



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



“Evaluación farmacocinética de IL-2 contenida en un sistema nanoacarreador”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

PRESENTA:

HUANTE GARCÍA ROSA MARÍA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA TERESA CORONA ORTEGA

ASESOR DE TESIS: DR. RÁMON SOTO VÁZQUEZ

México D.F.

Marzo 2014

“El presente trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Oncología Célular del UMIEZ FES-Zaragoza, Campus II, UNAM; bajo la Dirección de la Dra. María Teresa Corona Ortega y Asesoría del Dr. Ramón Soto Vázquez con financiamiento de los proyectos PAPIIT IN 220111 e IN214113”

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Por abrirme sus puertas, y poder terminar mi formación profesional satisfactoriamente en la máxima casa de estudios, por ser para mí una segunda casa y un lugar donde viví experiencias tanto personales como profesionales únicas. Por todo el apoyo profesional de cada uno de los profesores que imparten las materias que me hicieron formarme como una persona y como profesionista.

A la Dra. María Teresa Corona Ortega.

Por creer y confiar siempre en mí por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio y tenerme toda la calma y confianza, por pasar esos únicos e inolvidables momentos que me han hecho crecer profesionalmente.

Al Dr. Ramón Soto Vásquez.

Por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto, por haber motivado mi espíritu con esas pláticas emocionantes de patentes.

A la Dra. Leticia Cruz Antonio.

Por su apoyo y por haberme asesorado sobre cada una de mis dudas, por ser siempre una fuente de inspiración, para realizar hasta lo imposible.

Al Dr. Alberto García.

Por su gran apoyo y haberme brindado tiempo tan valioso, a pesar de no tenerlo, gracias.

A M en C Arturo Valle Mendiola y Q.F.B Jacqueline González Cervantes que me apoyaron en la revisión de esta tesis, ya que sin ellos no sería posible.

Agradezco a mis padres:

María de la Paz García Franco y José Luis Huante Hurtado Por apoyarme en este proyecto, ya que sin ustedes no hubiera sido posible este grande sueño.

Por el apoyo de mis hermanos y amigos:

José Luis Huante García, Patricia Huante García, Francisco Santiago Salvador Huante, Erika Reus, Gerardo González Suarez, José Alfredo Ruiz Ramos.

A mi Hijo Derek Emiliano Ruiz Huante.

Gracias por tu luz, desde que llegaste, has iluminado mi camino, eres parte de este sueño y de todos mis triunfos.

**Dedicado a mis padres María de la Paz García Franco, José Luis Huante Hurtado
y a mi Hijo Derek Emiliano Ruiz Huante**

INDICE

1. INTRODUCCION	7
2. MARCO TEORICO	8
2.1. Medicamentos biotecnológicos	8
2.2. Farmacocinética	8
2.2.1. Proceso ADME	9
2.2.2. Modelo monocompartimental	10
2.2.3. Modelo multicompartimental	10-11
2.3. Cáncer Cérvico Uterino	11-12
2.3.1. Factores que afectan el Cáncer Cervicouterino	12
2.4. Citocinas	12-13
2.4.1. Interleucina 2(IL-2)	13-14
2.4.2. Receptor de IL-2	14-15
2.4.3. Farmacocinética de IL-2	15-17
2.4.4. Efectos adversos del uso de IL-2	17
2.5. Liposomas	17-18
2.5.1. Tipos de liposomas	19
2.5.2. Ventajas de liposomas	19-21
2.5.3. Acción de Liposomas en el organismo	22-23
2.5.4. Farmacocinética de Liposomas	24
2.5.5. Sistema nanoacarreador de IL-2 basado en liposomas	24-25
2.5.6. Efectos del sistema nanoacarreador que contiene IL-2 en tratamientos del CaCU	26
2.5.7. Importancia de los liposomas en la industria farmacéutica	26

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	-----27
4. HIPÓTESIS	-----28
5. OBJETIVOS	-----29
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	-----30
7. MATERIALES	-----31
8. METODOLOGÍA	-----32-38
9. DIAGRAMA DE FLUJO	-----39
10. RESULTADOS	-----40-45
11. ANÁLISIS DE RESULTADOS	-----46
12. CONCLUSIONES	-----47
13. REFERENCIAS	-----48-50
14. ANEXO	-----51-53

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios preclínicos tienen como objetivo demostrar que el producto innovador reúne los requisitos de eficacia, seguridad y calidad exigidos para su comercialización y administración al ser humano, en ellos se incluyen estudios de toxicología, farmacodinamia y farmacocinética.

Trabajos realizados previamente en el Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza demostraron que el uso de la potente citocina inmunorreguladora Interleucina 2 (IL-2) tiene un efecto farmacodinámico en la disminución de tumores de cáncer cérvico uterino inducidos en ratones y que el uso de un sistema nanoacarreador que la contiene (patente MX/a/2008/008681), tiene el mismo efecto con la ventaja de no ser tóxico y reducir afectos adversos asociados a la IL-2 libre. Por lo anterior, en el presente trabajo se realizó la evaluación farmacocinética del sistema innovador consistente en un nanoacarreador que contiene IL-2 comparado con la IL-2 libre, con el fin de contribuir en los estudios preclínicos mostrando la posible modificación de la farmacocinética y finalmente realizar los estudios toxicológicos para demostrar que su uso cumple con eficacia, seguridad y calidad exigidos para su comercialización y administración al ser humano.

2. MARCO TEORICO

2.1. Medicamentos Biotecnológicos. A toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio que se presenta en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas. Los medicamentos biotecnológicos innovadores podrán ser referencia para los medicamentos biotecnológicos no innovadores, a los cuales se les denominará biocomparables. La forma de identificación de estos productos será determinada en las disposiciones reglamentarias. Estos productos comprenden proteínas terapéuticas, anticuerpos monoclonales, vacunas, productos de inmunoterapia contra las alergias, componentes de la sangre, tejidos y células para trasplantes. La norma vigente que rigen estos medicamentos es el PROY-NOM-257-SSA1-2013⁽¹⁾.

2.2. Farmacocinética. Es la rama de la farmacología que trata de la relación entre la evolución temporal de las concentraciones farmacológicas alcanzadas en diferentes regiones del organismo durante y después de su administración ⁽²⁾ que implica el proceso de absorción, distribución, metabolismo y eliminación^(3, 4, 5). (verFigura1)

CURSO TEMPORAL DEL MEDICAMENTO EN EL COMPARTIMENTO CENTRAL

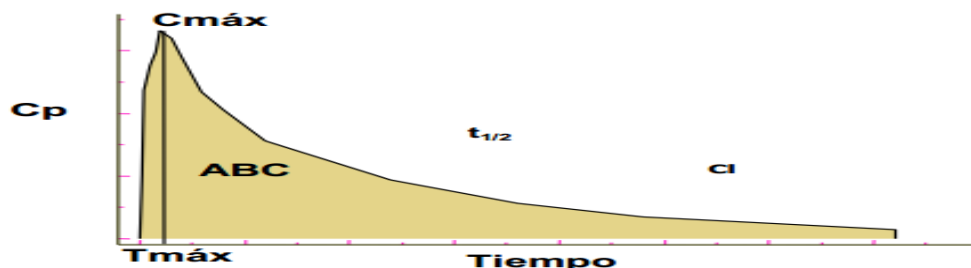


Figura 1. Parámetros farmacocinéticos que se pueden determinar después de una administración oral (modificación de buxton,2007) C_p : concentración plasmática, $t_{1/2}$: tiempo de vida media, CL: depuración.

2.2.1. Proceso de Absorción, Distribución, Metabolismo y Eliminación o Excreción

(ADME). El factor crucial para determinar los efectos adversos en la salud que resulta de la exposición a una sustancia química toxica es la cantidad de esta que llega hasta un tejido diana (efecto)^(4, 5, 6). (ver Tabla 1)

Tabla1.	PROCESO ADME
ABSORCIÓN	<p>Proceso de movimiento de una fármaco desde el sitio de administración pasa a través de los recubrimientos del cuerpo para entrar en este hacia el compartimento extracelular del cuerpo⁽³⁾.</p> <p>Estudia el paso de los fármacos a través de las membranas biológicas hasta llegar a la circulación en general para su distribución^(4,5).</p>
DISTRIBUCIÓN	<p>Repartición de un fármaco en los diferentes compartimentos de un organismo que puede contenerlo, entre ellos el intracelular o intersticial. En estos sitios puede almacenarse transitoria o permanentemente un fármaco (órganos blandos)⁽⁴⁾.</p>
METABOLISMO (biotransformación).	<p>Alteraciones de la estructura química de un fármaco impuesta por los procesos vitales. La biotransformación busca que las sustancias lipofílicas sean más hidrofílicas o solubles en agua. El órgano encargado de metabolizar es fundamentalmente el hígado^(4,5).</p>
EXCRECIÓN	<p>La fase final del proceso toxicológico es la excreción de los compuestos originales y los metabolitos productos de la biotransformación. De los tejidos a la sangre y de esta al exterior. Las rutas más importantes de excreción son: <i>Vía renal, biliar, pulmonar, salival, gástrica, intestinal, lagrimal y mamaria</i>^(4, 5, 6).</p>
Características principales del proceso de absorción, distribución, biotransformación y excreción en el organismo, después de la administración del fármaco.	

2.2.2. Modelo monocompartimental. Este modelo nos indica que cualquier cambio de concentración en el plasma refleja cuantitativamente los cambios experimentados en las concentraciones tisulares. En este modelo la eliminación se realiza mediante la eliminación de cinética de primer orden es decir que la velocidad de eliminación es en todo momento proporcional a la cantidad de producto presente en el organismo ⁽⁵⁾. (ver **Figura 2**)

REPRESENTACION DE MODELO DE UN COMPARTIMENTO

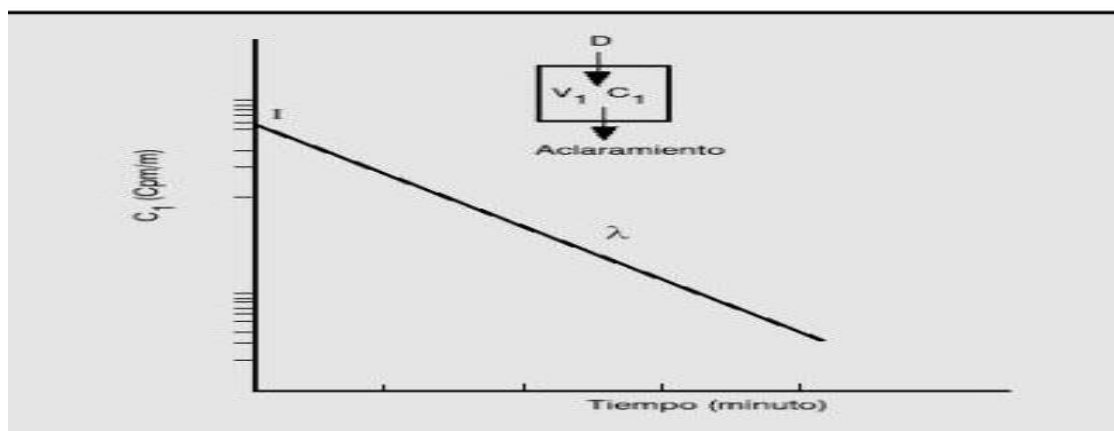


Figura 2. Fármacos que se comportan de acuerdo a este modelo pasan de compartimento central así los tejidos más vascularizados (corazón, hígado, bazo, riñón y pulmón) ⁽⁵⁾.

2.2.3. Modelo multicompartmental. En este hay una fase distributiva, de difusión de fármaco en la sangre y de esta a los otros compartimentos después de retorno y finalmente la eliminación. Cada una de estas fases se realiza a diferentes velocidades regidas por diferentes constantes ^(5, 6). (ver **Figura 3**)

REPRESENTACION GRAFICA DE UN MODELO DE DOS COMPARTIMENTOS

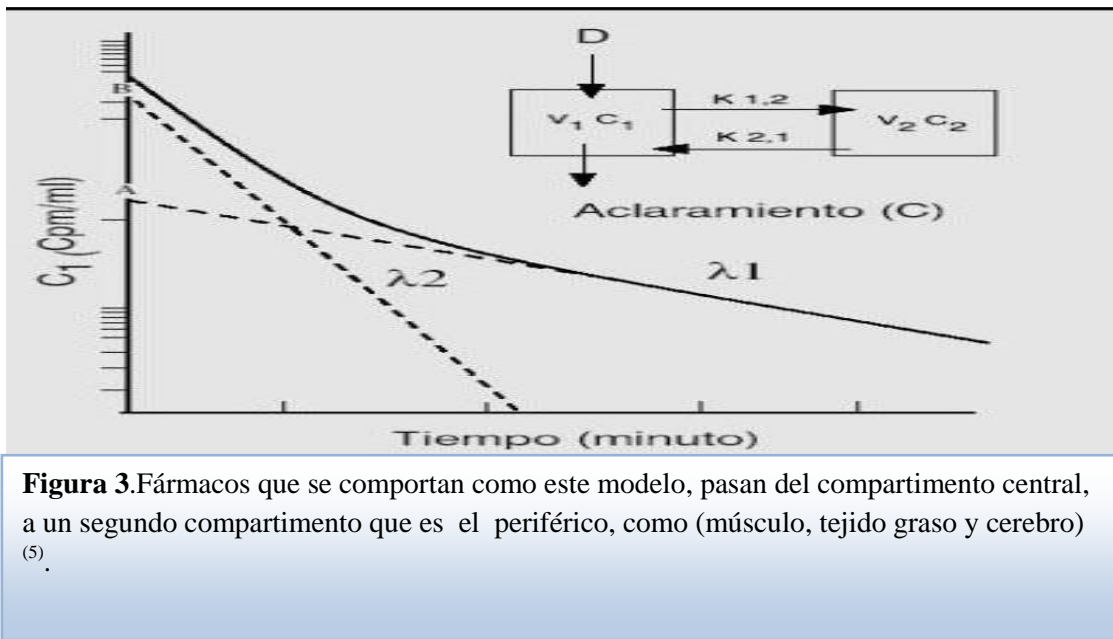


Figura 3. Fármacos que se comportan como este modelo, pasan del compartimento central, a un segundo compartimento que es el periférico, como (músculo, tejido graso y cerebro)⁽⁵⁾.

2.3. Cáncer Cérvico Uterino. El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, éstas se pueden suceder en etapas de displasia leve, moderada o severa y puede evolucionar en cáncer *in situ* (circunscrito a la superficie epitelial) y /o cáncer invasor cuando la lesión traspasa la membrana basal⁽⁷⁾.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS)⁽⁷⁾ ha declarado que el CaCU es una enfermedad en la que se presentan cambios en las células que cubren las paredes del cuello uterino (extremo inferior de la matriz que comunica con la vagina). Estas células inicialmente normales, a la postre se convierten en precancerosas. Con frecuencia en etapas iniciales del cáncer cérvico uterino no se presentan síntomas, por lo que a menudo éste no es detectado hasta que se halla en fases avanzadas. Asimismo, la OPS, hace mención de que el factor de riesgo más común del CaCU es la exposición a ciertas variedades del Virus Papiloma Humano (VPH). Siendo ésta una Infección de

Transmisión Sexual (ITS), en muchos casos asintomática, por lo que puede transcurrir mucho tiempo antes de que se detecte⁽⁸⁾. A menudo las mujeres que se infectan con el VPH en edades entre los 20 y 30 años, pueden padecer el desarrollo del cáncer, proceso que puede tomar hasta 20 años⁽⁹⁾.

2.3.1. Factores de riesgo en el desarrollo del Cáncer Cérvico Uterino (CaCU). Los factores de riesgo del CaCU son tanto de condición biológica como de carácter psicosocial. Entre los principales factores de riesgo pueden considerarse: 1) el que las mujeres no se realicen la prueba de detección periódicamente, 2) el inicio de las relaciones sexuales a una edad temprana, 3) el tener parejas sexuales múltiples, 4) contraer el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que debilita el sistema inmunológico de la mujer haciéndola más vulnerable a la infección por el virus Papiloma Humano (HPV), 5) presentar una historia familiar de cáncer cervicouterino, 6) encontrarse en edades de entre 30 y 60 años y 7) pertenecer a un nivel socio-económico bajo⁽¹⁰⁾. La prevalencia del VPH en países de tercer mundo es una gran incidencia de cáncer cervicouterino es de 10 a 20 %, mientras que la prevalencia en países desarrollados con baja incidencia es de 5-10%. Norma Oficial Mexicana para la Prevención, Detección, Diagnóstico, Tratamiento, Control y Vigilancia Epidemiológica del Cáncer Cérvico Uterino (NOM-014-SSA2-1994), actualizada el 6 de marzo de 1998⁽¹⁰⁾.

2.4. Citocinas. Las citocinas son proteínas producidas por muchos tipos celulares que intervienen de manera cualitativa y cuantitativa en la inducción y ejecución de las respuestas inmunitarias, están implicadas también en los procesos inflamatorios donde su principal función es mediar dichos procesos⁽¹¹⁾.

Las células con capacidad para producir citocinas son muy diversas, entre ellos destacan los monocitos, los macrófagos y los linfocitos⁽¹¹⁾.

Las funciones de las citocinas se agrupan en tres grupos principales:

1. Regulación de la función inmunitaria innata de los procesos inflamatorios induciendo la actividad y la quimiotaxis de los macrófagos, polimorfonucleares y las células asesinas naturales (NK) hacia las áreas de infección⁽¹¹⁾.
2. Regulación de la respuesta inmunitaria específica. Controla los procesos de diferenciación, activación y proliferación de linfocitos B y T⁽¹¹⁾.
3. Regulación de la hematopoyesis. Induce el crecimiento y la diferenciación de los precursores de los diferentes linajes hematopoyéticos⁽¹¹⁾.

Entre las citocinas se incluyen los llamados factores de crecimiento de las colonias de los granulocitos(G-CSF), colonias de granulocitos, macrófagos(GM-CSF), los interferones(α , β y γ) y las interleucinas (IL)⁽¹¹⁾.

2.4.1. Interleucina 2 (IL-2). Conocida como Aldesleukina, TCGF, Intomerleukin-2 Recombinant, Lymphocyte Mitogenic Factor, Thymocyte Stimulating Factor o Interleucina 2 (IL-2)⁽¹²⁾.

Es una glucoproteína de 133 aminoácidos, contiene 3 residuos cisteinicos en las posiciones 58,105 y 125, que forman enlaces di sulfuro que son esenciales para la actividad de la molécula. Algunas de características físicas y químicas de IL-2, están definidas (**ver Tabla2**).

Las células que principalmente secretan IL-2 son los linfocitos T, CD4 +, CD 8+, y los macrófagos. La IL-2 activa la proliferación de linfocitos T, células asesinas naturales (NK) y de los linfocitos B, promoviendo la progresión desde la fase G₁ del ciclo celular,

lo que permite un incremento en el número de estas células⁽¹³⁾. Además que IL-2 también influye en la síntesis de otras moléculas como el interferón γ , factor de necrosis tumoral(TNF) y el GM-CSF⁽¹²⁾.

Estas propiedades inmuno moduladoras han hecho que su primer uso clínico fuera como una alternativa terapéutica en los pacientes con cánceres diseminados resistentes a otros tratamientos, entre los que se encuentran el melanoma maligno, carcinomas renales, y el CaCU^(12, 13).

2.4.2. Receptor de IL-2 (IL-2R). El receptor de IL-2 (IL-2R), está conformado por 3 subunidades glucoproteicas llamadas α , β y γ ; ésta última es necesaria para la internalización y transducción de señales inducidas por el ligando. El IL-2R presenta la máxima afinidad por la IL-2 cuando está conformado por las tres subunidades (α , β y γ) que promueve la proliferación de linfocitos T. Se ha comprobado que el heterodímero IL-2 $\beta\gamma$ es necesario para llevar a cabo la señalización intracelular. Ejemplos de esta señalización es la fosforilación de proteínas tales como la cinasa Raf-1 específica de serina/treonina, la fosforilación de STAT3 y STAT5, por vía JAK3, el rápido incremento pH intracelular, el cual activa los canales de Na^+/H^+ , la activación de la tirosina cinasa SYC que es responsable de la proliferación celular⁽¹⁴⁾.

Tabla 2. PROPIEDADES DE INTERLEUCINA 2 (IL-2)	
Propiedades Farmacológicas	Analgésico, analgésico narcótico, agente antineoplásico, agente del sistema nervioso central, agente del sistema nervioso periférico y agente del sistema sensorial ⁽¹³⁾ .
Formula condensada	C ₆₉₃ H ₁₁₁₈ N ₁₇₈ . Peso Molecular 15415.9 Da
Propiedades químicas	Sensible a tripsinas, quimiotripsina, estable con 2-mercaptoetanol, Urea (2-4 mol /L).
Propiedades fisicoquímicas	Estable a pH 3-10 a 56°C por 60 min, Inestable después de 30 min a 70 °C.
Algunas de las propiedades químicas, farmacológicas y fisicoquímicas ^(12, 13, 14) .	

2.4.3. Farmacocinética de IL-2. Las curvas de vida media sérica en humanos de la IL-2 en una de sus presentaciones comerciales llamada aldesleukina, después de la administración en bolo intravenoso (i.v) se pueden describir como bi-exponenciales; con un $t_{1/2} \alpha$ de 13 minutos y un $t_{1/2} \beta$ de 85 minutos. La fase β es responsable del aclaramiento del 87% de la inyección en bolo^(14, 16, 17).

Los niveles séricos observados son proporcionales a la dosis de aldesleukina. Las cinéticas de IL-2 vía subcutánea (s.c) pueden describirse como un modelo de un compartimento. La vida-media de absorción de la IL-2 es de 45 minutos, mientras que la vida-media de eliminación es de 5.3 horas. La biodisponibilidad absoluta varía entre el 35-47% ^(14, 15).

El riñón es la principal vía de aclaramiento de IL-2 en animales y la mayor parte de la dosis inyectada se metaboliza en el hígado, sin que aparezca en la orina ninguna aldesleukina activa. Después de un periodo sin medicamento entre ciclos de dosis el aclaramiento de IL-2 retorna a sus valores originales. Los niveles de aclaramiento observados en humanos después de una infusión corta i.v (15 minutos) y después de 24 horas de infusión i.v continua varía entre 140-300 ml/min^(15, 16).

Algunos estudios realizados en humanos muestran como es su comportamiento farmacocinético en diferentes vías de administración y niveles de dosis por arriba de 10⁶ UI/ml de IL-2. Algunos de los parámetros farmacocinéticos se pueden describir en (ver Tabla 3y 4).

Tabla3. PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE IL-2 VIA INTRAVENOSA			
Parameter	Units	Median	Mean ± SD
Dose	MU/m²	6.00	
A + B/dose	(units/ml)/dose	400	540 ± 490
B/(A + B)	%	13.4	18.1 ± 14.2
V_c	ml	4,300	
V_n	ml	7,900	
T_a	min	12.9	13.8 ± 7.7
T_b	min	85	86 ± 34
AUC	(units/ml)min/dose	14,500	18,200 ± 15,900
Cl	ml/min	117	
K₁₂	Liters/min	0.017	
K₂₁	Liters/min	0.014	
K₁₀	Liters/min	0.031	

Datos obtenidos de 52 pacientes bolo vía intravenosa, en dosis de 0,5-14 MU/m². Modelo de dos compartimentos⁽¹⁸⁾.

Tabla4. PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE IL-2 VIA SUBCUTANEA.

Number	t_{max} (h)	C_{max} (IU ml ⁻¹)	$t_{1/2,z}$ (4,24 h) (h)	AUC(0,12 h) (IU ml ⁻¹ h)	AUC(0,24 h) (IU ml ⁻¹ h)
1	2.0	105	3.1	647	748
2	4.0	80	4.8	649	829
3	6.0	45	6.5	375	501
4	4.0	52	5.3	366	450
5	4.0	66	6.2	483	657
6	4.0	75	5.0	583	732
7	4.0	80	4.9	401	450
Mean \pm s.d.	4.0 \pm 1.2	72 \pm 20	5.1 \pm 1.1	501 \pm 125	627 \pm 153

Datos obtenidos de 7 pacientes en dosis de 20 X 10⁶ UI/ml de IL-2 en inyección subcutánea (s.c) en pacientes con carcinoma de células renales metastásico⁽¹⁹⁾.

2.4.4. Efectos adversos del uso de IL-2. Los principales efectos adversos reportados en dosis mayores de 10⁶UI/ml están indicados^(13,15, 18).**(ver Tabla 5)**

Tabla5. EFECTOS ADVERSOS DE IL-2 LIBRE

- **Síndrome de extravación capilar**
- **Edema generalizado(Descamación)**
- **Deterioro en la función renal**
- **Sistema de shock tóxico**
- **Anemia**
- **Infarto al miocardio**
- **Erupciones cutáneas**
- **Náuseas, vomito, fiebre, escalofrios, dolor de cabeza, muscular.**

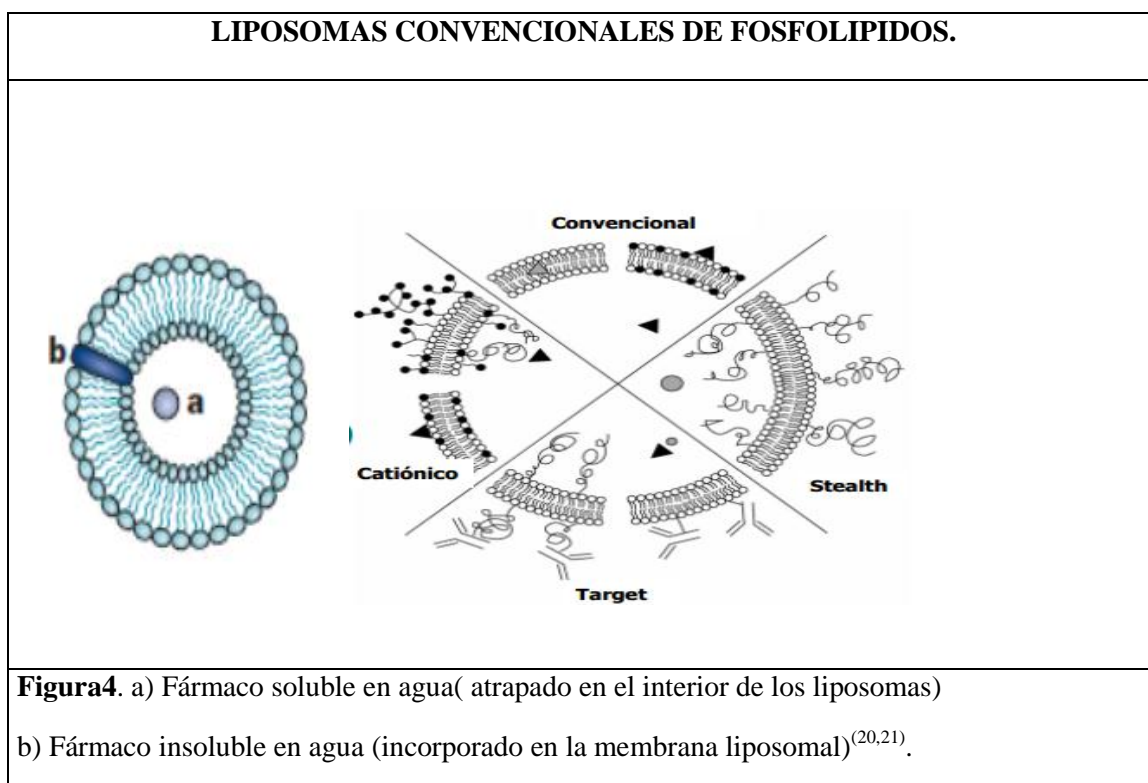
Principales efectos adversos de IL-2 reportados cuando es administrada en su forma libre^(13,15,17, 17).

2.5. Liposomas. Los liposomas fueron descubiertos en el año 1965 por Bangham y colaboradores⁽¹⁹⁾.

Los definió como estructuras formadas por lámelas o bicapas lipídicas concéntricas que están separadas por un número igual de espacios de contenido acuoso, generalmente de fosfolípidos ⁽²⁰⁾. Habitualmente se utilizan fosfolípidos, con o sin la incorporación de colesterol u otros materiales, introducidos en la pared de los liposomas con el fin de dotar las vesículas de alguna propiedad particular (ej: carga superficial)⁽²¹⁾.

Son estructuras huecas que presentan dimensiones entre 0,005 y 100 μm formados por lípidos anfipáticos, cuya estructura es similar a la membrana biológica. Esta estructura en un medio acuoso forma una bicapa lipídica en la que los grupos fosfato hidrofílicos forman la superficie de un sándwich y las colas hidrofóbicas no polares de los ácidos grasos se acomodan dentro de la estructura del sándwich, protegidos del agua ⁽²¹⁾.

La estructura se estabiliza al envolverse en una esfera ⁽²¹⁾. Este comportamiento permite que los liposomas puedan transportar fármacos solubles en agua en su compartimento interno o fármacos insolubles en agua en la membrana ⁽²¹⁾. (ver **Figura 4**).



2.5.1. Tipos de liposomas. Además de la clasificación habitual de los liposomas y sus características fisicoquímicas o al proceso de fabricación es posible realizar otra clasificación teniendo en cuenta el comportamiento que tendrán los liposomas de acuerdo a su estructura. Desde este punto de vista, se podrían distinguir los siguientes tipos de liposomas:

- Liposomas convencionales.
- Liposomas de circulación prolongada o stealth liposomas.
- Liposomas catiónicos.
- Inmunoliposomas.

Por su tamaño han sido clasificados como unilamelares pequeños (SUV), grandes (LUV), multilamelares (MLV) o multivesiculares (MVV)^(20,21). (**ver Tabla 6**)

Abreviatura	Nombre completo/lamellaridad	Tamaño
MLV	Vesículas multilamelares	> 0.5 µm
OLV	Vesículas oligolamelares	0.1-1 µm
UV	Vesículas unilamelares	Todos los rangos de tamaños
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas	40-100 nm
LUV	Vesículas unilamelares grandes	> 400 nm
GUV	Vesículas unilamelares gigantes	> 1 µm
MVV	Vesículas multivesiculares	> 1 µm

Nomenclatura de liposomas en función del tamaño y la lamellaridad⁽²⁰⁾.

2.5.2. Ventajas de liposomas. Inicialmente estas vesículas se utilizaron como modelo de membranas biológicas dada la similitud que presentan con ellas, pero muy pronto teniendo en cuenta su versatilidad estructural, así como su carácter biodegradable y biocompatible⁽²²⁾.

Se planteó su utilización en liberación y direccionamiento de fármacos, siendo espectacular el número de trabajos y patentes publicadas sobre la utilización de liposomas (**ver Tabla 7**) se encuentran los principales medicamentos encapsulados. Dentro de los beneficios que proporcionan los liposomas como sistemas acarreadores que encapsulan diferentes fármacos o principios activos, están la protección del fármaco de enzimas del organismo, reducción de efectos secundarios, reducción del efecto del primer paso, capacidad para mantenerse en circulación, especificidad de acción en células o tejidos blanco y la velocidad de liberación del fármaco puede ser optimizada en función de los requerimientos farmacológicos y farmacocinéticas ⁽²³⁾.

Adicionalmente los componentes de los liposomas no son tóxicos ni inmunogénicos son biodegradables y tienen la capacidad para contener, transportar, mejorar la estabilidad y ceder principios activos terapéuticos⁽²³⁾.

Tabla 7. PRINCIPALES FARMACOS ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS

Vía administración/ Producto/Estatus	Molécula activa	Indicaciones
Administración i.m.y otras		
Vacuna Novasome® Enfermedad de Newcastle	Virus muertos enfermedad de Newcastle	Enfermedad de Newcastle
Vacuna Novasome® Rheovirus Avian	Rheovirus Avian muertos	Enfermedades producidas por Rheovirus Avian
Hepaxal®	HAV	Hepatitis A
Inflexal®	Hemaglutinina y neuramidasa de H1N1H3N2 y B	Influenza
Pevi PRO y PEV3A Fase II	Epitopos sintéticos de <i>P. falciparum</i>	Malaria
DepoCyt (intratecal)	Citosina arabinosido	Meningitis linfomatosa y Neoplásica
Allovecvtin-7 (intralesional)		
Fase III	Plásmido HLA-B7	Terapia génica de cánceres metastásicos
Administración oral		
Vacuna Novasome <i>E. coli</i> 0157:H7	<i>E. coli</i> 0157 muertos	Infecciones por <i>E. coli</i>
Vacuna S. Flexneri 2A	S. Flexneri 2A muertos	Infecciones por S. flexneri
Administración tópica		
ELA- Max®	Lidocaina	Anestesia local, alivio temporal del dolor/ picor intenso
Dimericine®	Endonucleasa bacteriana T4N5	Trasplante renal Xeroderma pigmentosum
Administración tópica		
Pevary crema®	Econazol	Infecciones fúngicas tópicas
Dolant®	Diclofenaco	Antiinflamatorio tópico
Administración pulmonar		
Abelcet®	Anfotericina B	Infecciones fúngicas sistémicas; Trasplante de pulmón
9-N-Camptotecina	Camptotecina	Sarcoma de Erwing; Cáncer de Pulmón primario y metastásico; Cáncer de útero y endometrio
Cisplatino liposomado	Cisplatino	Cáncer de pulmón
Arikace	Amikacina	Fibrosis quística
Interleukina 2 liposomada	Interleukina 2	Metástasis pulmonares
Ciprofloxacino liposomado	Ciprofloxacino	Fibrosis quística
AeroLEF	Fentanilo	Dolores agudos cancerosos
Pentamidina liposomada	Pentamidina	Infecciones por VIH

Formulaciones que contienen liposomas comercializadas o en fases de ensayo clínico, para su utilización por diferentes vías y con distintos fines terapéuticos ⁽²⁰⁾.

2.5.3. Acción de liposomas en el organismo. Los liposomas pueden interactuar con la célula de distintas maneras. La absorción puede ser inespecífica o mediada por ligandos específicos tales como anticuerpos, hormonas, lectinas y pueden o no dar lugar secundariamente a la incorporación endocítica de los liposomas y su contenido al interior celular. El intercambio de lípidos es un proceso en el cual se transfiere lípido entre la membrana celular y la monocapa exterior del liposoma sin existir asociación íntima entre ambos. La endocitosis es una de las formas más importantes de interacción, los fagocitos incorporan liposomas de manera muy significativa, mientras que otras células no fagocíticas, también endocitan liposomas, aunque en menor proporción ⁽²⁴⁾.

La fusión de los liposomas con la membrana celular origina cualquier lípido o proteína de éste sea insertada en la membrana, cuando las vesículas unilamelares se fusionan, su contenido es inyectado directamente en el citoplasma, mientras que cuando se fusionan las vesículas multilamelares, inyectan su contenido en el citoplasma, secuestrado en unas pocas bicapas concéntricas de la vesícula original. Cuando los liposomas son inyectados intravenosamente, interactúan inmediatamente con las lipoproteínas de alta densidad, las cuales remueven las moléculas de fosfolípidos de las bicapas asociando el rompimiento de los liposomas y la liberación de su contenido en la circulación en general. Sin embargo cuando los liposomas contienen colesterol o fosfolípidos saturados, presentan un comportamiento más estable *in vivo*, debido a que estos compuestos previenen la desestabilización en la membrana y por ende la liberación del contenido de los liposomas⁽²⁴⁾. El tiempo en que los liposomas se mantienen en circulación depende del tamaño, la carga la composición y la cantidad de lípidos administrada, por ejemplo, las vesículas pequeñas tienen una vida media más larga que las vesículas grandes y los liposomas con carga positiva circulan por más tiempo que los liposomas con carga negativa.

En circulación son incorporados por monocitos, polimorfonucleares y células endoteliales, o interactúan con otros componentes de la sangre, asimismo, pueden ser removidos y retenidos por células fagocíticas del hígado, bazo, pulmón, bazo y médula ósea en la misma forma en que las otras partículas son removidas en la circulación. La cantidad de liposoma incorporada por estos órganos, es de alguna manera dependiente de la dosis del lípido administrada, con dosis pequeñas muchos liposomas son retenidos por el hígado, pero con dosis grandes la capacidad del hígado para remover partículas de la circulación es superada y la cantidad que se mantiene en circulación incorporada en mayor proporción por el bazo, pulmón y médula ósea; este fenómeno llamado “Bloqueo del sistema retículoendotelial”. El cual prolonga el tiempo de circulación de los liposomas, aunque no incrementa la acumulación a otros tejidos, ya que el patrón de similitud es muy similar⁽²⁵⁾. Los liposomas inyectados en la cavidad peritoneal tienen una conducta semejante en la manera en que otras partículas son removidas de este sitio, una proporción de liposomas intactos alcanzan los linfáticos y eventualmente llegan a la circulación con la subsecuente distribución a los órganos del sistema retículo endotelial⁽²⁶⁾.

Los liposomas inyectados subcutáneamente o intramuscularmente, son lentamente distribuidos del sitio de la inyección incorporada al sistema linfático y solo una pequeña cantidad alcanza la circulación, y eventualmente se distribuye en hígado y bazo. Los liposomas también son administrados tópicamente, demostrándose que a través de esta ruta constituye un sistema de liberación continua; asimismo los liposomas han tenido que ser administrados por otras vías, en las cuales se incluye la vía oral, interarticular y endolinfática entre otras^(26, 27).

2.5.4. Farmacocinética de Liposomas. La asociación de fármacos con liposomas como acarreadores, puede conducir a resultados dramáticos en la farmacocinética y en la distribución del fármaco. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco con liposomas es muy similar a lo de un fármaco libre⁽²⁸⁾.

No todos los fármacos son fácilmente estabilizados cuando se asocian con liposomas y se puede ver como la solubilidad de los fármacos tiene efectos en estas asociaciones⁽²⁸⁾. Esto es si el principio activo es hidrofílico, hidrofóbico o de solubilidad intermedia así como el coeficiente de partición (LogP_{oct})^(28,29).

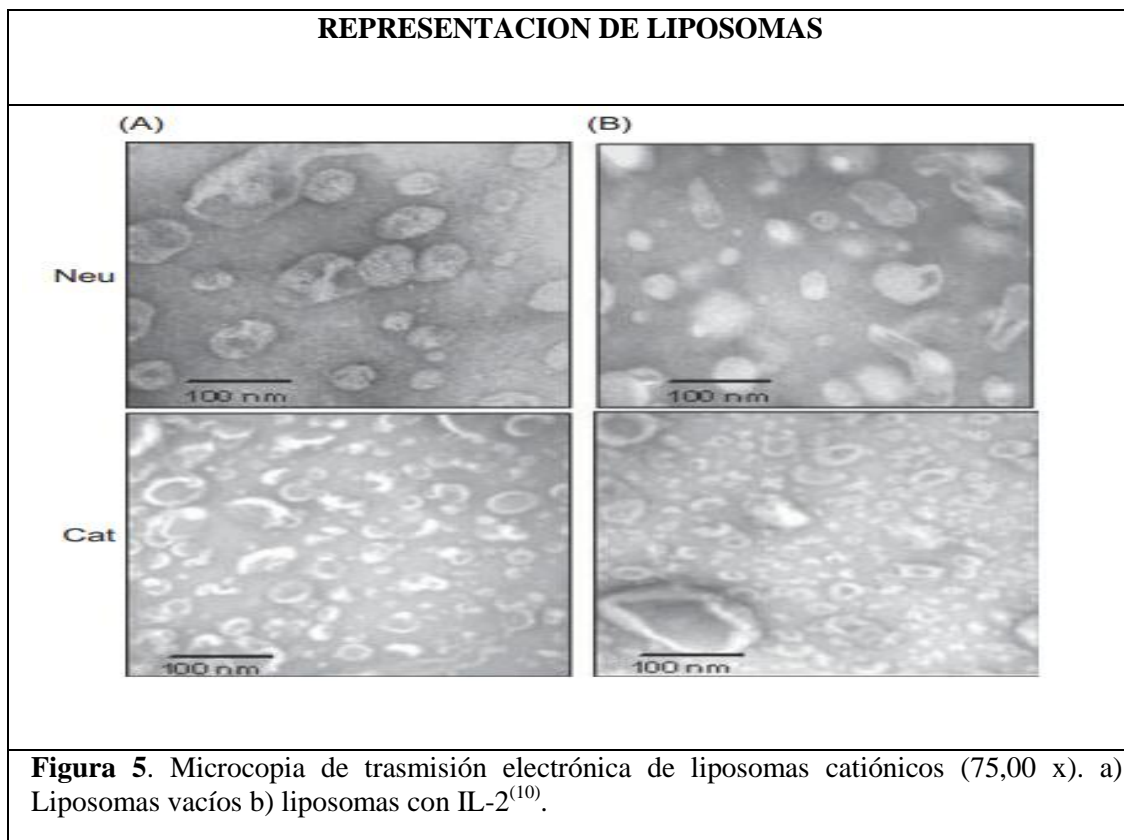
La farmacocinética de fármacos encapsulados con liposomas se puede describir matemáticamente como un modelo de dos compartimentos, que puede iniciar con una rápida fase de aclaramiento que refleja la distribución y una fase corta de eliminación, estos parámetros farmacocinéticos se ven afectados por la dosis, composición del sistema de liposomas, del diámetro de estos, y la vía de administración^(28,29).

La distribución de la depuración o aclaramiento (CL) es primero en el hígado a dosis bajas a los pocos minutos de la inyección al incrementarse la dosis hay un incremento en la vida media, se encuentra en el bazo, hígado, entre otros. Estas observaciones han sido aprobadas clínicamente, en formulaciones con fármacos antineoplásicos, como; Doxorubicin® y Vincristine® en el tratamiento contra cáncer de mama y próstata respectivamente⁽²⁹⁾.

2.5.5. Sistema nanoacarreador de IL-2 basado en liposomas. La invención se refiere a una novedosa composición de un producto antineoplásico e inmuno regulador y su uso en el tratamiento del cáncer cérvico uterino.

Este novedoso producto se fabrica en base de liposomas lipídicos de tipo catiónico utilizados como nanoacarreadores de interleucina 2 (IL-2), el lípido utilizado en su producción es una mezcla de fosfatidilcolina de yema de huevo (PC) y espermidin colesterol (Esp-Ch). La morfología de estos nanoacareadores es esférica y el tamaño varía entre 25 y 125 nm de diámetro(ver **Figura 5**), teniendo un predominio por los nanoacareadores pequeños, entre 25 y 50nm ⁽³⁰⁾.

Los nanoacareadores lipídicos catiónicos se preparan mezclando fosfatidilcolina (PC), (extracto clorofórmico de yema de huevo) y el espermidil-colesterol (Esp-Ch) (lípido catiónico sintético), este último le proporciona la carga positiva a la bicapa lipídica de los nanoacareadores ⁽³⁰⁾.



2.5.6. Efectos del sistema nanoacarreador que contiene IL-2 en tratamientos contra el cáncer cérvico uterino. De acuerdo a la PAT MX/a/2008/008681 el sistema nanoacarreador que contiene IL-2 es útil para el tratamiento del cáncer cervicouterino en la administración de hasta 200UI/ml de IL-2, favoreciendo la respuesta inmunológica en contra de este padecimiento, inhibiendo la proliferación de las células tumorales y activando el sistema inmunológico. El nanoacarreador se une a las células de carcinoma de cérvix tomando en cuenta que las células tumorales presentan receptores para la IL-2 y por tanto son afines al nanoacarreador que la transporta⁽³⁰⁾.

La novedosa invención describe el desarrollo de una composición y su uso para la eliminación de células de cáncer cérvico uterino, en especial en el caso de los estadios avanzados, reduciendo de manera importante los efectos colaterales por el efecto citotóxico que confiere la IL-2 en altas dosis; por lo que se trata de un vector directo para que la IL-2 este en el sitio de acción sin que se presenten efectos secundarios⁽³⁰⁾.

2.5.7. Importancia de los liposomas en la industria farmacéutica. El uso de sistemas acarreadores ha tenido un gran incremento; muchos de los fármacos usados de forma libre ahora son encapsulados en lípidos, para así llevarlos al sitio de acción, tener mejor eficacia y menor toxicidad en el organismo. Ejemplos de estos productos son los antineoplásicos, vacunas, acarreadores genéticos para transferir ADN y proteínas como la hemoglobina. Ha sido notable la utilización de liposomas para encapsular medicamentos antitumorales, por ejemplo; en adenocarcinomas se han administrado liposomas con muramiltripéptido e ifosfamida⁽³⁰⁾.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es una de las causas principales de muerte por neoplasia maligna entre las mujeres mexicanas, asociado significativamente a una etiología viral por lo que es candidato para el uso de inmunoterapia utilizando citocinas como la Interleucina 2 (IL-2). Según datos oficiales del Gobierno Federal en México, cada dos horas muere una mujer a causa de este tipo de cáncer, lo que implica alrededor de 4000 muertes de mujeres al año, lo que convierte al CaCU en un problema nacional en materia de salud. A partir de este aumento en la mortalidad a causa del CaCU la industria farmacéutica se ve obligada a desarrollar nuevas alternativas biotecnológicas en terapias farmacológicas contra el cáncer. Precisamente, en la actualidad la industria farmacéutica tiene como uno de sus principales objetivos el descubrimiento de nuevos medicamentos a través de la biotecnología así como la caracterización de nuevas moléculas por técnicas modernas.

Los liposomas son partículas generadas mediante biotecnología ampliamente utilizadas en diversas disciplinas, debido a sus características de biocompatibilidad, protección, tamaño, carga, propiedades superficiales y principalmente por poseer un alto potencial como transportadores de fármacos; siendo esta última característica la que influye directamente en la farmacocinética y biodisponibilidad de fármaco que conlleva a disminuir la toxicidad y prolongar el efecto terapéutico.

La IL-2 es utilizada en terapias contra diferentes tipos de cánceres, en los cuales se encuentra CaCU debido a su poder inmunorregulador; sin embargo, su uso produce serios efectos adversos, por lo que nuestro grupo de investigación la ha encapsulado en liposomas formando un nanosistema farmacéutico innovador y para cumplir el marco regulatorio vigente es importante realizar los estudios preclínicos pertinentes.

Estudios previos realizados han demostrado que el sistema nanoacarreador tiene eficacia farmacodinámica en la reducción de tumores de CaCU y que el sistema no es tóxico en dosis terapéuticas. Sin embargo para completar los estudios preclínicos, es importante demostrar su comportamiento farmacocinético cuando la IL-2 es encapsulada, para así, en un futuro poder ofrecer una composición farmacéutica estable, segura y eficaz para el tratamiento del Cáncer Cérvico Uterino que pueda ser utilizada en terapias clínicas en humanos.

4. HIPÓTESIS

Considerando que la IL-2 es una molécula inmunorreguladora eficaz en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y que su inclusión en un sistema nanoacarreador permite conservar sus cualidades farmacodinámicas, eliminando los efectos tóxicos visibles ofreciendo una composición farmacéutica estable, segura y eficaz, se espera que su evaluación farmacocinética contribuya a los estudios preclínicos para demostrar que puede ser usada en tratamientos contra el cáncer cérvico uterino. Además, tomando en cuenta que la IL-2 libre se comporta como un modelo de un compartimento por vía subcutánea u otra vía, excepto por vía intravenosa, se espera que IL-2 contenida en un sistema nanoacarreador se comporte farmacocinéticamente como un modelo de dos compartimentos, debido al carácter lipofílico del liposoma, sin que haya modificación en los parámetros farmacocinéticos de la IL-2.

5. OBJETIVOS

Objetivo general.

Realizar la comparación farmacocinética de IL-2 contenida en un sistema nanoacarreador (liposomas) y la citocina libre en ratones de la cepa CBA vía intraperitoneal.

Objetivos particulares.

- 1) Fabricar el sistema nanoacarreador de IL-2 y utilizarlo para comparar los parámetros farmacocinéticos de la IL-2 libre.
- 2) Realizar la cuantificación de IL-2 en suero y en diferentes órganos.
- 3) Calcular los parámetros farmacocinéticos.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL.

6.1. Tipo de estudio: Experimental, Prospectivo, Longitudinal y Comparativo.

6.1.1. Variables dependientes: Tiempo.

6.1.2. Variable independiente: Dosis del sistema nanoacarreador de IL-2.

6.1.3. Población objetivo: Sistema nanoacarreador que contiene IL-2

6.1.4. Población de estudio: Ratones hembra CBA inmuno suprimidas de un año de edad.

6.2. Criterios

6.2.1. Criterios de inclusión.

Ratones hembra inmunodeprimidas de un año de edad.

Sistema nanoacarreador de IL-2 en su periodo de vida útil.

6.2.2. Criterios de exclusión.

Ratones hembra que presenten alguna reacción alérgica.

Ratones hembra que se encuentren enfermas.

Sistema nanoacarreador de IL-2 que presente precipitación, aglomeración, presencia de partículas extrañas, cambios en su presentación como forma farmacéutica.

6.2.3. Criterios de eliminación.

Muerte del animal.

Lisis o hemolisis de las muestras de sangre.

7. MATERIALES

7.1. Material biológico:

Animales: El experimento se llevó a cabo con ratones hembra inmunodeprimidas de la cepa CBA con un año de vida, mantenidas en el bioterio de Roedores de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campus II, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

7.2. Equipos e Instrumentos.

Campana de flujo laminar.

Ultracentrífuga Modelo Beckman INV 1272811

Tubos para Ultracentrífuga

Rotor SW40-1, Camisas Número de Serie L92L831

Tubos Cónicos de 1,5 ml marca Eppendorf

Pipetas dosificadora Eppendorf

Lector de placa ELISA ELX800

Filtros de 0,22 micras marca Millipore

Balanza analítica Denver Instrument

Placas de ELISA Sarstedt Catálogo 82.1581

Equipo de refrigeración 2-8°C Nieto ByMetalfrío

Tubos estériles de ensayo 13X100 Pyrex

Inyecciones de insulina 1, 0.1 ml marca

Guantes, cofia, cubre bocas, bata blanca.

8. METODOLOGIA.

8.1. Sustancia a ensayar. Sistema nanoacarreador que contiene IL-2 en PBS lote LOCE120913 e IL-2 stock en PBS.

8.2. Producción de liposomas. Producción del sistema nanoacarreador que contiene IL-2 (liposomas) de acuerdo al *PNO- LOCE 120913* se compone de IL-2 en concentración de 100UI/ml, espermidilcolesterol, fosfatidilcolina, cloroformo (se eliminó el disolvente con corriente de nitrógeno), PBS(solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7,2-7,4). Se realizó un proceso de sonicación de ciclos de 5 segundos con descanso de 10 segundos entre cada ciclo y una ultracentrifugación con la ultracentrífuga Modelo Beckman IVN 1272811 Serie L92L831 a 40000 durante 40 min, se decantó el sobrenadante y el botón obtenido en la parte inferior de los tubos estériles representó a los liposomas que fueron resuspendidos con 13 ml PBS y acondicionados en eppendorf de 2ml.

8.3. Farmacocinética.

8.3.1. Ratones. Se realizó el estudio de farmacocinética con ratones hembra de la cepa CBA inmunosuprimidos de 1 año de edad como modelo de sujeto sano, criados y mantenidos del bioterio de la FEZ Zaragoza Campus II en condiciones de acabado sanitario, filtro de aire, con cama de Aspein Chip del laboratorio Heattreated 100% Virgin Wood fiberfuller, el tipo de alimento fue proteína para dieta de roedor (esterilizable) libre de aditivos de laboratorio Harlan 20185, agua esterilizada con filtro, cajas metálicas con 5 ratones cada una, control de temperatura y porcentaje de Humedad Relativa durante el estudio de aproximadamente 2 semanas con un promedio de $21.54^{\circ}\text{C} \pm 1.75^{\circ}\text{C}$ y $21.36\% \text{HR} \pm 6.134\% \text{HR}$ y ciclos de luz oscuridad de 12 horas.

Se formaron 2 grupos de 26 ratones, el primer grupo para IL-2 libre a 100UI/ml y el segundo grupo para el sistema nanoacarreador que contiene IL-2 a 100UI/ml de acuerdo al PNO- LOCE INM190913; se administró por vía intraperitoneal, en dosis única 300 µl tanto del sistema nanoacarreador que contiene IL-2 como a los ratones con el tratamiento de IL-2 libre, se utilizaron dos ratones por tiempo. Se sacrificaron dos ratones por tiempo por medio de método de exsanguinación en los tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 78, 120, 180, 300 y 480 min., se obtuvieron las muestras de sangre en tubos microtainer® de 2 ml con gel aumentador de suero entre 1-1.5 ml de sangre, se centrifugaron las muestras de sangre a 3000 rpm durante 15 min, se separó el suero entre 200-600 µl, se colocó en tubos eppendorf de 2 ml y se guardó en congelación, se eliminaron las muestras de sangre que presentaron lisis o hemolisis.

Se obtuvo corazón, riñón, hígado, grasa del peritoneo y pulmón de cada uno de los ratones, en los mismos tiempos de muestreo por duplicado. Se pesaron, se colocaron en papel aluminio y se congelaron en un equipo Nieto ByMetalfrío a -20°C.

8.3.2. Extracción de IL-2 por medio de Buffer de lisis en órganos. Se pesó el órgano después de la extracción, se procedió a conservarlos a -80°C. Para las determinaciones se descongeló se cortó un trozo de aproximadamente 0,5 g y se pesó, se colocó en un eppendorf de 2ml se agregó entre 200-400 µl de buffer de lisis y se trituró con un mortero, Se centrifugó a 3000rpm durante 15 minutos, Se separó la solución del botón. Esto se realizó en los 26 ratones de cada uno de los tratamientos para cada órgano en cada uno de los tiempos por duplicado, tanto de los ratones tratados con IL-2 libre así como de los ratones tratados con el sistema nanoacarreador que contiene IL-2. Se separó la solución y colocó en tubo eppendorf de 1,6 ml. De esta solución se tomaron 50µl por duplicado en cada pozo en una

inmunoplaaca de 96 pozos para la determinación de la cantidad de IL-2 mediante la técnica de ELISA.

8.3.3. Determinación de IL-2, en suero y en órganos de ratones de cepa CBA tratados con liposomas e IL-2 libre.

8.3.3.1. Soluciones requeridas.

Anticuerpo monoclonal contra IL-2 humana (anticuerpo de captura, obtenido de células de mieloma de ratón). Reconstituir 500µg de 1.0 ml de PBS estéril y homogenizar. Almacenar esta solución de 2-8°C.

Anticuerpo biotinilado contra IL-2 humana (Anticuerpo de detección, obtenido de IgG policlonal de cabra). Reconstituir 50µl en 250µl de Buffer trisalino estéril, pH 7,3 que contiene 0,1% de albúmina de suero bovino y homogenizar. Agregar 750µl de PBS estéril y homogenizar. Almacenar esta solución de 2-8°C.

Buffer de lavado 0.05% Tween 20 en PBS, pH 7,4.

Polivinilpirrolidona al 1% en buffer de lavado (PVP).

Estreptavidina HRP (estreptavidina con peroxidasa de rábano Ultrasensible Catalogo Number S2438 Sigma-Aldrich).

Solución salina Amortiguadora de Fosfatos pH 7.2-7.4 (Phosphate Buffer Saline PBS).

Solución Amortiguadora de citratos pH 5.

Solución sustrato-Mezcla 1:1 de agente colorante A(H₂O₂) y agente colorante B(tetrametilbenzidina)(R&D Systems, Catalog #DY999).

Solución paro-Ácido Sulfúrico 1M. Buffer de Lisis: Agua, Tritón x-100, PMSF 0,1 M, orto vanadato de sodio 0,1 M, EDTA 0,25M, NaCl 5 M, NaF 0,5 M, Pirofosfato de sodio 0,1 M, Tris 1M, Inhibidores de proteasas (Aprotinina, Leupeptina).

8.3.3.2. Preparación de la inmunoplaaca de ELISA de acuerdo al PNO (LOCE121012)

1. Se transfirieron entre 50-100µl/ del anticuerpo de captura MAB 602 por duplicado en una inmuno placa de 96 pozos de ELISA sarstead se diluyo la concentración con PBS. Se selló la placa con papel parafilm y se incubó a temperatura ambiente por 24h.
2. Se aspiró cada pozo y se lavó con buffer de lavado, se repitió el proceso dos veces para un total de 3 lavados se usó un dispersor múltiple Eppendorf®, se completó la eliminación del líquido en cada paso lo cual es esencial para un buen funcionamiento. Después del último lavado, se removió cualquier remanente de buffer de lavado por aspiración o por inversión de la placa y secar con una toalla de papel limpia.
3. Se bloqueó la inmunoplaaca se adicionando entre 50-200 µl de PVP se incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se repitió la aspiración/ lavado como en el paso 2. Las placas ahora están listas para la adición de las muestras.

8.3.4 Preparación de la curva estándar, muestras de suero y órganos.

8.3.4.1. Preparar una curva estándar de IL-2 LOTE 270513.

- 1- Se preparó una solución de IL-2 a una concentración de 500ng/ml en PBS.
- 2- De esta solución se tomó con una micropipeta 16µl se agregó en un vial limpio de 2ml que contenga 968 µl de PBS se obtuvo una concentración de 12 ng/ml hasta obtener una concentración de 10,8,6,4,0.5,0.25,0.125ng/ml.
- 3- Se colocó 50µl de las concentraciones de 12, 10, 8, 4, 0.5, 0.25, 0.125 ng/ml al menos por duplicado en una inmunoplaaca de 96 pozos de ELISA sarstead.

8.3.5. Muestras de suero y órganos.

5. Se colocó 50µl de suero de los tiempos 0, 0.5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 78, 120, 180, 300 y 480 min por duplicado un micro pipeta de 200µL.

6. Se colocó 50 µL la solución de lisis, de cada órgano, grasa, hígado, riñón, pulmón al menos por duplicado de los tiempos de muestreo, con un micro pipeta de 200µL.

7. Se incubó durante 1-2 h.

8. Se aspiró se lavó cada pocillo como lo indica el paso 2.

9. Se añadió 50-150µl del anticuerpo de detección a cada pozo, se cubrió la placa con papel parafilm, se encubó durante 1-2 h.

10. Se aspiró se lavó cada pocillo como lo indica el paso 2.

11. Se añadió 50-150µl a cada pocillo de estreptovidina, se dejó encubar durante 30-45 min. Se aspiró se lavó cada pocillo como lo indica el paso 2.

13. Se añadió 50-100 µl de solución TMB sustrato se añadió a cada pocillo se encubó durante 30 min en la oscuridad, se agitó para mezclar completamente.

14. Se agregó 25-100µL de solución de paro (H_2SO_4) por pozo.

15. Se determinó la densidad óptica de cada pozo dentro de los primeros 30 minutos usando el lector de Elisa ELX800 a 450 / 570 (corrección de longitud de onda). Se interpoló cada absorbancia para encontrar la concentración correspondiente a través de la curva estándar (**ver gráfico 1**).

8.4. Determinación de parámetros farmacocinéticas. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon por medio del Software Microsoft Excel 2010, a partir de

las concentraciones obtenidas de IL-2 libre administrada vía intraperitoneal de 0-8hrs. horas, los cálculos realizados fueron los siguientes:

Los cálculos realizados fueron: Área bajo la curva desde el tiempo cero hasta las 8 horas (ABC_{0-t}); se determinó por el método de trapecios.

Área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el infinito ($ABC_{0-\infty}$) obtenido de la concentración sanguínea versus tiempo.

Depuración aparente (CL) del compuesto en la sangre después de la administración (i.p); se calculó por medio de la multiplicación del volumen de distribución (Vd) y constante de eliminación K_e (distribución).

Volumen de distribución aparente (Vd); se calculó del cociente de dosis (D) y la ordenada al origen (C_0).

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$); se obtuvo del cociente de $\ln 2$ sobre constante de eliminación o en su caso de absorción (k_e, k_a).

Concentración máxima del compuesto en sangre ($C_{máx}$); es la concentración mayor que se observa después de la administración i.p.

Tiempo máximo ($t_{máx}$); tiempo para alcanzar la concentración más alta.

Constante de eliminación (K_e); se determinó con la pendiente negativa de la curva de regresión lineal. Constante de absorción (k_a); se determinó con la pendiente de la curva del método de residuales.

Apartir de los datos obtenidos de IL-2 en suero de 0-8 hrs con una dosis única vía intraperitoneal, para el tratamiento del sistema nanoacarreador que contiene IL-2. Los parámetros calculados fueron:

Área bajo la curva desde el tiempo cero hasta las 8 horas (ABC_0-t); se obtuvo por medio del método de trapecios.

Área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el infinito ($ABC_0-\infty$); se obtuvo por medio de la suma de los cocientes de $A/\alpha + B/\beta$.

B (ordenada al origen) y constante de transformación β (pendiente); se obtuvieron por medio de regresión lineal de la primera caída bioexponencial.

A (ordenada al origen) y constante de transformación α (pendiente); se obtuvieron por medio de método de residuales la segunda caída bioexponencial.

Volumen de distribución aparente (V_d); obtenido de la división de dosis (D) / $B(ABC_0-\infty)$.

Constante de distribución (K_{21}); se obtuvo de la siguiente fórmula $A\beta + B\alpha / (A+B)$.

Constante de distribución (K_{10}); se obtuvo de la división de $\alpha\beta / K_{21}$

Constante de distribución (K_{12}); se obtuvo de la siguiente suma $\beta + B + K_{21} + K_{10}$.

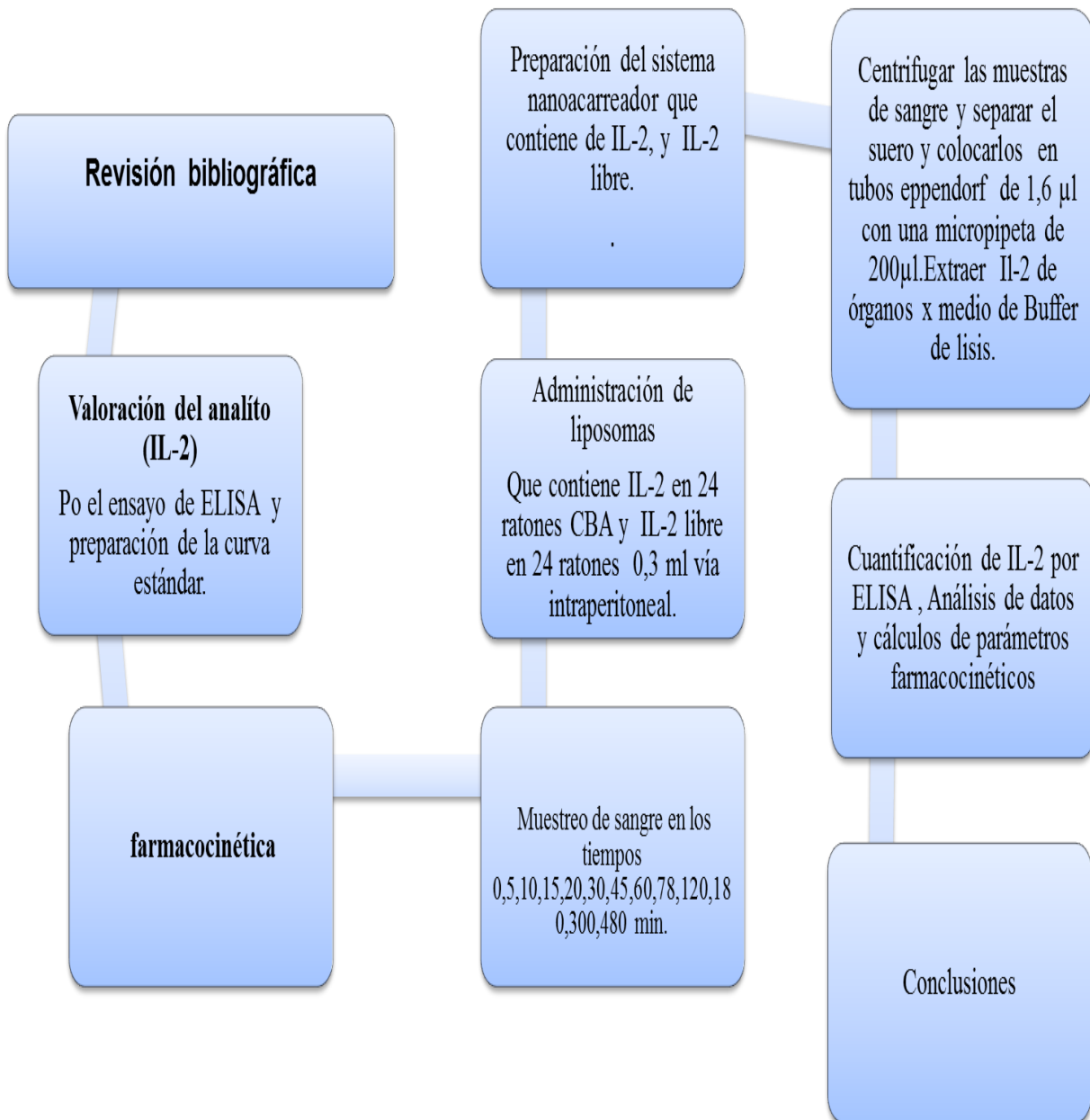
Concentración máxima del compuesto en sangre ($C_{m\acute{a}x}$); es la concentración mayor que se observa después de la administración i.p. Tiempo máximo ($t_{m\acute{a}x}$); tiempo para alcanzar la concentración más alta.

Tiempos de vida media de disposición ($t_{1/2}$); se obtuvo de la división de logaritmo natural de dos ($\ln 2$) sobre $\ln 2 / \alpha$ y $\ln 2 / \beta$ (constante de transformación).

Depuración aparente (Cl); se obtuvo de la multiplicación de ($V_d * K_{10}$).

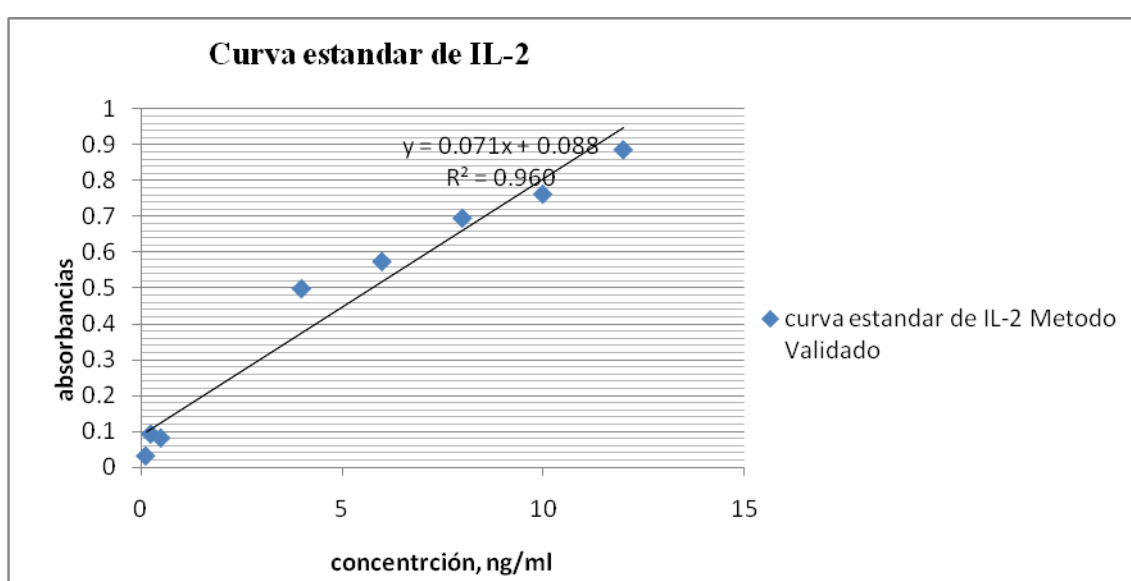
Volumen de distribución aparente (V_d); obtenido de la división de dosis (D) / $B(ABC_0-\infty)$. (Ver ANEXO1)

9. DIAGRAMA DE FLUJO



10. RESULTADOS.

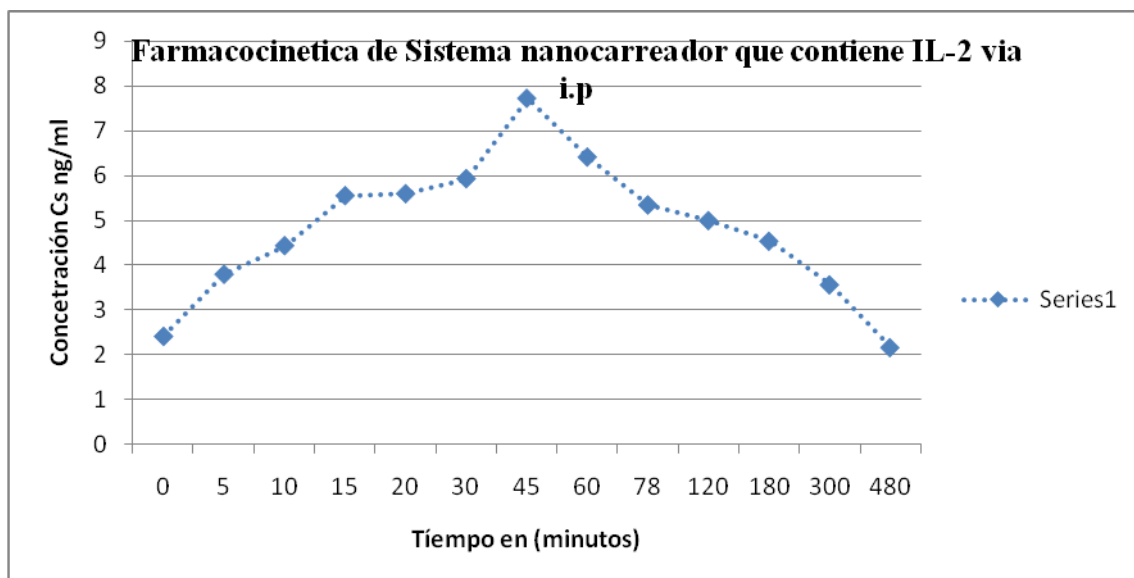
11.1. Curva estándar de IL-2. Con la finalidad de determinar la curva estándar de IL-2 por medio de ELISA, se usaron niveles de concentración de 0.125-12 ng/ml. Los resultados indicaron una r^2 de 0.9609, pendiente de 0.0715 y ordenada al origen de 0.0883 por medio de regresión lineal (ver **Grafica1**). El método es lineal en un intervalo de concentración de 0,125 a 12,0 ng/ml. Con un límite de cuantificación de 0.166ng/ml.



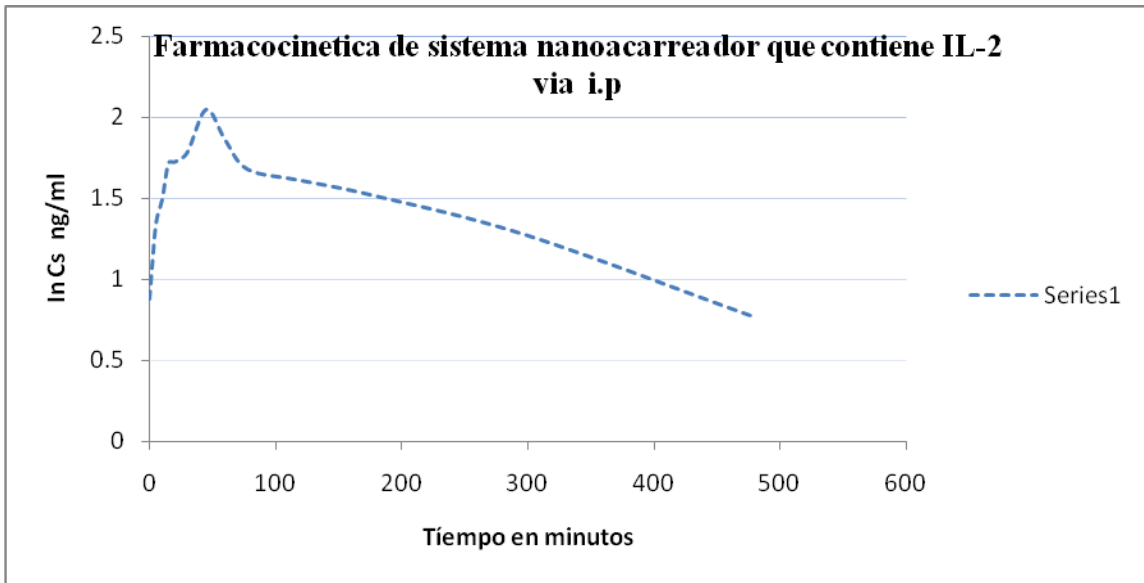
Grafica 1. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de: a) IL-2 libre b) sistema nanoacarreador que contiene IL-2.

11.2. Farmacocinética del sistema nanoacarreador que contiene IL-2 y IL-2 libre en ratones CBA, del lote LOCE191013. Con los datos obtenidos después de la administración en dosis única vía intraperitoneal en ratones de la cepa CBA en los tiempos de muestreo de 0-8 h, el comportamiento farmacocinético del sistema nanoacarreador que contiene IL-2 se puede describir como un modelo de dos compartimento (ver **Grafica 2,3 y Tabla 8**).

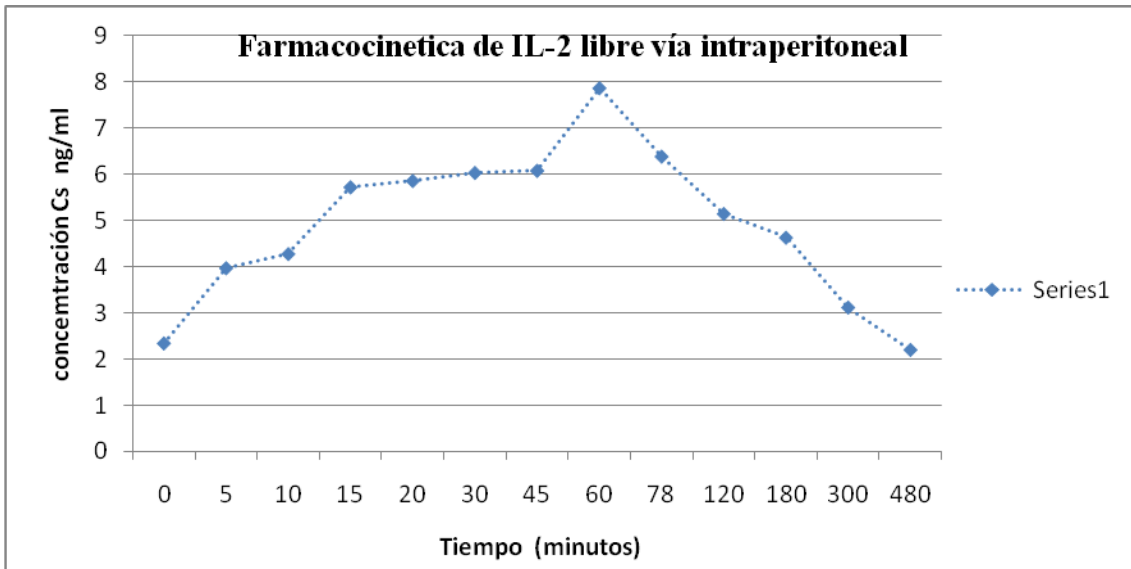
Los resultados obtenidos de IL-2 libre en los tiempos de muestreo de 0-8 h, muestran su comportamiento como un modelo de un compartimentos (ver Grafica 4,5 y tabla 8). Los resultados demostraron que el área bajo la curva (ABC) obtenida en los grupos tratados con el sistema a base de liposomas que contienen IL-2 es mayor que la de los ratones tratados con IL-2 libre (ver Tabla 8). La concentración sanguínea máxima obtenida ($C_{m\acute{a}x}$) del IL-2 contenida en sistema nanoacarreador y la de IL-2 libre no se vio modificada (ver Tabla 8). También se demostró que necesito de un menor tiempo en alcanzar la concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$) en los ratones tratados con el sistema nanoacarreador que los administrados con IL-2 libre (ver Tabla 8). Otro parámetro farmacocinéticos que se vio modificado fue volumen de distribución (ver Tabla 8).



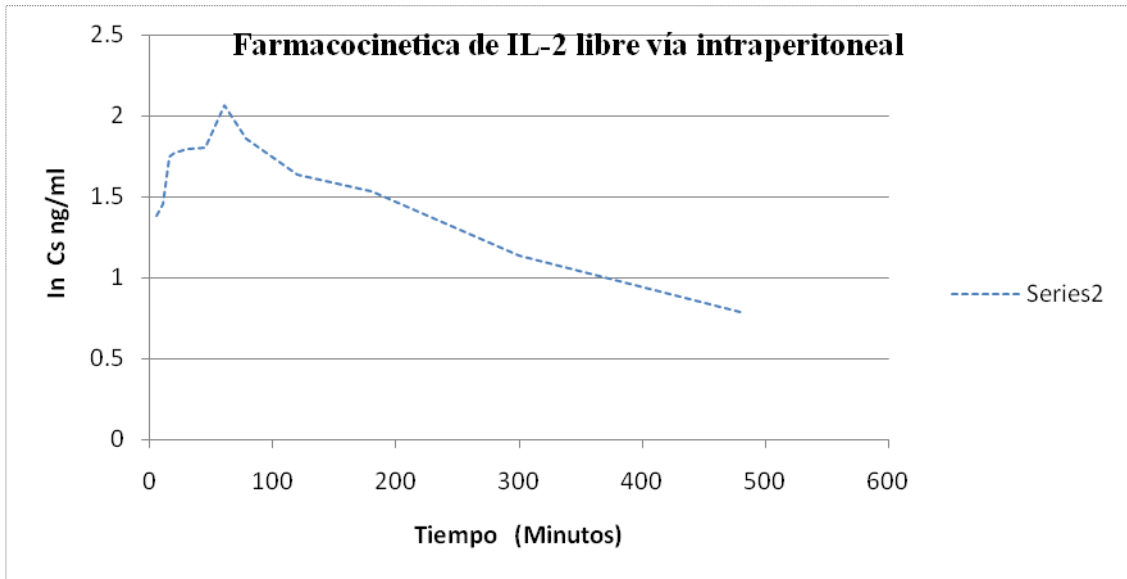
Grafica 2. Comportamiento de IL-2 encapsulada en liposomas, en tiempos de 0-8 hrs, se puede observar la concentración máxima (C_{max}), y el tiempo máximo (t_{max}).



Grafica 3. Comportamiento farmacocinético de sistema nanoacreador que contiene IL-2, se observa como es tiempo de eliminación es más larga.

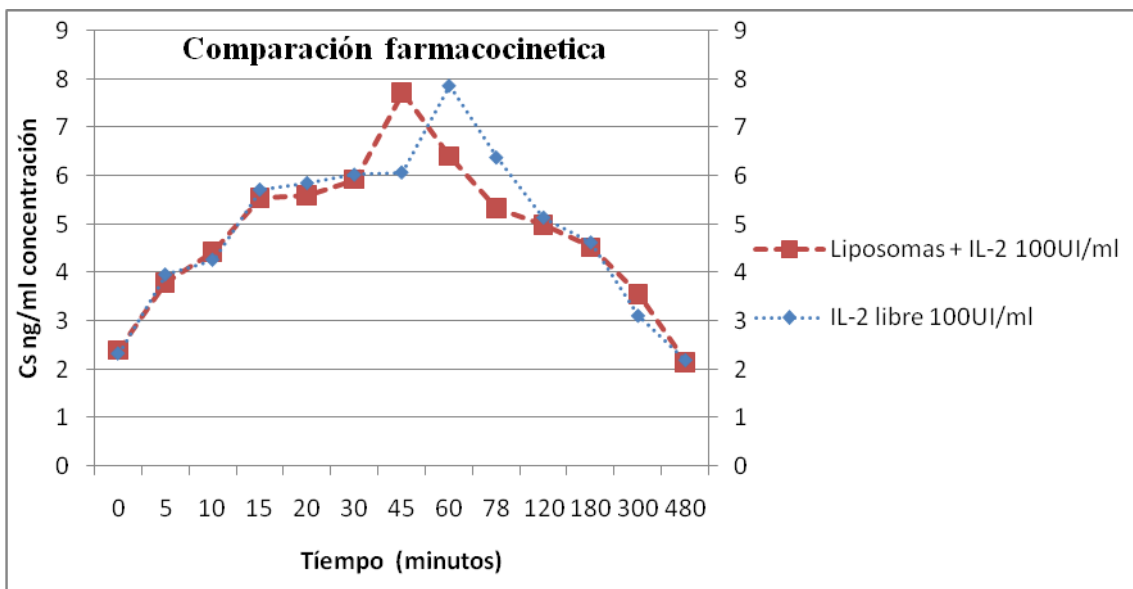


Grafica 4. Comportamiento farmacocinético de IL-2 libre de 0-8 hrs vía intraperitoneal se puede observar la concentración máxima (C_{max}) y el tiempo máximo (t_{max}).



Grafica 5. Comportamiento farmacocinético de IL-2 libre, se puede ver en la parte de eliminación de IL-2.

11.3 Comparación de Graficas y parámetros farmacocinéticos. Los resultados indican que las curvas que describen el comportamiento farmacocinéticos de sistema nanoacarreador que contiene IL-2 es muy similar en la parte de eliminación que en la del tratamiento con IL-2 libre. Así como la parte de absorción se puede ver casi el mismo comportamiento en el sistema que en la de IL-2 libre, excepto en la aparte del C_{max} que es menor, que en el tratamiento con IL-2 libre(ver **Gráfico 6**).



Gráfica 6. Comparación farmacocinética de sistema nanoacarreador que contiene IL-2 y IL-2 libre. Se pude ver un comportamiento similar en la parte de absorción.

Tabla 8. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS				
Parámetro	Liposomas +IL2	IL-2 libre	m± SD	UNIDADES
t_{max}	45	60	52.4±10.61	min
C_{max}	7,72573217	7.856347	7.792±0.924	ng/ml
Vd	3843.4519	3482.481264	3663±255.3	ml
Cl	8,8303083	9.064737379	8.95±0.166	L/h
ABC₀[∞]	2886.13143	2813.0985	2844.62±51.7	ng/ml
ABC₀^t	1962.19226	1948.61248	1955.41±9.603	ng/ml
Dosis	25500	25500	-----	ng/ml
T_{1/2α}	12,0388	----	-----	min
T_{1/2β}	302,2373	----	-----	min
T^{1/2} eliminación	----	266,331	-----	min
T^{1/2} absorción	----	21,2218494	-----	min
K₁₀	0,0022922	-----	-----	min ⁻¹
K₁₂	0,11961004	-----	-----	min ⁻¹
K₂₁	0,05745616	-----	-----	min ⁻¹
K_a	-----	0,035380837	-----	min ⁻¹
K_e	-----	0,00260258	-----	min ⁻¹
Cp₀	6,63379785	7.32131414	-----	ng/ml
<p>Datos obtenidos de 48 ratones después de la administración intraperitoneal de una dosis única en tiempo de 0-8 hrs del sistema nanoacarreador que contiene IL-2 y IL-2 en ratas hembra de la cepa CBA (n=26 ±2).</p>				

Los resultados indican la cantidad encontrada de IL-2 en los diferentes órganos (**ver Tabla 9**).

Tabla9. CANTIDAD DE IL-2 ng/ml EN DIFERENTES ORGANOS		
	Sistema que contiene IL-2	IL-2 libre
Hígado	32.2685319ng/ml	33.0050783ng/ml
Riñón	23.7704542ng/ml	13.2402341ng/ml
Pulmón	7.19121189ng/ml	-----
Grasa	22,9032ng/ml	-----
Cantidad de IL-2 ng/ml encontrada en órganos tratados con ambos tratamientos.		

11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la introducción de nuevos medicamentos es necesario presentar los estudios preclínicos pertinentes de acuerdo al PROY-NOM-257-SSA1-2013; en el presente trabajo se utilizó un producto innovador consistente en un sistema nanoacarreador que contiene IL-2 y para contribuir con los estudios preclínicos necesarios, se realizó la comparación de los parámetros farmacocinéticos contra la IL-2 libre.

Los estudios publicados para IL-2 libre en su forma comercial (aldesleuskina) indican que se comporta como un modelo de un comportamiento cuando es administrada por vía subcutánea u otra vía, en caso de vía intravenosa esta se comporta como un modelo de dos compartimentos. Otros estudios han demostrado que cuando un principio activo es encapsulado en un conjunto de lípidos los parámetros farmacocinéticos se ven modificados, además de comportarse como un modelo de dos compartimentos debido al carácter lipofílico de su composición, tamaño y que estos principios activos encapsulados tienen un tiempo más largo en la circulación que un fármaco en su forma libre. En este trabajo los resultados indicaron que IL-2 administrada por vía intraperitoneal, encapsulada en el sistema nanoacarreador tiene un tiempo de vida media de eliminación mayor que la de IL-2 libre, lo cual demuestra que permanece más tiempo en el organismo. Además quedó evidenciado que la IL-2 administrada en el sistema nanoacarreador se comporta como un modelo de dos compartimentos mientras que IL-2 libre se comporta como un modelo de un compartimento como se esperaba; sin embargo, se demostró que los parámetros farmacocinéticos para IL-2 ya sea contenida en el sistema nanoacarreador o libre no se vieron modificados. Los resultados obtenidos formarán parte de los estudios preclínicos para la propuesta de un nuevo medicamento seguro y eficaz contra el cáncer cérvico uterino, confirmando la ventaja sobre la IL-2 libre de que no se presenten efectos adversos visibles y que la IL-2 contenida puede aumentar el tiempo de circulación sin modificar los parámetros farmacocinéticos de la IL-2 libre. Además al circular la IL-2 acarreada por el sistema de forma no covalentemente unida al exterior de las partículas se posibilita su direccionamiento a aquellas células que poseen el receptor como es el caso de los linfocitos y las células tumorales posibilitando la regresión de los tumores. Finalmente, el presente trabajo es un avance importante en los estudios preclínicos establecidos en el PROY-NOM-257-SSA1-2013, para poder proponer al sistema como un medicamento seguro y eficaz para el tratamiento del cáncer cervicouterino en humanos.

12. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos de la evaluación farmacocinética de IL-2 contenida en un sistema nanoacarreador se concluye que los valores de los parámetros farmacocinéticos de la IL-2 contenida en nanoacarreador no se vieron modificados en comparación con los de la citocina libre por lo que este sistema innovador a base de liposomas en su forma farmacéutica puede ser utilizado en terapias farmacológicas de la misma forma que la libre en pacientes contra el cáncer.

13. REFERENCIAS.

1. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-257-SSA1-2013, Autorización de medicamentos, registro, renovación y modificaciones, publicada en el diario oficial de la federación: 06/05/2013.
2. Rang H, Dale M. Farmacología, editorial Elsevier, España; 2008.
3. Remington A,G. Farmacia, editorial Panamericana, 20ªedición, Buenos Aires-Bogotá. 2003: 1311-1319.
- 4.Katzung , MD, Bertram, Farmacología básica y clínica. Editorial el Manual Moderno, décima edición.2007:46.
5. Gibaldi M. Farmacocinética, editorial Reverté. España Barcelona; 2006.
6. Flores JB. Farmacología humana,4ª edición Editorial Noriega, México. 2004:14.
7. Guía de Práctica clínica. Prevención y Detección Oportuna de Cáncer Cervicouterino en el primer Nivel de Atención. Evidencia y Recomendaciones, Consejo de Salubridad General IMSS, ISSTE.2006:146.
8. Centro clínico de los institutos nacionales de la salud. Publicaciones de información para el paciente. Tratamiento con interleucina 2. (Consultado 1 enero 2013). Disponible en: www.publicaciones de información para el paciente.com
9. Llanes C A, Irma A, Torres F, Barrientos C G, Lin O D. Medicina Salud y Sociedad, Cáncer Cervicouterino. Enemigo de la Salud de la mujer. (Consultado 10 de febrero 2013). Disponible en: http://www.medicinasaludysociedad.com/site/images/stories/1_3/3_Rev-TeoCVU-EnemigoMujer.pdf
10. Corona T, Rangel R, Hernández M, Baeza I, Ibáñez M, Weiss B. Characterization of cationic liposomes having IL-2 expressed on the external surface, and their affinity to cervical cancer cells expressing the IL-2 receptor. J Drug Target (London).2006; 17 (7): 496-501.
11. López R, Cueva F J, Barón JF.Inmunomoduladores con interleucina-2 en oncología. Interleucina-2 como inmunomoduladora en carcinoma renal. Experiencia en administración subcutánea. (Consultado el 2 de enero 2013). Disponible en www.libroselectronicos.com.

12. United states National Library of Medicine. Cheml Dplu Lite. ToxNet. (Consultado el 3 enero 2012). Disponible en [http://www.chem.sis.nlm.gov/chemisplus/proxy servit](http://www.chem.sis.nlm.gov/chemisplus/proxy%20servit).
13. Fuente J M, Ferrandiz C. La piel en el contexto de la medicina y sus especialidades Efectos adversos cutáneos secundarios al tratamiento con interleucina 2. Badalona. Barcelona. España. 2003;18(8):416-421.
14. Rebollo A, Silva A. Estructura y Función del receptor de IL-2 .Centro de investigación biológicas. Velásquez. Madrid. 1994;13(2):39-44.
15. Diccionario de Especialidad Farmacéutica, Proleukin® PLM, Editorial 51, Thomson; 2005.
16. AHFS Drug Information. Aldesleukin.ediorialstaff 2012. (Consultado 1 de julio 2013). Disponible en: www.ahfsdruginformation.com.
17. Michael W. Korad, George H, Evan M. Hersh. Pharmacokinetics of Recombinant Interleukin 2 in human. Cancer Research. 2009; 19(90):50.
18. Kirchner G, I. A, Franzke J, Buer W, Berl M, Probst-Kepper F, Wittke K, Overmann S, L, R, Hoffmann H, Kirchner A, Ganser J. A. Pharmacokinetics of recombinant human interleukin-2 in advanced renal cell carcinoma patients following subcutaneous application. Br J Chn Pharmacol. 1998;46(5):10.
19. Bangham AD, Standish MM. & Watkins, J.C. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. 1965; 13(2): 238-252.
20. Torres D, Begoña S. Nano sistemas lipídicos. Departamento de farmacia y tecnología farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela. 2005:134-139.
21. Quan, W. D, Jr, Dean, G. E, Lieskovsky G, Mitchell M, Sand R. A, K. Phase II study of flow dose cyclophosphamide intravenosa interleukin-2 in metastatic renal cancer. Invests new drugs. 1994;12 (1): 35-9.
22. Perrie Y, Fenske D B, G Gregoriadis: Introducing liposomes to drug delivery. Drug Targ. 2008; 16(3):518-519.
23. Álvarez, P, A, M. Liposomas. Facultad de Química UNAM. 2006 (5):7-10.
24. Gutiérrez, P, Y. Actividad Antitumoral de la Interleucina-2 recombinante libre y atrapada en liposomas en un modelo de linfoma Subcutáneo Murino. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N, L. Tesis. 1997:28-30.

25. Gregoriads, G. Liposomes For Drug and vaccines trends in biotechnology. Invest-New-Drugs.1985;3(9): 235.
26. Backer, W, J. S, Ruendkin F, H. Antimicrobial chemotherapy directed by liposomes. J Antimicrobial Chemotherapy.1986; (17):547.
27. R,K. Oldham, Biological and biological modifiers; Fourth modality of cancer treatment. Cancer Treatment Reports. 1994;(1):68.
28. T.M. Allen, C.B. Hansen, and L.S. Guo. Biochemical.1993; 11(50): 9.
29. Andrew, S. Janoff, M. Liposome Pharmacokinetics. Liposome rational desing. edit. Dekker Inc. New york.1999: 63-72.
30. Corona S.R., Corona M.T, inventores; Universidad Nacional Autónoma de México, titular. Composición de un Producto Antineoplásico e Inmunorregulador y su Uso para el Tratamiento de Cáncer Cérvico Uterino. Patente mexicana. Expediente: MX/a/2008/008681.

14. ANEXO 1

PARAMETROS FARMACOCINETICOS.			
Parámetro	Símbolo	Definición	Unidad
Tiempo máximo	t_{max}	Tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima	min
Concentración máxima	C_{max}	Tiempo en el cual la concentración plasmática o sanguínea fue la máxima.	ng/ml
Constante de absorción	Ka	Cantidad de fármaco absorbido en el organismo.	h⁻¹ o min⁻¹
Constante de eliminación.	Ke	Cantidad del fármaco remante en el organismo,	h⁻¹ o min⁻¹
Tiempo de vida media.	$t_{1/2}$	Tiempo en que una determinada concentración del fármaco se reduce a la mitad de su valor. Valor constante e independiente de la dosis administrada y de la concentración inicial considerada	min o h
Volumen de distribución.	Vd	Teóricamente representa el volumen acuoso del organismo en el cual se distribuye una cantidad determinada de fármaco de acuerdo con sus características fisicoquímicas.	l ó l/kg
Área bajo la curva de niveles		Curvas de niveles plasmáticos contra tiempo. Cálculo mediante integración numérica:	

plasmáticos	ABC $ABC_{0-\infty} = D / V_d * k_{el}$	Se basa en calcular el área entre dos puntos experimentales consecutivos de la curva de niveles plasmáticos plasmáticos (METODO DE LOS TRAPEZOIDES): Área = $\Delta t * (C_1+C_2)/2$, $\Delta t = t_2-t_1$.	ng/ml
Aclaramiento o depuración.	CL $Cl_p = V_d * k_{el}$,	Es el volumen de sangre totalmente depurado de fármaco por unidad de tiempo, por parte del órgano (renal, hepático, etc.) o por el organismo.	l/h
Aclaramiento plasmático	Clp $Cl_p = V_d * 0.693 / t_{1/2}$,	El aclaramiento plasmático representa la eliminación del fármaco en función del volumen de distribución	l / min

MODELOS DE DOS COPARTIMENTOS

<p>Modelo de dos compartimentos</p> <p>$C_p = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} \quad \alpha \gg \beta$</p> <p>$K_{21} = A\beta + B\alpha / A + B$</p> <p>$C_{p0} = A + B$</p> <p>$V_d = \text{Dosis} / B(ABC_{0\infty})$</p> <p>Tiempos disposición $\ln 2 / \beta = t_{1/2\alpha}$</p> <p>$\ln 2 / \alpha = t_{1/2\beta}$</p> <p>Tiempos eliminación $\ln 2 / k_{10} = T_{1/2}$</p> <p>$CL = V_{dc} * K_{10}$</p> <p>$K_{10} = \alpha B / K_{21}$</p> <p>$K_{12} = \alpha + \beta + k_{21} + k_{10}$</p> <p>$ABC_{0\infty} = A / \alpha + B / \beta$</p> <p>$ABC_{0t} = (C_{p1} + C_{p2}) / 2 * (t_2 - t_1)$</p>	
--	--

MODELO DE UN COMPARTIMENTO

Modelo de un compartimento

$$C_{pt} = C_{po} e^{-k_d t}$$

$$V_d = \text{Dosis} / C_{p^{\circ}}$$

$$\ln 2 / k_d = T_{1/2}$$

$$CL = V_d * K_d$$

$$C_{p^{\circ}} = e(\text{ordenada al origen})$$

$$ABC_{0^{\infty}} = \text{dosis} / CL, C_{p^{\circ}} / k_d$$

$$ABC_{0t} = (C_{p1} + C_{p2}) / 2 * (t_2 - t_1)$$

$$t_{1/2} = \ln(2) / K_a, t_{1/2} \ln(2) / K_e$$