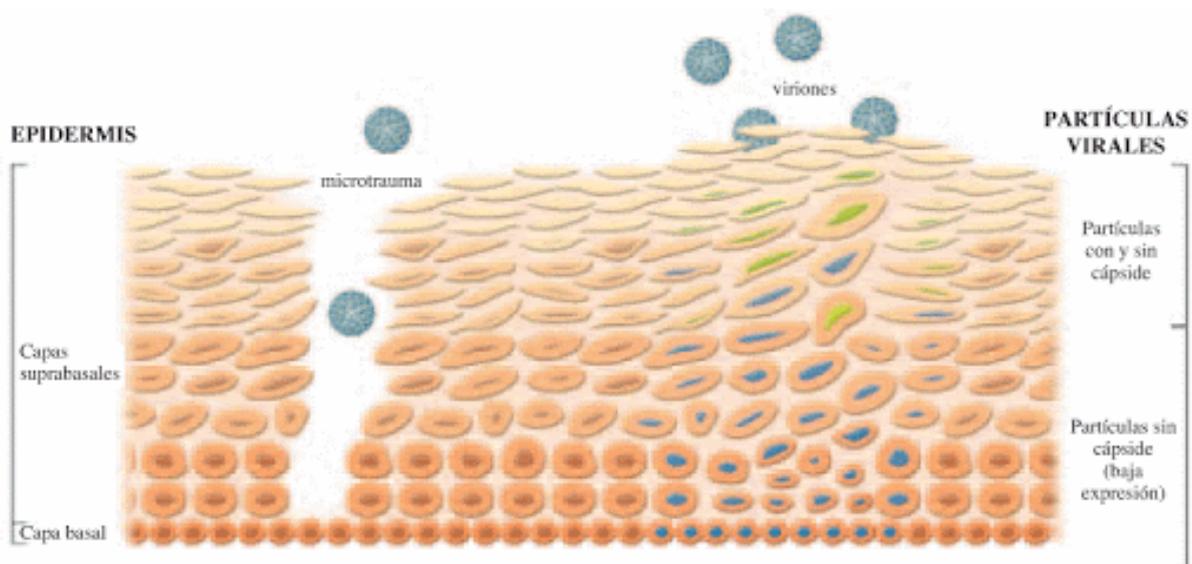


Figura 1: Ciclo vital del VPH

Un microtrauma en las capas suprabasales del epitelio de la unión escamocolumnar facilita la infección del virus en las capas basales, permaneciendo en situación episómica, con baja expresión. La replicación y expresión viral se produce en las capas superiores, induciendo alteraciones en el epitelio que incluyen papilomatosis, hiperqueratosis y coilocitosis. Las nuevas partículas virales se liberan con la descamación de las células más superficiales y diferenciadas del epitelio escamoso. Tomado de: (Diestro 2007 ;Lowy DR. et al. 2006)

Todos los VPH presentan distintas combinaciones de siete genes tempranos; E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7 y dos genes que codifican para proteínas tardías; L1 y L2



que se expresan sólo después de la infección y están implicadas en la formación de la cápside de los viriones. Los genes *E6* y *E7* de los VPH de alto riesgo son considerados oncogenes que favorecen el desarrollo del CC. La proteína *E7* es estructuralmente dinámica, es decir, sufre transiciones conformacionales que le permiten establecer una serie ordenada de asociaciones con distintas proteínas que participan en el control del ciclo celular. Uno de los procesos que dan origen a la transformación celular es la inhibición de pRb por la proteína *E7* de los VPH de alto riesgo (Lee Jo, 1998). La proteína pRb mantiene un bajo control del ciclo celular, ejerciendo una acción supresora sobre el factor de transcripción E2F, que cuando se encuentra libre promueve la expresión de numerosos genes involucrados en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. La proteína pRb se une a E2F y forma un complejo (pRb/E2F) que mantiene secuestrado este factor de transcripción durante la fase G1 del ciclo celular. La interacción de *E7* con pRb conduce a la disociación del complejo pRb/E2F, a la degradación subsecuente de pRb y a la activación prematura de E2F, lo que motiva que se encienda la transcripción de numerosos genes requeridos por la célula para entrar a la fase S. Entre los genes activados por E2F se encuentran los que codifican las ciclinas A y E y las cinasas dependientes de la ciclina (CDK2). Las ciclinas son proteínas que regulan la transición entre distintas fases del ciclo celular debido a su función como factores de activación de cinasas. (Vallejo, et. al., 2014). Por su parte, la oncoproteína *E6* interacciona con la proteína p53 y forma un complejo, p53 es un regulador de la estabilidad del ADN que induce apoptosis cuando hay un daño que no se puede reparar. La formación del complejo *E6/p53* induce la degradación de p53 vía proteosoma (Coico-Vega, 2018). Por un lado, *E7* favorece la proliferación celular y por otro *E6* inhibe la muerte celular por apoptosis (Santiago-Cruz, 2014).

3.3. Muerte Celular

La muerte celular constituye un aspecto esencial del funcionamiento normal de los organismos multicelulares. El mantenimiento de la homeostasis de estos organismos depende de un intrincado balance entre la renovación y la muerte celular. La muerte celular puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de



su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. (Lizarbe Iracheta, 2007). En este sentido la necrosis o muerte celular programada o apoptosis constituyen dos mecanismos básicos de muerte celular y pueden ser considerados como un extremo abanico de procesos que dirigen a las células no funcionales hacia su eliminación (Proskuryakov et al., 2003; Penaloza, et al., 2006)

3.4. Apoptosis

La apoptosis se puede definir como “el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos”. Este tipo de muerte se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva entre organismos tan diversos como los nematodos y los mamíferos. (Vaux, 1992; Hengartner, M.O., et al., 1994) La apoptosis es un proceso en el que aparecen múltiples eventos en diferentes momentos. La apoptosis se desencadena por: daño al ADN, citocinas, pérdida de la matriz extracelular, etc. Cuando hay algún daño celular o error en el ADN, la proteína P53 regula el proceso de reparación, sin embargo cuando no se puede corregir la célula es inducida a apoptosis. La apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de muerte celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, uno de los más importantes y mejor estudiados es el grupo de las cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Se han descrito 11 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La fragmentación del ADN en múltiples es una característica de la muerte celular por apoptosis. La detección de apoptosis ha adquirido gran importancia en el área del cáncer, ya que puede ser útil para conocer el mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad, efectividad de tratamientos, etc (Pérez-Machado, Lie-Concepción, 2012)



3.5. Tratamientos contra el Cáncer

Los tratamientos más comunes contra el cáncer son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, el uso de cada uno dependerá del tipo de neoplasia y estadio en el que se encuentre el paciente. Las opciones más recientes incluyen la terapia dirigida, la inmunoterapia, terapia hormonal y el uso de productos naturales antiproliferativos (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2019).

3.5.1. Terapias dirigidas

La terapia dirigida utiliza fármacos para evitar que el cáncer se desarrolle y se propague. En la terapia dirigida hay menos daño a las células normales que en otros tratamientos. La quimioterapia estándar trabaja al eliminar las células cancerígenas y algunas células normales. El tratamiento dirigido se concentra en objetivos o moléculas específicas en las células cancerígenas. Estos objetivos juegan un papel relevante en la forma en la que las células cancerígenas crecen y sobreviven. Utilizando estos objetivos, el medicamento incapacita a las células cancerígenas para que no puedan proliferar (American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2019).

Los medicamentos de terapia dirigida funcionan en formas distintas. Pueden:

- Apagar el proceso en las células cancerígenas que provoca que crezcan y proliferen
- Provocar que las células cancerígenas mueran por sí solas
- Eliminar las células cancerígenas directamente

3.5.2. Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento para el cáncer que depende del sistema inmunitario para combatir infecciones. Esta terapia utiliza sustancias producidas por el cuerpo o en un laboratorio para ayudar al sistema inmunitario a trabajar más duro



o de manera más enfocada para combatir el cáncer. Esto ayuda a su cuerpo a deshacerse de las células cancerígenas.

La inmunoterapia funciona al:

- Detener o frenar el crecimiento de las células cancerígenas
- Evitar que el cáncer se propague a otras partes del cuerpo
- Impulsar la capacidad del sistema inmunitario de eliminar las células cancerígenas

Estos fármacos se diseñan para buscar y atacar ciertas partes de una célula cancerígena. Algunos tienen toxinas o sustancias radiactivas unidas a ellos. La inmunoterapia se administra a través de una inyección o por vía intravenosa (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2019).

3.5.3. Terapia hormonal

La terapia hormonal se utiliza para tratar cánceres que son alimentados por hormonas, como el cáncer de mama, el cáncer de próstata o el cáncer de ovario. Esta terapia utiliza medicamentos para detener o bloquear las hormonas naturales del cuerpo. Esto ayuda a frenar el crecimiento de las células cancerígenas. La cirugía involucra extraer órganos que producen hormonas: los ovarios o los testículos. Los medicamentos se administran por vía intravenosa o como pastillas (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2019).

3.6. Productos Antiproliferativos naturales

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Estima que el 80% de las personas en regiones menos desarrolladas emplean la medicina tradicional con plantas para el cuidado de la salud. Muchos de los remedios tradicionales son fabricados a partir de plantas silvestres cuyo



contenido químico puede variar debido a razones genéticas o ambientales. (Loraine Schlaepfer, Mendoza-Espinoza J., 2010). El potencial de las plantas para curar la enfermedad es conocido desde siempre en todas las sociedades y este conocimiento ha sido aplicado en la medicina tradicional. El desarrollo de la química permitió el aislamiento de algunos de los elementos activos de las plantas y, en la mayoría de los casos, se pudo reproducir la actividad de los extractos crudos con la dosis equivalente del principio activo aislado (Sheng-Ji, P. 2001). Luego, se logró sintetizar estos principios activos o moléculas bioactivas estructuralmente relacionadas a él. De 1950 a 1970, se introdujeron en el mercado farmacéutico de Estados Unidos cerca de 100 nuevos fármacos antineoplásicos derivados de plantas, incluyendo la deserpidina, rescinamina, reserpina, vinblastina y vincristina. En épocas recientes, ha resurgido el interés por la medicina herbolaria y el desarrollo de fármacos a partir de especies vegetales como se observa en los estudios reportados recientemente para *Cleome gynandra* (Bala, A., 2010), *Oplopanax horridus* (Li X. L., 2010), *Cydonia oblonga* (Carvalho, 2010), *Sisymbrium officinale* Scop *Momordica charantia* (Ray R. B., 2010), etc., donde encontramos que el empleo de extractos vuelve a ser una opción para la búsqueda de fármacos con actividad citotóxica en la inhibición del crecimiento tumoral. (Loraine Schlaepfer, Mendoza-Espinoza J., 2010). Un estudio interesante es el trabajo descrito por el grupo de Pérez y cols. en 2010, donde llevaron a cabo estudios escalonados en pacientes con cáncer de seno en fase metastásica, para la dosificación de extractos de *Scutellaria barbata*, siendo un ejemplo claro de la sistematización científica que debe realizarse a los tratamientos de origen herbolario.

3.7. Productos Antiproliferativos naturales marinos

Las capacidades metabólicas y fisiológicas de los organismos marinos que les permiten sobrevivir en un hábitat complejo les confieren un enorme potencial para la producción de metabolitos únicos que no se encuentran en ambientes terrestres. Así, los organismos marinos y particularmente los invertebrados sésiles han sido reconocidos como una fuente atractiva de potenciales compuestos farmacéuticos (Faulkner, 2002). Entre estos organismos, las algas se reconocen también como



una de las fuentes más ricas en nuevos compuestos bioactivos de las cuales se han publicado varias revisiones sobre la actividad biológica de sus compuestos y derivados (Blunt *et al.*, 2006).

Con relación a su actividad para el tratamiento de cáncer, Yuan y Walsh (2006) demostraron una actividad antiproliferativa en los extractos de *Palmaria palmata*, *Laminaria setchellii*, *Macrocystis integrifolium* y *Nereocystis luetkeana* sobre la línea celular de CC HeLa (R Moo-Puc., D Robledo., & Freile-Pelegrín, 2009). También se ha encontrado que varias especies de algas marinas producen metabolitos secundarios con actividad antitumoral (Blunt *et al.*, 2006). Los polisacáridos extraídos de *Sargassum stenophyllum* y de *Capsosiphon fulvescens* inhibieron la migración y la viabilidad de las células de melanoma humano *in vitro* e *in vivo* (Díaz *et al.*, 2005) y la inducción de apoptosis en células gástricas humanas (Kwon y Nam, 2007). Algunos autores han comprobado que extractos de algas pardas tienen actividad antioxidante debido a su capacidad de captar radicales libres, la quelación de metales activos desde el punto de vista redox, los mecanismos de donación y aceptación de electrones, la capacidad de interrupción de la peroxidación lipídica y el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes (Yan *et al.*, 1998, 1999; Jiménez-Escrig *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002). Esta actividad a su vez pudiera explicar las propiedades neuro y hepato-protectoras que presentan algunos de estos extractos (Linares *et al.*, 2004; Raghavendra *et al.*, 2005). De Lara-Isassi (1991) estudió las propiedades antibióticas de veintiocho especies de algas marinas de tres localidades diferentes, dos de ellas en el Pacífico Mexicano, con el fin de tener representadas zonas templadas, tropicales y subtropicales, encontrando que las algas de zonas templadas presentan la mayor actividad antibiótica. Entre esas especies se encuentran *Dictyota flabellata*, *Macrocystis pyrifera*, *Spyridia filamentosa* y *Sargassum acinacifolium*. (Santiago, 2014)

3.8. Sargassum

El género *Sargassum* pertenece a la Familia Sargassaceae, del orden Fucales, de la Clase Phaeophyceae, constituye un grupo de macroalgas pardas que se encuentran distribuidas en casi todos los océanos del mundo. Cuenta con cerca de



550 especies, entre tropicales, subtropicales y templadas (Núñez y Casa, 1997, Suárez, 2008). Estas macroalgas pueden llegar a formar florecimientos masivos (bosques) y crecer en sustratos rocosos, fangosos y arenosos (Rivera y Scrosati, 2006; Rooker, et. al., 2006).

Entre los factores que determinan la distribución latitudinal de estas macroalgas se encuentran la temperatura y la luz, las cuales también determinan el crecimiento y la época de reproducción (Mateo-Cid, et. al., 1993). Este género presenta mayor crecimiento durante los meses cálidos en las zonas templadas y en los meses fríos en zonas tropicales y subtropicales (McCourt, 1984). En México el género presenta la mayor etapa de desarrollo entre marzo y junio, cuando la temperatura del agua es baja (20-25 °C), mostrando un período de rápido crecimiento y producción de un máximo de biomasa (Muñeton-Gómez y Hernández-Carmona, 1993).

El género *Sargassum* en México se encuentra bien representado a lo largo de sus costas, en el Golfo de México y en el Caribe; en la parte litoral del Océano Pacífico, incluyendo el mar de Cortés (Suárez, 2008). De las especies de *Sargassum* que rodean el Golfo de México se encuentran, *Sargassum vulgare*, *S. filipendula*, *S. fluitans*, *S. natans*, (Flores, 2010). Particularmente la especie *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (SabuCh), (Figura 2) se distribuye en los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán y Veracruz (Ortega, M. Martha, et. al., 2001).





Figura 2: Sargassum buxifolium (Chauvin)M. J. Wynne

Tomado de: *Sargassum hystrix* var. *buxifolium* Chauvin M. J. Wynne in GBIF Secretariat (2019)

Las algas pardas, especialmente las del Orden Dictyotales y Fucales, al cual pertenece el género *Sargassum* sp., son una fuente principal de diterpenos complejos y metabolitos con un origen terpenoide aromático, además de ácidos grasos y fenoles (Pesando, 1990). Martínez Nadal, et al., 1964, reportan que el complejo sarganin, que incluye a los dos compuestos denominados sarganin A y sarganin B descritos como ácidos grasos altamente volátiles, fue aislado de *S. natans* colectado en las costas de Puerto Rico, el cual presenta propiedades antibacterianas y antifúngicas de amplio espectro; los extractos crudos obtenidos con éter etílico de *S. johnstonii*, recolectados en la costa de la India presentaron los mayores halos de inhibición, en relación a los otros solventes utilizados, en contra de las bacterias Gram positivas y Gram negativas probadas (Padmini, et. al., 1986). Rao, et. al., 1987, reportan que las fracciones A y B de *S. johnstonii* exhibieron una mayor actividad antibacteriana en contra de bacterias Gram positivas y negativas que la actividad antibacteriana generada por un número de antibióticos conocidos. En este caso, la fracción A está constituida principalmente por esteroides, mientras



que la fracción B está constituida por ácidos grasos principalmente (Espinoza, Avalos, 1993).

Los fucoidanos son un grupo de polisacáridos sulfatados con abundante presencia en las paredes celulares de las algas pardas y otras especies marinas (Wang, Y. 2019). En general, la composición química de los fucoidanos de las macroalgas es muy compleja y varía mucho según la fuente de las algas, la ubicación geográfica y el proceso de extracción. Sin embargo, su columna vertebral estructural se compone de repetir α - (1 \rightarrow 3) enlaces l residuos -fucopyranose o alterna α - (1 \rightarrow 3) y α - (1 \rightarrow 4) enlaces l -fucopyranoses. Los residuos de fucosilo podrían estar mono o disustituidos con grupos sulfato y / o acetato en C-2 y C-4 o raramente en la posición C-3 (Hentati 2018). Además, junto con la cadena principal del fucosilo, una amplia gama de otros monosacáridos (manosa, galactosa, arabinosa, xilosa, glucosa, etc.), ácidos urónicos y proteínas también pueden formar parte de la estructura del fucoidan (Apostolova, *et al* 2020; Balboa, 2013).

Fucoidan ejerce su actividad no sólo in vitro sino también in vivo. Sin embargo, hay informes que indican niveles plasmáticos bajos de este polisacárido después de la ingesta oral (TOkita 2010). Por otro lado, también existe evidencia de un aumento de los niveles de fucoidan en determinados órganos. Nagamine *et al* (2015) informaron niveles más altos de fucoidan derivado de *Cladosiphon okamuranus* en el hígado de ratas alimentadas con fucoidan durante 2 semanas en comparación con los niveles respectivos en suero sanguíneo de los animales (Apostolova, 2020).

El tipo de formulación farmacéutica también podría influir en la farmacocinética del fucoidan. Según Kimura *et al.* (2013), la encapsulación de fucoidan en nanopartículas podría modificar su actividad citotóxica y este resultado está relacionado, al menos parcialmente, con una mayor permeabilidad. (Apostolova, 2020)

El mantener la estabilidad de los extractos naturales durante su almacenamiento es de suma importancia, ya que desde que se obtiene hasta que se procesa como fármaco de uso, pueden pasar desde días hasta meses, además poder conservarlos por más tiempo nos supondría una gran ventaja para producir a mayor escala, preservar íntegros los principios activos depende de cómo sea procesado el extracto, si se le adicionan conservadores, la temperatura de guardado o si requiere



un tratamiento especial. Se ha estudiado con más profundidad a las algas con fines alimenticios, así bien, tenemos como referencia que en el alga marina comestible hijiki (*Hizikia fusiformis*) las sustancias presentes permanecían estables, durante al menos un año, en la muestra sólida, almacenada en recipientes de poliestireno a 20 °C. Con respecto a los extractos acuosos de la misma alga, y para evitar su análisis inmediato, es recomendable su conservación a temperaturas de 4 °C, pudiendo emplearse tanto recipientes de poliestireno como de vidrio ámbar, durante un periodo máximo de una semana, tiempo a partir del cual algunos de los compuestos orgánicos dejaban de permanecer estables (García-Salgado, 2014).

Las investigaciones para desarrollar extractos naturales con estabilidad en el tiempo son escasas y la mayoría de ellas se centran en el efecto fitoquímico que ejercen los metabolitos secundarios sobre los sistemas y no sobre aquellos factores que afectan su estabilidad química (Montes, 2009). Sharapin (2000) sugiere que si se considera la composición química compleja de los extractos vegetales, se debe analizar y controlar el comportamiento de sus componentes durante el almacenamiento, considerando métodos de conservación efectivos para los principios activos que ellos contengan, para optimizar la calidad y tiempo de la fabricación de fármacos.

3.9. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas extraordinariamente pequeñas compuestas principalmente por fosfolípidos organizados en bicapa, conteniendo una fase acuosa en su interior, y está suspendida en una fase acuosa externa. (Figura. 3). Las nanopartículas basadas en lípidos catiónicos representan un vehículo accesible para ser empleado en vacunas, ya que además de poder encapsular antígenos proteicos con gran eficiencia, presentan biodegradabilidad y la posibilidad de ser suplementados con moléculas inmunoestimulantes (Torchilin, 2005; Mahapatro, Singh Dinesh, 2011).



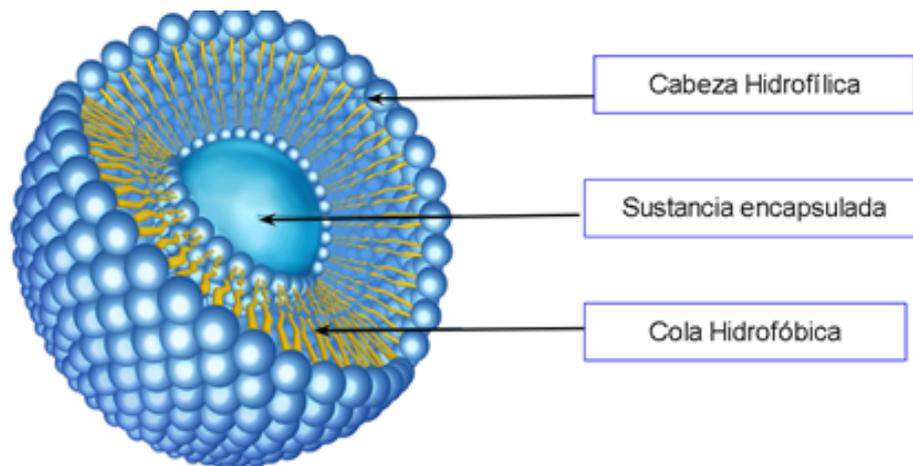


Figura 3: Composición de un Liposoma

Tomado y editado de: <https://www.zamnesia.es/blog-como-mejoran-los-liposomas-la-absorcion-de-cbd-n1522>

Estas moléculas pueden ser reconocidas por receptores inmunitarios presentes en células presentadoras de antígeno, como células dendríticas y macrófagos (Taken et al., 2007; Shimizu et al., 2007), lo que permitiría incrementar el reconocimiento antigénico. Las características de los liposomas modifican la farmacocinética del ingrediente activo encapsulado, mejorando la solubilidad, la biodisponibilidad y la estabilidad *in vitro* e *in vivo*. De esta manera, la sustancia permanece intacta, entregando el componente activo directamente a la célula.

A nivel sistémico, sólo son reconocidos los liposomas y no la molécula activa libre, de modo que el perfil farmacocinético del principio activo lo determinan las propiedades fisicoquímicas de los liposomas. Los sistemas liposomales pueden ser modificados en su composición para ajustar su afinidad por determinado sitio blanco. De este modo se aumenta allí la tasa de liberación del principio activo, disminuyendo los efectos secundarios ocasionados por la escasa liberación en otros tejidos. Este direccionamiento puede llevarse a cabo por procesos como la conjugación de anticuerpos o el diseño de liposomas con características particulares, como sensibilidad al pH (Navarro, 2008).

Una vez inyectados por vía endovenosa, los liposomas en circulación sanguínea son capturados principalmente por células del sistema retículo-endotelial (SRE). A diferencia de otros macrófagos fijos (peritoneales, bazo, médula ósea), la ubicación especial de las células de Kupffer (CK), intercaladas en el endotelio de los



sinusoides hepáticos, poseen óptima accesibilidad a los liposomas que circulan en el torrente sanguíneo. Por tanto, los órganos con mayor tasa de acumulación de liposomas, en términos de captura total y captura por gramo de tejido, son el hígado y el bazo. La abundancia de macrófagos (80-90% de los macrófagos fijos del cuerpo se hallan en el hígado y son las CK), su rica fuente de circulación sistémica y su accesibilidad son los motivos de la gran acumulación de liposomas en estos órganos (Sherphof, 1991; Navarro, 2008)

Cuando los liposomas acceden a su órgano blanco, las interacciones que se establecen con las células pueden clasificarse en cuatro categorías: a) intercambio de lípidos o proteínas con las membranas celulares; b) adsorción o unión (esto ocurrirá sólo después que el liposoma se una a la superficie celular); c) luego de la unión, la membrana del liposoma puede fusionarse con la membrana celular, y d) internalización por endocitosis o fagocitosis, siendo estas últimas las interacciones celulares más importantes que los liposomas entablan in vivo (Figura 4). Estas interacciones dependen fundamentalmente de la composición lipídica liposomal, el tipo celular y la presencia de receptores específicos, entre otros parámetros. La ruta intracelular seguida por los liposomas, luego de ingresar tanto por fagocitosis como por endocitosis, es la endolisosomal (Gregoriadis, 2001; Navarro, 2008).

Algunos liposomas se han diseñado para contener inmunógenos específicos que se han probado en el tratamiento del cáncer. Otros, además, se han usado para el transporte dérmico y transdérmico de componentes activos y también de manera oral, entre otros tenemos: analgésicos, antiinflamatorios, anti-arrugas, insulina, anti-cancerígenos (Hernandez, 2017).



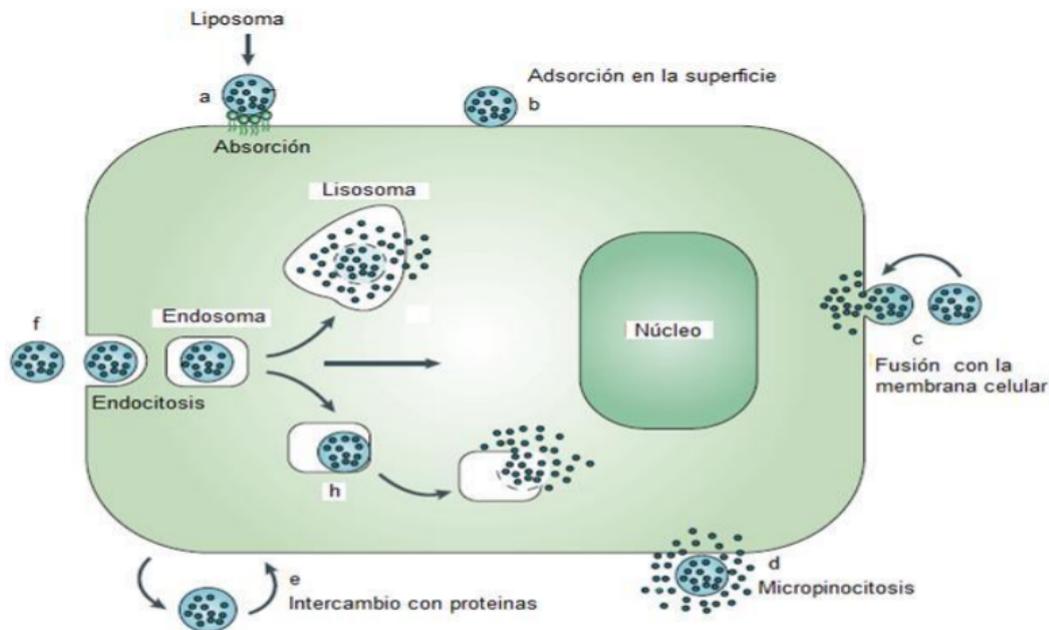


Figura 4 :Integración del liposoma y liberación del fármaco en la célula diana: a) Absorción; B) Adsorción; C) Fusión con la membrana celular; D) Liberación vía micropinocitosis; E) Endocitosis inespecífica; F) Entregado por la ruta del lisosoma y liberado en el citoplasma.

Tomado de: Acosta 2012 (Torchilin 2005)

Además se han buscado nuevos ligandos para la orientación de liposomas, se ha demostrado que varios anticuerpos monoclonales pueden dirigir liposomas a muchas dianas, la optimización de las propiedades de los liposomas es una preocupación constante. La mayoría de las investigaciones en este campo está relacionada con el cáncer, que utiliza una variedad de anticuerpos, para lograr una eficacia terapéutica mucho mayor con fármacos liposomales dirigidos a anticuerpos, como se ha demostrado con células de linfoma B y epítomos internalizables (CD19), por ejemplo se ha desarrollado un concepto interesante para dirigirse a los tumores con sobreexpresión de HER2 utilizando liposomas anti-HER242. El anticuerpo CC52 dirigido contra el adenocarcinoma de colon, se unió a liposomas PEGilados en un modelo de rata de CC531 metastásico. También se probaron anticuerpos específicos para nucleosomas , anticuerpos capaces de reconocer varias células tumorales a través de los nucleosomas unidos a la superficie de las células tumorales mejoraron la focalización de Doxil (Alza) en las células tumorales y aumentó su citotoxicidad. Los inmunoliposomas que contienen el nuevo fármaco



antitumoral fenretinida, y que se dirigen al GD2, indujeron la apoptosis en líneas celulares de neuroblastoma y melanoma, y demostraron una fuerte actividad antineuroblastoma tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones. Una combinación de inmunoliposoma y péptido disruptor del endosoma mejora la entrega citosólica del fármaco liposomal, aumenta la citotoxicidad y abre nuevas vías para la construcción de sistemas liposomales dirigidos; esto se demostró con la cadena de toxina diftérica que se combinó con el péptido fusogénico dependiente del pH, péptido diINF-7 en liposomas integrados específicamente dirigidos al carcinoma de ovario (Torochillin, 2005).

3.10. Ratones Nude (nu/nu)

Los ratones que portan una mutación simple se han convertido en modelos importantes para su utilización en la experimentación científica. Una de estas mutaciones espontáneas simples es la denominada nude (nu). Este alelo mutante homocigoto recesivo pertenece al grupo linkage VII del cromosoma 11 y aparece por primera vez en el año 1966 en una colonia ex criada de ratones en un laboratorio en Glasgow, Escocia. Luego, 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 alogénicos ni xenotransplantes (Cecilia Carbone & Fabricio Maschi 2006).





Figura 5: Ratón Nude (nu/nu)
Tomado de: Nude mouse (athymic mouse).

Los homocigotos para el gen nude (nu/nu) son inmunocomprometidos (Figura 5). Además de su deficiencia de linfocitos T, tienen un complemento normal de linfocitos B dependientes de la médula ósea, por lo tanto, estos animales se convirtieron en una herramienta excelente para estudiar el papel del timo en la diferenciación linfocitaria y para realizar investigaciones sobre las funciones de las células B, las interacciones con otras células y para estudiar la actividad de células inmunes como las Natural Killer (NK) que aparecen en niveles elevados junto con los macrófagos (Cecilia Carbone & Fabricio Maschi, 2006). Por su condición de inmunodeficientes, los ratones nude deben obligatoriamente mantenerse en ambientes en los que se hayan instalado barreras sanitarias estrictas.

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 animal de experimentación inmunodeficiente. Los roedores inmunodeficientes son modelos indispensables para las investigaciones biomédicas en estudios de oncología, inmunología, enfermedades infecciosas, estudios del sistema inmune, toxicidad y farmacocinética, dosis letal, rechazo de tejidos trasplantados, infecciones, cáncer y crecimiento de tumores.



3.11. Perfil hepático y renal

En la práctica clínica diaria, las múltiples funciones hepáticas sólo son superadas por los métodos bioquímicos diseñados para examinarlos. De forma esquemática, las pruebas funcionales hepáticas se pueden dividir en:

- a) Pruebas que informan sobre posible lesión hepatocelular o citólisis
- b) Pruebas relacionadas con el metabolismo de la bilirrubina (captación, conjugación y excreción), así como del estasis biliar (colestasis)
- c) Pruebas que analizan la síntesis hepática de sustancias necesarias para el funcionalismo corporal. Generalmente suelen alterarse varias de estas funciones al mismo tiempo, aunque hay formas aisladas con afectación única (Garcia & Zurita 2010).

Entre las pruebas que informan de lesión hepatocelular o citólisis destacan las transaminasas o aminotransferasas. Éstas representan enzimas del metabolismo intermedio, que catalizan la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o alanina al ácido acetoglutárico, formando ácido oxalacético y ácido pirúvico. En el hígado se producen múltiples reacciones de transaminación, pero las únicas transaminasas con valor clínico son dos: 1) aspartato-aminotransferasa o transaminasa glutámico oxalacética (AST o GOT) cuya vida media es de 48 horas, y 2) alaninoaminotransferasa o transaminasa glutámico-pirúvica (ALT o GPT) con una vida media de 18 horas. La ALT es más específica de daño hepático que la AST, debido a que la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, además del citosol y mitocondria, se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos. La elevación sérica de transaminasas se correlaciona con el vertido a la sangre del contenido enzimático de los hepatocitos afectados, aunque la gradación de la elevación enzimática puede no relacionarse con la gravedad lesional. Así, pues, se puede considerar la enfermedad hepática como la causa más importante del aumento de la actividad de la ALT y frecuente del aumento de la actividad de la AST. (Garcia & Zurita 2010)



3.12. Transaminasas

Las transaminasas son proteínas o catalizadores químicos de origen biológico esenciales para la vida, permiten que se produzcan numerosas reacciones bioquímicas en las células corporales, conjugadas y sintetizadas por células de diferentes tejidos hepático, miocárdico, renal y muscular estriado. La causa de los incrementos de los valores normales del mecanismo fisiológico son estas enzimas transaminasas séricas. Cuando ocurre daño a nivel de muchas células activas de esos tejidos, como resultado de un proceso patológico, pasan a la sangre cantidades de enzimas transaminasas, por lo tanto se elevan las concentraciones por encima de sus valores normales o fisiológicos (Ganon, 1994).

Estas transaminasas se encuentran dentro de las células y cuya función es catalizar las reacciones de transaminación, cuando una célula es dañada y destruida las transaminasas plasmáticas se elevan por encima de sus valores normales o fisiológicos, indicando la existencia de un problema en la población celular de donde es originaria (SONCCO, 2019).

3.12.1. AST, Aspartato aminotransferasa

El aspartato aminotransferasa (AST). Sus sinónimos son; L-aspartato-2-oxoglutarato aminotransferasa, transaminasa glutámico oxalacético (TGO). Cataliza la transferencia de un grupo amino de un aminoácido L-glutamato o – L- aspartato a cetoácidos, cetoglutarato u oxaloacetato; esta reacción se lleva a cabo para proporcionar nitrógeno al ciclo de urea (Hicks, 2007). Su peso molecular es de 110000 Dalton; Los tejidos más ricos de AST son: corazón, hígado, músculo, riñón, cerebro, páncreas, eritrocitos, leucocitos, pulmón y bazo (Profeti, 2005).

La presencia elevada de la AST sérica se observa en necrosis del músculo esquelético y cardíaco y en la necrosis hepática. Cuando la elevación de la AST sérica no va acompañada de la elevación de ALT indica necrosis muscular (Sodikoff, 1996).



3.12.2. ALT, Alanina Aminotransferasa

Alanina aminotransferasa (ALT), sus sinónimos incluyen: L-alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa o transaminasa glutámico pirúvico (TGP) su peso molecular es de 100 Dalton; cataliza la transferencia de un grupo amino de la L-alanina o L-glutamato de los correspondientes cetoácidos, cetoglutarato y piruvato; esta reacción proporciona nitrógeno al ciclo de la urea. Es una enzima citoplasmática, dimérica cada subunidad tiene un peso molecular de 50 mil Dalton (Hicks, 2007). La ALT está presente en cantidad elevada en el hígado y en pequeña cantidad en el músculo, en el corazón y en el riñón. (SONCCO, 2019)

3.12.3. Creatininas

Es un compuesto formado por la degradación del ácido orgánico nitrogenado, creatina (producida a partir de aminoácidos en el riñón, hígado y páncreas, 50% almacenada en el músculo), que produce energía mediante la regeneración de adenosín trifosfato (ATP). La creatinina es un producto de desecho de la actividad muscular influido por la masa, la actividad muscular y el consumo de creatina (carne), además de algunos medicamentos (cimetidina y trimetoprima inhiben la secreción de creatinina) (K DOQI, 2002). Este producto es detectable en la sangre y normalmente es eliminado por la orina, mediante su filtrado libre en el glomérulo y secreción en el túbulo proximal. La determinación de creatinina sérica es el estudio de elección para evaluar la correcta función de los riñones, (National Kidney Foundation), cuyo aumento de su concentración indica deficiencias en la filtración. Se utiliza para estimar el daño renal agudo en conjunto con la determinación de nitrógeno ureico. (López-Heydeck, 2018).

3.13. Diagnóstico

Ciertas enzimas, proenzimas y sus sustratos se encuentran siempre en la circulación de los animales normales, por ejemplo tenemos a las transaminasas, en valores de 1 millón de veces inferiores que en los tejidos. Su presencia en el



plasma, en cifras mayores que los valores normales sugiere una velocidad aumentada de destrucción tisular. La medición de las transaminasas puede por lo tanto constituir para una prueba valiosa de diagnóstico y pronóstico de enfermedades metabólicas hepáticas, cardíacas y óseo. (SONCCO 2019). Finalmente indica que la concentración de los valores normales o fisiológicos de las transaminasas en la circulación sanguínea se debe a la destrucción rutinaria normal fisiológica de los eritrocitos, leucocitos y otras células (Murray, 1992).

En general, puede decirse que cuanto mayor sean los niveles enzimáticos séricos, mayor es la lesión celular en intensidad, aunque de esto no se puede inferir exactamente la extensión del daño y si este es o no irreversible. (Alarcon, 2009).

3.14. Valores de referencia

Fabry (2009). Realizó un estudio en medicina de animales no tradicionales en la Universidad Nacional de Chile, con el objetivo de determinar los parámetros bioquímicos normales para mamíferos seleccionados: los resultados fueron, para hámster los valores normales para fosfatasa alcalina es de 3.2 – 30.5 UI/L, alanina transaminasa ALT 11.6 – 35.9UI/L, aspartato transaminasa AST es de 37.6 – 168 UI/L, proteínas totales 5.9 – 6.5g/dl/L. Para conejos proteínas totales 5,4 – 7.5 g/L, urea 17 -- 23.5 mg/L y creatinina 0.8 -- 1.8 mg/L. Para ratas fosfatasa alcalina 41 ± 5 UI/L, alanina transaminasa TGP 108 ± 19 UI/L y aspartato transaminasa TGO 83 ± 18 UI/L. Leon-Goñi (2011) reporta los parámetros bioquímicos de Creatininas en hembras por rango de semanas de edad 5-8, 9-14 y 15-22 para los cuales determina la concentración de Creatinina (mg/dL) 0.23 – 0.80, 0.5 – 0.92 y 0.48 – 0.68 respectivamente



4. Hipótesis



Se sabe que la fracción 2 del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (SabuCh) inhibe la proliferación de la línea celular de carcinoma de cérvix INBL. La fracción 2 del extracto de *Sargassum* detiene el ciclo celular en la fase G1 e induce la expresión de los genes proapoptóticos SMAC/DIABLO y bcl-2 para inducir la apoptosis de células de CC. Se ha demostrado que el uso de liposomas catiónicos permite mantener y dirigir diferentes moléculas a masas tumorales en modelos *in vivo*. Por tanto, si encapsulamos la fracción 2 del extracto de SabuCh en liposomas catiónicos disminuirá y se inhibirá el crecimiento de tumores de CC en un modelo *in vivo*.



5. Objetivo



5.1. General:

Analizar el efecto de liposomas catiónicos conteniendo la fracción 2 del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (SabuCh), en el crecimiento tumoral inducido por células de Carcinoma de cérvix en ratones de la cepa nu/nu.

5.2. Particulares:

1. Obtener cultivos celulares de la línea INBL para un total de 76×10^6 cel.
2. Comprobar la estabilidad de la fracción 2 de SabuCh mediante su IC50
3. Inducir tumores en ratones hembra de la cepa nu/nu
4. Sintetizar liposomas catiónicos que contengan la fracción 2 del extracto de SabuCh.
5. Administrar dosis de liposomas cargados con la fracción 2 de SabuCh en ratones hembra con inducción tumoral.
6. Observar el efecto de los liposomas con la fracción 2 de SabuCh.



6. METODOLOGÍA



6.1. Cultivo celular

La línea Celular INBL se cultivó en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), previamente inactivado, en botellas de cultivo de 75 cm³ y de 500 cm³. Los cultivos se incubaron a 37°C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmósfera húmeda saturante al 5 % de CO₂.

6.2. Resiembra celular

Una vez que las células dentro de las cajas de cultivo alcanzaron un 80% de confluencia se realizó una resiembra (de lo contrario las células podrían morir). Para esto se debe retirar el medio de las cajas y realizar de 2 a 3 lavados con PBS. Posteriormente se despegaron usando verseno y se centrifugaron a 1500 rpm, 5 minutos, una vez finalizado el tiempo se desechó el sobrenadante y se mantiene el botón celular. El botón de células se homogeneizó con medio, en la caja se agregó medio al 10% de SFB y medio acondicionado. Finalmente se agregaron las células previamente resuspendidas, a la caja de cultivo que está en uso y a una nueva, para que ambas queden aproximadamente al 40% de su capacidad. Estas cajas se volvieron a introducir en la incubadora, este procedimiento se repite hasta tener una caja de 500cm³ llena para obtener alrededor de 76x10⁶ de células INBL para ser inoculadas en los individuos de cada grupo experimental.

6.3. Material Biológico

De acuerdo a lo reportado anteriormente por Luna-Cruz, 2012 el alga *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne, fue colectado en playa “Los Muñecos”, Veracruz en temporada de secas en el mes de abril. La determinación taxonómica se llevó a cabo en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, una vez confirmado que se trataba de la especie de interés se realizó el extracto etanólico, todo este proceso se realizó bajo la dirección y supervisión de la Dra. Alejandrina G. Ávila Ortíz. Para este extracto se realizó una separación de los carotenoides para después fraccionarlo de acuerdo a la proporción de carotenos y xantofilas, obteniendo así 20 eluatos (Figura 6) (Luna-Cruz,2012)



Las 20 fracciones obtenidas se mantuvieron en refrigeración, separadas cada una en un tubo eppendorf de 10µl protegidas de la luz, ya que los productos obtenidos del alga son fotosensibles.

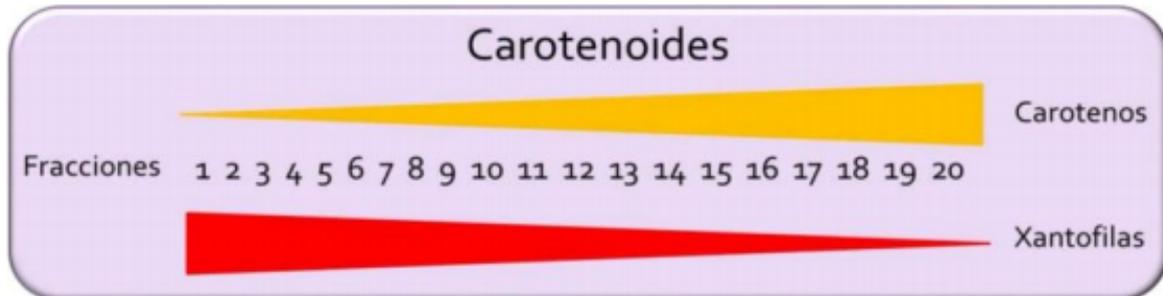


Figura 6: Proporción de carotenos y xantofilas por fracción del extracto de SabuCh
Tomado de : Luna-Cruz 2012

Las fracciones obtenidas han sido probadas anteriormente en las líneas de CC CALO e INBL para obtener la IC₅₀, para cada una de ellas, se reportó así que 5 fracciones eran las más activas, de las cuales la fracción 2 presenta una actividad mayor a una menor concentración (Luna-Cruz 2012), por tal motivo esta fracción se utiliza actualmente dentro del laboratorio para ambas líneas.

6.4. Disoluciones de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (SabuCh)

Se tomó la fracción 2 (F2) y se pesaron 0.0066 g en una balanza analítica, se le agregaron 10µl de DMSO, para disolver, esto nos resulta una dilución inicial de 0.66mg/µl.

Se partió de la solución anterior para obtener una solución stock, tomando los 10µl de SabuCh+DMSO y agregando 200µl de medio RPMI 1640 sin suero, de esta dilución se obtuvo una concentración de 0.0314mg/µl.

Por último se preparó una solución a 0.0000739mg/µl, se tomó una alícuota de 2.1µl de la solución stock y se le agregaran 888.9 µl de medio RPMI 1640 sin suero.



6.5. Cinética de proliferación

Se contaron las células con ayuda de una cámara de Neubauer para ser sembradas en una placa de 96 pozos, en cada uno se colocaron 10×10^4 células con medio RPMI 1640 al 10% con SFB. Se evaluaron los pozos que contenían células cultivadas en presencia de la solución $0.0000739\text{mg}/\mu\text{l}$ de la fracción 2 del extracto de SabuCh y como control células cultivadas sin el extracto, durante 72 horas.

Después de ese tiempo para calcular la densidad celular la placa se leyó por espectrofotometría mediante la técnica de cristal violeta, que consta de la fijación de las células presentes en la placa con glutaraldehído al 1.1% durante 20 minutos para proceder a hacer un lavado con PBS y después teñir con cristal violeta por 20 minutos, finalmente la placa se leyó con un lector Elisa a una absorbancia de 590 nm.

Una vez obtenidas las lecturas, fueron graficadas y se realizaron los análisis estadísticos para saber con certeza si el comportamiento del extracto es significativo o no lo es.

6.6. Síntesis de Liposomas

Liposomas vacíos; procesamiento maestro para liposomas catiónicos. Lote: PNO-LOCE-A 071020

Liposomas con la F2 de SabuCh; procesamiento maestro para fabricación de liposomas catiónicos que contienen fitol. Lote: PNO-LOCE-A 071020.

Los liposomas catiónicos se prepararon mezclando en proporción 1:1 Molar un lípido catiónico y un fosfolípido, en cloroformo, en el caso de los liposomas con SabuCh se añade fitol, posteriormente el cloroformo fue evaporado con flujo de nitrógeno, se agregó PBS y se llevó a 3 ciclos de sonicación, por último se resuspendió en PBS y se fraccionó en tubos Eppendorf nuevos y estériles llenados hasta tope para no dejar entrar aire. (Corona, M.T. *et al*). Título de patente: 330174

6.7. Modelo *in vivo* de tumores de CC

Los ratones nu/nu se mantuvieron en condiciones de bioherio estéril, con agua y



comida *ad libitum* y se dejaron con periodos de luz y oscuridad de 12 horas. Se pesaron y colocaron 3 individuos por jaula según el grupo experimental al que pertenecían en este caso fueron 5 grupos:

- A. Testigo ambiental (Testigo)
- B. Tumores
- C. Tumor + Liposomas vacíos (LipVac)
- D. Tumor + Liposomas + F2 de SabuCh (LipSabuCh)
- E. Tumor + SabuCh libre (SabuCh)

Para manejar correctamente a los ratones, se debe de estar calmado y en un ambiente tranquilo para ellos, así se evita que los animales se pongan nerviosos y se estresen, lo cual dificulta el trabajo. Se debe dominar la técnica de sujeción y manipulación de animales de laboratorio, con esta técnica se puede sujetar al animal con una mano y tener la otra mano disponible para trabajar.

Para llevar a cabo la inducción de los tumores, se cargaron jeringas con 6 millones de células INBL en 300 μ l de PBS, la inoculación se hizo mediante una inyección intraperitoneal en un ángulo de 45° en el área abdominal a la altura de los pezones, sin tocarlos, y sin tocar la parte media del abdomen, se dejaron 20 días para que las células establecieran las masas tumorales y durante este tiempo fueron minuciosamente monitoreadas, supervisando su salud visible. Una vez transcurrido el tiempo se dio el tratamiento determinado a cada ratón, dependiendo el grupo experimental al que pertenecían, las jeringas se cargaron con 300 μ l de Liposomas con SabuCh, Liposomas vacíos o SabuCh libre y se aplicó según era el caso.

6.8. Sacrificio

Se anestesió cada ratón con una cámara de éter y se tomó una muestra de sangre



de cada individuo mediante un corte axilar que nos dejó tener acceso a la vena cava superior, una vez expuesta se colocó el tubo recolector sin anticoagulante y se cortó la vena para aprovechar el flujo sanguíneo y drenar la mayor cantidad de sangre, una vez que el ratón se queda sin sangre fallece, se confirmó el deceso mediante dislocación cervical. Se procedió a la disección del cadáver y la recuperación y medición del diámetro de los tumores presentes en los cuerpos, los tumores se fijaron en una solución Bouin al 1% y posteriormente pasaron por una escala de alcoholes para su conservación. La sangre obtenida fue centrifugada a 1.600 g durante 10 minutos para recuperar el suero, se enviaron a analizar si hay daño renal o hepático mediante el perfil AST, ALT y Creatininas en el laboratorio de patología clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia FMVZ.

Por último se calculó la densidad tumoral por grupo experimental con la media de los tumores, mediante la fórmula del volumen de una esfera y se realizó un análisis estadístico ANOVA para determinar y comparar estadísticamente los resultados obtenidos por grupo.



7. Resultados



7.1. Obtener cultivos celulares de la línea INBL para un total de 72×10^6 cel.

Las línea celular fue obtenida del banco de criopreservación del Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ en la FES Zaragoza. Las células de la línea de CC. INBL (estadio IV metastásico) fue descongelada del banco de criopreservación del Laboratorio de Oncología Celular y cultivada en medio RPMI 1640 suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB) (Figura 7).

Las células fueron contadas con ayuda de una cámara de Neubauer y se realizó la prueba de viabilidad mediante Azul tripano. Se obtuvo un total de 74×10^6 de cel. INBL presentes en 20 ml de PBS, divididas entre los 12 ratones a inocular, nos da un total de 6×10^6 de cel INBL para cada uno, como se había establecido. Así que las células se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 3.6 ml de PBS necesarios para cargar cada una de las jeringas con 300 μ l de la solución celular.

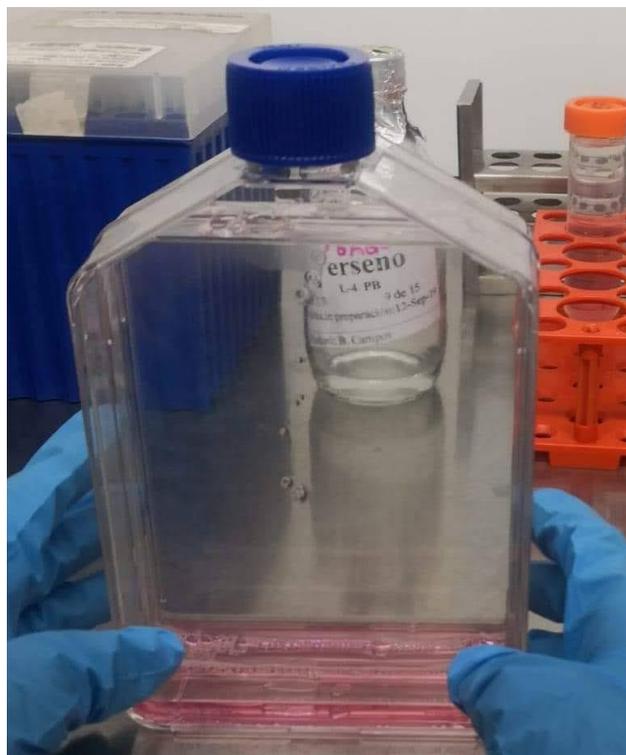


Figura 7 : Botella de cultivo de 500cm² con medio



7.2. Estabilidad de la fracción 2 de SabuCh

Los productos liofilizados obtenidos del extracto de SabuCh se mantienen estables y se conservan en buenas condiciones, sin señales de alguna contaminación o sin rastro de descomposición a pesar de que fueron sintetizados en el año 2012. La fracción 2 (F2) se disolvió completamente de acuerdo con lo reportado en ese año.

Se probó la estabilidad del efecto antiproliferativo de la F2 mediante la IC_{50} realizando varias cinéticas de proliferación, comparando células INBL no estimuladas con células INBL cultivadas en presencia del extracto de SabuCh 0.0000739mg/ μ l.

Se observó cada pozo de la placa, se notaba que las células control tenían una morfología normal (empedrada), se veían la mayoría de ellas adheridas al fondo de forma uniforme y las flotantes (es decir las muertas) eran menos, (Figura 8 A); por lo contrario las células estimuladas con el extracto (Figura 8 B) tenían una morfología globosa, la mayoría se encontraban flotantes en el medio, y las pocas que se mantenían adheridas lo hacían en la periferia del pozo.

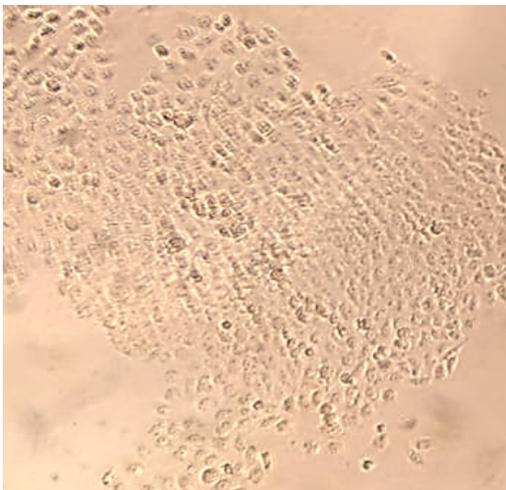
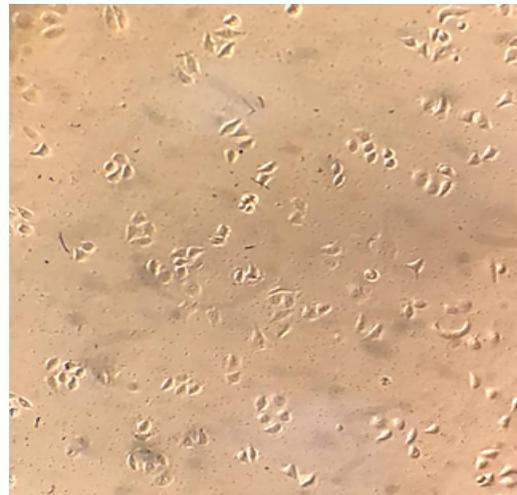


Figura 8 A: células INBL



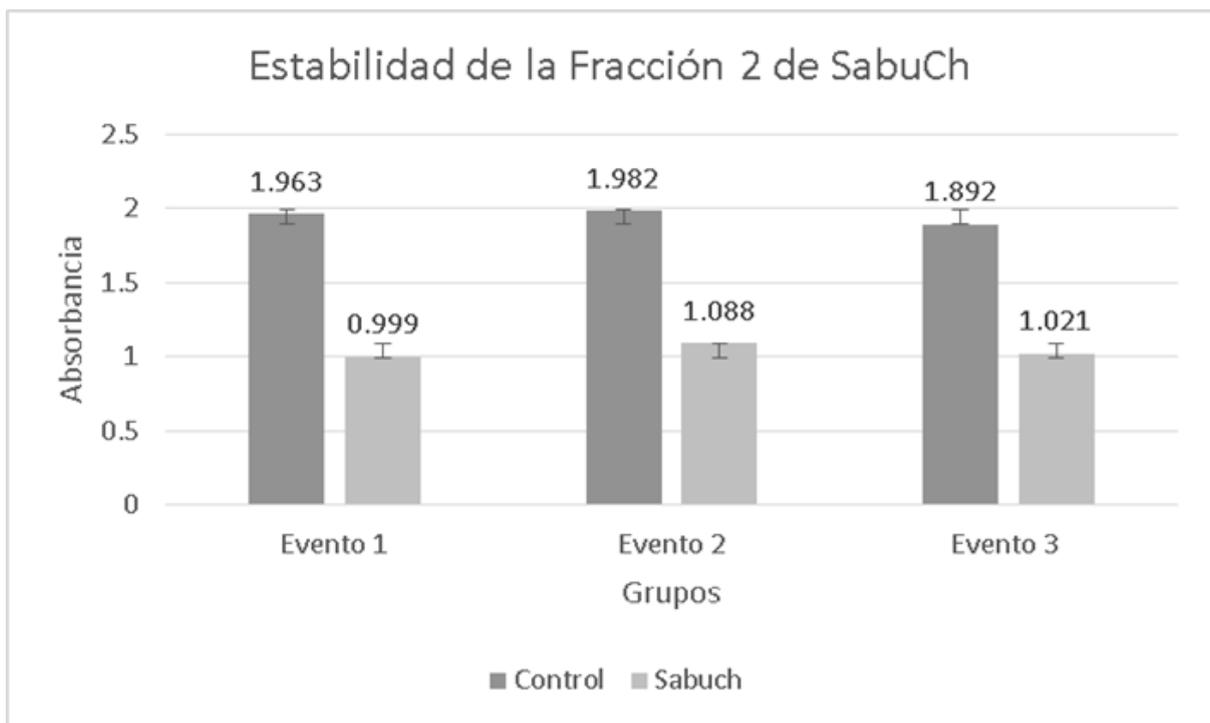
B : células INBL con F2 de SabuCh

En la gráfica 1 podemos observar que los pozos control mantienen una proliferación similar, cerca de dos unidades de absorbancia, y muestra que las células están creciendo de manera normal, mientras que en las células tratadas con la F2 de SabuCh que están cerca de una unidad de absorbancia, hay una disminución aproximadamente de la mitad de las células, con respecto al control, lo que



demuestra el decaimiento del ritmo de proliferación ya que como se sabe, la fracción 2 del extracto de *Sargassum* detiene el ciclo celular en la fase G1 e induce la expresión de los genes proapoptóticos SMAC/DIABLO y bcl-2 para inducir la apoptosis por lo tanto el ciclo celular se detiene y las células son enviadas a muerte.

Gráfica 1: Estabilidad de la fracción 2 (F2) de SabuCh



Eje x= Número de eventos (repeticiones) de la prueba de estabilidad, Eje y= absorbancia

7.3. Inducción de tumores en ratones hembra de la cepa nu/nu

Los ratones nu/nu hembra de 20 semanas de edad con certificado de salud se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, a su llegada se condicionaron durante dos semanas previas a la inoculación y fueron mantenidas en condiciones de bioterio esteril, con agua y alimento *ad libitum* previamente esterilizado, en jaulas Ancares con camas de



aserrín, filtro Ancar y rejillas también estériles.

Los grupos experimentales fueron divididos por jaula con 3 individuos cada una, debidamente etiquetadas, con información perteneciente al grupo experimental que fue analizado, con las semanas de edad de las ratonas. (Figura 9).



Figura 9: Distribución de jaulas

Cada individuo fue pesado y se les colocó de una a tres marcas de la base de la cola hacia arriba, asignando un número de identificación (uno, dos o tres), conjugado con un número de identificación propio (ID Ratón), de la base de datos del Laboratorio 4 de Oncología Celular de experimentación con Animales, para monitorearlos durante todo el proceso (Tabla 1). Finalmente se inyectó a 45° intraperitonealmente a cada ratón con 6×10^6 células INBL (figura 10).



Tabla 2: identidad de ratones nu/nu

Grupo	No. Ratón	ID. Ratón	Peso inicial (g)
A	I	2152	24.76
	II	2153	26.45
	III	2154	24.90
B	I	2154	26.21
	II	2155	27.57
	III	2156	26.77
C	I	2157	27.41
	II	2158	22.03
	III	2159	27.50
D	I	2160	26.45
	II	2161	27.24
	III	2162	27.11
E	I	2163	24.51
	II	2164	25.56
	III	2165	24.31



Figura 10: A) Marcaje



B) Pesaje



C) inoculación



7.4. Síntesis de liposomas catiónicos que encapsulan la fracción 2 del extracto de SabuCh.

Se fabricaron 5 ml de Liposomas vacíos (Lote: PNO-LOCE-A 071020) bajo el procesamiento maestro para la fabricación de liposomas catiónicos y 5ml de liposomas con SabuCh encapsulado a 3 μ M (Lote: PNO-LOCE-A 071020) bajo el procesamiento maestro para liposomas que contienen fitol, procedimiento con título de patente número: 330174. Se mantuvieron en refrigeración a 4°C antes de su uso. Se colocó la dosis determinada de Liposomas Vacíos, Liposomas que contienen la F2 de SabuCh y la F2 de Sabuch libre 0.0000739mg/ μ l, en jeringas para insulina de 1ml, en condiciones estériles y se transportaron en cajas de unicef cerradas hacia el bioterio para su aplicación.

7.5. Dosis de liposomas cargados con la fracción 2 de SabuCh en ratones hembra con inducción tumoral.

Se administraron 300 μ l con la dosis de Liposomas Vacíos a las sujetos del grupo C: LipVac 300 μ l con la dosis de Liposomas que contienen la F2 de SabuCh a las sujetos grupo D: LipSabuCh y 300 μ l con la dosis de SabuCh libre a las sujetos grupo E: SabuCh, cada 24 horas durante 4 días (Tabla 3). Se registró el estado de cada grupo.



Tabla 3: Tratamiento experimental

Día	Grupo	Dosis	observaciones
1	C	300µl	Individuos con deterioro dérmico, enrojecimiento y oscurecimiento de la zona peritoneal
	D	300µl LipSabuCh 3µM	Individuos con deterioro dérmico, enrojecimiento y oscurecimiento de la zona peritoneal.
	E	300µl 739 x 10 ⁻⁵ mg/µl	Individuos con deterioro dérmico, enrojecimiento y oscurecimiento de la zona peritoneal.
2	C	300µl	Individuos con deterioro dérmico, enrojecimiento y oscurecimiento de la zona peritoneal.
	D	300µl LipSabuCh 3µM	Individuos sin oscurecimiento peritoneal, prevalece el enrojecimiento capilar
	E	300µl 739 x 10 ⁻⁵ mg/µl	Individuos con ligero oscurecimiento peritoneal y piel emblanquecida por placas en el lomo.
3	C	300µl	Individuos con enrojecimiento capilar y poco oscurecimiento en el área peritoneal
	D	300µl LipSabuCh 3µM	individuos sin anomalías visibles.
	E	300µl 739 x 10 ⁻⁵ mg/µl	Individuos con cambios drásticos de conducta, piel seca, y con zonas totalmente blancas.
4	C	300µl	Individuos con enrojecimiento capilar y poco oscurecimiento en el área peritoneal
	D	300µl LipSabuCh 3µM	Individuos normales.
	E	300µl 739 x 10 ⁻⁵ mg/µl	Individuos decaídos, conductas anormales y pérdida de apetito.



7.6. Efecto de los liposomas con la fracción 2 de SabuCh sobre las masas tumorales inducidas.

Al concluir el tratamiento se dejó pasar 24 horas desde la última dosis aplicada para realizar el sacrificio, es decir los cuatro días de tratamiento y al día cinco se tomó la muestra de sangre y se sacrificaron

7.6.1. Grupo A: Testigo

Se diseccionó cada individuo para cuantificar el número y medida de los tumores, para el grupo A, Testigo, (Figura 11) se obtuvo un total de cero tumores, las hebras se encontraban en excelentes condiciones físicas, sin ninguna sintomatología de deterioro.

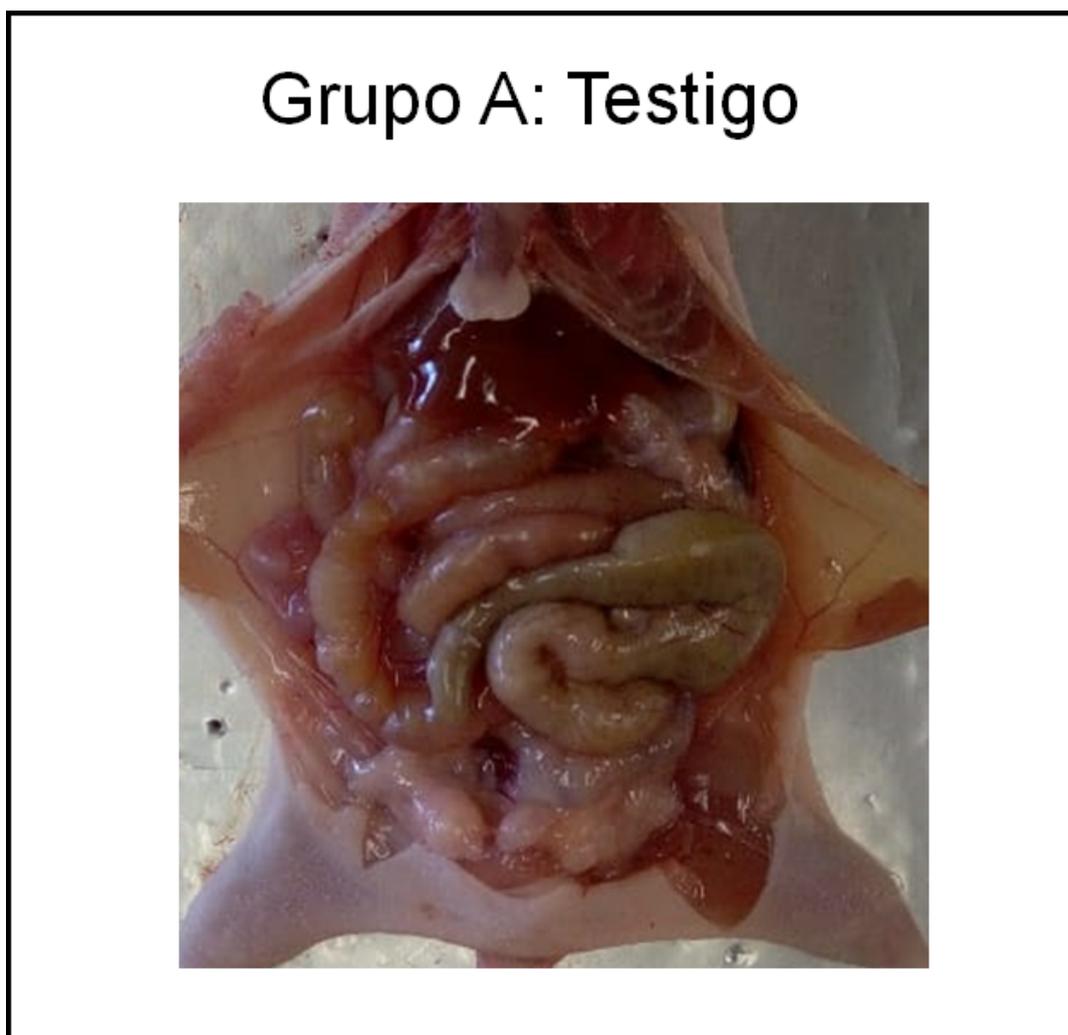


Figura 11: Morfología del grupo Testigo



7.6.2. Grupo B: Tumoral

Muestra desarrollo de tumores principalmente en el área peritoneal, en los intestinos y en los ovarios (círculos verdes), también deja ver un grado de deterioro de los órganos, inflamación y oscurecimiento de los mismos (Señalado en las flechas), la dermis enrojecida con capas de grasa acumulada y semblante decaído (Figura 12).

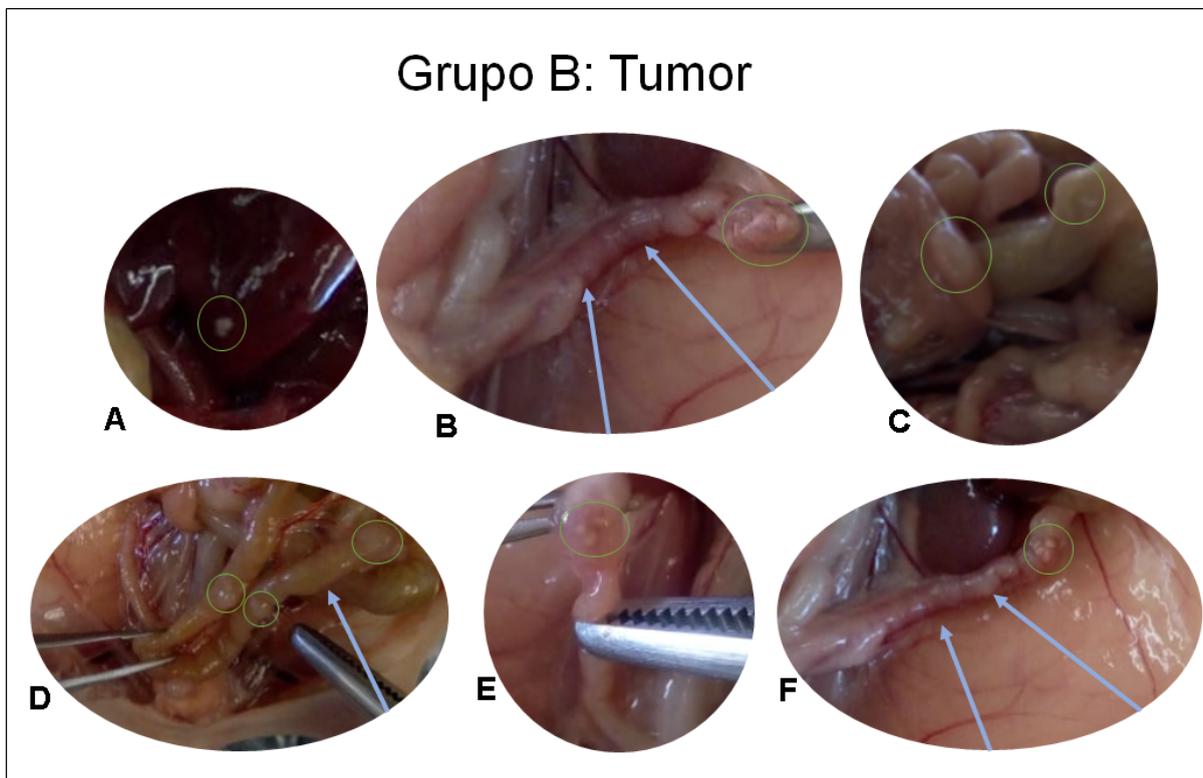


Figura 12: Morfología del grupo tumor: Se observa un tumor pulmonar de 4 mm de diámetro, el pulmón tiene un color más oscuro que lo normal (A), los intestinos se encuentran inflamados, oscurecidos y se observan tumores que van desde 1mm hasta 6mm de diámetro (C,D), El sistema reproductor se encuentra hipertrofiado, los ovarios han sido invadidos por varios tumores pequeños (E) o por pocos tumores pero de mayor tamaño (B), las trompas de falopio tienen comienzos de vascularización además de una notoria inflamación y enrojecimiento (F).



7.6.3. Grupo C: LipVac.

Se reporta que principalmente el hígado, ovario e intestino han sido invadidos por tumores de 2 mm hasta 4 mm (Figura 13) (en círculos verdes), los oviductos estaban inflamados y vascularizados (Señalado en azul), aunque se encontraban tumores de menor tamaño que en el grupo B, el estado de los órganos era bastante similar e incluso más severo en este grupo. Rangel-Corona en el 2011, reportó que los liposomas catiónicos también pueden ocasionar una reducción de las masas tumorales por sí solos, pero no es significativamente importante respecto a los compuestos activos que se pueden encapsular en él, además se podría atribuir a la citotoxicidad que tienen cuando se encuentran vacíos.

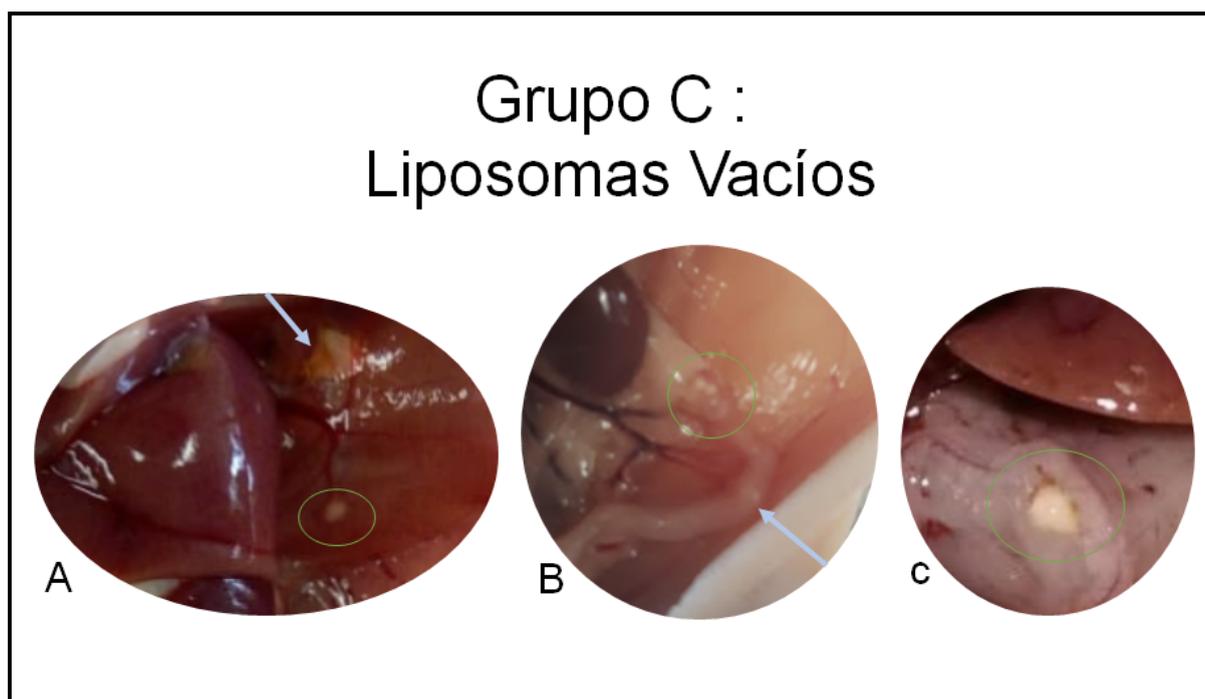


Figura 13: Morfología del grupo LipVac. A: Se observa un tumor hepático de 2 mm de diámetro que además ya tiene vascularización. B: Hay inflamación en las trompas de falopio y presencia de tumores en los ovarios. C: fragmentos del intestino se encontraban emblanquecidos y se podrían ver tumores de hasta 5 mm de diámetro.



7.6.4. Grupo D: LipSabuCh.

La zona peritoneal se encontraba en condiciones normales, no había cambios de color ni tamaño en los órganos, además la dermis no cambió de color ni almacenó grasa, muestra pocas presencias tumorales, solo se desarrollaron tumores de 1 mm a 2 mm, en los ovarios no se distinguían tumores en cambio tenían el color rosado claro de este órgano cuando es sano. (Figura 14). El estado físico visible de cada individuo era normal, con conductas y actividades iguales al grupo control.

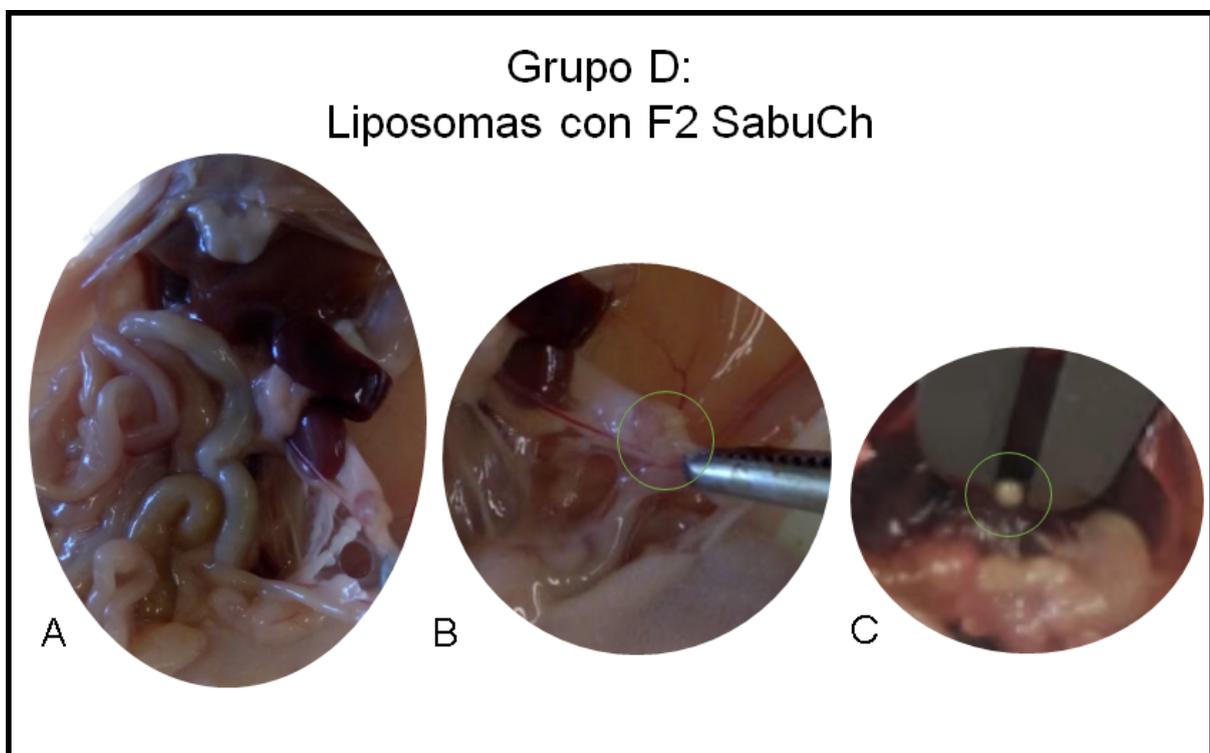


Figura 14: Morfología del grupo LipSabuCh: Se observa que los órganos internos están en buenas condiciones, sin inflamación ni oscurecimiento (A), en los ovarios se puede notar que la mayor parte del recuperó su color rosa normal y no habían tumores visibles (B), por último se observa un tumor en el hígado.



7.6.5. Grupo E: SabuCh.

Podemos ver en la zona peritoneal, hay un oscurecimiento drástico en sus órganos, además de que se notan inflamados y con ciertas lesiones, hay pocos tumores presentes, de 1mm hasta 3mm principalmente en intestino y ovario (en círculo verde), los oviductos inflamados, emblanquecidos y vascularizados (señalados en azul), la dermis también enrojecida y con grasa, en general las condiciones de este grupo coinciden con el grupo B y C (Figura 15).

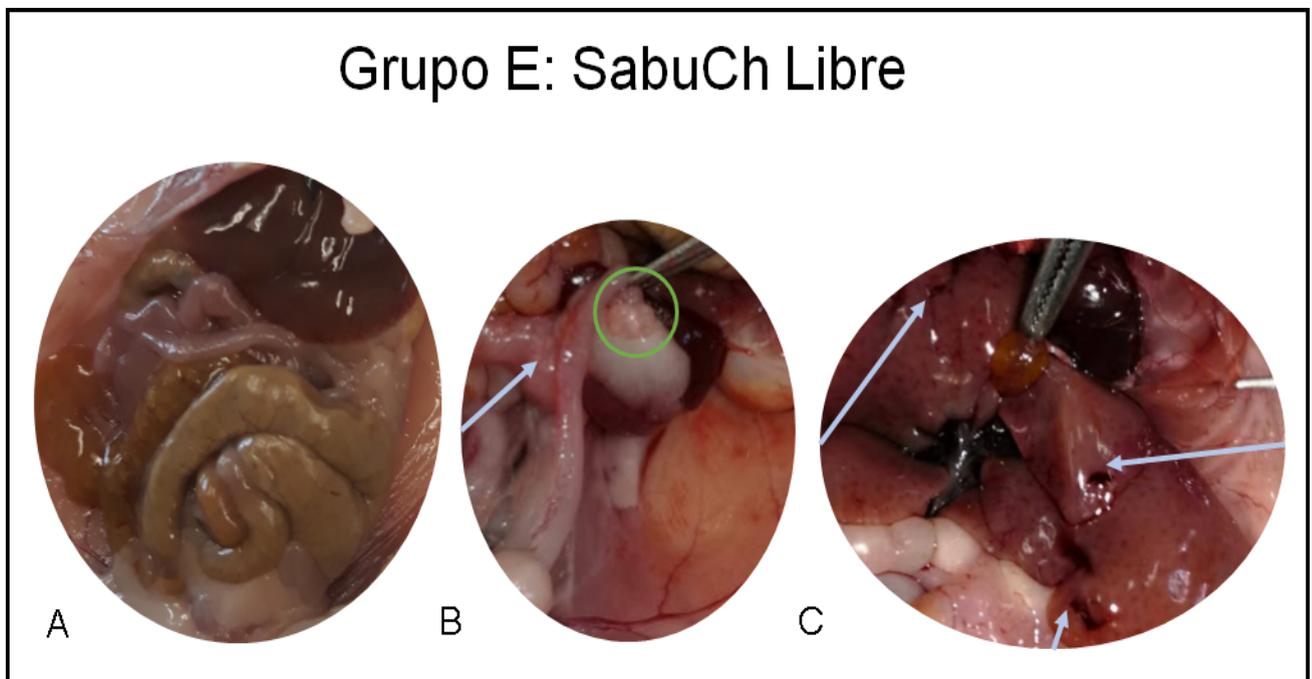


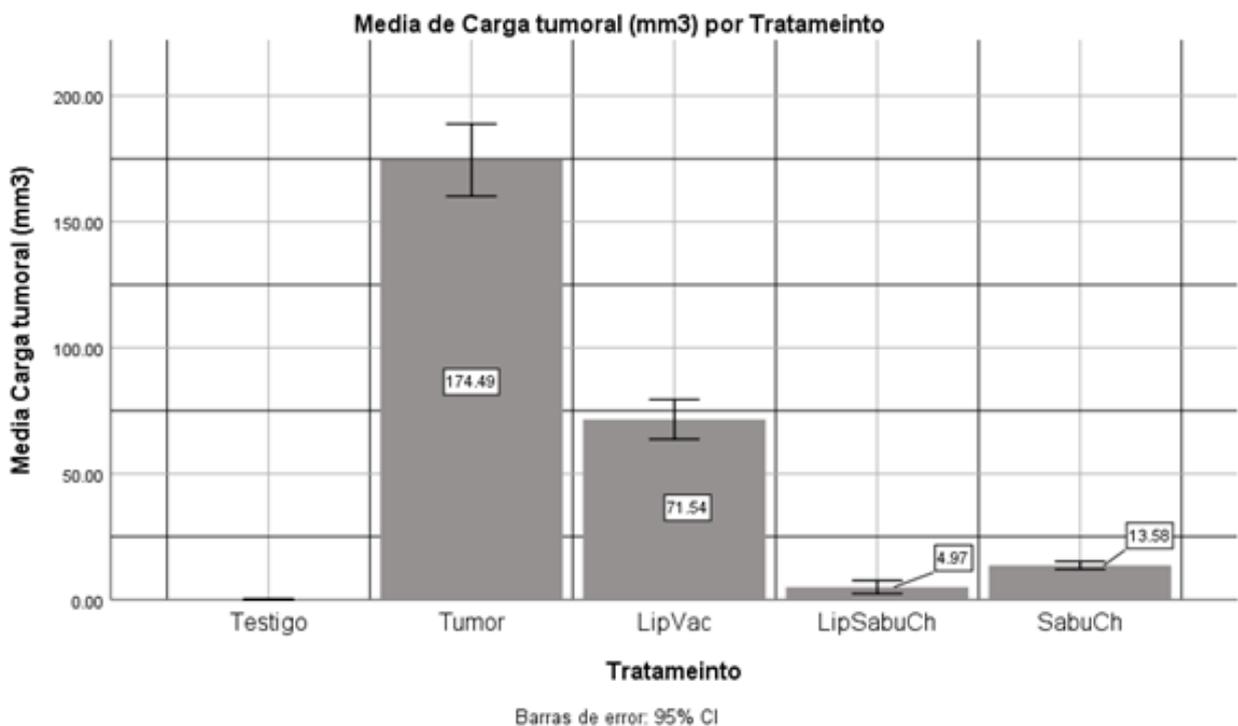
Figura 15: Morfología del grupo SabuCh Libre : Oscurecimiento e inflamación de la zona peritoneal (A), Tumores presentes en ovarios con emblanquecimiento y vascularización de trompas de falopio (B), lesiones que muestran afección en el hígado (C).



7.7. Densidad tumoral

El control ambiental (Grupo A: Testigo) tiene una carga tumoral promedio de 0 mm³, mientras que el control tumoral (Grupo B: Tumor) tiene una carga tumoral promedio de 174.49mm³. Comparando los controles con los tratamientos administrados, se nota la mayor reducción en el grupo D: LipSabuCh con una carga tumoral promedio de 4.97 mm³, seguida por la administración de SabuCh libre con 13.58 mm³ (Gráfica 2).

Gráfica 2: Cargas tumorales por grupo nu/nu



Eje x: Grupo experimental, Eje y: media en la carga tumoral

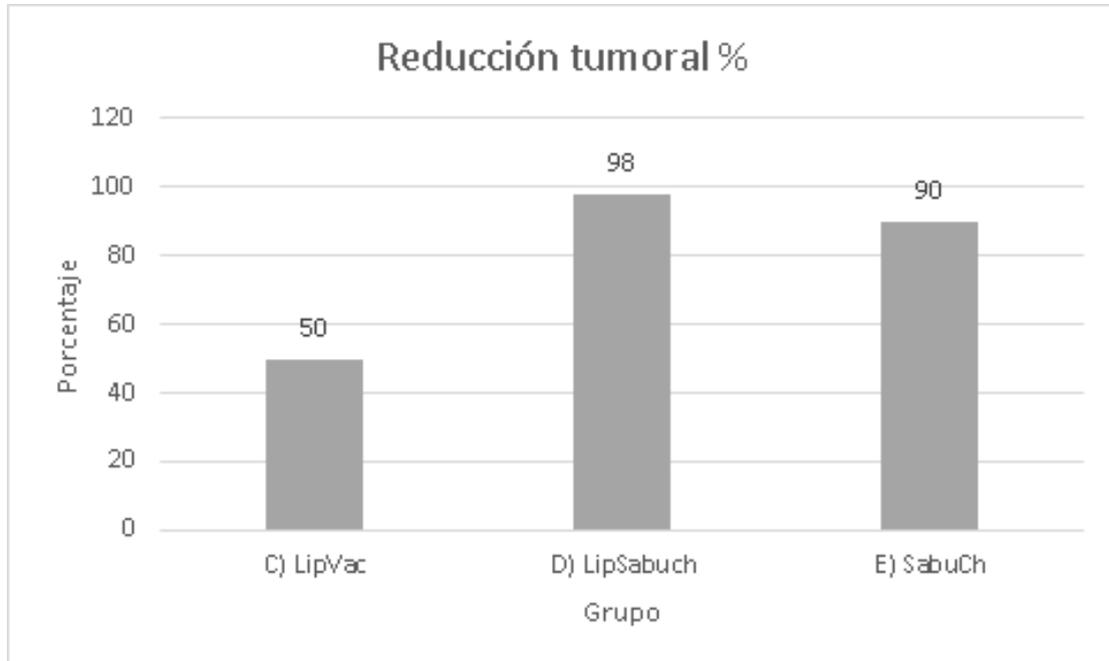
También hay una reducción considerable en el grupo C: LipVac (71.54 mm³) que en comparación con el grupo B:Tumor desciende hasta cerca de la mitad.

De acuerdo a los grupos evaluados y sus cargas tumorales, es evidente que los tres tratamientos aplicados reducen en cierto punto la carga tumoral, pero la reducción más importante se presenta con la aplicación de liposomas que contienen la F2 de



SabuCh, donde podemos observar un retroceso de las neoplasias establecidas de hasta un 98% comparados con nuestros controles (Gráfica 3).

Gráfica 3: Regresión tumoral (%)



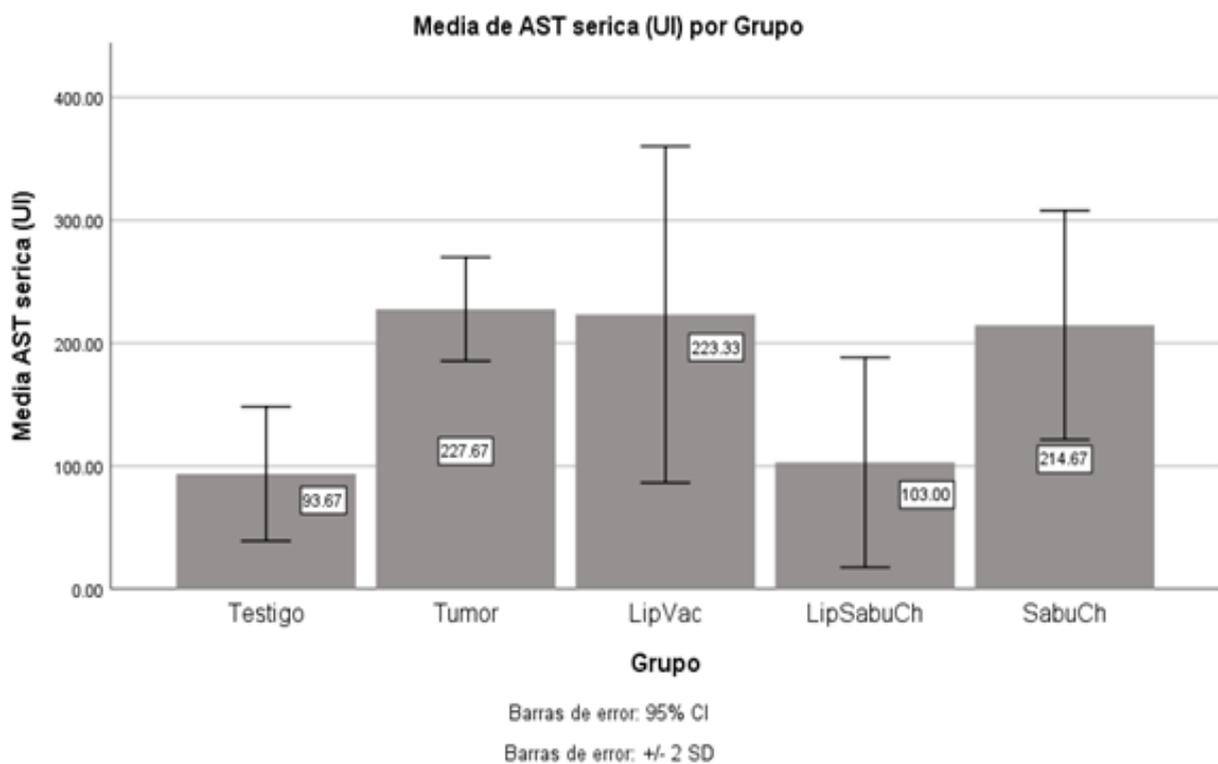
Eje x: Tratamientos aplicados, Eje y: Porcentaje de reducción.



7.8. Perfil hepático y renal

De Acuerdo a los resultados entregados por el laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), para el perfil hepático, los niveles de la transaminasa AST (Aspartato aminotransferasa), se encuentran elevados para el grupo B: tumor (227.67 UI), C: LipVac (223.33 UI) y E: SabuCh (214.67), mientras que los grupos A: Testigo (93.67 UI) y D: LipSabuCh (103.00 UI) están dentro del nivel normal de acuerdo a los valores de referencia para esta transaminasa 37.6 – 168 UI/L reportados por Fabry (2009).

Gráfica 4 : Perfil de AST



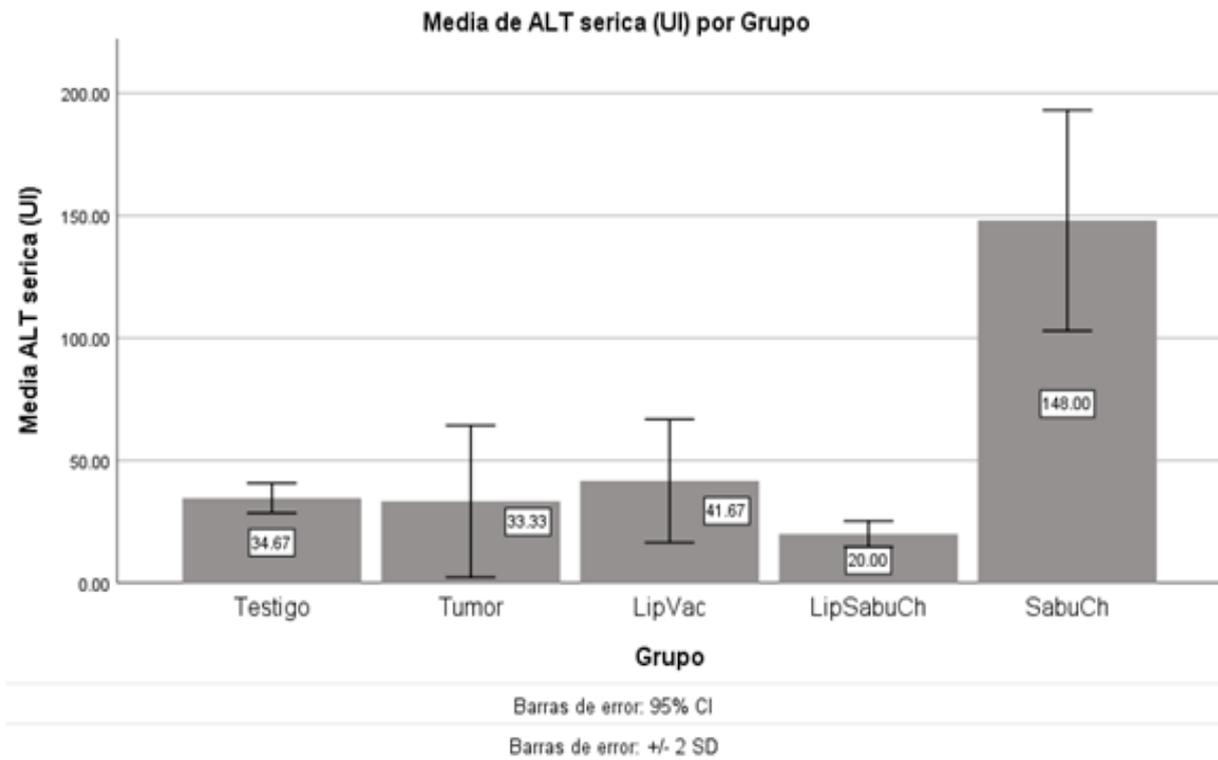
Eje x: Grupos experimentales, Eje y: Media de AST en suero

Los niveles reportados para la transaminasa ALT (Alanin aminotransferasa) se encuentran levemente elevados en el grupo C: LipVac (41.67 UI) por otra parte los grupos A: Testigo (34.67 UI) y D:LipSabuCh (20.00) se encuentran dentro de los



valores de referencia 11.6 – 35.9UI/L, reportados por Fabry (2009), pero hay una alza en el grupo E: SabuCH (148.00 UI) de 3.5 veces el valor máximo referido.

Gráfica 5: Perfil de ALT

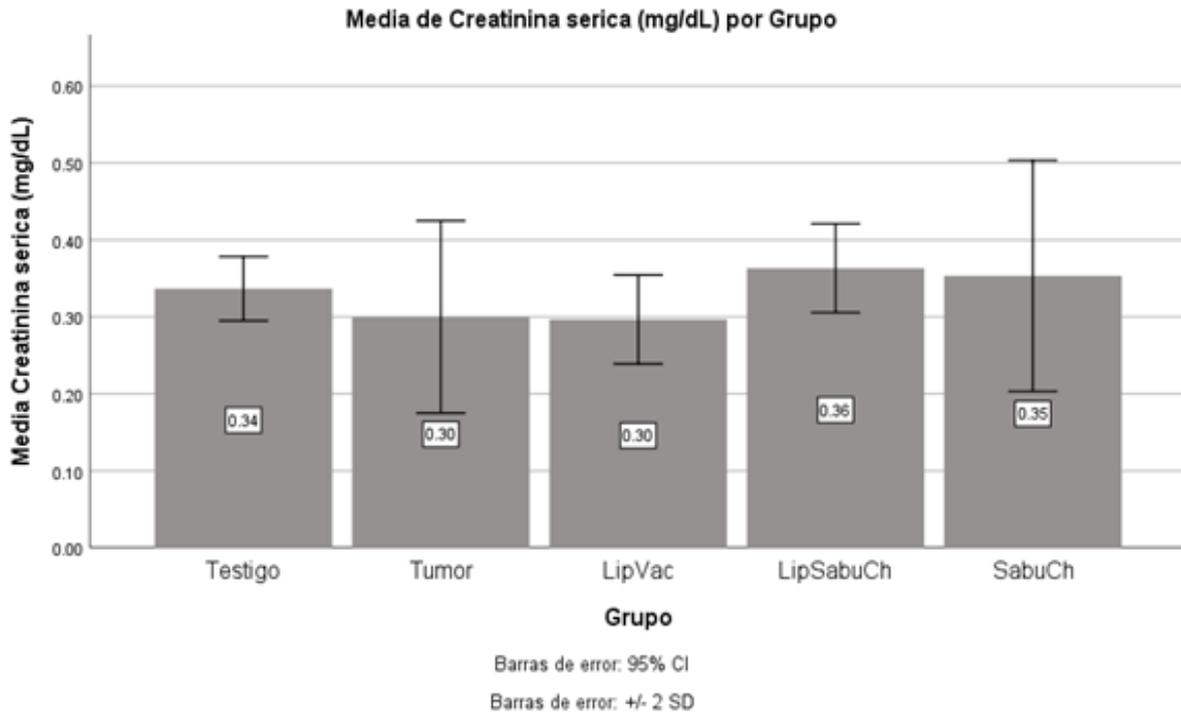


Eje x: Grupos experimentales, Eje y: Media de ALT en suero

Para el perfil renal se midieron la concentración de creatininas séricas, de acuerdo al valor de referencia: 0.48 – 0.68 mg/dL, reportados por Leon-Goñi (2011), los grupos experimentales muestran niveles de creatinina de 0.30 a 0.36 mg/dL lo que significa que están por debajo del promedio, sin embargo no es una baja alarmante.



Gráfica 6: Perfil de Creatinina



Eje x: Grupos experimentales, Eje y: Media de creatinina en suero.



7.9 Diagnóstico

Se realizó el diagnóstico de cada grupo experimental, partiendo con individuos que se certificaron como sanos por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, comparando con los resultados obtenidos de los análisis de toxicidad al final de la prueba y el comportamiento de los sujetos que cada grupo presentaba antes durante y después del experimento (Tabla 3).

Tabla 3: Condiciones físicas por grupo

Grupo	Condiciones físicas
A: Testigo	Conducta: normal Apariencia física: normal Apariencia de órganos: normal Perfil de creatininas: riñones sanos Perfil ALT y AST: sano
B: Tumor	Conducta: nerviosa y agresiva Apariencia física: enrojecimiento de la piel Apariencia de órganos: oscurecimiento e inflamación Perfil de creatinina s: riñones sanos Perfil de AST y ALT: necrosis muscular y necrosis hepática
C: LipVac	Conducta: nerviosa y agresiva Apariencia física: enrojecimiento de la piel Apariencia de órganos: oscurecimiento e inflamación Perfil de creatinina s: riñones sanos Perfil de AST y ALT: necrosis muscular y necrosis hepática
D: LipSabuCh	Conducta: normal Apariencia física: normal Apariencia de órganos: normal Perfil de creatininas: riñones sanos Perfil ALT y AST: sano
E: SabuCh	Conducta: nerviosa y agresiva Apariencia física: enrojecimiento de la piel Apariencia de órganos: oscurecimiento e inflamación Perfil de creatinina s: riñones sanos Perfil de AST y ALT: necrosis hepática



8. Análisis de resultados



La fracción 2 del extracto de *Sargassum hystrix buxifolium* Chauvin mostró tener potencial como tratamiento antineoplásico, ya que detiene el ciclo celular e induce la muerte por apoptosis (Santiago- Cruz 2014), esto es muy importante debido a que no causaría efecto inflamatorio para el organismo, por esta razón se busca que sus efectos se mantengan estables. Las púberas realizadas indican que a ocho años de la obtención del extracto su aspecto físico es completamente normal, su color verde oscuro es el adecuado, no se notan rastros de ningún tipo de contaminación (moho o suciedad) o de pérdida de materia, puesto que el peso del extracto es el mismo que se reporta en su etiqueta inicial, el tubo en el que se mantiene tampoco muestra señales de estar dañado (roto o aplastado). Las buenas condiciones físicas en las que se encuentra el producto se deben a que su almacenaje ha sido el adecuado, manteniéndolo en refrigeración de a 20 ° y alejado de la luz, cabe resaltar que el extracto no cuenta con ningún conservador artificial o alguna otra sustancia externa a él. Es importante no solo que sus características físicas se mantengan, sino también sus propiedades químicas, podemos observar que su capacidad de dilución y la IC₅₀ sigue siendo la misma de acuerdo a lo reportado con Luna-Cruz 2012, por lo tanto, tomando como referencia a Garcia-Salgado 2014, que dice que las propiedades químicas de la alga marina comestible hijiki (*Hizikia fusiformis*) se pueden mantener estables durante al menos un año en la muestra sólida, almacenada en recipientes de poliestireno a 20°, podemos inferir que las propiedades del extracto liofilizado (sólido) de *Sargassum buxifolium* (Chauvin)M. J. Wynne (SabuCh) se mantienen por lo menos 8 años en las condiciones ya mencionadas de luz y temperatura.

Los animales de laboratorio para investigación, en general, han sido caracterizados morfológica y fisiológicamente, pero además su conducta también es un indicativo claro de las normalidades y anormalidades, que atraviesan durante el desarrollo de alguna investigación. Es por eso que cada individuo fue minuciosamente monitoreado durante el desarrollo de este trabajo, se puede observar que todos los grupos con inducción tumoral mantienen una baja de energía en sus actividades normales (aseo personal, alimentación y aseo en la jaula), oscurecimiento de la zona perineal y enrojecimiento dérmico en secciones localizadas en el lomo, además de presentar un cuadro anormal de excreción, con heces amarillentas y acuosas. Si bien aún no había masas tumorales palpables, estos síntomas eran



indicativos de anomalías en el funcionamiento de algunos órganos que podían deberse al establecimiento tumoral, ya que el grupo testigo no presentaba las condiciones antes mencionadas.

Al principio del tratamiento todos los individuos parten con las mismas características, después de la primera dosis se mantienen en el mismo estado, al segundo día de aplicación solo el grupo D se despega ligeramente de los demás al reducir el oscurecimiento peritoneal, a lo largo del tratamiento se nota una mejoría a tal grado que para el cuarto día las condiciones de este grupo eran completamente normales, comparadas con el grupo A (Testigo). Para los demás grupos no se observaron grandes mejoras, solo en el grupo E (SabuCh libre) al segundo día de tratamiento habían reducido el enrojecimiento capilar y el oscurecimiento peritoneal, pero para el final del tratamiento se observan una nuevas situaciones adversas, con pérdida del apetito, decaimiento y conducta anormalmente agresiva. Estos resultados nos permiten inferir que el tratamiento con la F2 de SabuCh encapsulado muestra una mejora visible sin tener efectos adversos notorios sobre la fisonomía y conducta de los ratones.

Para asegurar con certeza la eficacia de la F2 de Sabuch como tratamiento antineoplásico se hizo un análisis estadístico con los resultados tumorales obtenidos del sacrificio presentes en cada grupo, de acuerdo al tratamiento aplicado y lo observado previamente.

Como era de esperarse, en nuestros grupos control tenemos una carga tumoral nula (Grupo A: Testigo) y una carga tumoral máxima de 174.49 mm^3 (Grupo B: Tumoral), lo cual nos indica que la inoculación fue llevada a cabo de manera correcta, por lo tanto la regresión tumoral que se observa en cada grupo con respecto al grupo B: Tumor es veraz. Es evidente que el grupo D: LipSabuCh reduce mayoritariamente las cargas tumorales, aunque también hay una reducción importante en el grupo D: SabuCh, esto se debe a que como se ha demostrado antes el alga muestra eificentes efectos antiproliferativos *in vitro* (Santiago-Cruz, 2014) pero las características físicas y conductuales de estos dos grupos son muy diferentes, mientras que el grupo D: LipSabuCh es equiparable con el grupo A: Testigo, el



grupo E: SabuCh tiende a ser como el grupo B: Tumor, esto sugiere que el mejor candidato para aplicarse como tratamiento son los Liposomas con la F2 de SabuCh. El grupo C: LipVac también demostró que puede disminuir la carga tumoral, pero por las condiciones físicas y el notable deterioro de órganos nos podrían estar indicando cierta toxicidad cuando las vesículas liposomales se administran solas.

Para corroborar el estado de salud en el que se encontraba cada grupo experimental se mandaron a hacer estudios de indicadores séricos de daño renal y hepático, esto confirma si hay toxicidad en el alga, la vesícula liposomal o el alga encapsulada en vesícula liposomal.

El perfil de aspartato aminotransferasa (AST) indica que cuando se encuentra elevada hay necrosis del músculo esquelético y cardíaco, y necrosis hepática. De acuerdo a los valores de referencia 37.6 – 168 UI/L, el grupo A: testigo y el grupo B: LipSabuCh que se encuentran dentro de este rango estarían en condiciones saludables, por lo contrario el grupo B: Tumor y el grupo C: LipVac están por encima del valor normal, e indica que el hígado y el músculo se encuentran ya comprometidos, en el grupo E: SabuCh hay un ligero aumento del valor estándar pero aún no es significativo para confirmar que tenga daño en los órganos ya mencionados.

El perfil de Alanina aminotransferasa (ALT), es el mejor indicador de daño hepático, su elevación indica que hay un mal funcionamiento o necrosis hepática. El valor de referencia para esta transaminasa es de 11.6 – 35.9UI/L. Conforme a este rango el Grupo A: Testigo y el Grupo D: LipSabuCh reafirman que se encuentran saludables, mientras que nuevamente los Grupos B: Tumor y C: LipVac se encuentran elevados, por encima del rango normal, lo que confirma la necrosis hepática y muscular (cardíaco y liso). El mayor incremento en los valores normales para la ALT se encuentra en el grupo E: SabuCh que se eleva hasta casi cuatro veces más del valor promedio, su incremento indica claramente que el hígado ha sido severamente afectado, ya que cuando la ALT incrementa sin el incremento de la AST se debe solo a afecciones hepáticas.

El perfil de creatinina se analizó como marcador de daño renal, ya que estas moléculas se producen principalmente en el riñón, aunque también se pueden encontrar en hígado y páncreas, pero con menor frecuencia. La presencia normal



de creatininas va de 0.48 – 0.68 mg/dl, en nuestros grupos experimentales podemos observar que están ligeramente por debajo del valor mencionado, pero esto no significa que el riñón se vea afectado, ya que para considerar una patología los análisis tendrían que arrojar una alza o disminución de al menos el doble del valor de referencia, así entonces la integridad y funciones renales no son perjudicadas.

De acuerdo a los resultados de los análisis podemos deducir que los grupos C: LipVac y E: SabuCh sufren de algún tipo de daño hepático y/o muscular, que también podemos ver en el grupo B: Tumor, esto nos estaría indicando que aunque reducen la carga tumoral, se encuentran igual de afectados que individuos con tumores establecidos, lo que sugiere que son tóxicos para el organismo y que en efecto, si están matando células cancerígenas, pero también matan células sanas, de manera indiscriminada, lo que causa en el sujeto efectos secundarios adversos. Esto se debe a que las algas pardas están formadas principalmente por fucoidan, un compuesto que les confiere la actividad biológica como antitumoral pero que resulta ser tóxico, pues se acumula en el hígado y causa daño en él, cuando se administra libre, de igual manera que los Liposomas vacíos.

Contrariamente, los resultados de los análisis sanguíneos para el grupo D: LipSabuCh nos plantea que se encuentran en condiciones normales de salud, tanto así que son comparables con sujetos que no han padecido con establecimientos tumorales, (Grupo A: Testigo) así que nuevamente el grupo D resulta ser el más propicio para ser aplicado como tratamiento sin tener efectos adversos sobre el organismo, ya que aunque el fucoidan y los Liposomas vacíos tienen cierta toxicidad, cuando se forma la composición de ambos, su farmacocinética se ve modificada, se puede absorber de mejor manera y llegar a las células dianas de forma más efectiva sin almacenarse en el hígado, por lo tanto no representaría un riesgo para el organismo, dejando atrás los efectos secundarios de una quimioterapia convencional.

Durante todo el experimento se vigiló las condiciones de cada uno de los sujetos para en conjunto poder dar un diagnóstico final al estado de salud de cada grupo (Tabla 3), de acuerdo a lo observado en el comportamiento y el aspecto físico, antes y durante el tratamiento, en la disección y lo visto en los análisis sanguíneos podemos inferir, que el tratamiento con vesículas liposomales que contengan la F2



de SabuCh en su interior no resulta ser dañina o tóxica para el organismo y puede administrarse sin perjudicar al individuo e inclusive mantener condiciones semejantes con los individuos a los que no se les administra ninguna sustancia.

Por otro lado podemos decir que las vesículas liposomales vacías resultan ser citotóxicas para el organismo, esto se debe a que la F2 de SabuCh le brinda estabilidad y en conjunto son benéficas para el organismo, pero separadas resultan ser perjudiciales puesto que cuando se administra SabuCh libre es tóxico, dañando severamente el hígado, estos efectos adversos pueden compararse con los efectos provocados cuando se establecen neoplasias en el organismo en vista de que sus afecciones son muy semejantes a las de los individuos que se encuentran enfermos.

La F2 de SabuCh encapsulada demostró una efectividad del 96%, seguido por el extracto aplicado de manera libre 83% (Gráfica 6), Claramente las propiedades antineoplásicas del alga se encuentran presentes en ambos casos, pero es el nano acarreador, en este caso la composición liposomal, lo que estabiliza, magnifica su efecto y lo potencializa como un posible tratamiento ya que su efectividad no se ve alterada por un efecto adverso en el organismo.

Así pues que la Fracción 2 de SabuCh encapsulada en liposomas catiónicos es por mucho la mejor opción para ser un potencial tratamiento contra el Carcinoma de Cérvix, en virtud de las propiedades antiproliferativas, detención del ciclo celular e inducción de apoptosis (Luna-Cruz 2012 ; Santiago-Cruz, 2014) que caracteriza a esta especie, además al ser encapsulada por una vesícula nanoacarreadora (liposoma), se estabilizan, para en conjunto reducir casi por completo las cargas tumorales inducidas en un modelo murino y sin resultar tóxicas para el sujeto.



9. Conclusiones



Se comprobó de manera *in vitro* que la fracción 2 de SabuCh mantiene estables las propiedades antineoplásicas reportadas en el año 2012 por Luna-Cruz, mediante la IC_{50} que determinó. Por esta razón concluimos que el extracto de SabuCh liofilizado, almacenado en condiciones de refrigeración 18°-20° y sin contacto de luz, se puede preservar sin la necesidad de adicionar conservadores o alguna otra sustancia que pudiese alterar sus atributos naturales, por al menos ocho años, pero no se descarta la posibilidad de que pudieran perdurar por más tiempo, ya que los extractos etanólicos de los que se tienen reporte se han mantenido en las mismas condiciones hasta por diez años.

La administración de la fracción 2 de SabuCh contenida en liposomas, muestra mejoría gradual y significativa en las condiciones físicas de las hembras nu/nu, provocadas por el establecimiento tumoral, así que podemos inferir que su aplicación las ayuda a recuperar la estabilidad y no las perjudica ni interfiere en sus actividades.

De acuerdo al análisis estadístico se observa que los liposomas que contienen la fracción 2 de SabuCh, tienen la mayor regresión tumoral, reduciendo las cargas tumorales hasta un 98% sin ocasionar efectos secundarios adversos sobre el organismo, además de no presentar toxicidad hepática o daño renal, por lo tanto se convierte en la opción más propicia para usarse como un eficiente tratamiento.

Los tratamientos de origen natural son potencialmente una alternativa viable para tratar el cáncer. Las algas pardas son un recurso de importancia para obtener compuestos antiproliferativos, en particular la fracción 2 de SabuCh contenida en Liposomas catiónicos es una alternativa prometedora para el tratamiento del carcinoma de cérvix.



Lista de figuras

1. Ciclo vital del VPH.

Tomado de: Diestro 2007 (Lowy DR. et al., 2006)

2. *Sargassum hystrix buxifolium* Chauvin M. J. Wynne (SabuCh).

Tomado de: Sargassum hystrix var. buxifolium Chauvin M. J. Wynne in GBIF Secretariat (2019). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org

3. Composición de un liposoma.

Tomado y editado de: <https://www.zamnesia.es/blog-como-mejoran-los-liposomas-la-absorcion-de-cbd-n1522>

4. Interacción del liposoma y liberación del fármaco en la célula diana

Tomado de: Acosta 2012 (Torchilin, 2005)

5. ratón Nude nu/nu

Tomado de: Nude mouse (athymic mouse). Special thanks to PD Dr. Walter Mier (University of Heidelberg) File:Nacktmaus 01.jpg Creado el: 4 de julio de 2008

6. Proporción de Carotenos y xantofilas del extracto de SabuCh

Tomado de: Luna-Cruz, 2012

7. A: Células INBL. B: Células INBL Cultivadas en presencia de SabuCh

8. Botella de cultivo de 500 cm² con medio

9. Distribución de jaulas

10. Marcaje, pesaje e inoculación

11. Morfología del grupo Testigo

12. Morfología del grupo Tumor

13. Morfología del grupo LipVac

14. Morfología del grupo LipSabuCh

15. Morfología del grupo SabuCh Libre



Lista de gráficas

1. Estabilidad de la fracción (F2) de SabuCh
2. Carga tumoral
3. Reducción tumoral
4. Perfil de AST
5. Perfil de ALT
6. Perfil de Creatininas



Lista de tablas

1. Estadios del Carcinoma de Cérvix

Tomado de : Álvarez, Claudia y Castro Nessim, Ernesto y Virginillo, Juan Martín y Bruno, Gabriel y González, Christian y Vallejos, Javier y Dieguez, Adriana (2012). Actualización de la estadificación de cáncer de cuello uterino. Revista Argentina de Radiología, 76 (2), 169-171. [Fecha de Consulta 19 de Marzo de 2021]. ISSN: 1852-9992. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3825/382538499014>

2. Identidad de ratones nu/nu

3. Tratamiento experimental

4. Condiciones físicas por grupo



10. Referencias



1. Alarcon M. & Ramírez M. (2009) *Alteraciones Enzimáticas séricas en ratas tratadas con Bisulfito de sodio*. Recuperado el 22 de octubre del 2020 Disponible en: <http://acta.ivic.ve/SI4/articulo8.pdf>.
2. Álvarez, C., Castro N., Virginillo E., Martín, J., Dieguez, A. *et all* (2012). *Actualización de la estadificación de cáncer de cuello uterino*. Revista Argentina de Radiología, 76 (2), 169-171. Recuperado el 15 de Marzo de 2021. ISSN: 1852-9992. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3825/382538499014>
3. American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2019) *Cáncer metastásico: Tipos de tratamiento*. Junta Editorial de Cáncer.Net, Recuperado el 22 de octubre del 2020. Disponible en : <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama-metast%C3%A1sico/tipos-de-tratamiento>
4. Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, L., Peychev, L., Trica, B., Oancea, F., Delattre, C. & Kokova, V. (2020) "*Efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios del fucoidan: una revisión*" *Polymers* 12, no. 10: 2338. Recuperado el 11 de Noviembre del 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/polym12102338>
5. Arango-Vélez EF, Arroyave-Hoyos CL, Zuleta-Tobón JJ, Restrepo-Ceballos MV, Lopera-Upegui AJ, Zuluaga-Castellanos H, *et all*. (2018) *Investigación de la eficacia y criterios de aprobación de los tratamientos con medicamentos para pacientes con cáncer: una revisión*. *Iatreia*. Jul-Sept;31(3): 284-293. DOI:10.17533/udea.iatreia.v31n3a06
6. Bala A., Kar B., Haldar P. K., Mazumder U. K. & Bera S. (2010) *Evaluation of anticancer activity of Cleome gynandra on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice*. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(1):131-134.



7. Balboa EM, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H. (2013) *In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae*. Food Chem. Jun 1;138(2-3):1764-85. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.026. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23411309.
8. Bartalini L. (2018) *Respuesta inmune humoral inducida por liposomas catiónicos formulados con diferentes inmunoestimulantes*. ISSN: 2469-1526 Recuperado el 9 de octubre del 2020. Disponible en : https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/2077/R_CB14.pdf?sequence=1&isAllowed=y
9. Blunt JW., Copp BR., Munro MHG., Northcote PT. & Prinsep MR. (2006) *Marine natural products*. Nat. Prod. Rep. 23: 26–78.
10. Cabané P., Díaz J., Rojas J., Maluenda F., Rencoret G. & Saud K. (2007) *Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad*. Rev Chil Cir.; 59(2): 116-121.
11. Carbone, C. & Maschi, F. (2006) *El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia*. Revista Química Viva, número 1, ISSN 1666-7948, Recuperado el 22 Octubre 2020. Disponible en : <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n1/carbone.pdf>
12. Carvalho M., Silva B. M., Silva R., Valentão P., Andrade P. B. & Bastos M. L. (2010) *First report on Cydonia oblonga Miller anticancer potential: differential antiproliferative effect against human kidney and colon cancer cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(6):3366-3370.
13. Coico-Vega, M., Iglesias-Osores, S., Aguilar-Gamboa, F., (2018) *comunicación corta detection of oncoproteins e6 / e7: an alternative for the screening of cervix cancer*. REV EXP MED 2018;4(3). Julio - Septiembre
14. Corona M.T., Weiss S.B, Ibáñez H.M, Baeza R.I, Rangel C.R, inventores; Ciudad de México.(2010) *Composición de un Producto Antineoplásico e Inmunoregulador y su uso para el Tratamiento del Cáncer Cervico Uterino*. Patente Mexicana. Expediente MX/a/2008/008681



15. Días PF., Siqueira JM., Vendruscolo LF., De Jesus T., Gagliardi AR., Maraschin M. & Ribeiro-do-Valle RM. (2005) . *Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56: 436–446
16. Diestro-Tejeda, M. D., Serrano-Velasco, M., & Gómez-Pastrana Nieto, F. (2007). *Cáncer de cuello uterino: Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH)*. *Oncología (Barcelona)*, 30(2), 14-31. Recuperado en 24 de octubre de 2020, Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352007000200002&lng=es&tlng=es.
17. Goñi C., León, Blanco, Diuris, Peña, Amelia, Ronda, González M., Bárbara O., Arteaga, María E., Bada, Ana M., González, Y, & Mancebo, A. (2011). *Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB*, Cenp: SPRD. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12 (11), 1-10. Recuperado el 22 de Octubre de 2020. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=636/63622049001>
18. Faulkner DJ. 2002. *Marine natural products*. *Nat. Prod. Rep.* 19: 1–48
19. Fabry M. (2009) *Medicina de animales no tradicionales*. Disponible en: <https://www.petcare.cl/medicinaRubroVet6.htm>.
20. Ganon W. (1994) *Fisiología Médica*. Décima Cuarta Edición. Editorial Manual Moderno S.A.
21. García-Martín, M. & Zurita-Molina, A. (2010). *Transaminasas: Valoración y Significación Clínica*. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP*. Pag. 267 – 275.
22. García-Salgado; M.A. & Quijano. (2014) *Stability of toxic arsenic species and arsenosugars found in the dry alga Hijiki and its water extracts*. *Talanta*, 128, 83-81 (DOI:10.1016/j.talanta.2014.04.038).
23. Globocan 2020
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>



<https://gco.iarc.fr/>

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>

24. Granados-García, M., Rodríguez-Martín, A. & Hinojosa-Gómez, J. (2016). *Tratamiento del cáncer: oncología médica, quirúrgica y radioterapia*. México D.F, México: Editorial El Manual Moderno ISBN: 9786074485486
25. Hentati, F., Delattre, C., Ursu, AV., Desbrières, J ., Le Cerf, D., Gardarin, C., Abdelkafi, S., Michaud, P. & Pierre, G. (2018) *Caracterización estructural y actividad antioxidante de polisacáridos solubles en agua del alga parda tunecina Cystoseira compressa* . Carbohidr. Polym., 198 , 589–600.
26. Hicks J. (2007) *Bioquímica Clínica*. Segunda Edición. Editorial McGraw – Hill Interamericana S.A. de C. V. P. 115-150.
27. Infante, R. *et al.* (2015) *Efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la actividad de extractos etanólicos de Lantana camara L. y Heliotropium indicum L. sobre Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Agron.* vol.64, n.4, pp.363-367. ISSN 0120-2812. Recuperado el 22 de octubre del 2020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n4.47608>.
28. Iturbe, A. (2018) *Nuevos vectores en la aplicación vía tópica de medicamentos. Liposomas (i)*. FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, Recuperado el 21 de Abril del 2020. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANE%20ITURBE%20BALZOLA.pdf>
29. KDOQI (2002) *Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification*. KDOQI Guidelines for CKD Care. The National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF KDOQI)™. Recuperado el 9 de Octubre del 2020. Disponible en: http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_commentaries.cfm. American Journal of Kidney Diseases (AJKD)



30. Kimura, R., Rokkaku, T., Takeda, S., Senba, M. & Mori, N. (2013) *Efectos citotóxicos de las nanopartículas de fucoidan contra el osteosarcoma*. Mar. Drugs 11 , 4267–4278
31. Kwon MJ. & Nam TJ. (2007) *A polysaccharide of the marine alga Capsosiphon fulvescens induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF–IR–mediated PI3K/Akt pathway*. Cell Biol. Int. 31: 768–775.
32. Lee JO., Russo AA. & Pavletich NP. *Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7*. Nature. 1998;391:859-65
33. Li X. L., Sun S., Du G. J., Qi L. W., Williams S., Wang C. Z. & Yuan C. S. (2010) *Effects of Oplopanax horridus on human colorectal cancer cells*. Anticancer Research, 30(2):295-302
34. López-Heydeck SM., López-Arriaga JA., Montenegro-Morales LP., Cerecero-Aguirre P. & Vázquez-De Anda GF. (2018) *Análisis de laboratorio para el diagnóstico temprano de insuficiencia renal crónica*. Rev Mex Urol. ene-feb;78(1):73-90. Recuperado el 9 de Octubre del 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.24245/revmexurol.v78i1.1601>
35. Loraine, Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, José Alberto (2010). *Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 41 (4), 18-27. ISSN: 1870-0195. Recuperado el 14 de Octubre de 2020. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=579/57916060003>
36. Luna-Cruz, N. (2012) *Determinación de las fases del ciclo celular de líneas de Carcinoma de Cérvix CALO E INBL cultivadas en presencia del extracto de Sargassum hystrix buxifolium Chauvin*. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL TESIS DE LICENCIATURA.
37. Maschi, F. (2006) *El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia*. Revista QuímicaViva, número 1, año 5. Recuperado el 14 de Octubre del 2020. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n1/carbone.pdf>



38. Mendez, D. & Villarraga, V. (2020) *Efectos psicológicos relacionados con la quimioterapia en pacientes oncológicos con cáncer de mama*. UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES, HUMANAS Y EDUCACIÓN PROGRAMA DE PSICOLOGÍA SEDE BOGOTÁ. Recuperado el 20 de Abril del 2020 Consultado en: https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/19972/1/2020_cancer_quimioterapia_efectos.pdf
39. Munévar-Niño J., Becerra-Calixto A. & Bermúdez-Olaya C. (2008) *Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica*. Acta odontol. venez. 2008 Dic; 46(3): 361-369.
40. Murray R., Granner D., Mayes P., & Rodwell V. (1992) *Bioquímica de Harper*, Décima segunda Edición. Editorial el Manual Moderno, S.A. México
41. National Kidney Foundation™. Kidney disease. Disponible en: <http://www.kidney.org/index.cfm>.
42. Nagamine, T., Nakazato, K., Tomioka, S., Iha, M. & Nakajima, K. (2015) *Absorción intestinal de fucoïdan extraído del alga parda, cladosiphon okamuranus*. Mar. Drugs, 13 , 48–64.
43. Navarro, G., Cabral, P., Malanga, A. & Savio, E. (2008) Diseño de liposomas para el transporte de diclofenac sódico. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 37 (2), 212-223.
44. Organización Mundial de la Salud. (2019). *Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino*. Mayo 27, 2019. Recuperado el 22 de Octubre del 2020. Disponible en OMS Sitio web: [https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
45. Pérez A. T., Arun B., Tripathy D., Tagliaferri M. A., Shaw H. S., Kimmick G. G., Cohen I., Shtivelman E., Caygill K. A., Grady D., Schactman M. & Shapiro C. L. (2010) *A phase 1B dose escalation trial of Scutellaria barbata (BZL101) for patients with metastatic breast cancer*. Breast Cancer Research and Treatment, 120(1):111-118



46. Pérez-Machado J. & Lie-Concepción AE. (2012) *Apoptosis, mecanismo de acción*. *Medimay* 18(2):aprox. 15 p. Recuperado el 9 de Marzo del 2021. Disponible en: <http://revcmhabana.sld.cu/index.php/rcmh/article/view/572>
47. Profeti G., Matamoros A. & Vega C. (2005) *Manual de Procedimientos de Laboratorio en Bioquímica Clínica y Control de Calidad*. Cuarta Edición. Managua-Nicaragua.
48. Ray R. B., Raychoudhuri A., Steele R. & Nerurkar P. (2010) *Bitter melon (Momordica charantia) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis*. *Cancer Research*, 70(5):1925-1931.
49. Reynoso-Noveron & Torres-Dominguez (2017) *Epidemiology of cancer in México: global burden and projections 2000-2020*. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual* Vol. 8, Núm. 1, Agosto 2017-Enero 2018
50. Moo-Puc, R., D Robledo., & Freile-Pelegrín (2009) *In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico*. *Ciencias Marinas*, 35(4): 345–358
51. Samperio-Calderón J.E., Salazar-Campos A. (2019) *Eficacia de las pruebas diagnósticas del Cáncer Cervicouterino y Virus del Papiloma Humano*. *JONNPR*. 2019;4(5):551-66. DOI: 10.19230/jonnpr.2953
52. Santiago-Cruz R. (2014) *Determinación del ARNm para citocromo c en líneas celulares de CaCu, cultivadas en presencia del extracto de Sargassum buxifolium (Chauvin) M. J. Wynne*. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL .TESIS DE LICENCIATURA. Disponible en: https://www.zaragoza.unam.mx/wpcontent/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_santiago_cruz.pdf
53. SONCCO-SULLCARANA, L. (2019) *Actividad enzimática de fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico oxalacético y glutámico pirúvico en cuyes (cavia porcellus L.) del cip majes, arequipa* . UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. ESCUELA PROFESIONAL DE



MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. Tesis de Licenciatura una-puno. Perú. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/11063/Soncco_Sullcarana_Luis_Miguel.pdf?sequence=1&isAllowed=y

54. Secretaria de Salud (2018) *Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013-2018*. Programa. México: Secretaría de Salud
55. Sheng-Ji, P. (2001) *Ethnobotanical approaches of traditional medicine studies: Some experiences from Asia*. *Pharmaceutical Biology*, 39(1):74-79.
56. Sodikoff C. (1996). *Pruebas diagnósticas y de laboratorio en las enfermedades de pequeños animales*. Madrid, España: Mosby-Doyma. 2º ed. 435 p. Perú: MACRO EIRL.
57. Taken, P.J., Vries, I.J.M. de, Torensma, R. & Figdor, C.G., (2007) *Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting*. *Nature Review Immunology*, 7,790-799.
58. The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved - May, (2019) Disponible en : <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>
59. The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved - May, (2018) Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1
60. Tokita, Y., Nakajima, K., Mochida, H., Iha, M. & Nagamine, T. (2010) *Desarrollo de un anticuerpo específico de fucoïdan y medición de fucoïdan en suero y orina mediante ELISA tipo sándwich*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010 , 74 , 350–357.



61. Torchilin, VC. (2005). *Avances recientes con liposomas como vehículos farmacéuticos*. Nature Reviews Drug Discovery, 4 (2), 145-160. doi: 10.1038 / nrd1632
62. Vallejo-Ruiz,V., Velázquez-Márquez, N., Sánchez-Alonso, P., Santos-López, P., & Reyes-Leyvaa, J., (2014) *La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2015;53 Supl 2:S172-7
63. Wang, Y., Xing, M ., Cao, Q., Ji, A., Liang, H. & Song, S. (2019) *Actividades biológicas del fucoidan y los factores que median sus efectos terapéuticos: una revisión de estudios recientes*. Recent Studies. Mar Drugs. 2019 Mar 20;17(3):183. doi: 10.3390/md17030183. PMID: 30897733; PMCID: PMC6471298.
64. Yuan YV. & Walsh NA. (2006) *Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds*. Food Chem. Toxicol. 44: 1144–1150.



Anexos



Preparación de reactivos y soluciones

Medio de cultivo RPMI 1640 (Roswell park memorial institute 1640)

Rpmi 1640 Gibco BRL USA 10.42 g

NaHCO₃ Sigma Chem USA 2.0g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada ajustando el pH a 7.2 con ácido clorhídrico (HCL) 1N 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° centígrados

Composición del medio RPMI 1640

AMINOÁCIDOS	mg/L	biotina	0,200
L-arginina.HCL	200,00	panotenoato de calcio	0,250
L-asparigina.H2O	50,00	cloruro de colina	3,000
L-ácido aspártico	20,00	ácido fólico	1,000
L-cistina	65,20	inositol	35,000
L-ácidoglutâmico	20,00	nicotinamida	1,000
L-glutamina	300,00	ácido p-aminobenzoico	1,000
glicina	10,00	piridoxina.HCL	1,000
L-histidina.HCL.H2O	15,00	riboflavina	0,200
hidroxiprolina	20,00	tiamina.HCL	1,000
L-isoleucina	50,00	vitamina B12	0,005



SALES INORGÁNICAS	mg/L	SALES INORGÁNICAS	mg/L
L-triptófano	5,00	L-tirosina	28,33
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100,00	MgSO ₄ .7H ₂ O	100,00
L-prolina	20,00	L-serina	30,00
KCL	400,00	NaCl	6.000,00
L-tirosina	28,33	L-valina	20,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	100,00	L-treonina	20,00
NaHCO ₃	2.000,00	Na ₂ HPO ₄	800,00

Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El SFB (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos, de esta manera son desactivadas las proteínas de bajo peso molecular que pudieran interferir con la proliferación y crecimiento celular.

Solución fisiológica de Verseno

Disolver en 800 ml de agua bidestilada y en el orden siguiente:

NaCl.....8.0 gramos

KCl.....0.4 gramos

EDTA.....0.2 gramos

Tris M Base4.04 gramos



Ajustar el pH a 7.7 con HCl y aforar a 1 L.

Esterilizar en autoclave a 20 libras de presión por 20 minutos.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

En 800 ml de agua bidestilada se disuelven:

NaCl.....8.0 gramos

Fosfato de sodio monobásico.....2.88 gramos

Fosfato de potasio.....0.4 gramos

Cloruro de potasio.....0.2 gramos

Ajustar el pH a 7.2 con HCl y aforar a 1 L.

Esterilizar en autoclave a 20 libras de presión por 20 minutos.

Azul Tripano

Se emplea para pruebas de viabilidad y con ríó celular se utiliza una dilución del colorante azul tripano Sigma gem usa al 0.3% en PVC y se filtra con papel whatman número 2

Glutaraldehído al 1.1%

En 48.9 ml de agua mlq se agregan 1.1 ml de Glutaraldehído al 50% para preparar 50 ml. Cubrir de la luz.

Cristal violeta al 0.1%

Hidróxido de sodio.....1.98 gramos

Ácido fórmico 200 mM.....2.14 ml

Cristal violeta.....0.5 gramos



Preparar la solución amortiguadora con el hidróxido de sodio y el ácido fórmico y ajustar el pH a 6.

Aforar a 250 ml.

Agregar el cristal violeta

