

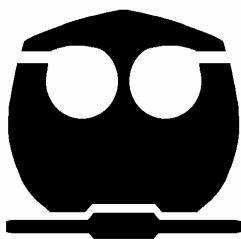


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Elaboración y caracterización de nanoesferas
lipídicas cargadas con *cis*-Diaminodicloroplatino(II)
y marcadas con núcleos radioactivos de Indio-111
con potencial como sistema de quimio-radiación en
tratamiento de cáncer.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
CARLOS JUÁREZ OSORNIO



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dr. Jesús García Fadrique
Vocal	Dra. Josefina Elizalde Torres
Secretario	Dr. Luis Alberto Medina Velázquez
1er. Suplente	Dra. Gregoria Flores Rodríguez
2do. Suplente	Dra. Maria Josefa Bernard Bernard

Este trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCAN-IFUNAM, Instituto Nacional de Cancerología. México D. F.

Dr. Luis Alberto Medina Velázquez
ASESOR

Dra. Patricia García López
SUPERVISOR TECNICO

Carlos Juárez Osornio
SUSTENTANTE

Aquel que duda y no investiga, se torna no solo infeliz, sino también injusto.

Blaise Pascal

AGRADECIMIENTOS

“A TI UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA”

*El calor de esta bendita tierra me forjó del barro más
Mexicano, pero fue en tus aulas donde me forme como
profesionista universitario.*

*Llore, pero también reí, tropecé pues el camino no fue fácil, y
al final me levante.*

*El cóndor me inspiró, pero fuiste tu águila azteca por quién
mi corazón de puma luchó.*

*Hoy, hoy lo sé: como no te voy a querer, si mi corazón azul es
y mi piel dorada, siempre; verdaderamente siempre te amaré.*

Carlos Juárez Osornio

AGRADECIMIENTOS

Dr. Luis A. Medina:

Doc. Gracias por el apoyo enorme y la confianza que depositaste en mí, alcanzamos la meta trazada, gracias por permitirme sacar al químico que traigo dentro.

Dra. Ma. Esther Brandan. Gpo. de dosimetría y Física Médica, IFUNAM:
Gracias por haber confiado en mí y por el enorme apoyo proporcionado.

Dra. Patricia García. Laboratorio de Farmacología, INCan:
Paty, muchas gracias por el espacio que me brindaste y tu amplia gama de comentarios respecto al trabajo, además por el apoyo experimental.

Dra. Ma. Josefa Bernard B. Facultad de Química:
Le agradezco la amabilidad que tuvo al ofrecerme el espacio y un equipo de su laboratorio para la realización de algunas mediciones.

Dra. Consuelo Arteaga (INCMyNSZ) y Prof. Luis Rendón (IFUNAM)
Muchísimas gracias por los equipos y el espacio proporcionado para la realización de algunas evaluaciones experimentales.

Compañeros de Cancerología:

Rufina, Ivonne, Rafael, Claudia, Aurora, Enrique, Mario, Adela, Angélica, Adriana, Victoria, Deirdre, Polette. Gracias por los momentos tan lindos que tuve con ustedes y por el apoyo brindado.

A mis Profesores de la Facultad:

Mil gracias a todos aquellos que me formaron en las benditas aulas de la Fac. de Química, en especial a los profesores: Enrique Bravo M., Georgina A. Duarte L., Adelina Pazos G., Arturo V. Rosales O., Josefina G. Toledo M., Josefina Viades T., Ma. Luisa Padilla, Ma Asunción Carranza O., Ma Teresa Herrera B.

A mis amigos de la Facultad:

Norma, Teresita, Elisa, Beto, Ruth, Saraí, Noemí Vázquez, Noemí Salinas, Amalia, Marcelino, Luis, Guadalupe, Paty M. y Paty B. Gracias por haber sido mis amigos sinceros y por los momentos tan lindos que vivimos.

CONACyT:

Proyecto CONACyT- 46227.

UNAM:

Proyecto PAPIIT-UNAM (IN-110204).

DEDICATORIAS

A mi Madre: Este logro má fue tuyo también, quien sino tu que me enseñaste tanto de la vida, alcanzamos la meta una vez mas. TE QUIERO MUCHO.

A mi Padre: Gracias por haber creído en que lo podía lograr, te dedico también esta victoria.

A mi hermana: A ti, la otra mujer en casa, recíbelo porque es un logro de todos y por creer en mí. TE QUIERO MUCHO.

A mi familia Juárez G. y Osornio M.: Abuelos, Tíos y primos, reciban un pedacito de esto, gracias por haber sido la familia que fueron.

A mi abue Brígida Galicia L. (q. e. p. d.) Se adelantó y ya no fue testigo de esta victoria, de cualquier manera le dedico con mucho cariño, respeto y admiración este trabajo.

A mi hermana postiza Ruth: carnala, esto es tuyo, como todos esos secretos, momentos y alegrías que te compartí, fue maravilloso conocerte, sabes que te quiero mucho.

A mi hermana postiza Minerva: Sin ser mi hermana de sangre sabes que lo eres, tantos años ya de compartir infinidad de vivencias, para ti también es, sabes que te quiero mucho.

Paty Bolaños: Mi confidente, mi amiga incondicional, mi consejera, que lindo haberte conocido, para ti también es, te quiero mucho.

Paty Medellín: Recibe un pedacito de esto superamiguísima incondicional, gracias por ser como eres conmigo y causarme tantas alegrías, maravilloso haberte conocido, te quiero mucho.

Y a ti, si a ti; también te lo dedico,
no creas que te había olvidado.

Si no lo consigue, déjelo, tómese una taza de café y ¡piense!
Ute Müller

INDICE GENERAL

	Páginas
RESUMEN	3
CAPITULO 1	
OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	5
CAPITULO 2	
INTRODUCCION	
2.1 Cáncer, generalidades	7
2.2 Quimioterapia del cáncer	7
2.2.1 Tipos de quimioterapia	7
2.2.2 Cis-diaminodicloroplatino(II)	8
<i>Comportamiento en solución acuosa</i>	8
<i>Mecanismo de acción</i>	9
<i>Resistencia</i>	11
<i>Toxicidad</i>	12
2.3 Radioterapia del cáncer	13
2.3.1 Radiobiología	13
2.3.2 Radioterapia	13
<i>Radioterapia con radionúclidos</i>	14
<i>Mecanismo de acción</i>	14
<i>Resistencia</i>	16
<i>Efectos tóxicos</i>	17
2.4 Quimio-radioterapia	17
<i>Mecanismo de acción</i>	18
<i>Esquema de tratamiento</i>	18
2.5 Terapia dirigida	18
2.5.1 Radiofármacos.	18
2.5.2 Vectores de quimio-radioterapia	19
2.5.2.1 Nanoesferas lipídicas (liposomas)	19
<i>Mecanismo de formación</i>	19
<i>Tipos de nanoesferas</i>	20
<i>Propiedades Fisico-químicas</i>	21
<i>Métodos de preparación</i>	26
<i>Homogenización de tamaño de las nanoesferas</i>	27
<i>Purificación de la suspensión</i>	28
<i>Análisis químico</i>	29
<i>Cuantificación del principio activo encapsulado</i>	29
<i>Modificación superficial y estabilidad in vivo</i>	29
<i>Marcado con radionúclidos</i>	31
<i>Caracterización y controles de calidad</i>	32
<i>Farmacología general</i>	32
<i>Ventajas Farmacológicas del uso de nanoesferas</i>	34
<i>Nanoesferas lipídicas cargadas de cis-DDP</i>	35

<i>Nanoesferas lipídicas como vectores de quimio-radiación</i>	35
CAPITULO 3	
METODOLOGIA EXPERIMENTAL	
3.1 Técnica de elaboración de nanoesferas	37
3.2 Homogenización del tamaño de nanoesferas	37
3.3 Purificación de la suspensión vía equilibrio Donan de membrana	38
3.4 Evaluaciones analíticas	
3.4.1 Cuantificación de <i>cis</i> -DDP encapsulado	38
<i>Cromatografía de líquidos de alta resolución</i>	38
<i>Condiciones del equipo</i>	38
3.4.2 Cuantificación de lípidos del sistema.	38
3.4.2.1 Reaccion de Stewart	38
<i>Preparación de NH₄FeSCN.</i>	38
<i>Curva patrón.</i>	38
<i>Muestras de nanoesferas.</i>	39
3.4.3 Imágenes y tamaño de partícula	39
<i>Tamaño por dispersión dinámica de luz</i>	39
<i>Microscopia electrónica</i>	39
3.5 Marcado de la suspensión con In-111n	39
3.5.1 Radionúclido.	39
3.5.2 Marcado de la suspensión.	39
3.5.3 Eliminación de In-111 no quelado.	39
3.5.4 Eficiencia de marcado	40
3.6 Estabilidad de marcado	40
3.6.1 Monitoreo	40
3.6.2 Lecturas de actividad	40
3.6.3 Determinación de la estabilidad	40
CAPITULO 4	
RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1 Cuantificación de <i>cis</i> -DDP encapsulado	42
4.2 Cuantificación de lípidos del sistema	42
4.3 Tamaño de partícula	43
4.4 Imágenes de las nanoesferas	43
4.5 Marcado con In-111	44
4.6 Estabilidad de marcado	45
4.7 Representación esquemática del sistema elaborado	48
CAPITULO 5	
CONCLUSIONES	50
CAPITULO 6	
BIBLIOGRAFIA	52
ANEXO I	
Monografía de los compuestos hidrofóbicos empleados	59
ANEXO II	
Apuntes de apoyo a la introducción	62
ANEXO III	
Parámetros cromatográficos	69

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

CaCU	Cáncer Cérvico-Uterino
<i>cis</i>-DDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II)
s.s.i	Solucion salina isotónica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
GSH	Glutación
RI	Radiaciones ionizantes
e-	Electrones
eV	electrón-volt
Q-R	Quimio-radioterapia
T_c	Temperatura de transición
CL	Cama lipídica
T_{1/2}	Tiempo de vida media

RESUMEN

RESUMEN

La necesidad de tratamientos más eficaces contra los diversos tipos de cáncer que se presentan en la población mexicana ha sido la directriz de este proyecto. En el presente trabajo, se muestran las técnicas desarrolladas para la elaboración de un nano-sistema de quimio-radiación con gran potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer cérvico-uterino.

El sistema desarrollado se compone de nanoesferas lipídicas (comúnmente conocidas como liposomas) cargadas en su interior con *cis*-diaminodicloroplatino(II) y marcadas en su superficie con núcleos radioactivos de In-111.

En este trabajo se muestran los resultados de la primera fase del proyecto, que consistió en llegar a una formulación de la suspensión de nanoesferas con niveles de encapsulación de 600 µg/ml. El tamaño de las nanoesferas fue satisfactoriamente homogéneo en el orden de los 100 nm. De igual manera las evaluaciones realizadas para determinar la eficiencia de marcado con el radionúclido y su estabilidad en solución salina y plasma, fueron superiores al 80 % durante 72 h.

CAPÍTULO 1

O B J E T I V O S
Y
J U S T I F I C A C I O N

OBJETIVO GENERAL.

- Desarrollo de nanoesferas lipídicas como vectores de quimio-radiación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Elaboración de una suspensión estable de nanoesferas lipídicas cargada de cis-diaminodicloroplatino(II) (cisplatino o *cis*-DDP)
- Marcado de las nanoesferas en su superficie con el emisor de radiación In-111.

JUSTIFICACION

El uso de nanoesferas lipídicas cargadas de cis-DDP permitiría una disminución en la toxicidad inherente del fármaco, y el marcado en la superficie con el núcleo radioactivo ofrece la posibilidad de producir una irradiación mejor localizada. En la práctica, la encapsulación de fármacos en nanoesferas ofrece una mejoría en la farmacocinética de éstos, permitiendo un tratamiento más eficaz. La combinación de cisplatino encapsulado con los núcleos radioactivos potenciaría el efecto citotóxico de ambos incrementando el índice terapéutico del sistema.

El uso de núcleos radiactivos emisores de partículas beta de alta energía permitiría una irradiación mejor localizada en el tumor; sin embargo, durante el desarrollo de este proyecto de tesis no fue posible la adquisición de un núcleo emisor de partículas beta, por lo que se decidió utilizar Indio-111 que es un emisor de gammas. El marcado con el emisor de betas se ha postergado para un futuro próximo.

Dado el objetivo de este trabajo, la información bibliográfica utilizada como apoyo se enfocó mayoritariamente en las generalidades necesarias de la quimioterapia con cisplatino y radioterapia con radionúclidos.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer, generalidades.

El cáncer, en sus diversas modalidades, sigue siendo un problema de salud pública en diversos países, en los cuáles las principales neoplasias muestran un patrón ascendente,^{2,5,45} esta situación trae como consecuencia la necesidad de desarrollar programas preventivos y tratamientos más eficaces que representen una esperanza de vida mayor para los enfermos de cáncer.^{1-3,19}

De manera general, el cáncer es un padecimiento provocado por células que se comportan de manera anormal a causa de desórdenes genéticos (mutaciones); estas células presentan entre otras cosas, una reproducción anormal, apareciendo cúmulos de células o tumores en el organismo del enfermo, eventualmente estos cúmulos de células inmortales provocan daño a tejidos adyacentes y la muerte del enfermo.³³ De entre todos los cánceres, el cérvico-uterino (CaCU) es la segunda causa de muerte en mujeres en el mundo.^{32,46,47} En nuestro país, ocupa el primer lugar.^{4,29,47}

2.2 Quimioterapia del cáncer.

La quimioterapia es, de forma general, cualquier tratamiento basado en la administración de sustancias químicas (fármacos), pero es común que el término quimioterapia se refiera a los tratamientos de enfermedades neoplásicas.⁷ Los fármacos empleados en el tratamiento de cáncer tienen la función de impedir la reproducción de las células cancerosas. En general, su mecanismo de acción se basa en producir una alteración celular, ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos o síntesis de proteínas. Sin embargo, debido a su inespecificidad afecta células y tejidos sanos que se encuentran en división constante (como las células del epitelio gastro-intestinal), provocando efectos tóxico secundarios.⁷

El cáncer según su tipo y estadio puede ser tratado por medio de quimioterapia, radioterapia, cirugía o combinaciones de éstos (tratamiento multidisciplinar). La Tabla 1 muestra los antineoplásicos más comunes.^{6,7,9-11,14}

2.2.1 Tipos de quimioterapia.

- ❖ Poliquimioterapia: Es el uso de varios citotóxicos con diferentes mecanismos de acción (sinergismo) para disminuir la dosis individual de cada fármaco y aumentar la potencia terapéutica del combinado.
- ❖ Quimioterapia adyuvante: Es la que se administra generalmente después de un tratamiento principal como es la cirugía, para disminuir la incidencia de metástasis.¹⁹
- ❖ Quimioterapia neoadyuvante: Es la que se inicia antes de cualquier tratamiento quirúrgico o de radioterapia para disminuir el tamaño tumoral.¹⁹
- ❖ Quimioradioterapia concomitante: En esta modalidad el fármaco es administrado de forma simultánea con radioterapia con el fin de potenciar el efecto de la radiación, de actuar a la par con ella y disminuir la radioresistencia en células con hipoxia.^{19,25,27,31}

Tabla 1. Quimioterapéuticos antineoplásicos más comunes

Clase	Nombre genérico	Enfermedad
Agentes de alquilación	Ciclofosfamida	Leucemias, neuroblastoma, cáncer de mama, ovarios, pulmones y testículo.
	Semustina	Tumores primarios de encéfalo, estómago y colon.
	Dacarbazina	Melanoma maligno y sarcoma de tejidos blandos.
Antimetabolitos	Metotrexato	Leucemias, cánceres de seno, cabeza y cuello.
	5-fluorouracilo	Cáncer de mama, colon, estómago, páncreas, ovario, cabeza y cuello.
	Mercaptopurina	Leucemias
Productos naturales	Etopósido	Cáncer de testículo, pulmón, mama, leucemia y sarcoma de Kaposi.
	Doxorrubicina	Leucemias agudas, tumores de mama, tiroides, pulmones y estómago.
	Mitomicina	Cáncer de estómago, cuello uterino, colon, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello
Agentes diversos	Cis-platino Carboplatino	Cáncer de testículo, ovario, cervix, cabeza, cuello, vejiga, pulmón, uterino, endometrio y esófago
	Hidroxiurea Tamoxifeno	Leucemias Cáncer de mama

2.2.2 *cis*-diaminodicloroplatino(II)

El *cis*-diaminodicloroplatino(II) (cisplatino o *cis*-DDP), es uno de los antineoplásicos más usados desde finales de los 70's, debido a la efectividad mostrada en el tratamiento de diversos cánceres.^{6,7,10,62,64,88} Es un complejo de coordinación con platino divalente, ligandos de NH₃ y Cloruro. Presenta una configuración espacial tipo *cis*- y una geometría plana cuadrada (Fig. 1).^{7-9,12,52} Es un polvo amarillo con un valor de solubilidad en agua de 0.253g/100g a 25°C y de 1mg/ml en solución salina isotónica (s.s.i.), es insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos. El valor de MW es 300.05 g/mol.^{9,12}

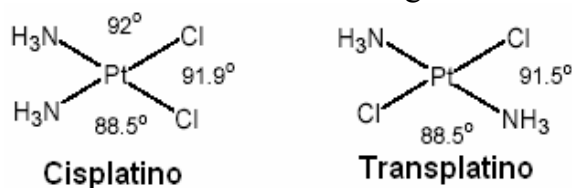


Figura 1: Esquema Tridimensional de *cis*-DDP y *trans*-DDP. Rosenberg y colaboradores demostraron que el *cis*-DDP fue el responsable de los efectos citotóxicos mostrados en sus experimentos, la especie *trans*- no mostró efectos importantes.^{6,7,8}

Comportamiento en solución acuosa:

Para ser administrado el cisplatino, es preparado en s.s.i., para prevenir el intercambio de sus Cl⁻ lábiles por los iones OH⁻ y/o por moléculas de H₂O, aunque es más efectivo el acuo-compuesto (sobre todo la especie di-acuo) que el que posee Cl⁻, también es más nefrotóxico. Al ser disuelto en medio con NaCl

(0.9% w/v) se aminora la toxicidad renal pues se favorece la presencia del compuesto como cloro-especie (Figura 2).^{7,8}

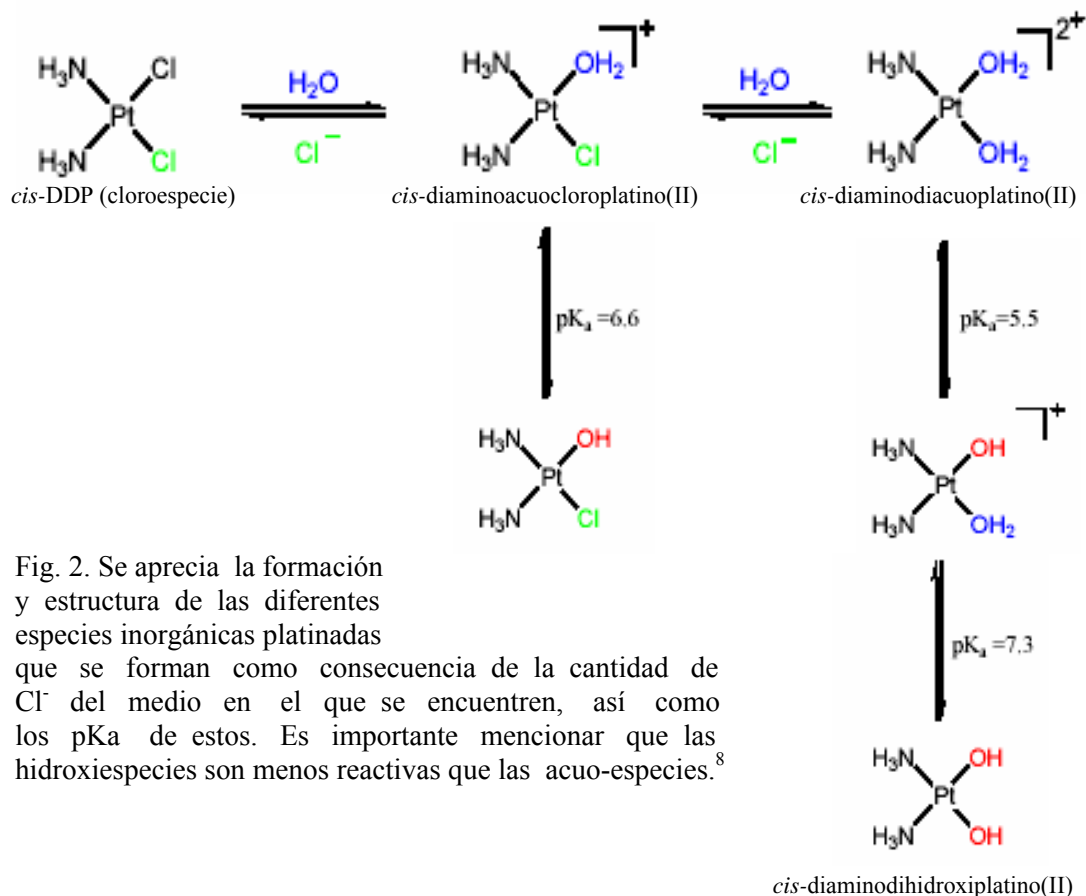


Fig. 2. Se aprecia la formación y estructura de las diferentes especies inorgánicas platinadas que se forman como consecuencia de la cantidad de Cl^- del medio en el que se encuentren, así como los pK_a de estos. Es importante mencionar que las hidroxiespecies son menos reactivas que las acuo-especies.⁸

Mecanismo de acción:

En general, la unión del cisplatino con el ADN de células tumorales (aductos) es el fenómeno responsable de sus propiedades antitumorales.^{6,10,11,17,21,57,62} El daño inducido al ADN puede interferir en la transcripción normal y/o con los mecanismos de replicación.^{7,11,14-18,20,23,70} Se sabe también de la capacidad inductora de estrés oxidativo del *cis*-DDP al favorecer la presencia de ciertos radicales libres (especies ROS).^{14,15} Eventualmente estos desórdenes provocan el proceso citotóxico que desemboca en la muerte de las células tumorales.

Se ha planteado que más del 50% del *cis*-DDP entra en las células por difusión pasiva,^{7,10,21,57,69,88} y el resto por influencia del potencial de membrana.¹⁰ En el medio extracelular las concentraciones del ion Cl^- son de ≈ 100 mM, lo que desfavorece la formación de las especies mono y di-acuo de *cis*-DDP (Fig. 2). En contraste, las concentraciones de Cl^- del medio intracelular caen hasta ser de 4-20 mM.^{11,20,31,32,57,69} Al haber niveles intracelulares bajos del ión Cl^- , el cisplatino intercambia sus ligandos lábiles de Cl^- por moléculas de agua formándose las especies cargadas mono y di-acuo.^{10,11,57,88} Estos cationes electrofílicos poseen gran afinidad por centros nucleofílicos como proteínas, ARN y ADN.^{7,10,11,15,20,21,23,57,69,88}

El átomo de N 7 (Fig. 3)^{11-13,16,20,57} ubicado en el anillo de imidazol tanto de la adenina como de la guanina del ADN son los sitios más accesibles con los que el

cisplatino puede reaccionar para formar uniones fuertes conocidas como aductos.^{7,10-12,16,20,23,57,69} Estas uniones pueden ser de dos tipos: monofuncionales y bifuncionales. En el aducto monofuncional es la especie mono-acuo del complejo platinado la que reacciona, muchos de estos posiblemente vuelven a reaccionar para producir aductos bifuncionales (fig. 4).^{11,57,69} Ambos interfieren en la replicación del ADN y transcripción del ARN, arrojándose la célula en la fase G2 del ciclo⁷ y/o programándose la muerte celular (Fig. 5).^{10,11}

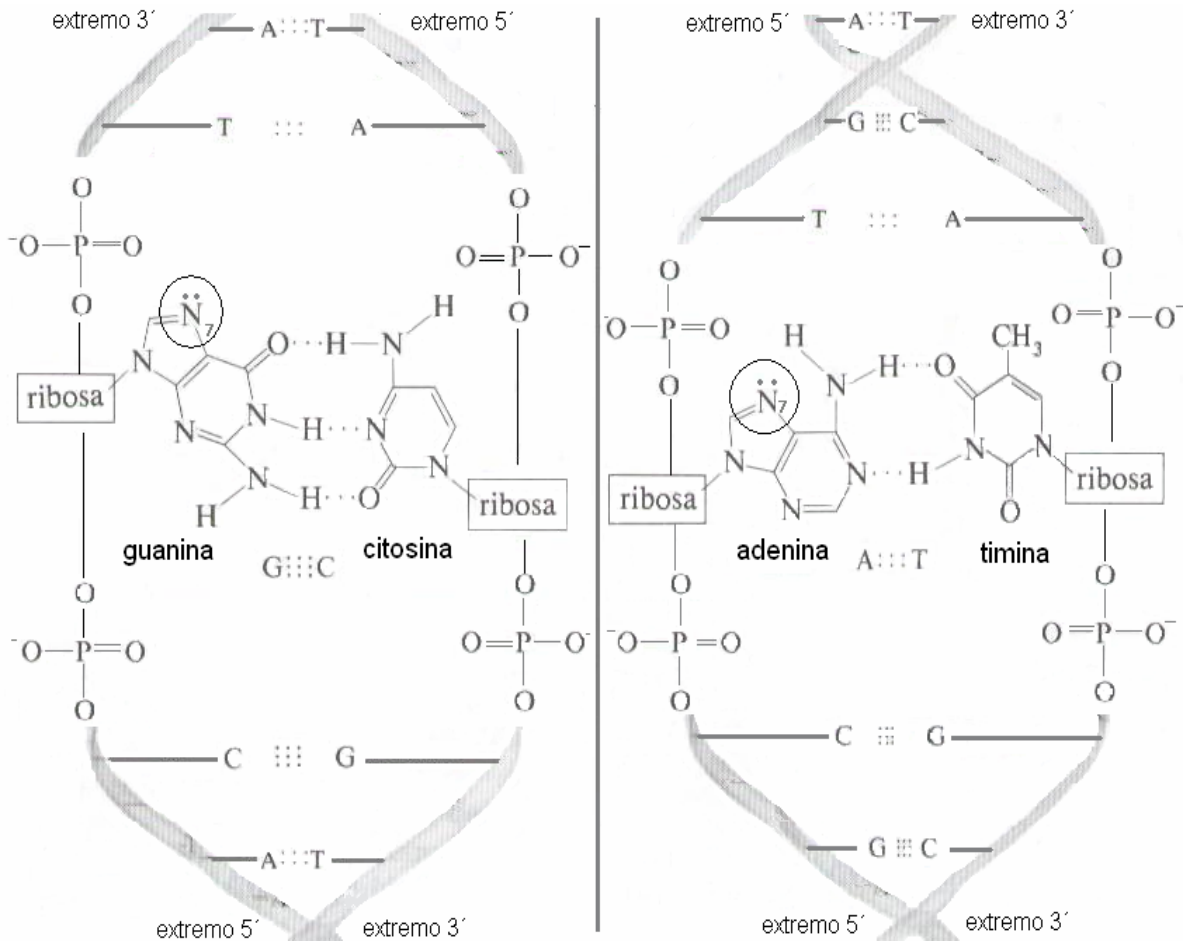


Figura 3. En el esquema, se puede apreciar tanto en la adenina como en la guanina de el ADN, el N7 nucleofílico con el que el *cis*-DDP reacciona formando aductos.

Se sabe que el daño mas importante se debe a las di-acuo-especies de *cis*-DDP, pues se ha encontrado que el 60-65% de los aductos formados son del tipo *cis*-DDP-G-G, en dónde la especie *cis*-[Pt(NH₃)₂]²⁺ se une a dos Guaninas adyacentes de una hebra del ADN, el 20-25% son del tipo *cis*-DDP-G-A, en dónde la unión incluye Adenina de la misma hebra y el menor porcentaje que corresponde al 5-10%, son del tipo *cis*-DDP-G-G siendo las Guaninas de hebras distintas.^{10,11,16,20}

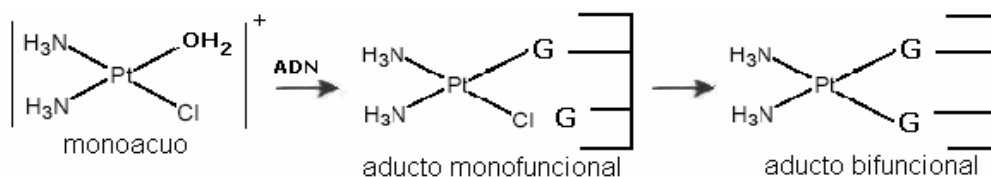


Figura 4: Tipos de aductos con *cis*-DDP.

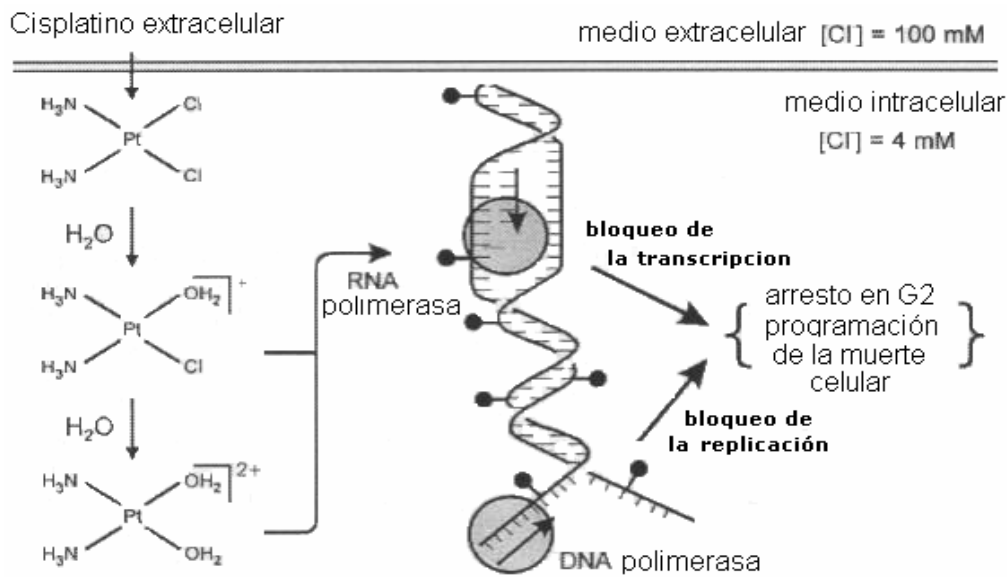


Figura 5: Una vez formadas las acuoespecies de *cis*-DDP que reaccionan con especies nucleofílicas como el ADN, se puede ver afectada su lectura normal durante la división celular, arrojándose la célula en la fase G2.

Todas las uniones cisplatino-ADN provocan una modificación estructural al material genético, siendo al parecer de gran importancia la unión *cis*-DDP-G-G.^{11,16,20,21,23,57} Estudios de cristalografía de rayos X muestran que este aducto provoca que el ADN en el sitio de unión se doble (32-35° vs los 13° de la unión *cis*-DDP-G-A). Estos cambios estructurales son los que probablemente interfieren en la lectura normal del material genético generando así un daño celular importante (fig. 6).^{11,12,16,21,23,57} Recientes investigaciones muestran que entre otras cosas, el daño producido al ADN por parte del *cis*-DDP provoca una caída de la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM), consecuentemente disminuye la liberación de especies ROS, de la proteína Bax y Ca²⁺, los cuáles provocan su ruptura, liberándose así entonces la procaspasa-9 (proteína aspartato-específica 9), la cuál en medio citosólico forma complejos apoptóticos activadores de una serie de caspasas; la consecuencia final del fenómeno es la muerte celular.¹¹

Resistencia:

Se sabe que en líneas celulares resistentes al fármaco hay una sobreproducción de algunas proteínas. Diversas publicaciones manifiestan el papel importante que al respecto juegan el Glutatión (GSH) y proteínas de bajo peso molecular conocidas como metalotioneínas.^{10,11,14,17,18} El GSH tiene la capacidad de reaccionar con compuestos electrofílicos como el di-acuo *cis*-DDP formándose conjugados platinados de menor reactividad.^{10,11} El conjugado GS-cisplatino formado, puede ser expulsado al exterior celular mediante una bomba ATP-dependiente.^{10,11,23} Se sabe que concentraciones de GSH superiores a los 10mM están estrechamente relacionadas con la resistencia al fármaco,¹¹ de hecho estas cantidades elevadas propician la formación del complejo GS-cisplatino-SG que es farmacológicamente inactivo,^{10,11} esto afecta la formación de aductos

monofuncionales con el ADN y las pequeñas cantidades que aparecen pueden ser eliminadas por reparación del material genético por parte de enzimas como la polimerasa α ¹⁰ Si la formación de aductos monofuncionales desciende, la formación de aductos bifuncionales prácticamente desaparece.¹⁰

Las metalotioneínas son una familia de proteínas ricas en cisteína (las cuáles tienen el grupo -SH),^{10,14,17} Se ha observado una sobreproducción de estas en líneas celulares resistentes a cisplatino, estas pueden unirse al *cis*-DDP en proporción 1:10, con esto se afecta la efectividad del fármaco.^{10,14,17,18}

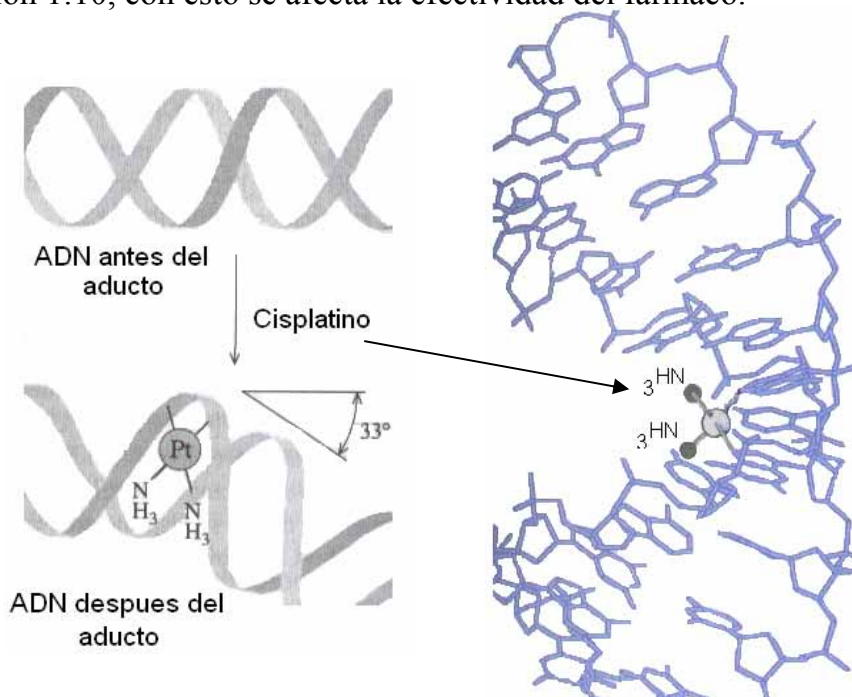


Figura 6: La unión *cis*-DDP-G-G, provoca modificaciones estructurales importantes, en ambas figuras se aprecia el doblez que aparece en el ADN.

Se sabe también que en líneas celulares resistentes, hay concentraciones intracelulares del fármaco bajas, quizás haya una disminución en la captación de este o un acarreo al exterior celular eficiente.^{10,11,23} En experimentos de modificación de la fluidez de membrana por hipertermia se ha observado un incremento en la captación del fármaco, pero se sabe que diversos agentes que no modifican la permeabilidad de membrana alteran la captación de *cis*-DDP, lo que hace pensar en la existencia de proteínas mediadoras de la captación. Fármacos inhibidores de la sodio-potasio ATPasa disminuyen la captación de cisplatino, de modo que se ha definido que la acumulación intracelular del fármaco puede ser potasio-dependiente, es decir, esta en función del potencial de membrana.^{10,21} Se conoce ya la presencia de una proteína de 48 kDa en células resistentes, lo cuál hace pensar que regula la captación del cisplatino o su acarreo al exterior.^{10,21,23}

Toxicidad:

La vía de administración de *cis*-DDP es intravenosa y se usa como vehículo s.s.i. para disminuir la presencia de las acuo-especies y disminuir su toxicidad.^{6,7,57} Después de la administración, alrededor del 90% se encuentra

unido a proteínas plasmáticas, lo que reduce su excreción urinaria y propicia la deposición en tejido. El problema toxicológico más importante que se presenta es la nefrotoxicidad,^{6,7,9,57,62,64,67,69,70} esto trae como consecuencia perturbaciones en los niveles de electrolitos apareciendo entonces problemas de hipomagnesemia, hipocalcemia, hipopotasemia e hipofosfatemia.^{6,7,31} La ototoxicidad es otro problema importante, se manifiesta por pérdida de la audición de frecuencias altas,^{6,7,62} también es de importancia la neuropatía periférica, leucopenia, trombocitopenia y anemia que se llega a presentar.^{7,62}

2.3 Radioterapia del Cáncer

El descubrimiento de los rayos X por W. Röntgen en 1895, de la radioactividad natural tres años después por H. Becquerel y del aislamiento del radio por Pierre y Marie Curie pocos meses después, marcaron el nacimiento de una nueva ciencia que se encargó del estudio de las radiaciones.^{24,30,34,39} Durante el siglo siguiente la química, biología y física aportaron la información necesaria para el aprovechamiento clínico de las radiaciones ionizantes (RI).^{24,30,34}

2.3.1 Radiobiología

La radiobiología es el estudio de la acción de las RI en tejido vivo.^{24,25,34} La interacción de las radiaciones con materia orgánica es muy importante en el campo de la radioterapia, si esta contiene la suficiente energía puede remover electrones de los átomos en el material en el cuál interactúan, proceso conocido como ionización, y RI a aquellas que la producen.³⁴

La energía necesaria para expulsar electrones (e^-) fuera de sus orbitales varía según el elemento y el orbital afectado, en general los pares de iones formados en los tejidos orgánicos provienen de expulsar e^- de los últimos orbitales ya que para el proceso se requiere poca energía, aproximadamente 4.9 eV para romper el enlace C = C y de menos de 32.5 eV en la ionización de moléculas orgánicas en general.^{30,34} Los cambios biológicos posteriores a una exposición a RI dependen de su energía y el tiempo de exposición a ellas. A nivel celular también son de importancia factores como la fase del ciclo celular y eficiencia en la reparación de los daños en el DNA en la célula tumoral.²⁴

Las RI al interactuar con materia orgánica provoca un desplazamiento de e^- , produciéndose moléculas positivas (electrófilos) y e^- , todas las radiaciones de partícula producen ionizaciones directamente, los rayos γ y X las producen indirectamente mediante los efectos fotoeléctrico y Compton (Véase anexo II).³⁰

2.3.2 Radioterapia

La radioterapia es el uso de las RI para el tratamiento de cánceres como los de piel, esófago, laringe, cabeza, mama y cerviz.^{19,27} La radioterapia puede ser dividida en tres modalidades: Radioterapia externa (teleterapia),²⁹ Radioterapia interna (braquiterapia)²⁵ y terapia con radionúclidos.⁴⁰

Radioterapia con radionúclidos:

A pesar de los buenos resultados que se obtienen en la radioterapia, hay pacientes con cánceres de cabeza, cuello, esófago, mama, próstata, colon y ovario que no responden adecuadamente al tratamiento, sobre todo por la escasa o nula oportunidad que se tiene de eliminar eficazmente las células malignas diseminadas (metástasis).⁴⁰ La terapia con radionúclidos busca sobre todo tratar eficazmente esas diseminaciones tumorales peligrosas y además ofrecer dosis de radiación mejor localizadas y disminuir así la toxicidad. Esto es hoy en día posible gracias al desarrollo de metodologías para la producción de radionúclidos artificiales de interés médico.^{41,43,104} El primer radionúclido utilizado clínicamente fue el ¹³¹I para tratar cáncer de tiroides, posteriormente se utilizaron químicos marcados como el ³²P-ortofosfato en el tratamiento de policitemia y trombocitemia.^{40,41,44} Actualmente se avanza en la producción de Cloruro de ⁸⁹Sr y ¹⁵³Sm para su uso en cáncer de hueso.^{40,44}

Mecanismo de acción:

En general, los efectos biológicos de la radiación se deben a la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan principalmente al ADN.^{25,26,28,32-35,37} En la década de los 30, se hizo cada vez más evidente la importancia del oxígeno en la efectividad de la radioterapia. Para finales de los 50, se sabía ya de la radioresistencia que se presentaba en células tumorales con hipoxia, fenómeno que motivo investigaciones dirigidas a describir los procesos involucrados en la absorción de radiaciones por tejido orgánico.²⁴ Una vez que las RI interactúan con tejido orgánico, esta según su tipo y características, provoca excitación o expulsión de e⁻ de una infinidad de moléculas presentes los cuáles tienen una capacidad de reaccionar con el ADN nuclear y producir una mutación (acción directa de la radiación) o estos e⁻ liberados actúan sobre especies químicas produciéndose especies ROS las cuáles finalmente dañan el ADN mediante rupturas en sus hebras (acción indirecta de la radiación) (Fig. 7).^{28,32-35,37}

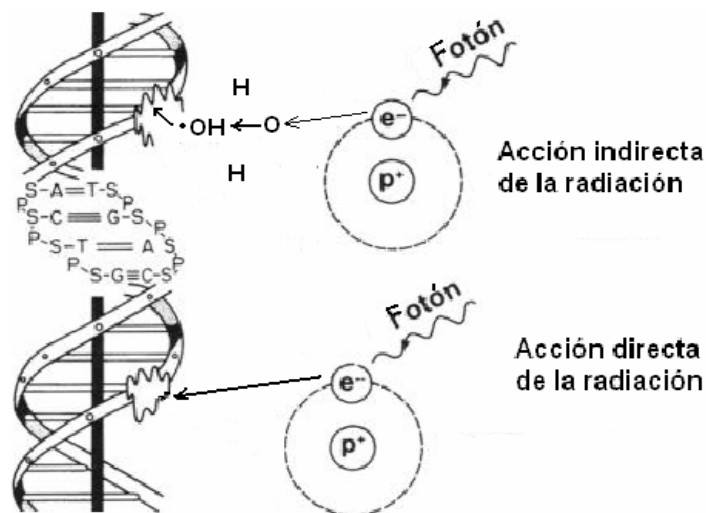


Figura 7: El esquema muestra las dos vías por las que la radiación afecta al material genético. Directamente la radiación libera e⁻ que posteriormente provocan ionizaciones en el ADN. Indirectamente las radiaciones producen radicales libres que son los que finalmente dañan el material genético.

La presencia de las ROS, desencadena en la célula blanco el proceso conocido como estrés oxidativo. Tanto la radiación γ como X, no producen ionizaciones directamente, solo provocan excitación electrónica.^{25,28,34,37}

Los efectos biológicos de las RI se deben a dos reacciones fotoquímicas que se desencadenan por exposición de tejido vivo a estas. Debido a la composición química de los organismos vivos (mayoritariamente agua y en menor proporción moléculas con abundantes grupos RH, donde R es cualquier radical orgánico), las principales reacciones son:^{28,36}

Fotólisis del agua

Foto-oxidación de moléculas RH

La fotólisis del agua produce de manera inmediata el radical hidroxilo (HO•) y e^- , mientras que la foto-oxidación de moléculas RH produce e^- de manera inmediata y dos de forma secundaria: el radical peroxilo (ROO•) y el alcoxilo (RO•) (Fig. 8).^{28,32-34,36}

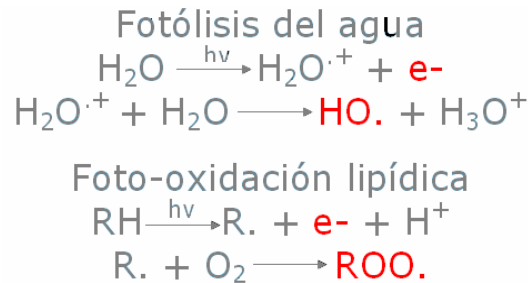


Figura 8: Esquema que representa la formación de e^- y de los radicales libres Hidroxilo, peroxilo y alcoxilo durante la exposición de tejido vivo a RI.

La propagación de la producción de especies ROS se da gracias al encuentro de los e^- y el oxígeno singlete (especie de O_2 altamente reactiva) (Fig. 9),^{28,32,33} esta reacción produce varios ROS: anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo, radical dióxido de nitrógeno (NO_2), además de H_2O_2 y e^- , todos son muy reactivos frente a moléculas nucleofílicas como el ADN (Fig. 10).^{31,32,37} De lo anterior, se deriva la explicación de la baja efectividad de la radioterapia en tumoraciones con hipoxia.^{24,25,28,31,32}

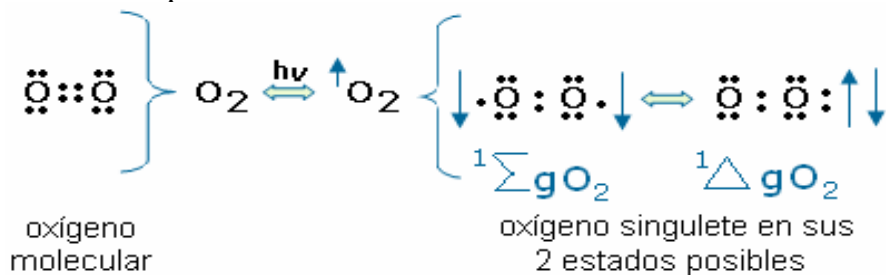


Figura 9: El esquema representa la formación de la especie reactiva de oxígeno conocida como oxígeno singlete, gracias a la excitación de los electrones desencadenada por la exposición a RI.

Así mismo, el estrés oxidativo generado provoca daño al sistema de transporte de Ca^{2+} que desemboca en la activación de proteasas que desestabilizan a las

proteínas conocidas como metalotioneinas, las cuales a su vez liberan Fe^{2+} , este metal desencadena entonces la reacción de Fenton (Fig. 11).²⁸ En suma, esta cascada de reacciones en cadena provoca daño severo a una gama amplia de moléculas y componentes celulares sobre todo el material genético (Fig. 12).²⁸

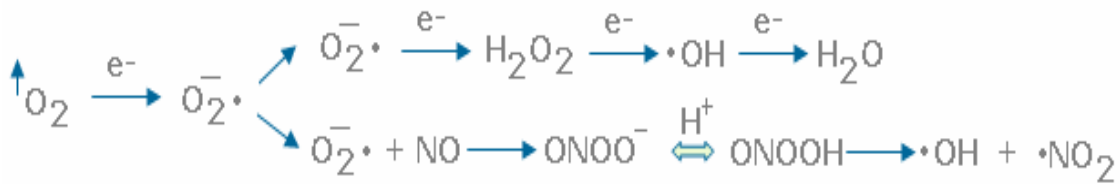


Figura 10: Propagación de los efectos de la exposición a RI, mediante la formación de más especies ROS a causa del oxígeno singulete.

Resistencia:

La resistencia que se presenta en algunas masas tumorales a radioterapia se debe principalmente al estadio, tamaño de la masa tumoral, grado de oxigenación de éste y la fase del ciclo celular.^{25,31} Dependiendo de la intensidad de radiación, tiempo de exposición a esta y tasa de dosis, se puede presentar de manera importante el fenómeno conocido como resistencia por dispersión de radiación, que no es otra cosa que células tumorales resistentes debido al contacto previo con los efectos químicos propios de la radiación de baja intensidad, que le permiten manejar el exceso de especies ROS producidas y una reparación de daños en el ADN,³¹ de aquí que se requieren cálculos físicos rigurosos que permitan la administración de sesiones de radiación óptimas para evitar la radiación subletal y la repoblación tumoral consecuente a la radioresistencia.^{24,25}

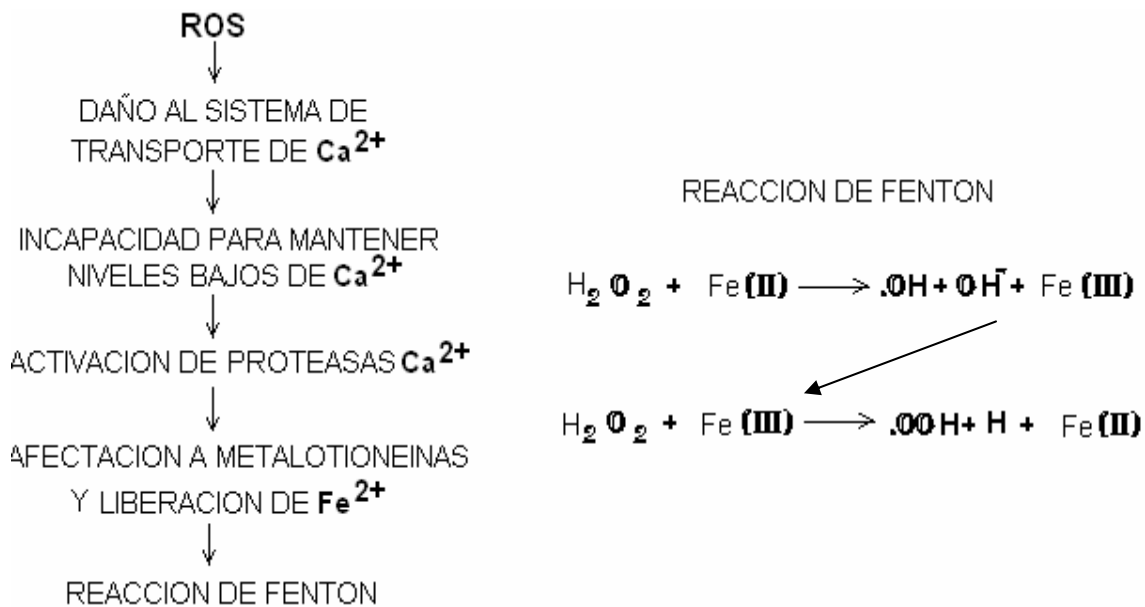


Figura 11: Representación que muestra el desencadenamiento de la reacción de Fenton que libera más especies ROS.

Efectos Tóxicos:

Estos se deben a la afectación de tejido sano,²⁵ el que inmediatamente es afectado es el mucoso (a las 2 semanas de iniciado el tratamiento), apareciendo mucositis.^{24,25} Los tratamientos de cáncer de cabeza y cuello dejan secuelas importantes, aparecen 3 años después de la irradiación. Se ha observado la presencia de xerostomia, fibrosis de piel y músculo, necrosis de tejidos blandos, hueso y de cartilago, daño ocular a causa de cataratas o retinopatía, y del sistema nerviosos central al inducir mielopatía.²⁵ Quizás la consecuencia más importante es la aparición de leucemia en número considerable de pacientes tratados.^{24,25} Debido al papel del oxígeno en los efectos de las RI, las células tumorales con hipoxia necesitan un incremento en la dosis de radiación para efectos letales,^{25,100} esto trae como consecuencia dos efectos adversos: aparición o incremento de la radioresistencia y daño a tejido sano.

2.4 Quimio-radioterapia

Desde aproximadamente 10 años, la modalidad de quimio-radioterapia (Q-R) para CaCU a aumentado la esperanza de vida en hasta 60% de las pacientes vs el 30% que se venía teniendo en la modalidad de radioterapia.²⁷ En esta forma de tratamiento se usa cisplatino y radioterapia pélvica, recientemente se ha comenzado a utilizar en cáncer de cabeza y cuello.^{25,27,45-48,99} Actualmente se busca elaborar un esquema de Q-R que mejore los resultados obtenidos.^{31,46,48,74,100}

El CaCU es muy agresivo, invade estructuras cercanas y presenta metástasis hacia los nodos linfáticos que complica su tratamiento. En consecuencia han sido ideadas estrategias de tratamiento que representen una esperanza de vida cada vez mayor para las pacientes,^{31,45} Así mismo recientes investigaciones están comenzando a evaluar el uso de cisplatino y 5-fluoruracilo en combinación con radioterapia en CaCU.²⁷

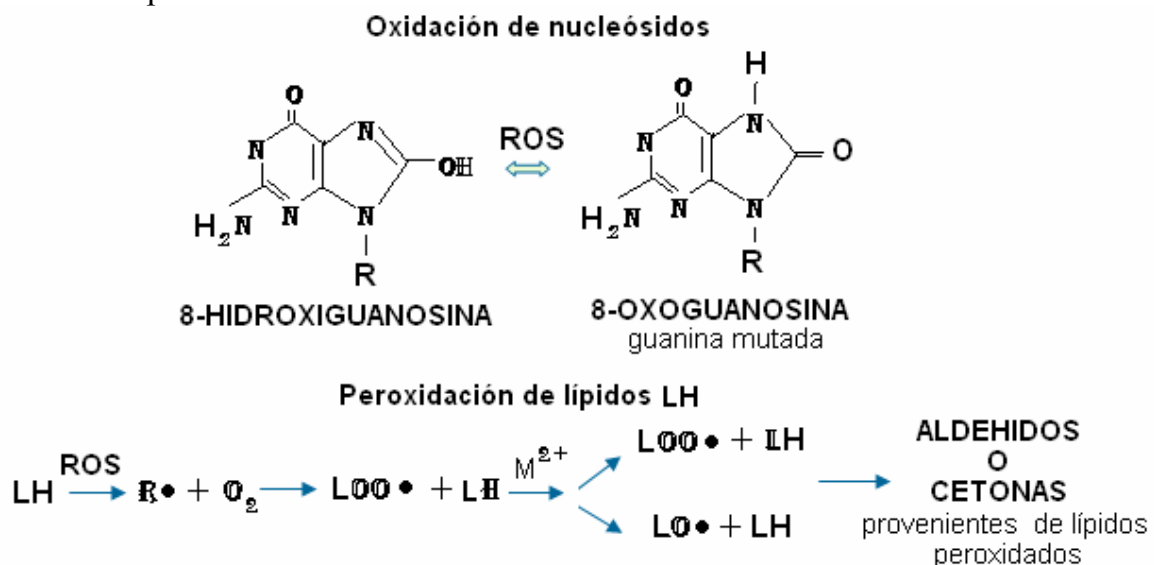


Figura 12: Se muestran dos reacciones entre componentes celulares y especies ROS. destacan las modificaciones que se desencadenan en el material genético.

Mecanismo de acción:

El mecanismo de acción de la Q-R aun no es conocido del todo, existe la posibilidad que el *cis*-DDP incremente la sensibilidad de la masa tumoral a la radioterapia, posiblemente porque cada uno afecte en diferentes fases del ciclo celular simultáneamente,^{31,45} otra hipótesis menciona que el cisplatino provoca gradualmente la disminución de la masa tumoral, permitiendo esto una mejoría en la oxigenación del resto de la masa y/o una inhibición de la reparación celular a causa de la radiación subletal.⁴⁵

Esquema de tratamiento:

La quimio-radioterapia ha venido siendo estudiada en dos modalidades: neoadyuvante y concurrente.^{45,100} En la primera, el *cis*-DDP es administrado antes de la radioterapia para disminuir el tamaño de la masa tumoral, diversos artículos científicos postulan que, según reportes clínicos, esta modalidad no ha sido tan efectiva para el grueso de los pacientes tratados, quizás esto puede deberse a la aparición de clones resistentes inducidos por la previa administración de *cis*-DDP, comprometiéndose los resultados de la radioterapia.⁴⁵ La Q-R concurrente consiste en la administración simultánea de *cis*-DDP (se ha utilizado también hidroxiurea, mitomicina y 5-fluoruracilo) y radiación. Diversos estudios in vivo e in vitro han evaluado y demostrado el incremento citotóxico en líneas celulares de cáncer de cervix. Comparativamente esta modalidad ha sido más efectiva que la Q-R neoadyuvante.^{45,74,100} La quimio-radioterapia concomitante del CaCU, es un campo clínico que ha mostrado resultados positivos. Este éxito hace necesario determinar que dosis y de que fármaco o fármacos utilizar, pero sobre todo de desarrollar la manera de administrar ambos de una forma mas controlada, eficaz y menos tóxica.

2.5 Terapia dirigida

“Bala mágica”, término acuñado por Paul Erlich para hacer mención a agentes quimioterapéuticos con afinidad específica por los tejidos enfermos.⁴⁹ Esta concepción inexistente en la práctica clínica hasta antes del presente siglo, es hoy una meta a alcanzar en prácticamente todas las investigaciones que buscan la cura eficaz de todos los tipos de cáncer.

2.5.1 Radio-fármacos

El uso de radionúclidos unidos a fármacos con fines terapéuticos y de diagnóstico, dio lugar al nacimiento de los radiofármacos.^{40,41,82} Como ejemplos recientes de radiofármacos utilizados con fines terapéuticos son: la meta-iodobenzilguanidina marcada con ¹³¹I o ¹²⁵I para el tratamiento de neuroblastoma y análogos de somatostatina marcada con ¹¹¹In para el tratamiento de tumores neuroendocrinos.⁴⁰ En el campo de metástasis esqueléticas, se trabaja con ¹⁵³Sm-EDTMP y ¹⁸⁶Re-HEDP.^{40,41} Desde hace 15 años aproximadamente, muchos trabajos se han enfocado al estudio de anticuerpos monoclonales radiomarcados con especificidad por algunos antígenos superficiales tumorales.⁴ Debido a los

resultados obtenidos en tratamientos de tumores primarios y algunas metástasis a base de radiofármacos como los mencionados, hay gran interés en la selección del radionúclido adecuado y de su vector.^{40,82}

2.5.2 Vectores de quimio-radioterapia

Existen, de manera teórica como experimental, vectores para quimioterapia y en mayor proporción para radioterapia con radionúclidos, van desde iones radioactivos, hasta nanoesferas lipídicas (Figura 13).^{40,49-54,57-60,62,64,66,70,72,74-77,82,106} Investigaciones sobre vectores de quimio-radiación aún no existen.

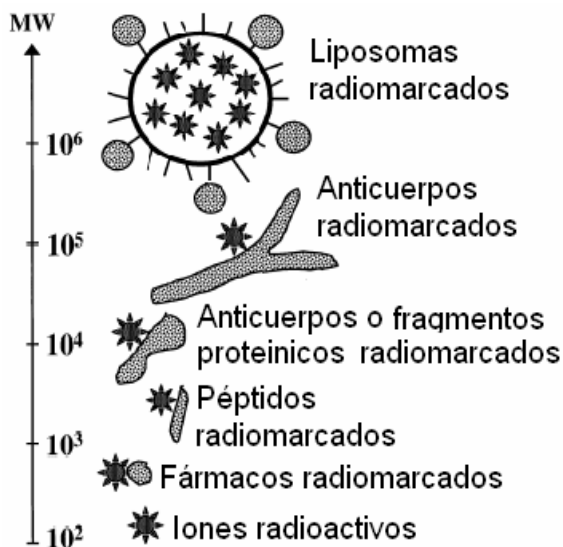


Figura 13: Agentes propuestos como vectores de radionúclidos.

2.5.2.1 Nanoesferas lipídicas (Liposomas):

Las nanoesferas lipídicas, han sido descritas desde hace 40 años, desde entonces han sido desarrollados métodos de elaboración, controles de calidad, etc.^{49-54,58,60} Las nanoesferas han mostrado gran potencial para el transporte de fármacos, ya que se reduce considerablemente la toxicidad inherente y mejora la farmacocinética,^{50-54,57-60,62,64,69-71,74-77,81,83,92,106} de hecho existen varias formulaciones de nanoesferas en evaluaciones clínicas (SPI-77 para cisplatino,^{50,62} vacuna tetano-hepatitis-difteria ambas en fase I,⁵⁰ Mikasome® para Amikacina⁵⁰ y Nyotran® para Nystatina en fase II de investigación^{35,50}) y dos ya aprobadas para su uso en humanos en E. U. A. y países Europeos, son: Ambiosome® y AmphotecTM ambos para administración de Anfotericina B.⁵⁰ También se han utilizado con éxito en el transporte de radionúclidos para imagenología nuclear.^{59-61,63,66,71,73,77}

Mecanismo de formación:

En general, las nanoesferas lipídicas son partículas coloidales suspendidas en un medio acuoso, están formadas de fosfolípidos de una cabeza polar y doble cadena hidrofóbica (Fig. 14), arreglados en bicapas lipídicas similares a las membranas celulares.^{50,54,56,59,71,83,87,91,92,94} Debido a la configuración espacial cilíndrica de los fosfolípidos de doble cadena, la estructura estable que se forma

es la bicapa lipídica vs la estructura micelar que se forma con fosfolípidos de una sola cadena de configuración espacial cónica (Fig. 15).⁵⁴⁻⁵⁶

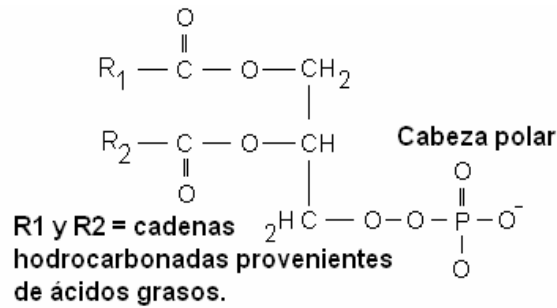


Figura 14: Esquema general de un fosfo-lípido de doble cadena hidrofóbica. Cada grupo OH del esqueleto de glicerol fue esterificado, dos de ellos con el grupo COOH de los ácidos grasos y el otro con ácido fosfórico.

Las nanoesferas se forman de manera espontánea cuando el agua entra en contacto con una mezcla anfifílica (como fosfolípidos y colesterol previamente mezclados). Para estabilizarse el sistema las porciones hidrofílicas de los lípidos (cabeza polar) quedan en contacto con la fase acuosa, mientras que las hidrofóbicas se intercalan entre si obteniéndose un arreglo espacial esférico estable (Fig. 16).⁵⁴⁻⁵⁶ Si es adicionado algún agente a la fase acuosa, este quedará atrapado dentro de las nanoesferas formadas.^{54,66,91,92,94}

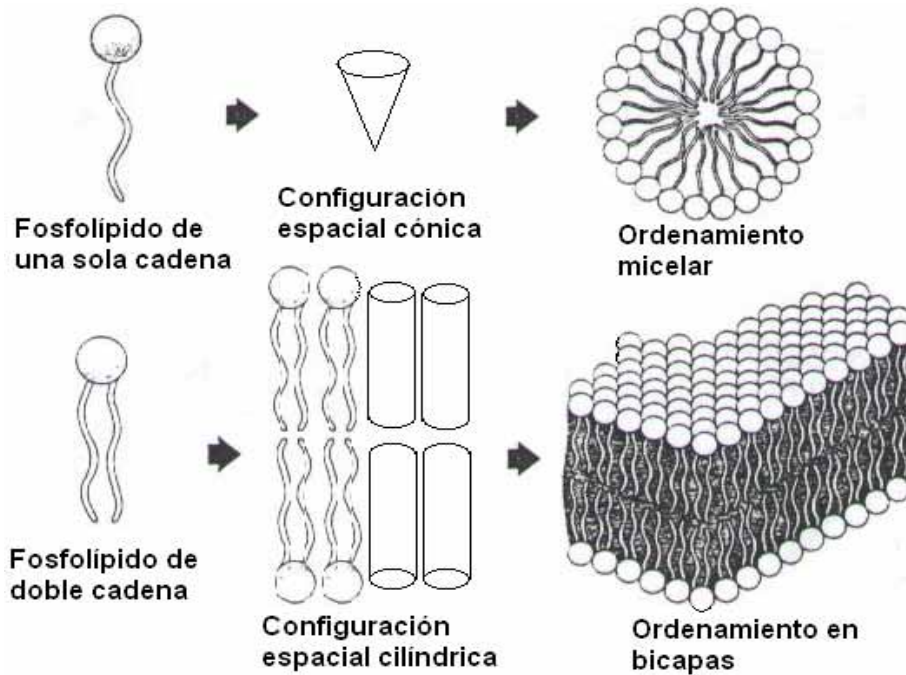


Figura 15: Debido a la configuración de los fosfolípidos de doble cadena, el arreglo espacial que se forma en medio acuoso es el de bicapas lipídicas.

Tipos de nanoesferas:

Existen varios tipos de nanoesferas lipídicas: están las llamadas multilaminales (MLV), y las vesículas unilaminales (ULV), ambas pueden ser pequeñas (SUV), medianas (LUV) y grandes (GUV) (Fig. 17).^{51,53,54,58,60,63,66,73} El

tipo de nano-esfera formada esta en función del tipo de fosfolípido (longitud de las cadenas hidrofóbicas y arreglo espacial de estas a causa de la distribución de los dobles enlaces presentes) y método de elaboración empleado.^{53,54}

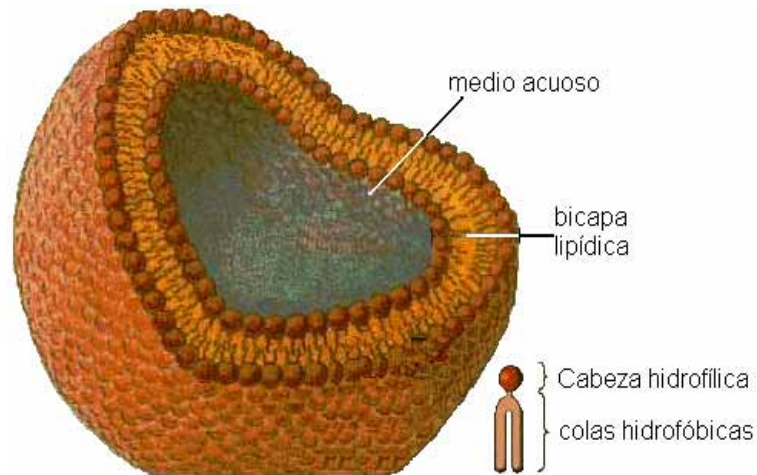


Figura 16: Esquema representativo de una nano-esfera lipídica, se observa el arreglo de los fosfolípidos en bicapas.

Propiedades físico-químicas:

- Fluidez de membrana:

Una característica importante derivada de la composición membranal de las nanoesferas es la rigidez o fluidez de ésta. Los lípidos en una membrana pueden estar de manera ordenada y rígida o de manera desordenada y fluida.^{51,52,54-56} En el estado ordenado, todos los enlaces C-C tienen configuración *trans* o anti (Fig. 17), mientras que en el estado desordenado tienen la configuración llamada *gauche*, que puede ser positivo (*g+*), si el giro de un C de la cadena es en sentido de las manecillas del reloj y negativo (*g-*) si es en sentido contrario. Si un C gira 120° en sentido de las manecillas del reloj se tendría la configuración ordenada *g-* (Fig. 18).^{55,56}

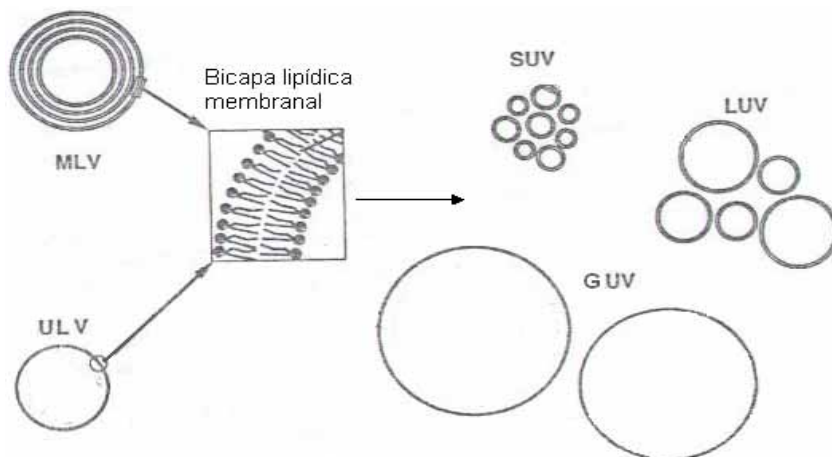


Figura 17: Diferentes tipos de nanoesferas.

También es de importancia al hablar de fluidez, la longitud o cantidad de carbonos presentes en la cadena hidrocarbonada, así como de la de dobles

enlaces o grado de insaturación de ésta. Si además de tener lípidos con configuración espacial *g*, hay presentes dobles enlaces con configuración *cis*, habrá muy poca cercanía entre las cadenas hidrocarbonadas, teniéndose como consecuencia fuerzas de van der Waals débiles y un empaquetamiento de las colas hidrofóbicas desordenado, lo que a su vez puede provocar que entre las cabezas polares hayan fuerzas electrostáticas débiles y una reducida formación de puentes de hidrógeno.^{52,55,56} Por el contrario lípidos saturados, de configuración *trans* favorecen fuerzas de van der Waals intensas, buena interacción electrostática entre las cabezas polares y un empaquetamiento ordenado. Al respecto, la longitud de las cadenas hidrofóbicas puede contribuir también con la intensidad de las fuerzas de van der Waals, ya que a mayor longitud, la probabilidad de establecer fuerzas de este tipo entre las cadenas hidrocarbonadas aumentará.^{55,56}

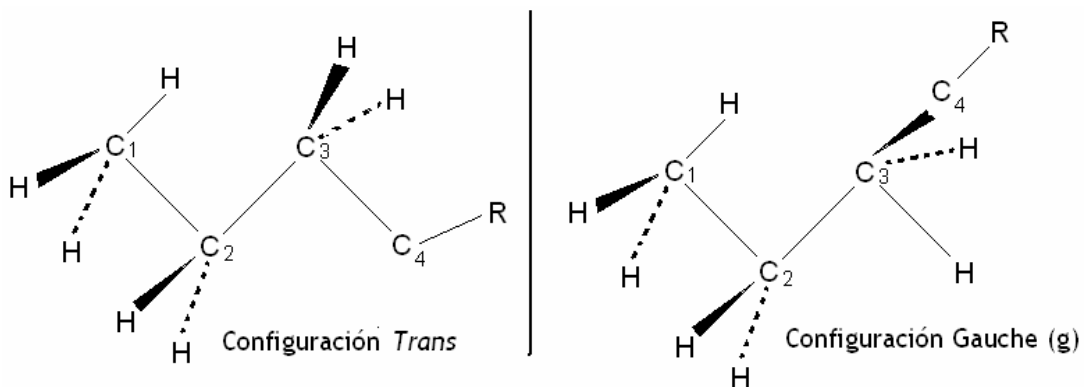


Figura 18: La configuración *trans* de los C en un fosfolípido, provee un estado rígido vs. el estado fluido (configuración *g*). En el esquema, se muestra un fosfolípido de configuración *g*.

- Temperatura de transición :

La temperatura de transición (T_c) es un valor límite en la que nanoesferas con valores de temperatura por debajo de esta, presenta membranas de nanoesferas rígidas y ordenadas, con valores por arriba de esta, se presentan membranas fluidas y desordenadas, ya que se favorece la configuración *gauche* en los fosfolípidos (Fig.19).^{51,52,54-56,87} Este valor de T_c corresponde a la media de los valores de temperatura de fusión de los fosfolípidos presentes en la mezcla, un valor elevado de T_c indica entre otras cosas, la presencia de cadenas hidrocarbonadas largas con una cantidad de dobles enlaces pequeña y membranas empaquetadas ordenadamente.^{54-56,58}

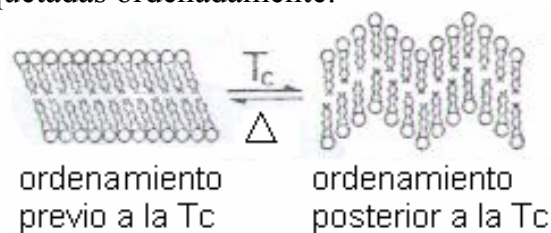


Figura 19: Representación esquemática de la estructura fluida y desordenada que aparece en bicapas lipídicas una vez que pasan la T_c .

- Estabilidad de membrana:

El colesterol, es un componente importante que provee estabilidad a la bicapa lipídica, rige de manera considerable la fluidez de membrana, se intercala entre los lípidos de la bicapa, su grupo polar hidroxil permanece cerca de las cabezas polares de los lípidos y es quien entra en contacto con la fase acuosa (Fig. 20),^{55,56,58} el anillo esteroideo interactúa con las cadenas hidrocarbonadas y se reduce así el movimiento de deslizamiento entre los fosfolípidos,^{52,55,56} en otras palabras, el colesterol disminuye el movimiento aleatorio de las cadenas hidrocarbonadas controlando así la fluidez.^{55,56}

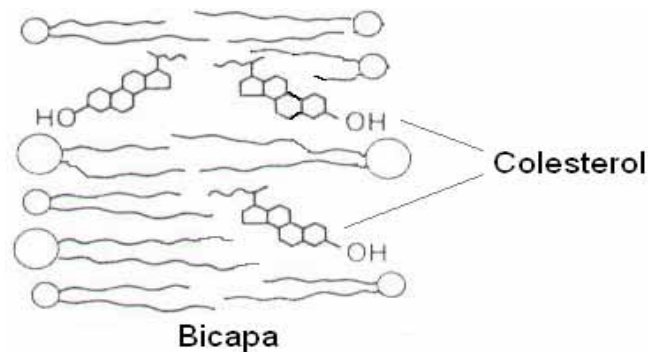


Figura 20: En la imagen se aprecia como se da el empaquetamiento entre los anillos del colesterol y las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos por una parte, y de las cabezas polares y el grupo OH por la otra.

- Carga superficial:

El tipo de lípido que se emplea en la elaboración de nanoesferas determina también la carga superficial de ésta, existen tanto lípidos catiónicos, aniónicos y neutros.^{52,54} Es muy poco común la elaboración de liposomas con fosfolípidos catiónicos, de hecho su elaboración se reserva a liposomas que sirven como vectores de transfección de ADN.⁵¹ DOTMA y DOSPA son ejemplos de dos fosfolípidos de este tipo (Fig. 21).^{51,52,54}

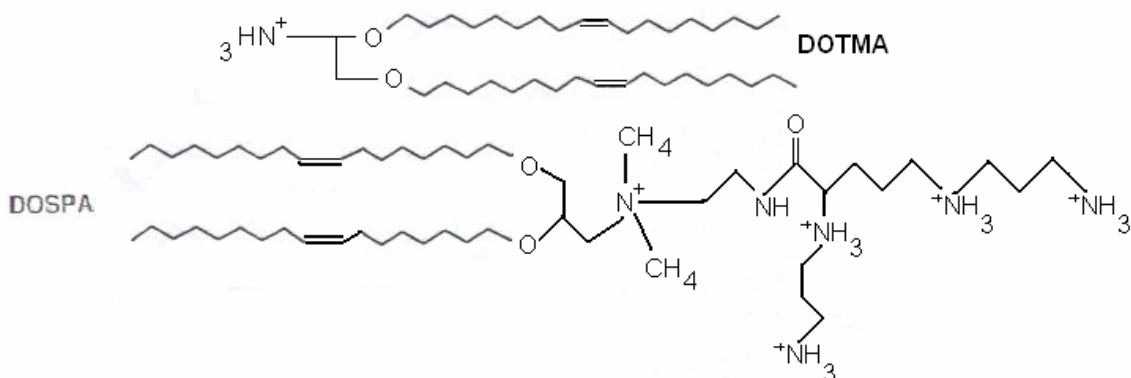


Figura 21: La imagen muestra dos ejemplos de fosfolípidos catiónicos.

En el caso de lípidos neutros, estos estructuralmente no poseen grupos que en solución se disocian en grupos cargados pero hay los que a pH's fisiológicos

se comportan como zwitterion teniendo así una carga neta neutra; como ejemplo del primer caso tenemos al colesterol y para el segundo caso HSPC (véase anexo I), DMPE y DSPC, los cuales son tres fosfolípidos ampliamente usados en la elaboración de nanoesferas (Fig 22).^{52,54,86} Así mismo para el caso de lípidos aniónicos tenemos como ejemplo al PEG₂₀₀₀DSPE (anexo I).⁸⁶ Evidentemente la disociación de los grupos que proveen de carga la superficie liposomal esta en función de su valor de pKa y del pH del medio.⁵²

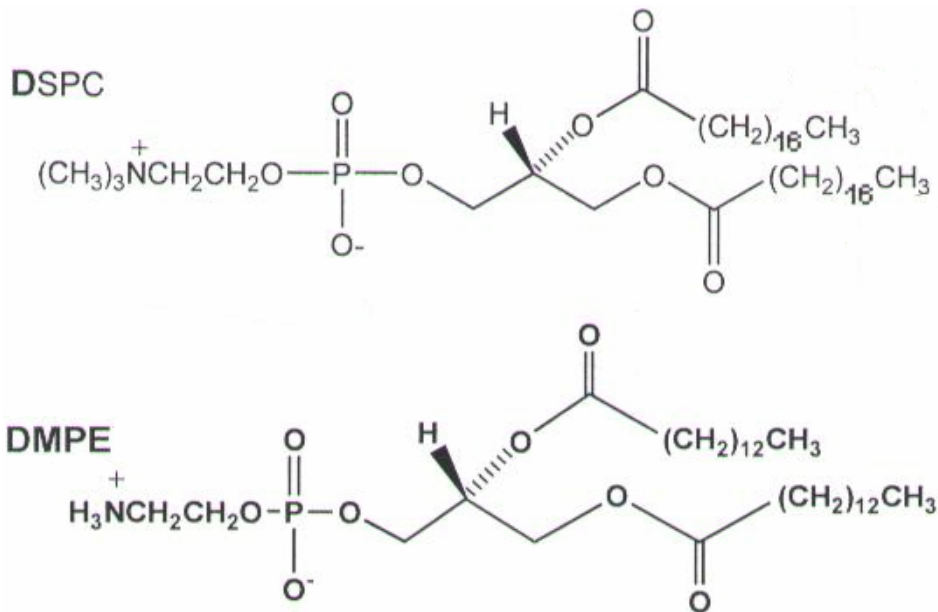


Figura 22: El esquema muestra dos ejemplos de Fosfolípidos ampliamente usados en la elaboración de nanoesferas.

- Estabilidad química:

Un fenómeno que afecta de manera importante la estabilidad de las nanoesferas es la oxidación de los fosfolípidos por la acción de ROS. El paso inicial de este fenómeno es la abstracción de un H de alguna cadena hidrocarbonada, o bien, la oxidación de los dobles enlaces por parte de oxígeno. Como productos aparecen aldehidos, cetonas e hidroperóxidos (Fig. 23);⁵³ la consecuencia principal es el incremento en la permeabilidad de las nanoesferas, pérdida de rigidez y por lo tanto susceptibilidad a choque osmótico,⁵³ se puede controlar mediante:⁵³

- Uso de reactivos libres de metales de transición
- Evitar procedimientos de elaboración a altas temperaturas (no más de 70 °C).
- Uso de cantidades suficientes de lípidos parcialmente hidrogenados o enteramente como el DPPC o el DSPC.
- Uso de antioxidantes como el α -tocoferol (vit. E) o vitamina C.
- Almacenar los liposomas a bajas presiones de oxígeno y escasa luz.

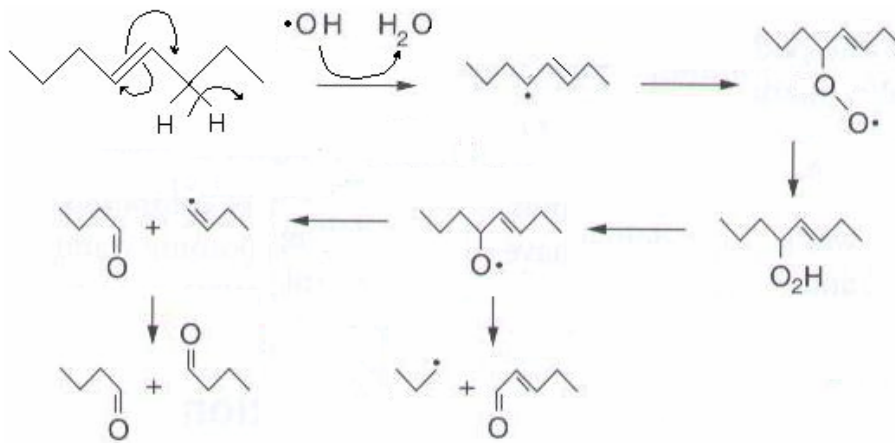


Figura 23: El esquema representa dos posibles vías de oxidación de una cadena hidrocarbonada de un lípido.

La hidrólisis de fosfolípidos es otro fenómeno importante que se debe controlar (Fig. 24). Este depende sobre todo de la composición del medio de dispersión y de pH de éste. Puede controlarse de la siguiente manera:⁵³

- Mediante el empleo de fosfolípidos que favorezcan membranas rígidas para controlar la permeabilidad.
- Mantener las nanoesferas a pH por arriba de 4.

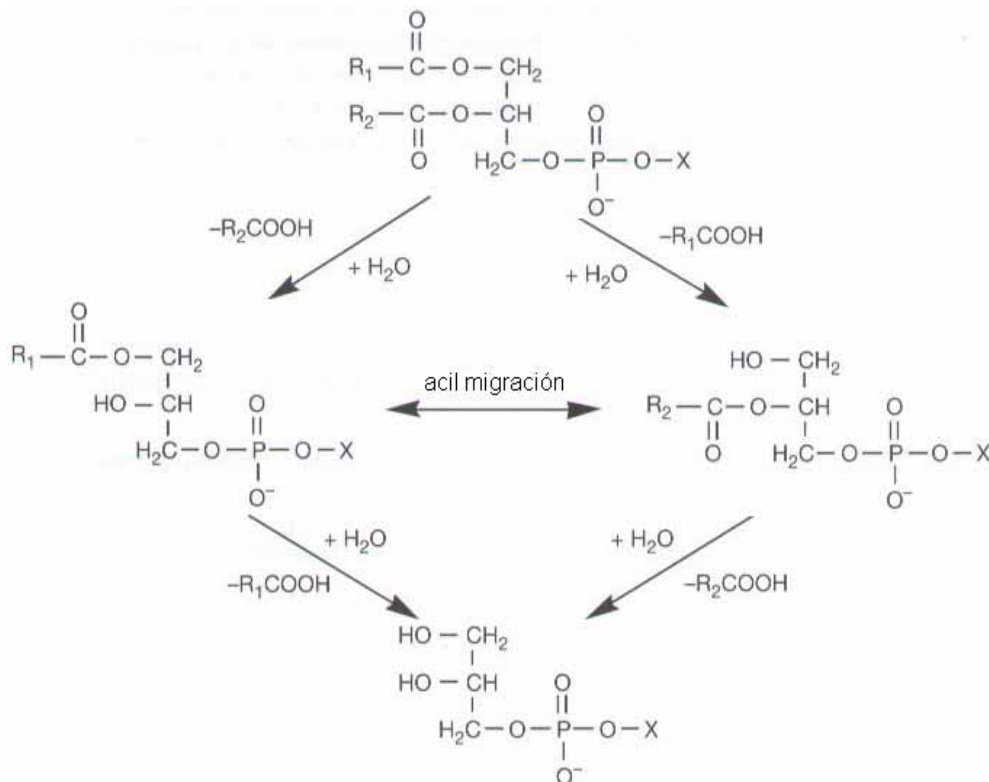


Figura 24: El esquema muestra la hidrólisis general de un fosfolípido.

- Estabilidad coloidal:

En general, una suspensión de partículas coloidales cargadas es estable cuando la fuerza de repulsión electrostática es más grande que las atractivas

de van der Waals. En el medio dispersor, juega un papel importante la composición iónica de éste, ya que puede contribuir en la disminución de las fuerzas repulsivas entre partículas desestabilizando al sistema.^{54,56,95,104,105}

Cualquier partícula coloidal cargada, es capaz de generar una diferencia de potencial entre la doble capa de Helmholtz y la capa difusa que forma en la suspensión, conocida como potencial ζ (fig. 25). Entre mayor sea el valor de potencial zeta, mayor será la repulsión entre las partículas coloidales y mayor será la estabilidad de la suspensión, el valor de potencial zeta puede modificarse añadiendo iones adecuados al medio para incrementar o disminuir su valor.^{54,56,95,96,104,105}

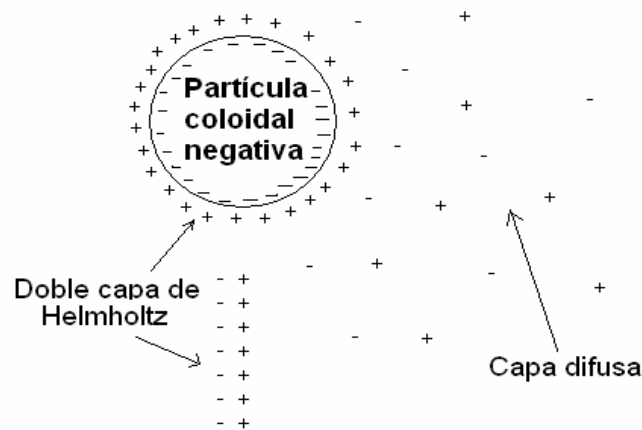


Figura 25: Esquema representativo de la distribución de cargas en un sistema coloidal, formado por partículas coloidales de carga negativa, que obligan a la formación de la doble capa de Helmholtz y la capa difusa, la diferencia de potencial entre estas dos capas es conocida como potencial zeta (ζ).

Métodos de preparación:

- Hidratación de lípidos:

Esta técnica de elaboración de nanoesferas describe un método en el que es necesario realizar previamente una mezcla de los componentes lipídicos en un disolvente orgánico, comúnmente se utiliza cloroformo o la mezcla cloroformo/metanol 3:1 (para lípidos de polaridad baja). La mezcla es preparada en un matraz de bola mediante agitación manual o mecánica hasta garantizar su homogeneidad.⁵³ El disolvente orgánico es entonces evaporado a presión reducida vía rotavapor para obtener una capa lipídica adherida al interior del matraz comúnmente llamada capa lipídica (CL). Para garantizar el secado completo de esta capa, suele someterse a vacío por unas horas. Seca la capa lipídica es hidratada con la solución acuosa de elección, la cual tendrá disuelto al agente que se desea encapsular, se agita moderadamente a la temperatura T_c estimada para la mezcla de lípidos y se deja reposar. Es común que en este proceso se formen nanoesferas lipídicas del tipo MLV (Fig. 25).^{53,54,58,68,71}

Un método alternativo de hidratación describe la disolución de los lípidos en etanol caliente, esta solución etanólica es goteada directamente en la fase acuosa de elección, la cual deberá estar a la temperatura T_c y en agitación

moderada. La suspensión formada se mantiene a la temperatura T_c hasta que el disolvente orgánico se haya evaporado.^{53,57}



Figura 26: Representación de la elaboración de una suspensión de nanoesferas. 1. hidratación de la cama lipídica con la solución elegida, 2. agitación mecánica y 3. formación de las vesículas.

- Vesículas por sonicación:

Esta técnica emplea energía sonora para la producción de nanoesferas, para tal fin es necesario preparar una dispersión de fosfolípidos en agua, la muestra es entonces sometida a sonicación por 10-15 minutos. Esta técnica permite la elaboración de nanoesferas del tipo SUV.^{53,54}

- Evaporación de fase reversa:

Esta técnica apareció a finales de los 70, en esta se prepara un pastel de lípidos tal y como se describió en la técnica de hidratación lipídica, ya seco es nuevamente disuelto en dietil éter o metanol y se adiciona la fase acuosa a 1/3 del volumen de la fase orgánica, este sistema bi-fásico es sonificado para formar micelas reversas en la fase acuosa. A la mezcla obtenida le es retirada la fase orgánica vía rotavapor y si es necesario se puede adicionar más fase acuosa para mantener en rotavapor por varios minutos y garantizar la efectiva eliminación de la fase orgánica y para tener la suspensión a la consistencia deseada.^{53,77}

- Eliminación de Tensoactivo:

En esta técnica se prepara una mezcla CL/tensoactivo 10:2, al evaporar la mezcla cloroformo/metanol 1:1 vía rotavapor. La capa seca es hidratada con la solución de elección y agitada moderadamente por algunos minutos, la suspensión de micelas obtenida es entonces sometida a un método de purificación del tensoactivo como: Equilibrio Donan de membrana o Cromatografía de filtración en gel. Al disminuir gradualmente la cantidad de tensoactivo del medio, se van formando las nanoesferas.⁵³

Homogenización del tamaño de las nanoesferas:

Todas las suspensiones de nanoesferas elaboradas bajo cualquier método de preparación descrito anteriormente no presentan homogeneidad en cuanto a tamaño. Es factible producir suspensiones con un tamaño elegido y homogéneo de partícula mediante el proceso conocido como extrusión, éste método además permite reducir la cantidad de láminas lipídicas en las MLV para dar paso a las SUV o LUV. El procedimiento consiste en hacer pasar la suspensión mediante

presión con N_2 a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro deseado a la temperatura T_c de la suspensión (Fig. 27).^{53,54,57}

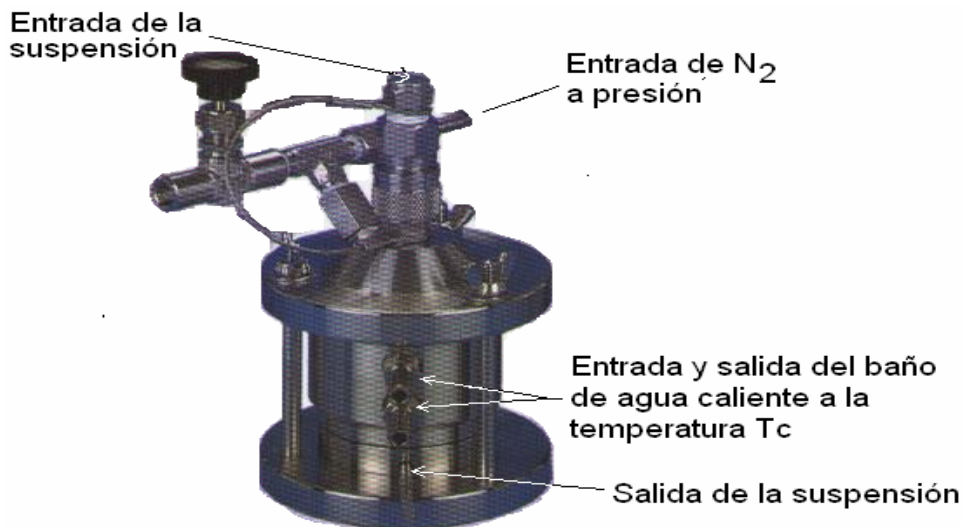


Figura 27: El esquema muestra uno de los tantos modelos de equipos para extrusión que existen en el mercado.

Purificación de la suspensión:

La purificación de la suspensión, tiene por objetivo remover el material que no se encapsuló durante la elaboración o que fue liberado durante el proceso de extrusión. La elección del método de purificación depende de las propiedades químicas del agente que se desea remover, a continuación se dan algunos ejemplos:

- Cromatografía de filtración en gel (exclusión de tamaño):

Una columna para cromatografía de este tipo permite el paso de la suspensión a través de ella por acción de la gravedad. Dentro de la columna se encuentra un gel hecho de un polímero hidrofílico insoluble, un sistema de este tipo ampliamente utilizado es el que utiliza gel SEPHADEX (polímero de dextrano). Esta modalidad de cromatografía, no solo se ha utilizado con el fin de purificar la suspensión recién preparada del agente no encapsulado, sino en la separación de esta en poblaciones de tamaños diferentes de nanoesferas.^{53,90,91,92,94}

- Centrifugación:

Es muy utilizada en la modalidad de gradiente de densidad, sobre todo si lo que se desea es eliminar de la suspensión son nanoesferas del tipo SUV, suele utilizarse glicerol a diferentes concentraciones para formar el gradiente, también es ampliamente usado el Ficoll.⁵³

- Equilibrio Donan de Membrana:

Este método de separación es comúnmente llamado diálisis, en este la separación se hace a través de intercambio de iones a través de una membrana semi-permeable, la suspensión a purificar es depositada en membranas para diálisis de tamaño de poro adecuado y es depositada en medio provisto de iones tolerables para que se de el intercambio y consecuentemente la purificación.^{53,57}

Análisis Químico:

La cantidad de fosfolípidos presentes en las nanoesferas, es un parámetro muy importante, existen varias metodologías analíticas para determinarla, a continuación dos de ellas:

- **Ensayo Bartlet:**

Este ensayo se basa en una determinación colorimétrica de fosfato inorgánico. Para tal fin, es necesario que los fosfolípidos presentes en las nanoesferas sean sometidos a ácido perclórico para obtener fosfato inorgánico a partir de ellos. El fosfato inorgánico es transformado por la adición de molibdato de amonio a ácido fosfo-molíbico, el cuál es reducido a un complejo de color azul por la acción de ac. 4-amino-2-naftil-sulfónico en calentamiento, El complejo colorido puede ser determinado espectrofotométricamente a 830 nm.^{53,64}

- **Reacción de Stewart:**

El ensayo de Stewart para fosfolípidos contempla la formación de un complejo entre los fosfolípidos y ferrotiocianato de amonio en medio orgánico, donde desaparece la necesidad de formar fosfato orgánico. Para tal fin, es necesario secar una muestra de nanoesferas de agua, su bicapa lipídica es disuelta en cloroformo, el ferrotiocianato de amonio (en fase acuosa) es adicionado y ambas fases son agitadas para favorecer la reacción mencionada y la fase orgánica es entonces leída a 488 nm.^{53,85}

Cuantificación del principio activo encapsulado:

La determinación de la cantidad del principio activo encapsulado es otro parámetro importante. Su cuantificación depende de las propiedades químicas del agente y además de la gran gama de técnicas analíticas que existen.^{50,53}

Modificación superficial y estabilidad in vivo:

Investigaciones pasadas realizaron la elaboración de nanoesferas lipídicas evaluando diferentes componentes lipídicos y en diferentes cantidades para llegar a una formulación que, entre otras cosas, presentará buenos niveles de encapsulación y estabilidad; un caso especial fueron aquellas que contenían un elevado porcentaje de colesterol, al ser evaluadas in vivo, eran eliminadas de la circulación, encontrándose una acumulación importante en células de Kupffer, así como en macrófagos del bazo, lo que llevó a la conclusión de que eran reconocidos rápidamente por el sistema retículo endotelial (RES),^{50,52,53,58,59,63,65,72,77,79,81,83} esto evidentemente afectaría la efectividad terapéutica, ya que habría una captación y degradación importante de las nanoesferas cargadas de principio activo, de cualquier manera el fenómeno depende de muchas cosas como tamaño de partícula, carga superficial y fluidez de membrana. De manera general el tiempo de vida media en circulación ($T_{1/2}$) disminuye si aumenta el tamaño de partícula, la densidad de carga negativa superficial y si la fluidez de membrana es alta.^{50,52,53,65,72,76,77,81}

El mecanismo por el cual las nanoesferas son retiradas de la circulación no se conoce aún en detalle, pero se sabe que plasma que ha estado en contacto con nanoesferas muestra una disminución en la cantidad de proteínas, esto hace

suponer que son captadas por la superficie liposomal mediante simples interacciones electrostáticas, este hecho fue de importancia ya que se encontró una relación que a mayor captación de proteínas plasmáticas, mayor era la remoción de las nanoesferas.⁵³ Este hecho hizo suponer que el exceso de cargas negativas superficiales posiblemente favorece el reconocimiento por receptores membranales de los macrófagos.^{50,53} Experimentos con liposomas de carga superficial neutra, se presentó el mismo fenómeno de remoción, en este caso participando activamente factores de la vía del complemento y opsoninas, de aquí que se pensara en la necesidad de poner superficialmente algún agente que interfiriera en la unión de proteínas plasmáticas y/o del complemento a las nanoesferas.^{50,52,53,72,76} Estudios posteriores mostraron que la incorporación de pequeñas cantidades de algunos glucolípidos elevaban de manera considerable el tiempo de circulación en sangre y por lo tanto aumentaba la probabilidad de captación de las nanoesferas por el tejido tumoral murino.^{50,53,72,82} Esas nanoesferas fueron llamadas “stealth liposomes”, años después fue introducido el término “Nanoesferas estéricamente estables” (Sterically Stabilized liposomes).^{50,52,53,77,82,106} Fue así como se comenzó a evaluar la posibilidad de probar con polímeros sujetos a la superficie, se probó con polímeros derivados de dextrano y con el poli(etilenglicol) de cadena lineal (PEG), el cuál extendió el tiempo de circulación de manera considerable, así como de su captación por células tumorales (Fig. 28).^{50,52,53,58,59,72,76,77,79}

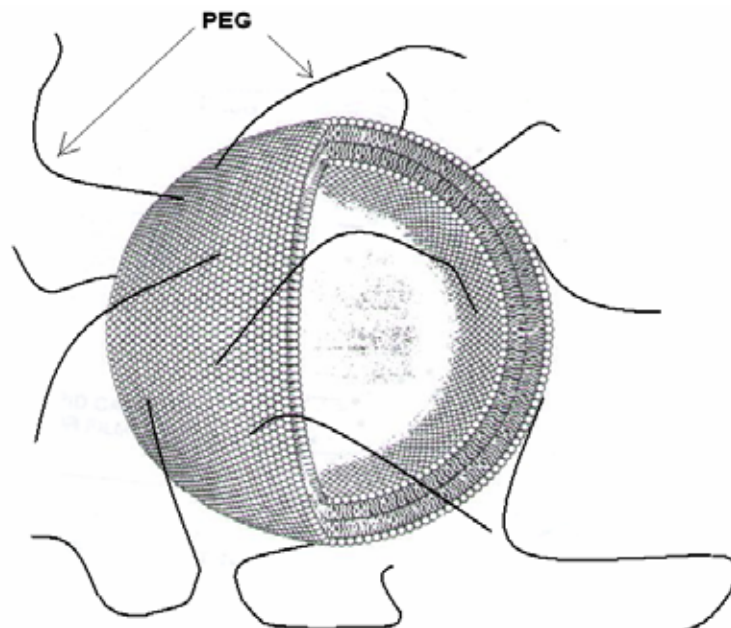


Figura 28: Esquema representativo de una nano-esfera PEGilada.

Estas nanoesferas fueron conocidas como “PEG-coated liposomes” o “liposomas PEGilados” (PEGylated liposomes), la presencia de este polímero en baja proporción molar, posiblemente interfiere espacialmente (estéricamente) en la unión de cualquier proteína a la superficie.^{52,53,58-60,72,76,106} Así mismo la longitud de éste es un factor de importancia, pues al ser de 2000 Da y estar en proporción molar menor a 5%, aumentaba óptimamente el $T_{1/2}$.^{50,53}

Debido a la importancia farmacológica que se observó de los liposomas PEGilados, se diseñaron diversos métodos de incorporación del polímero en la superficie,⁷⁵ un método importante fue la incorporación de un fosfolípido unido al PEG dentro de la membrana liposomal. En la actualidad es ampliamente utilizado el PEG-fosfolípido PEG₂₀₀₀DSPE (anexo I, apartado A I.2).^{50,52,53,60,86}

Es muy importante mencionar que la cantidad de PEG adicionado a la superficie liposomal es un parámetro crítico, ya que si esta en elevadas cantidades, puede interferir en la captación de la nano-esfera por parte de la célula tumoral. Una hipótesis sostiene la posibilidad de que estas sean captadas por contacto entre las bicapas lipídicas, lo cual desencadena una fusión de ellas y por lo tanto la entrada del principio activo encapsulado.^{50,53}

Marcado con radionúclidos:

Debido a los pobres resultados obtenidos en la encapsulación de material radioactivo en nanoesferas para imagenología nuclear, como pérdida de la actividad del radionúclido a causa del tiempo invertido en su elaboración y una exposición importante a radioactividad, principalmente de personal, fue necesario el desarrollo de técnicas de marcado de nanoesferas preformadas.^{60,66,71,77,80}

La presencia de cargas eléctricas en la superficie de las membranas permitió idear un marcado de éstas con núcleos radioactivos por simple interacción entre cargas; los estudios al respecto mostraron una pobre estabilidad del marcado en ensayos in vivo, debido a la fuerte interacción electrostática que se presentó entre el radionúclido y proteínas plasmáticas, sobre todo de la conocida como transferrina lo cual trajo como consecuencia un intercambio considerable del radionúclido hacia los centros más electronegativos de las proteínas.⁶⁶

También fue ideado un método de marcado mediante la asociación del radionúclido a la bicapa gracias a su previa incorporación en un agente lipofílico afín a la bicapa membranal, tal es el caso del complejo oxina-radionúclido, este mediante incubación con calentamiento moderado es introducido a la membrana de las nanoesferas consiguiéndose así la incorporación del radionúclido,^{60,66,80,83} pero en pruebas in vivo se observó una captación del agente lipofílico marcado por membranas celulares circundantes, lo cual limitó la práctica de esta técnica.⁶⁶

La incorporación de un agente quelante en la superficie liposomal, permitiría también un marcado de las nanoesferas preformadas, es así como se diseñó la incorporación del ácido dietilentriamin-pentacético (DTPA) a un fosfolípido como el DMPE y tener así el compuesto conocido como DMPE-DTPA (véase Anexo I), el cual es añadido a la mezcla de fosfolípidos con los que se elaboraran las nanoesferas y permite el quelado de iones radioactivos en la superficie de estas.^{59-61,63,66,80} Esta reciente forma de marcado de nanoesferas permite la obtención de suspensiones marcadas de mayor estabilidad in vivo, ya que el quelado obtenido es muy estable a pH fisiológico.⁶⁰ Gracias a esta metodología, se ha permitido elaborar liposomas para imagenología nuclear con ⁶⁷Ga, ¹¹¹In y ^{99m}Tc en la superficie membranal.^{60,61,66,80,81}

El uso de liposomas como vectores para la administración de radionúclidos con fines terapéuticos apareció una vez que se perfeccionaron y aparecieron

nuevas técnicas de marcado mediante formación de quelados, así como del desarrollo de la química de coordinación de los diversos radionúclidos,^{59,60,82,103} de esta manera se ha elaborado nanoesferas marcadas con ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re y ¹³¹I y se avanza en el marcado con ⁶⁷Cu, y ¹³¹I. Antes del quelado de los radionúclidos, estos eran cargados en el interior de las nanoesferas, de hecho hay gran cantidad de información de su elaboración con ^{99m}Tc principalmente (ya que se utilizaban otros radionúclidos), pero debido a que experimentalmente es mucho más complicado y menos eficiente que el quelado, se está aceptando la forma alterna de marcado.^{60,66,71}

Caracterización y controles de calidad:

Debido al potencial enorme que tienen las nanoesferas lipídicas para el transporte de fármacos, es imprescindible el desarrollo de controles de calidad que contemplen todos aquellos parámetros necesarios para determinar una seguridad total para experimentación en animales de laboratorio, pero sobre todo para su administración en humanos.^{50,53} Un parámetro evidentemente crítico de control de calidad son los niveles de esterilidad y pirogenicidad. En la tabla 2, se muestran los principales parámetros de control.^{50,53,54}

Tabla 2. Parámetros de control de calidad

Estudios generales	Equipo
pH Conductividad Concentración de fosfolípidos Concentración de colesterol Cantidad de agente encapsulado Solventes orgánicos residuales	pH-ímetro Conductímetro Ensayo Barlett o Stewart Ensayo del colesterol oxidasa, HPLC fase normal y reversa Espectrofotometría, HPLC, NMR
Caracterización física	
Distribución del tamaño de partícula	Dispersión dinámica de luz, cromatografía de Exclusión de tamaño, microscopía electrónica.
Estabilidad Química	
Oxidación de fosfolípidos Hidrólisis de Fosfolípidos Esterilidad Pirogenicidad y endotoxinas	Determinación de peroxidación lipídica, composición lipídica. Composición lipídica Cultivos en medio aeróbico y anaeróbico Ensayo de lisado de limulus amebocito

Farmacología general:

La farmacocinética de las nanoesferas está en función de las mismas variables de las que depende el mecanismo de captación. Así mismo, se había discutido anteriormente el papel importante que juega el PEG en la prolongación efectiva del $T_{1/2}$, así como de su tamaño,^{50,52,53,59} al respecto aparentemente la

composición lipídica no influye significativamente. En cuanto a la carga superficial, se ha observado que a mayor presencia de cargas negativas, mayor es la captación por parte del RES.^{50,52,53}

Posterior a la administración de la suspensión de liposomas, se ha observado que su distribución depende primeramente del sitio de inyección, en la administración intraperitoneal, nanoesferas de 100nm de diámetro son absorbidas en 1 hora hacia la circulación con una eficiencia del 30-40% de la dosis inicial con un $T_{1/2} = 11$ horas. También, después de la inyección, migran pequeñas nanoesferas hacia los nódulos linfáticos cercanos al sitio de administración.^{50,53} Una hipótesis plantea que una vez que las nanoesferas se encuentran en el torrente circulatorio, se acumulan en las zonas periféricas a la masa tumoral por extravasación de éstas a través de lesiones porosas presentes en los vasos sanguíneos (endotelio fenestrado) que alimentan al tumor^{52,74}, las cuales van desde 100 hasta 700 nm de diámetro vs los 6 nm en promedio que presenta el endotelio de los vasos de tejidos sanos. Una vez allí, comienza la interacción liposoma-tejido blanco (Fig. 29). De manera general, hay cuatro hipótesis que explican la interacción que sucede entre la célula y una nanoesfera (Fig. 30).^{52,53}

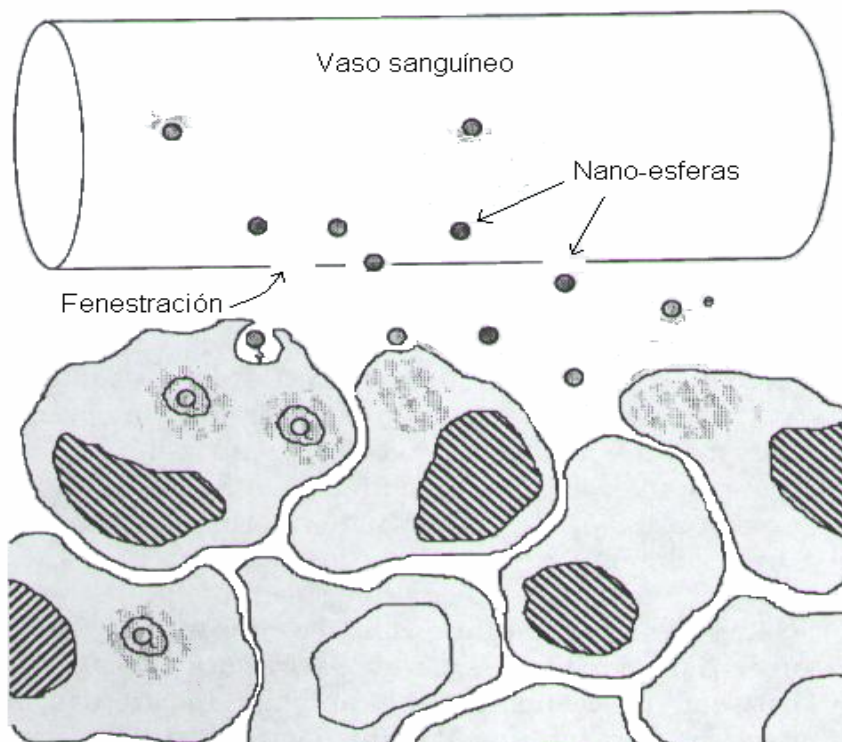


Figura 29: La figura muestra la acumulación de nanoesferas en la periferia de células tumorales a causa de la fenestración de la importante vascularización que poseen.

In vivo es bien conocida la captación de las nanoesferas no PEGiladas por parte de los macrófagos, la interacción posiblemente esta mediada por receptores y desemboca en una endocitosis o fagocitosis de la partícula, el endosoma formado es fusionado con lisosomas para ser digerido. Este fenómeno sirvió de base para formular las 4 teorías mencionadas y concluir además que la

interacción liposoma-célula blanco esta en función de muchas variables de entre las que destacan el tipo de célula blanco, composición superficial de la nanoesfera y de la célula, carga superficial composición lipídica y tamaño de la nanoesfera así como de la composición del suero.⁵³

Ventajas farmacológicas del uso de nanoesferas:

De manera general, a través de la encapsulación de agentes de quimioterapia en vectores de transporte como las nanoesferas lipídicas, se reduce el volumen de distribución del fármaco y aumenta la concentración de este en el interior tumoral. Esto resulta en el incremento en la cantidad de fármaco efectivamente liberada en el tumor y en un mayor efecto terapéutico.^{50-53,57,76,98} Esto es posible gracias a que las nanoesferas protegen el fármaco del metabolismo e inactivación que sucede en el plasma, y por ser vehículos que transportan elevadas cantidades de fármacos, evitándose la pérdida de más del 90% de éste en comparación con lo que sucede en la administración tradicional de *cis*-DDP.⁵⁰ Así mismo, ofrecen una nueva forma de administración de radioterapia, esta sería más segura y efectiva, pues los índices necesarios de radiación disminuirían al lograrse la deposición de esta dentro de la masa tumoral o en la periferia, además de que la radiación en tránsito que el vector suministraría a las diversas zonas del organismo en su viaje desde el sitio de administración hasta el tejido blanco, sería menor que el que recibe el tejido sano en la radioterapia tradicional.

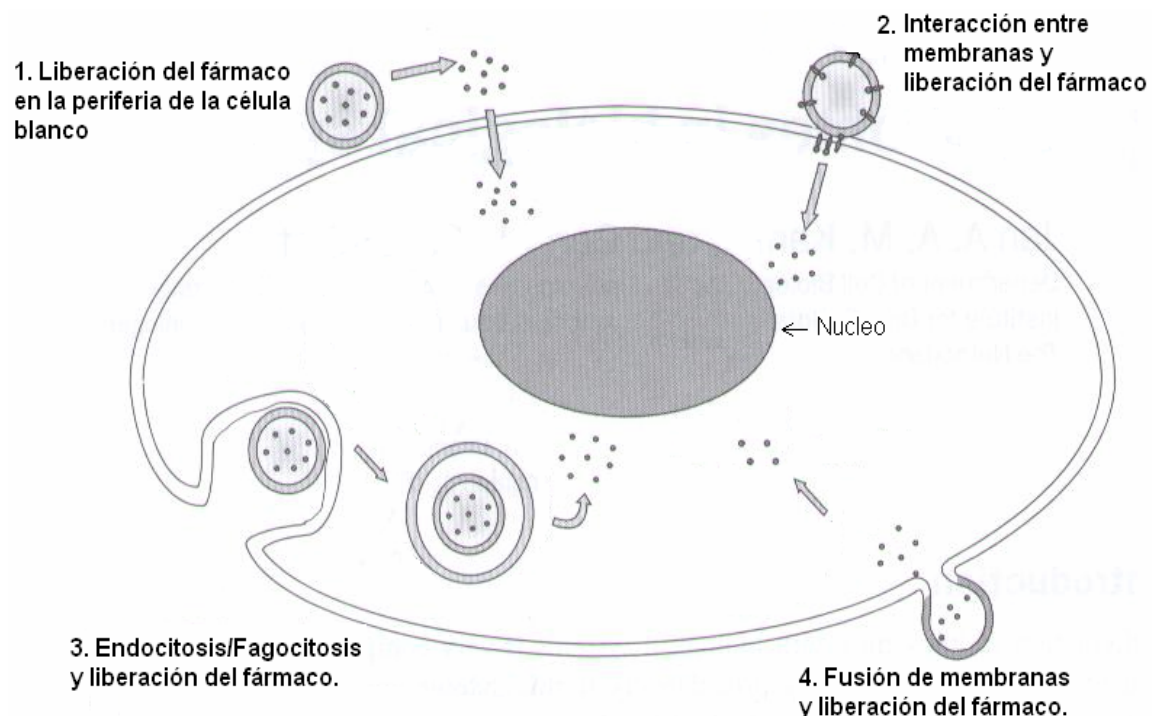


Figura 30: El esquema representa las cuatro posibles formas de entrega del principio activo encapsulado en nanoesferas. 1) El fármaco es liberado fuera sin necesidad de previa interacción nano-esfera/célula blanco para posteriormente ser introducido 2) Previa interacciones membranales nano-esfera/célula blanco, es liberado el fármaco en la periferia. 3) La nano-esfera es introducida al interior celular, luego de ser digerido el fagosoma, el fármaco es liberado. 4) El fármaco es liberado posterior a la fusión de la membrana celular/nano-esfera.

Nanoesferas lipídicas cargadas de cis-DDP:

Debido a los severos efectos secundarios que aparecen como consecuencia del uso terapéutico del *cis*-DDP, fueron desarrollados análogos de menor toxicidad como el carboplatino y oxaliplatino, pero debido al interés que existe a nivel mundial en el desarrollo de terapias menos agresivas a tejido sano, muchas investigaciones se enfocaron en reducir su toxicidad y aumentar su actividad terapéutica mediante la encapsulación en nanoesferas lipídicas.^{50,52,53,57}

SPI-77, es una formulación de cisplatino encapsulado en nanoesferas en fase I de investigación, posee en su superficie metoxi-poli(etilenglicol) (que provee una vida media de 70-100 horas), de un diámetro aproximado a los 100nm. En estudios preclínicos ha resultado ser menos tóxico en comparación con la administración tradicional de cisplatino y en general los efectos antitumorales son mejores que los mostrados por carboplatino y cisplatino en pacientes.^{50,98}

Nanoesferas lipídicas como vectores de quimio-radiación:

Debido a los considerables y muy numerosos trabajos experimentales que muestran los resultados tan prometedores de las evaluaciones realizadas a diversas formulaciones de fármacos y radionúclidos encapsulados en nanoesferas lipídicas, estos vectores se muestran ideales para alojar ambos agentes para ser un vector de quimio-radioterapia. Hay evidencia necesaria para saber que es un vector prácticamente inocuo para el organismo, su composición a base de agentes lipídicos naturales no representa peligro toxicológico, la estabilidad frente al sistema inmunológico, dado por el PEG, les proveen un $T_{1/2}$ en circulación adecuado para que tanto la radioterapia como la quimioterapia surtan efecto farmacológico importante, además de que posiblemente se disminuya la quimio-resistencia y radio-resistencia por ser un sistema que administre ambas terapias simultáneamente. La química de coordinación y la producción artificial de radionúclidos de diversos valores de vida media y tipos de emisión radioactiva adecuados para sistemas biológicos, ha puesto al alcance los conocimientos teóricos para la manipulación adecuada de estos en un sistema de nanoesferas, y el principal y más importante factor, este sistema es susceptible de en un futuro ser diseñado y elaborado como vector específico por células tumorales, mediante la adición del marcador adecuado en sus superficie que le permita ser captado exclusivamente por el tejido canceroso.

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Técnica de elaboración de nanoesferas.

3.1.1 Hidratación de fosfolípidos previa evaporación de disolvente orgánico.^{53,65,68,71,79}

En un matraz de bola para rotavapor, se deposita la cantidad de masa a utilizar de HSPC/Colesterol/²⁰⁰⁰PEG-DSPE/DMPE-DTPA/ α Tocoferol (véase anexo I) en relación molar 50:46:1.5:1.5:1, estos son disueltos en cloroformo (Sigma U.S.A.) en relación volumen final de suspensión preparada/cloroformo de 1:2. La mezcla es sometida a agitación en rotavapor (Laborota 400, Heidolph, Alemania) a 90 rpm por 10 minutos. Es entonces retirado el disolvente orgánico a presión reducida manteniendo el sistema a 40°C y 240 rpm

Finalizada la evaporación, una CL es obtenida en el matraz de bola, esta es mantenida a presión reducida y agitación a 60 rpm durante 30 minutos. Para garantizar la sequedad total de la CL, el matraz de bola es introducido en una campana de vacío por 5 horas.

Una solución de cisplatino (6 mg/ml) (Sigma, Alemania) es preparada en S.S.I. (Baxter, México) en un vaso de precipitados (el volumen de solución platinada esta regido por la relación en masa cisplatino/compuestos hidrofóbicos 1:8), se mantiene a 65°C por 1 hora. Al término, esta es pasada a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.22 μ m de tamaño de poro (Corning, U. S. A.) y es depositada sobre la cama lipídica seca, se mantiene el sistema en agitación a 60 rpm por 1 hora en rotavapor a presión atmosférica normal.

La suspensión formada, es entonces dejada en reposo a temperatura ambiente por 2 horas. Al término, un precipitado de cisplatino se observa en el fondo del matraz, éste es eliminado por decantación de la suspensión, la cual es almacenada en tubos cónicos de 15 ml (Falcon U.S.A.) a 4°C.

En la técnica de elaboración de nanoesferas, fue utilizado material estéril y el trabajo fue realizado en una campana de flujo laminar (Sterilgard III, Baker Company, U. S. A.).

La suspensión es depositada en membranas para diálisis (Spectra/Por[®] MWCO: 3500, Canada) y es depositada en medio de purificación NaCl (3 mM)/Sacarosa (6 % w/v)⁵⁷ en proporción 1:20 suspensión/medio por 24 horas. Al término, la suspensión es guardada a 4°C.

3.2 Homogenización del tamaño de nanoesferas.

3.2.1 Extrusión.^{53,57}

La suspensión recibida de la primera purificación, es diluida 1:2 con S.S.I. Es montado el equipo de extrusión (Lipex[™] Extruder, Northern Lipids, Canada) y mantenido a la temperatura T_c aproximada de 65°C, la suspensión es depositada en el equipo provisto de un filtro de policarbonato (Whatman Nucleopore Northern Lipids, Canada) de 400 nm de tamaño de poro y se hace pasar por empuje a presión con N₂ (Aga, México) a través de él 2 veces, al término es repetido el procedimiento 2 veces a través de un filtro de 200 nm y 4 veces a través de filtros de 100 nm.

La suspensión recibida es depositada en tubo cónico de 15 ml y guardada a 4°C. El proceso de extrusión fue llevado a cabo con el equipo y material de laboratorio estéril y en una campana de flujo laminar.

3.3 Purificación de la suspensión vía equilibrio Donan de membrana.

La suspensión recibida del proceso de extrusión es sometida a purificación (apartado 3.1.1 último párrafo), a las 24 horas, se cambia el medio de purificación, el cual nuevamente es retirado 24 horas después. Es entonces cuando la suspensión es llevada a pH = 3 y se depositada en medio de purificación también a pH = 3, para una purificación en medio ácido, el cual es retirado a las 12 horas.

3.4 Evaluaciones analíticas.

3.4.1 Cuantificación de *cis*-DDP encapsulado:^{88,89}

Cromatografía de líquidos de alta resolución

Las muestras de nanoesferas fueron cuantificadas siguiendo dos protocolos para HPLC desarrollados en el laboratorio de Farmacología del INCan. Fueron cuantificados 100µl de suspensión de nanoesferas

Condiciones del equipo

El sistema consistió de una unidad de inyección de solvente 650E solvent delivery (Waters Assoc. Milford MA, USA), un inyector de 20 µl (Rheodyne, Cotati Ca, USA), un detector UV 486 y columnas Synmetry C18 de 150 x 3.9 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Las muestras fueron leídas a 254 nm y 23°C de temperatura.

3.4.2 Cuantificación de lípidos del sistema.

3.4.2.1 Reacción de Stewart.^{53,85}

Preparación de NH₄FeSCN.

Se disolvieron 27.03 g de FeCl₃·6H₂O (Sigma-Aldrich, Alemania) y 30.4 g de NH₄SCN (Sigma-Aldrich, Alemania) en 1 litro de agua desionizada.

Curva patrón

Se preparó una solución de HSPC (0.1 mg/ml) en cloroformo, de la cual fueron preparadas por triplicado diluciones para la realización de la curva patrón.

Tanto del HSPC (0.1 mg/ml) como de sus diluciones, fueron tomados 2 ml y se mezclaron mediante agitación en vórtex con 2 ml de la solución de NH₄FeSCN (reactivo en exceso) durante 2 minutos. Al término, cada muestra se centrifugó a 500 rpm (Centrifuge 5702 R, Eppendorf, U. S. A.) por 3 minutos. La

fase orgánica fue leída a 488 nm (DU[®] 530, Beckman coulter TM, U. S. A.) en celdas de cuarzo de 1 ml de capacidad y 1 cm de longitud de paso óptico.

Muestras de nanoesferas

Fue cuantificado un volumen de 2 µl de suspensión concentrada (apartado 3.5.2) y uno de 4 µl de suspensión sin concentrar. A cada muestra le fue removida el agua con vapor de N₂ (-190°C), una vez secas, se les adicionó 2 ml de cloroformo. Al término se adicionó 2 ml de la solución de NH₄FeSCN. La muestra se mezcló mediante agitación en vórtex durante 2 minutos. Al término, la muestras fueron centrifugadas a 500 rpm por 3 minutos. La fase orgánica fue leída a 488.

3.4.3 Imágenes y tamaño de partícula.

Tamaño por dispersión dinámica de luz.^{72,77,96}

De una suspensión extruída hasta 100 nm, se tomaron 2 muestras, una fue diluida 1:10 y la otra 1:100 en S: S. I., de cada dilución, tres alícuotas de cada una, fueron leídas en un equipo de dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano, Malvern, UK) a 25°C, 1.33 de índice de refracción y 0.8872 cP de viscosidad.⁷²

*Microscopía electrónica.*⁵³

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión (FEG 2010 FASTEM). Para la determinación, un volumen pequeño de suspensión fue depositado en discos pequeños para secarse a temperatura ambiente, para posteriormente ser depositada en el ocular del microscopio.

3.5 Marcado de la suspensión con In-111.^{42,43,79,83}

3.5.1 Radionúclido:

Fue utilizado ¹¹¹InCl₃ (T_{1/2} = 2.8 días, emisión de gammas con energías de 171.3 y 245.4 keV) disuelto en HCL 0.03 N (MIYMSA radiofarmacia, México) La actividad del radionúclido y de las muestras marcadas fue determinada mediante un activímetro digital (Deluxe, Nuclear Associates, USA).

3.5.2 Marcado de la suspensión:⁸⁰

Se realizó el marcado utilizando nanoesferas lipídicas de 100 nm. La suspensión fue concentrada eliminando el 50% de agua mediante centrifugación al vacío (SpeedVac Concentrator, Termo Electrón Corporation, U. S. A.) por 2 horas a 1700 rpm y 40°C. Posteriormente, la suspensión fue marcada a razón de 0.5 mCi de actividad de radionúclido por cada 2 ml de suspensión, la incubación se llevó a cabo a pH = 3, y temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, se determinó la actividad del radionúclido y de la muestra de nanoesferas.

3.5.3 Eliminación de In-111 no quelado:^{93,94,101}

Para la eliminación del radionúclido no encapsulado, se usaron columnas de cromatografía para filtración en gel SephadexTM G-25 M (PD-10 Amersham

Biosciences, Suecia). Primeramente a la columna se le permitió eluir el buffer de fábrica, y posteriormente fue lavada 3 veces con S. S. I. pH = 3 para luego ser depositada la suspensión marcada. Al término de la separación cromatográfica se determinó la actividad restante en la suspensión, para evaluar la eficiencia de marcado.

3.5.4 Eficiencia de marcado:

Este valor se obtuvo mediante las ecuaciones siguientes:

$$E = \frac{\text{Actividad suspensión previa cromatografía}}{\text{Actividad suspensión post-cromatografía}} \times 100$$

$$\text{Actividad suspensión} = \frac{\text{Actividad medida}}{\text{volumen total}}$$

3.6 Estabilidad de marcado.^{42,43}

3.6.1 Evaluación:

Se utilizó la técnica de cromatografía instantánea en papel impregnado de sílica gel (ITLC). Fueron tomados 2 µl de nanoesferas marcadas con el In-111, de la mezcla plasma/nanoesferas (3:1) (prueba in Vitro) y del radionúclido utilizado (referencia) (Apartado 3.5.1) y cada una fue depositada por separado en papel para cromatografía ITLC (Gelman Sciences, U.S.A.) de 1 cm de ancho por 10 cm de alto, se permitió la elusión completa de la fase móvil (Acido acético/Metanol/Agua 1:1:1 llevado a pH = 3 con HCl diluido) hasta la parte superior del papel. Al término de la separación, cada papel fue cortado a la mitad.

3.6.2 Lecturas de actividad:

En cada sección de papel de cromatografía fue medida la actividad utilizando un detector gamma de pozo de NaI(Tl) (Canberra, U. K.). Durante cada medición se determinó el valor de radiación de fondo (antes y después de las mediciones y se obtuvo su valor promedio). Al final este valor de fondo fue restado a cada una de las lecturas experimentales.

3.6.3 Determinación de la estabilidad:

El cálculo de estabilidad del marcado se realizó a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ In-111 liberado} = \frac{\text{actividad papel parte superior}}{\text{actividad papel parte inferior} + \text{actividad papel parte superior}} \times 100$$

$$\% \text{ In-111 unido} = \frac{\text{actividad papel parte inferior}}{\text{actividad papel parte inferior} + \text{actividad papel parte superior}} \times 100$$

CAPÍTULO 4

R E S U L T A D O S
Y
D I S C U S I O N

4.1 Cuantificación de *cis*-DDP encapsulado:

La Tabla 4.1a, muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de dos muestras de suspensión de nanoesferas sometidas a extrusión y purificación.

Tabla 4.1a.

Muestra	<i>cis</i> -DDP ($\mu\text{g/ml}$)
1	607.45
2	601.65

Como se observa, la cantidad de cisplatino encapsulada en las nanoesferas (604.5 ± 2.9), correspondió a aproximadamente 1/10 de la concentración inicial de cisplatino, cantidad aceptable para los fines de este trabajo.

4.2 Cuantificación de lípidos del sistema:

La Tabla 4.2a, muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de fosfolípidos en las nanoesferas. El ensayo A se refiere a las muestras sin concentrar y el B a muestras concentradas en un 50%. Por último, la Tabla 4.2b muestra los promedios correspondientes de concentración del analito.

Tabla 4.2a

ensayo	mg/ml lípidos
A	0.047
A	0.046
A	0.044
B	0.05
B	0.053
B	0.051

Tabla 4.2 b.

ensayo	mg/ml fosfolípidos totales
A	0.0457 +/- 0.0015
B	0.0513 +/- 0.0015

Los resultados indicaron que la muestra no concentrada presentó una cantidad mayor de fosfolípidos, respecto a la muestra concentrada. No hay elementos para suponer que el proceso de concentración (eliminación del exceso de agua) provoque pérdida de lípidos del sistema.

4.3 Tamaño de partícula:

La Tabla 4.3 a presenta los resultados obtenidos para el tamaño de diámetro de las nanoesferas.

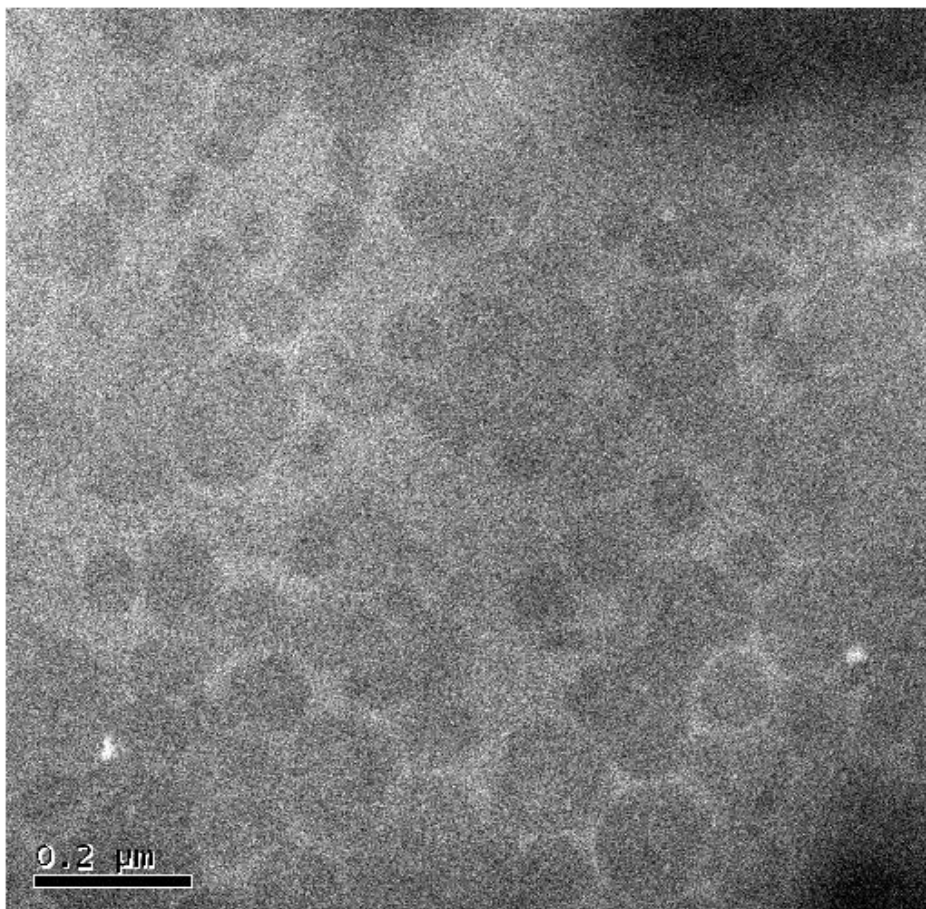
Tabla 4.3a

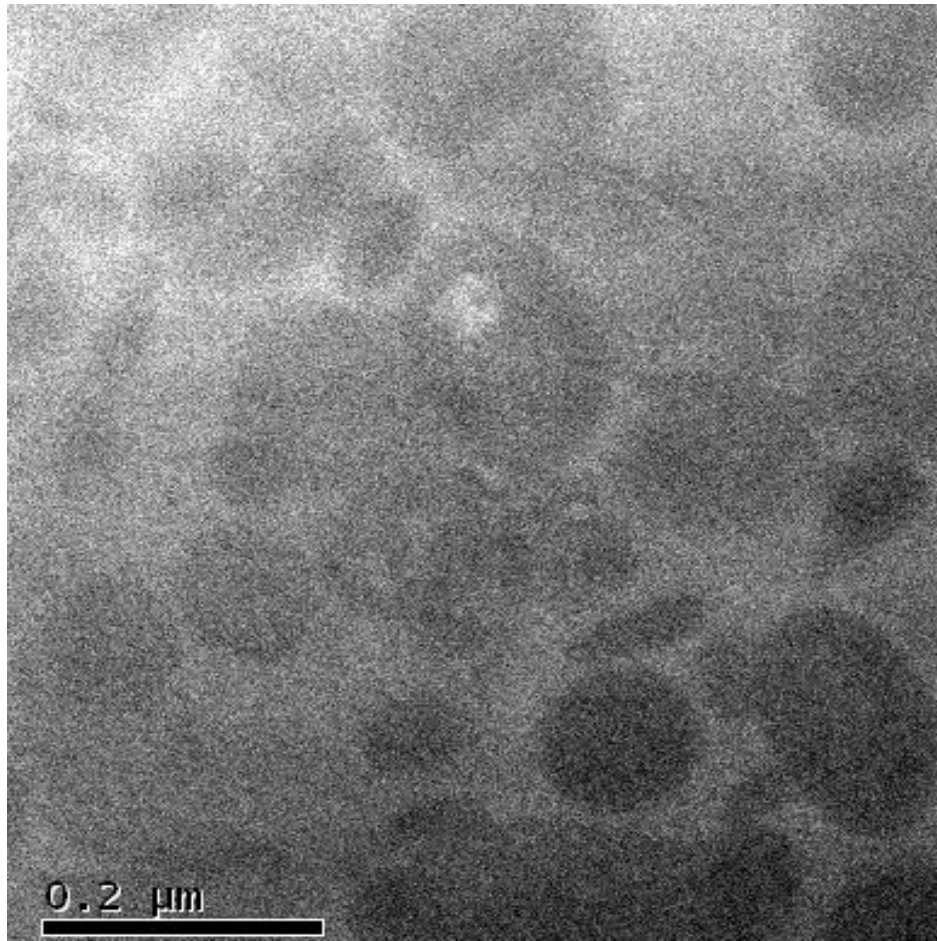
Dilución	Diámetro (nm)	Índice de polidispersión (pdi)
1:10	114.7 +/- 0.6	0.045 +/- 0.017
1:100	114 +/- 0	0.076 +/- 0.009

Como se observa, el tamaño de diámetro obtenido en ambas diluciones, es del orden de los 100 nm. El índice de polidispersión (pdi) mide la homogeneidad de la muestra de liposomas, respecto al diámetro. Un valor de 0.0 representa una muestra totalmente homogénea, mientras que un valor de pdi de 1.0 representa una muestra totalmente heterogénea.

4.4 Imágenes de las nanoesferas:

Las siguientes imágenes corresponden a las fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de una muestra de nanoesferas a 100 nm. Las fotografías son de la misma muestra de nanoesferas, sólo que la última es una ampliación.





Es importante destacar que las imágenes muestran la morfología esférica esperada para las nanoesferas. La escala mostrada en cada una de las imágenes permite hacer referencia al tamaño de los 100nm de diámetro que ya se había obtenido en el análisis de tamaño por dispersión dinámica de luz.

4.5 Marcado con In-111

A continuación, se presentan los datos correspondientes al experimento de marcado.

Se utilizó un volumen de 0.89 ml de radionúclido con una actividad de 1.13 mCi/ml; este volumen fue diluido hasta un volumen final de 2 ml con S.S.I., pH = 3, con lo que se obtuvieron 0.5 mCi/ml de actividad. La Tabla 4.5a, muestra los parámetros más importantes determinados antes del marcado de la suspensión y la Tabla 4.5 b los valores después del marcado.

Tabla 4.5a

	Volumen de suspensión (ml)	Volumen de radionúclido (ml)	Actividad radionúclido antes del marcado (mCi)	Volumen total de incubación (Vi) (ml)
Ensayo 1	1.9	0.8	0.40	2.7
Ensayo 2	2	0.8	0.41	2.8

Tabla 4.5b.

	Vi (ml)	Actividad i (mCi)	mCi/Vi (mCi/ml)	V.f	Actividad f (mCi)	mCi/Vf (mCi/ml)	Eficiencia
Ensayo 1	2.7	0.399	0.148	2.9	0.36	0.124	84%
Ensayo 2	2.8	0.404	0.144	3	0.36	0.12	83%

i = inicial f = final

Vf = volumen de suspensión obtenido al final de la cromatografía.

Como se observa, los valores obtenidos de eficiencia de marcado fueron muy homogéneos, 83.5% de valor promedio.

4.6 Estabilidad de marcado:

Los datos de la Tabla 4.6a corresponden a las pruebas de estabilidad *in Vitro* del marcado de las nanoesferas en solución salina (ensayo 1) y en el plasma (ensayo 2). La Tabla 4.6b muestra la prueba de referencia cromatográfica con In-111.

Tabla 4.6a

	ensayo 1				ensayo 2			
tiempo	% Unido	error	% Libre	error	% Unido	error	% Libre	error
0.25	97.81	0.56	2.19	0.19	98.34	0.19	1.66	0.19
0.5	97.61	3.37	2.39	1.49	97.47	1.49	2.53	1.49
1.5	96.78	0.45	3.22	12.17	90.59	12.17	9.41	12.17
3	98.29	1.83	1.71	0.71	98.79	0.71	1.21	0.71
24	98.18	1.27	1.82	5.20	93.55	5.20	6.45	5.20
48	97.40	0.51	2.60	0.45	88.03	0.45	11.97	0.45
72	98.71	1.77	1.29	10.30	88.90	10.30	11.10	10.30

%Unido = porcentaje de In-111 unido a las nanoesferas.

% Libre = porcentaje del In-111 liberado de las nanoesferas.

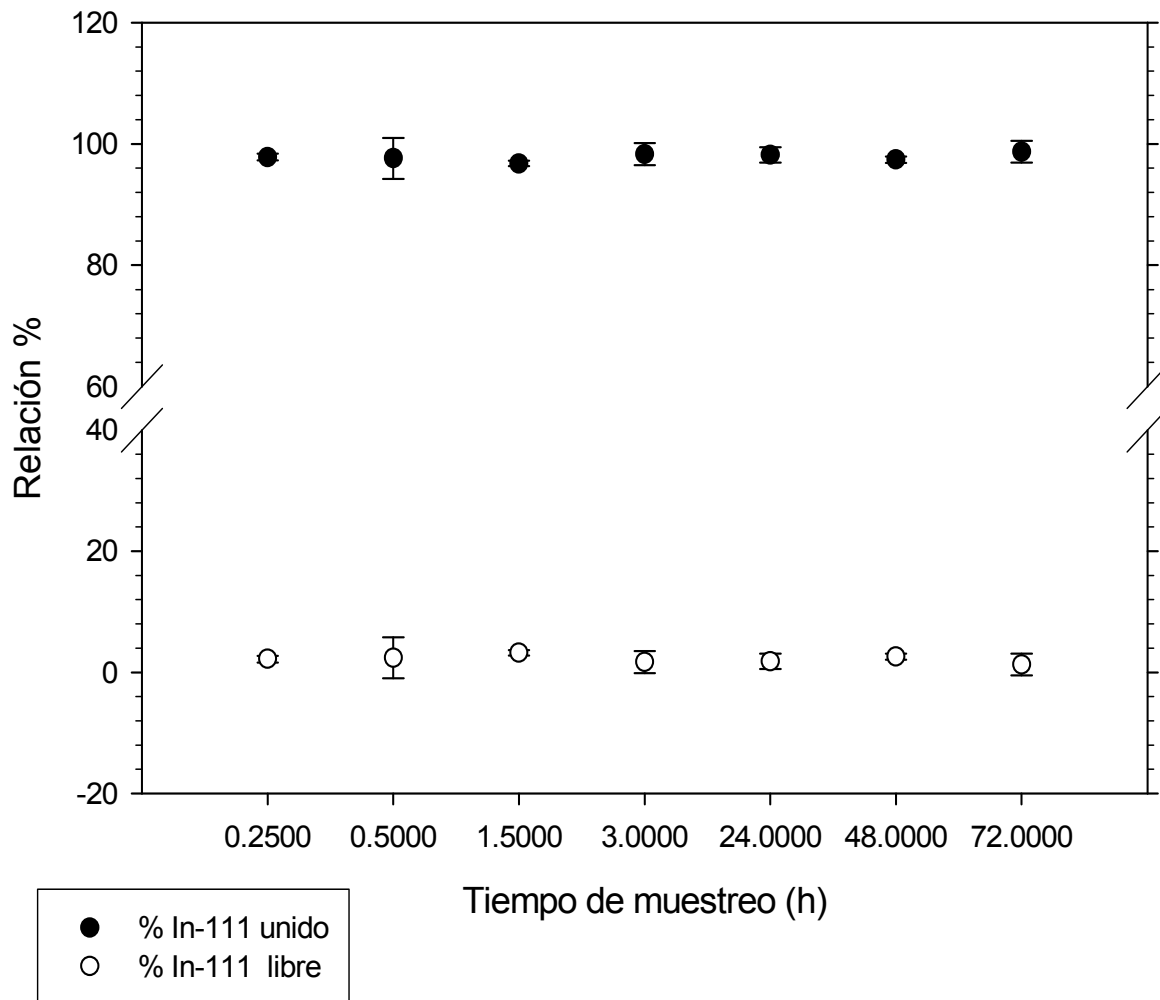
Tabla 4.6 b

Promedio de % B	Promedio de % T	Error B	Error T
2.547	97.353	0.645	0.645

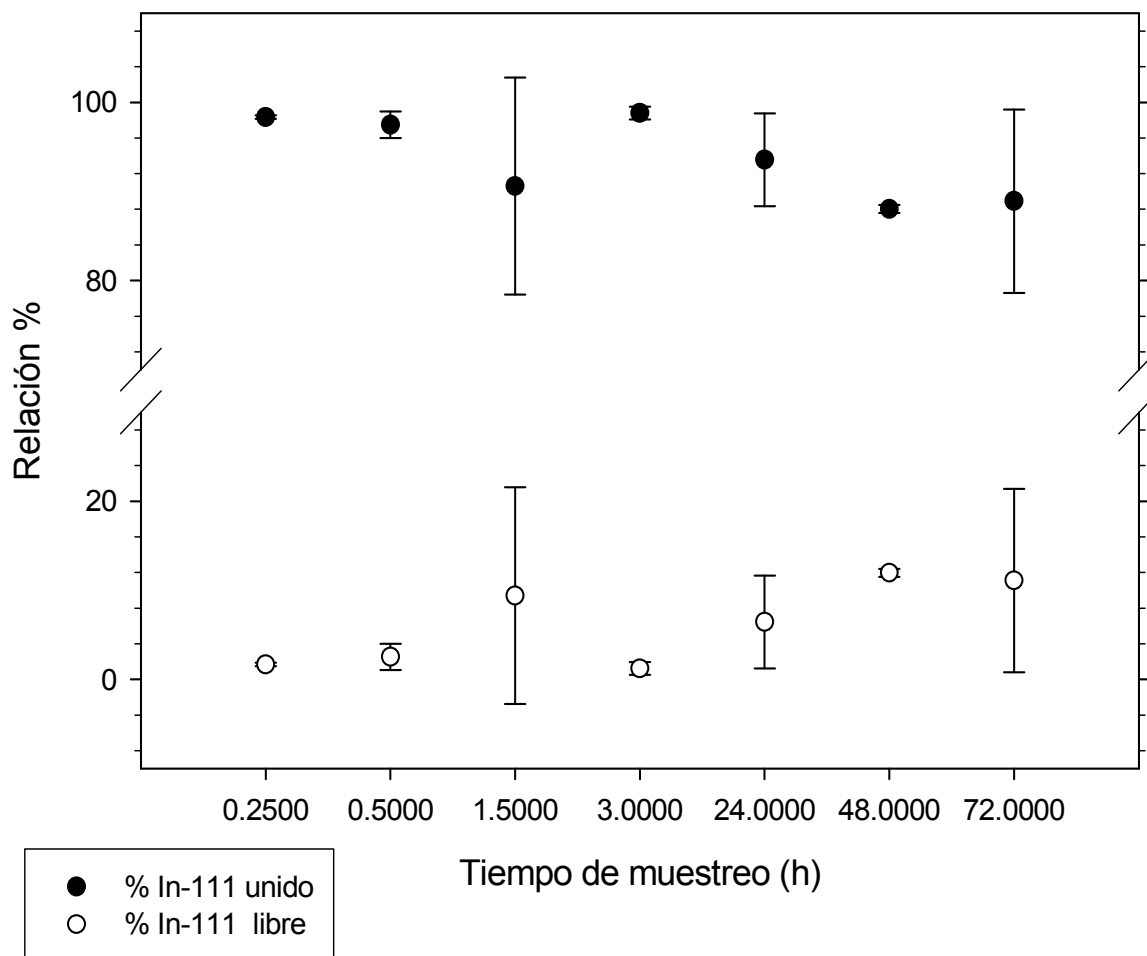
B = actividad parte inferior del papel, y T = actividad en la parte superior.

A continuación se muestran las curvas de estabilidad correspondientes a los ensayos de la Tabla 4.6 a.

Curva ensayo 1 (estabilidad en s.s.i.)



Curva ensayo 2 (estabilidad en plasma)

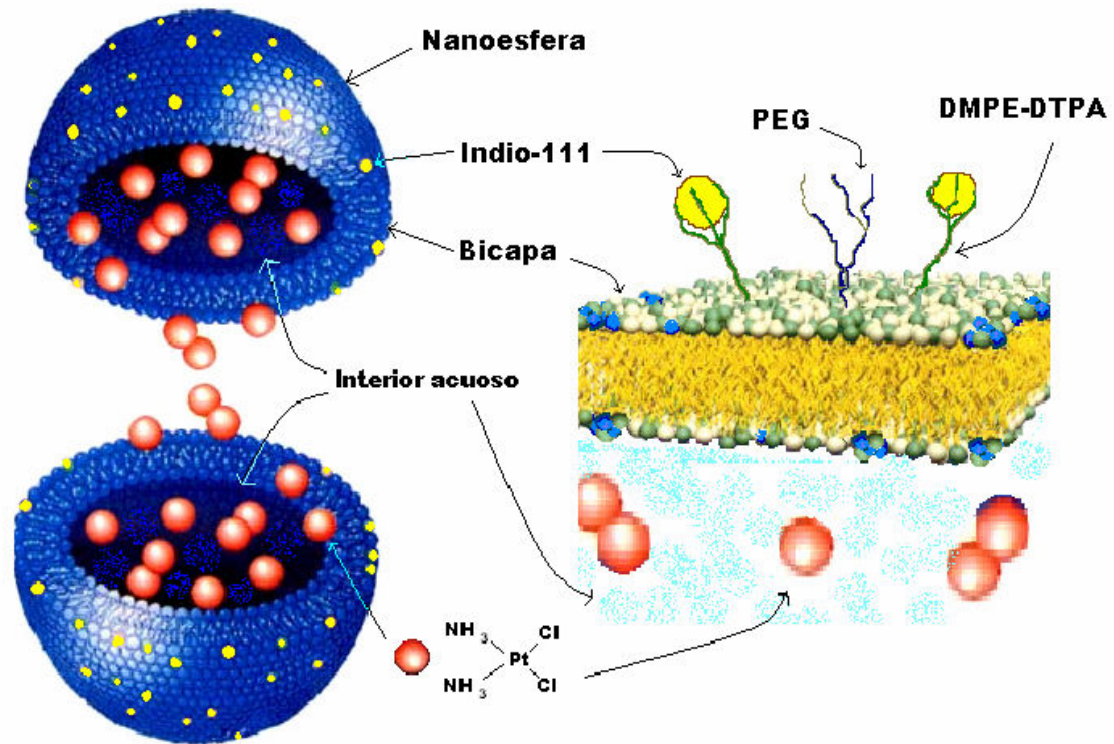


Es importante destacar el arrastre de más del 97 % de In-111 en la cromatografía de referencia (tabla 4.6b). Este valor es muy importante, ya que lo podemos interpretar como la confiabilidad que tienen los resultados presentados en la Tabla 4.6a y consecuentemente de las 2 curvas anteriores.

Basados en lo anterior, los resultados que muestran las dos gráficas representan el comportamiento de la estabilidad de marcado. La gráfica correspondiente al ensayo 1 (en solución salina a temperatura ambiente), muestra que el marcado es estable (>95%) durante las 72 horas del muestreo.

La curva para estabilidad en plasma (37 °C), correspondiente al ensayo 2, muestra una estabilidad > 95 % durante las primeras 24 h, observándose una disminución a 85% después de 24 horas. Se sabe que proteínas plasmáticas conocidas como metalotioneinas tienen gran afinidad por cationes metálicos, posiblemente esto explique tal comportamiento observado.

4.7 Representación esquemática del sistema elaborado:



Como se puede observar, la imagen anterior, representa esquemáticamente una nanoesfera lipídica cargada con *cis*-diaminodichloroplatino(II) y marcada con ¹¹¹In en su superficie.

CAPÍTULO 5

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método para la producción de nanoesferas lipídicas cargadas con *cis*-DDP y marcadas en su superficie con núcleos radioactivos de In-111 con potencial como sistema de quimio-radiación en tratamiento de cáncer.

Para el desarrollo del sistema fue de gran importancia determinar:

- a) Una técnica de elaboración de la suspensión de nanoesferas.
- b) Elección los compuestos hidrofóbicos a utilizar y la relación molar entre ellos (HSPC/Colesterol/²⁰⁰⁰PEG-DSPE/DMPE-DTPA/ α -Tocoferol, relación molar 50:46:1.5:1.5:1).
- c) La relación en masa de estos compuestos respecto al *cis*-DDP encapsulado.
- d) La metodología de marcado con el radionúclido (necesariamente el medio debe estar a pH ácido).
- e) Condiciones cromatográficas en la estabilidad de marcado
- f) Condiciones de purificación de la suspensión, tanto de *cis*-DDP como de ¹¹¹In³⁺.

Utilizando técnicas de dispersión dinámica de luz y fotográficas con microscopio electrónico de transmisión, se pudo verificar que el tamaño de las nanoesferas producidas fue del orden de los 100 nm de diámetro con un ipd de 0.08.

La técnica de marcado con el ¹¹¹In³⁺ en medio ácido y temperatura ambiente, permitió la obtención de una suspensión con valores de eficiencia de marcado superiores al 80%. Aunado a lo anterior, la prueba de estabilidad de marcado mostró valores superiores al 90%, decreciendo a partir de las 24 horas para los experimentos en plasma (37°C).

CAPÍTULO 6

B I B L I O G R A F I A

1. Salamerón-Castro J., Franco-Marina F., et al. Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer en el Instituto Mexicano del Seguro Social: 1991:1995. *Salud Pública de México*. 1997;39(4):1-19.
2. Hermon C., Beral V., Breast cancer mortality rates are levelling off or I to decline in many western counties: Analysis of times trends, age co-horts and age-period models of breast cancer mortality in 20 countries. *British Journal cancer*. 1996;73(7):955-960.
3. Secretaria de Salud. Cáncer un encuentro con el futuro epidemiológico. Los retos de la transición. Cuadernos de la Secretaria de Salud. México D. F. 1994.
4. Cisneros M. T., Espinoza R., Pineda B. E. Mortalidad por cáncer de la mujer mexicana. *Salud Pública*. 1987;29:299-312.
5. Green J. Rudel R. Environmental Pollutants and Breast Cancer. *Environmental Health Perspectives*. 2003(11)8:1007-1019.
6. Cedric M. Smith, Alan M. Regnard. *Farmacología. Médica Panamericana*. México 1992.
7. Goodman & Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Tomo II. Edición 9. México 1996. pp. 1301-1308, 1348-1350.
8. Frausto J. J. R., Silva D, et al. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. Oxford University press. 2° edition. U. S. A. 2001.
9. www.inchem.org/documents/pims/pharm/cisplat.htm. Noviembre de 2005
10. Kartalou M. Essigmann J. M. Mechanism of resistance to cisplatin. *Mutation Research*. 2001;478:23-43.
11. Fuentes M. A. Alonso C. Pérez J. M. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chemical Reviews*. 2003;103:3:645-662.
12. Chang R. *Química*. McGraw Hill. 6ª edición. México 1999. pp 898-99.
13. Wade L. G. *Química Orgánica*. Pearson Education. 2ª edición. México 1993 pp 1158-1160.
14. Yamabe Y. Kondo Y. Endo W. Characterization of cis-diaminedichloroplatinum(II)-Resistant Murine cell lines derived from Metallothionein Null Cells. *Journal of Health Science*. 2001(4)47:378-384.
15. Matsuda H., Tanaka T., et al. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochemica et Biophysica Research*. 1994;203:1175-1180.
16. Stehlikova K. Kosthunova H. et al. DNA bending and unwinding due to the major 1,2-GG intrastrand cross-link formed by antitumor cis-diaminedichloroplatinum(II) are flanking-base independent. *Nucleic Acids Research*. 2002;30:13:2894-2898.
17. Kasahara K Fijiwara Y. Nishio K T. et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer research*. 1991;51:3237-3242.
18. Bakka A. Endersen L. et al. Resistance against *cis*-dichlorodiamineplatinum(II) in cultured cells with a high content of metallothionein. *Toxicology Appl. Pharmacology*. 1981;19:149-154.
19. Chemotherapy for head and neck cancer. www.utmb.edu/otoref/Grnds/Chemo-030416/Chemo-030416.htm. Marzo de 2006.
20. Pinto A. L. Lippard S. J. Binding of the antitumor drug *cis*-diaminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochemica et Biophysica*. 1985;780:167-180.

21. Gately D. P. Howell S. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal Cancer*. 1993;67:1171-1176.
22. Boulikas T. Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (review). *Oncology Reports*. 2003;10:1663-1682.
23. Mansouri A. Henle K. J. et al. Characterization of a cisplatin-resistan subline of murine RIF-1 cells and reversal of drug resistance by hyperthermia. *Cancer Research*. 1989;49:2674-2678.
24. Bernier J. Hall E. J. et al. Radiation Oncology: a century of achievements. *Nature reviews*. 2004,4:737-747.
25. Principles of Radiation Oncology. www.otohns.net/default.asp?id=15231. Marzo de 2006.
26. Dale R. Carabe-Fernández A. The radiobiology of conventional Radiotherapy and its application to Radionuclide Therapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2005(20)1:47-52.
27. Yashar C. M., Spanos W. J. Potentiation of the radiation effect with genistein in cervical cancer cells. *Gynecologic Oncology*. 2005;99:199-205.
28. Riley P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal Radiat. Biol*. 1994(65);1:27-33.
29. Rodríguez Ponce M. Dosimetría para un tratamiento de cancer cérvico-uterino que combina braquiterapia de baja tasa de dosis y teleterapia con rayos X. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Físicas, U.N.A.M, México 2003.
30. Behrens C. F. *Medicina Nuclear*. Edición 5. Salvat editores. Barcelona España 1972. pp 1-28, 89-109, 139-148, 259-287, 328-408, 439-473.
31. Pawlik T. M., et al. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. Journal Radiation Oncology Biol. Phys*. 2004,59(4)928-942.
32. Beckman K. Ames B. N. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological reviews*. 1998(78)2:547-556.
33. LeFemme C. Walt A. *Radiation, Cell Cycle, and Cancer*. Los Alamos Science 1995;3:51-88.
34. Hall E. J. *Radiobiology for the radiologist*. 4th edition. Lippincott Company. USA 1994 pp 1-27.
35. Khan F. M. *The physics of radiation therapy*. 2 edicion. Williams & Wilkins. USA 1994. pp 12-91, 418-470.
36. Halpern H. J. Yu C. Barth E. Peric. M. et al. *In situ* detection, by spin trapping, of hydroxyl radical markers produced from ionizing radiation in the tumor of a living mouse. *Medical Sciences*. 1995;92:796-800.
37. Cember H. *Introduction to Health Physics*. 3th edition. McGraw-Hill. U:S:A 1996. pp 28-35, 75-104, 169-170,233-236,
38. Orear J. *Física Fundamental*. Edición 2. Limusa. México 1975. pp 260-276, 408-474.
39. Acosta V. *Curso de Física Moderna*. Harla. México 1975. pp 69-96.
40. Carlsson J. Aronsson E. F. Tumour therapy with radionuclides: assessment of progress and problems. *Radiotherapy and oncology*. 2003;66:107-117.
41. McDugall R. *Systemic Radiation Therapy with Unsealed Radionuclides*. *Seminars in Radiation Oncology*. 2000(10)2:91-102.
42. Saha G. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 3° edition. Springer-Verlag U.S.A 1992.
43. Moerlein S. M. Welch M. J. The Chemistry of Gallium and Indium as related to radiopharmaceutical production. *International Journal of N. Medic. And Biology*. 1981;8:277-287.

44. Stephen R. T. Option for Radionuclide Therapy: From Fixed Activity to Patient-Specific Treatment Planning. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2002(17)1:71-82.
45. Rose P. G. Chemoradiotherapy for cervical cancer. *European J. of Cancer* 2002,38:270278.
46. Bradley J., Monk M. D. Development of an in vitro chemo-radiation response assay for Cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 2002;87:193199.
47. Dueñas-González A. Cetina L. Mariscal I. et al. Modern management of locally advanced cervical carcinoma. *Cancer treatment reviews*. 2003;29:389-399.
48. Koivusalo R. Krausz E. et al. Chemoradiation of cervical cancer cells: targeting human Papillomavirus E6 and p53 leads to either augmented or attenuated apoptosis depending on the platinum carrier ligand. *Cancer Research*. 2002;62:7364-7371.
49. Gabizon A. Stealth liposomes and tumor targeting: One step further in the quest for the magic bullet. *Clinical Cancer Research*. 2001;7:223-225.
50. Janoff A. S. Liposomes. Marcel Dekker Inc. New Jersey USA. 1999. pp 1-63.
51. Berenholz Y. Relevancy of Drug Loading to liposomal formulation therapeutic efficacy. *Journal of liposome Research*. 2003(13)1:1-8.
52. Drummond D. C., Meyer O., et al. Optimizing Liposomes for delivery of Chemoterapeutic agents to solid tumors. *The Americ. Society for Pharmac. And Experimental Therap*. 1999;(51)4:691-743.
53. Torchilin Vladimir P. Weissig Volkmar. Liposomes. Oxford. Second edition. Boston MA USA. 2003. pp 3-75, 149-164, 193-286, 305-335.
54. Basic D. Liposomes in gene delivery. CRC press. U.S.A 1997. pp 67-113.
55. Voet D. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona España 1992. pp 293-328.
56. Stryer L. Bioquímica. Reverté. 3 edición Tomo 1. Barcelona España 1988. pp 289-312.
57. Peleg-Shulman T., Gibson D., et al. Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochemica et Biophysica*. 2001:1510:278-291.
58. Lasic D. D. Liposomes. *Science&medicine*.- 1996(3)3:34-44.
59. Torchilin V. P. Recent Advances with liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nature reviews*. 2005;4:145-160.
60. Torchilin V. P. Targeted delivery of imaging agents. CRC Press. U. S. A. 1995. pp 149-173.
61. Torchillin V. P. Surface-modified liposomes in gamma- and MR-imaging. *Advanced drug delivery*. 1997;24:301-313.
62. Jetske M. Terwogt M. Groenewegen G. Phase I and Pharmacokinetic study of SPI-77, a liposomal encapsulated dosage form of cisplatin. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2002;49:201-210.
63. Torchillin V. P. Polymeric Contrast Agents for Medical Imaging. *Courent Pharmaceutical Biotechnology*. 2000:183-215.
64. Perez-Soler R. Francis K. Al-Baker S. Preparation and characterization of liposomes containing a liphophilic cisplatin derivative for clinical use. *Journal microencapsulation*. 1994(11)1:41-54.
65. Sampedro F. Partika J. Santalo P. et al. Liposomes as carriers of different new liphophilic antitumour drugs: a preliminary report. *Journal microencapsulation*. 1993(11)3:309-318.
66. Phillips T. W. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Advanced drug delivery*. 1999(5)37:13-32.

67. Khokhar A. R. Xu Q. Newman R. A. et al. Preparation, Characterization, and antitumor activity of water-soluble aminoalkanol platinum(II) complexes. *Journal of inorganic biochemistry*. 1991;43:57-63.
68. Perez-Soler R. Han I. Al-Baker S. et al. Lipophilic platinum complexes entrapped in liposomes: improved stability and preserved antitumor activity with complexes containing linear alkyl carboxylate leaving groups. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1994;33:378-384.
69. Burger K. Staffhorst R. et al. Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity. *Nature medicine*. 2002(8)1:81-85.
70. Han I. Sook M. Kim M. K. Liposome Formulations for Effective Administration of Lipophilic Malonatoplatinum(II) Complexes. *Journal Cancer Research*. 2002;93:1244-1249.
71. Cao Y. Suresh M. R. A Simple and Efficient Method for Radiolabeling of Performed Liposomes. 1998(1)1:31-37.
72. Vonarbourg A. Saulnier P. Passirani C. et al. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis*. 2005;26:2066-2075.
73. Emfietzoglou D. Kostarelou K. Sgouros G. An Analytic Dosimetry Study for the Use of Radionuclide-Liposome Conjugates in internal Radiotherapy. *Radionuclide-Liposome Dosimetry*. 2001;42:499-504.
74. Harrington K. J. Rowlinson-Busza G. Syrigos K. N. Pegylated Liposomes-encapsulated Doxorubicin and Cisplatin Enhance the Effect of Radiotherapy in a tumor Xenograft Model. *Clinical Cancer Research*. 2000;6:4939-4949.
75. Allen T. M. Sapa P. Moase E. Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes. *Cellular & molecular biology letters*. 2002;7:889-894.
76. Harivardhan L. Kumar R. Cuttani K. et al. Etoposide-incorporated Tripalmitin Nanoparticles with Different Surface Charge: Formulation, Characterization, Radiolabeling and Biodistribution Studies. *The AAPS Journal*. 2004(6)3:1-10.
77. Arulsudar N. Subramanian N. Mishra P. Preparation, Characterization, and Biodistribution Study of Technetium-99m-Labeled Leuprolide Acetate-Loaded Liposomes in Ehrlich Ascites Tumor-Bearing Mice.
78. Scott R. Volkov V. B. Shiyankovskaya I. V. Novel Chelate-induced Magnetic Alignment of Biological membranes. *Biophysical Journal*. 1998;75:2163-2169.
79. Tilcock C. Ahkong Q. F. Fisher D. ^{99m}Tc-labeling of Lipid Vesicles Containing the Lipophilic Chelator PE-DTTA: Effect of Tin-to-Chelate Ratio, Chelate Content and Surface Polymer on Labeling Efficiency and Biodistribution Behavior. *Nuclear Medicine Biology*. 1994(21)1:89-96.
80. Hnatowich D. J. Friedman B. Clancy B. Labeling of Performed Liposomes with Ga-67 and Tc-99m by chelation. *Journal Nuclear Medicine*. 1981;22:810-814.
81. Kabalka G. W. Davis M. Holmberg E. Gadolinium-labeled Liposomes Containing Amphiphilic Gd-DTPA Derivatives of varying chain length: Targeted MRI Contrast Enhancement agents for the liver. *Magnetic Resonance Imaging*. 1991;9:373-377.
82. Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemistry Society Reviews*. 2004;33:445-461.
83. Harrington K. J. Rowlinson-Busza G. Syrigos K. N. Uster P. Biodistribution and pharmacokinetics of ¹¹¹In-DTPA-labelled pegylated liposomes in a human tumour xenograft model: implications for novel targeting strategies. *British Journal of Cancer*. 2000(83)2:232-238.

84. Arano Y. Uezono T. Akizawa H. Ono M. et al. Reassessment of Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA) as a Chelating Agent for Indium-111 Labeling of Polypeptides Using a Newly Synthesized Monoreactive DTPA Derivative. *Journal Medical Chemistry*. 1996;39:3451-3460.
85. Stewart J. Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1980;104:10-14.
86. www.northernlipids.com Agosto de 2005.
87. Koyama T. M. Stevens C. R. Borda E. J. et al. Characterizing the Gel to liquid Crystal Transition in Lipid-Bilayer Model Systems. *The chemical educator*. 2000(5)3:1-5.
88. Lopez-Flores A. Jurado R. García-López P. A high-performance liquid Chromatographic assay for determination of cisplatin in plasma, cancer cell, and tumor samples. *Journal of Pharm. And Toxicological Methods*. 2005;52:366-377.
89. Cruz R. Desarrollo de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar cisplatino encapsulado en liposomas. Informe de servicio social, Ingeniería Bioquímica Industrial. UAM-Iztapalapa. México 2006.
90. Reynolds J. A. Nozaki Y. Tanford C. Gel-Exclusion Chromatography on S1000 Sephacryl: Application to Phospholipid Vesicles. *Analytical Biochemistry*. 1983;130:471-474.
91. Jederstrom G. Rusell G. Size Exclusion Chromatography of Liposomes on Different Gel media. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1981(70)8:1981.
92. Per L. Cheng-Ming Z. et al. Chromatographic approaches to liposomes, proteoliposomes and biomembrane vesicles. *Journal of Chromatography*. 1999;720:103-120.
93. Principles and applications of size-exclusion Chromatography www.impactanalytical.com. Febrero de 2006.
94. Grabielle-Madelmont C. Lesieur S. Ollivon M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *Biochemical and biophysical methods*. 2003;56:189-217.
95. Potencial Zeta: Un curso completo en 15 minutos. www.zeta-meter.com/redchile. Noviembre de 2005.
96. Manual de uso del Zetasizer nano. www.zeta-meter.com/redchile. Noviembre de 2005.
97. Iturbe J. L. Fundamentos de radioquímica. Universidad Autónoma del Estado de México. México 2001. pp 7-114.
98. Rosenthal D. Yom S. S. Liu L. et al. A Phase study of SPI-077 (Stealth® liposomal cisplatin) concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer. *Investigational New Drugs*. 2002;20:343-349.
99. Umanzor J. Aguiluz M. Pineda C. Andrade S. et al. Concurrent cisplatin/gemcitabine chemotherapy along with radiotherapy in locally advanced cervical carcinoma: A phase II trial. *Gynecologic Oncology*. 2006;100:70-75.
100. Serkies K. Jassem J. Concurrent weekly cisplatin and radiotherapy in routine management of cervical cancer: a report on patient compliance and acute toxicity. *Int. Journal Radiation Oncology Biol. Phys.* 2004(60)3:814-821.
101. Rubinson J. F. Rubinson K. A. Química analítica contemporánea. Pearson education. Edición 1. México 2000. pp 404-457.
102. www.avantilipids.com Agosto de 2005.

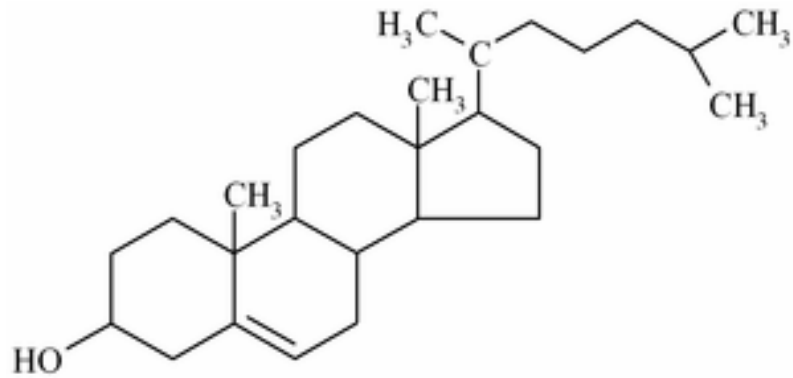
103. Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemistry Society Reviews*. 2004;33:445-461.
104. Mysels K. J. Krieger R. *Introduction to Colloid Chemistry*. Publishing Company. New York. U. S. A. 1978 pp 35-91, 315-334
105. Maron S. H. Lando J. *Fisicoquímica Fundamental*. 2° edición. Limusa. México 1990. pp 925-955.
106. Allen T. M Cullis P. R. Drug Delivery systems: Entering the Mainstream. *Science*. 2004;303:1818-

A N E X O I

A I.4 Colesterol (Calbiochem. Canada)

- Colesterol:

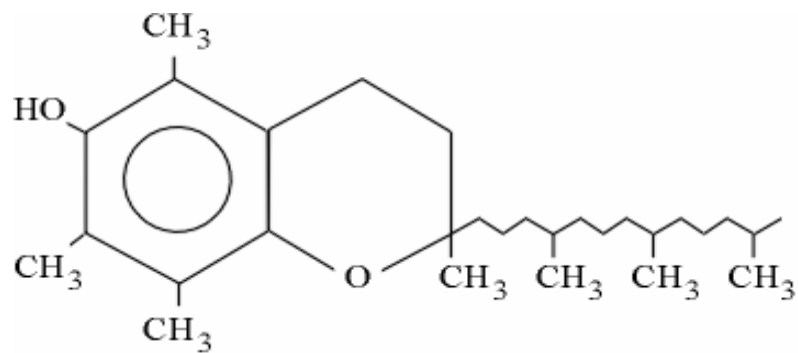
Polvo blanco de MW = 386.7 g/mol , pf. = 148.5°C



A I.5 Vitamina E (Biochemka, Suiza)

- Vitamina E:

Aceite amarillento, MW = 430.72 g/mol,



Alfa tocoferol

A N E X O II

Apuntes de apoyo a la introducción

A.1 Física de radiaciones, conceptos:

Radiación:

De manera general, es energía transmitida a través del espacio o medio material en forma de ondas electromagnéticas o partículas energéticas.^{30,38}

Radiación electromagnética:

Este tipo de radiación es la responsable de la propagación de energía de fenómenos como la luz, temperatura, radio, radiación U.V., rayos X y γ ; la energía se propaga mediante ondas electromagnéticas, una onda electromagnética consiste de un campo eléctrico y uno magnético perpendiculares entre sí que se propaga también en dirección perpendicular, la energía asociada a ella se obtiene como $h\nu$ ($h = \text{cte. de Planck}$ y $\nu = \text{longitud de onda}$) (Fig. A).^{30,36,38,39,97}

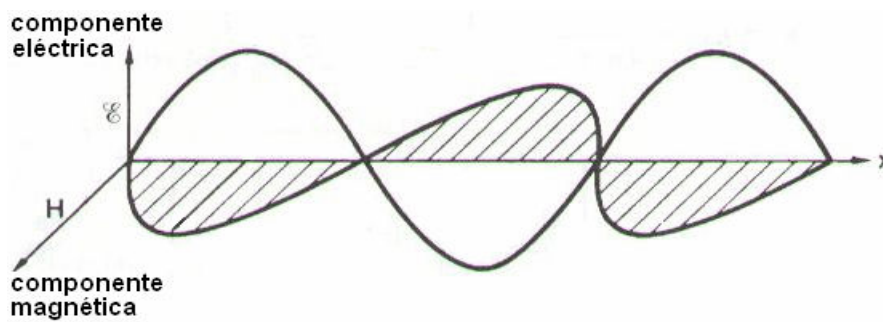


Figura A: representación esquemática de una onda electromagnética

Radiación de partícula:

Se le llama así a la emisión y propagación de energía a través del espacio por partículas cargadas y no cargadas (electrones, protones neutrones, etc.), con un determinado valor de energía cinética.^{30,34,97}

*Unidades:*³⁶

Actividad: la actividad corresponde al número de desintegraciones que manifieste el material radioactivo por unidad de tiempo, esta definida como:

$$1 \text{ Bq (Bequerel)} = 1 \text{ dps (desintegración / minuto)}$$

$$1 \text{ Ci (Curie)} = 3.7 \times 10^{10} \text{ dps} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

Exposición: corresponde a la cantidad de ionizaciones (cantidad de carga) producidas en 1 kg de aire por rayos X o γ , esta definida como:

$$1 \text{ R (Roentgen)} = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}$$

Dosis absorbida: determina la cantidad de energía absorbida por unidad de masa, se define como:

$$1 \text{ Gy (Gray)} = 1 \text{ J/kg} = 100 \text{ rad}$$

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg / g}$$

Energía de un haz de radiación:

$$1 \text{ eV (electrón volt)} = 1.6022 \times 10^{-19} \text{ J}$$

Decaimiento radioactivo:

La radioactividad es un proceso nuclear mediante el cual ciertos núcleos inestables emiten energía en forma de radiación electromagnética (como los rayos γ) o partículas cargadas (α o β) para llegar a un estado estable. El decaimiento radioactivo se refiere al índice mediante el cual un átomo inestable emite energía o se desintegra con respecto al tiempo. Matemáticamente, el decaimiento radioactivo se calcula mediante la siguiente ecuación: ^{30,36,42,97}

$$A(t) = A_0 e^{-\lambda t}$$

Donde A_0 corresponde a la actividad inicial, λ es la constante de decaimiento (específica para cada radionúclido), y t corresponde al tiempo.

Isótopo:

Se refiere a átomos cuyo núcleo posee el mismo número de protones pero diferente número de neutrones, es decir, se tiene el mismo valor de Z (número de protones nucleares) y diferente de N (número de neutrones). Es importante recordar que ambas cantidades de partículas están relacionadas en el número de masa (A), esta se define como $A = Z + N$. ^{30,36,42}

Emisión (Radiación) α :

En núcleos inestables pesados, es común el desprendimiento de partículas α . Una partícula α está formada por dos neutrones (n) y dos protones (p^+) expulsados del núcleo de un átomo (Fig. B). ^{34,36,42,97}

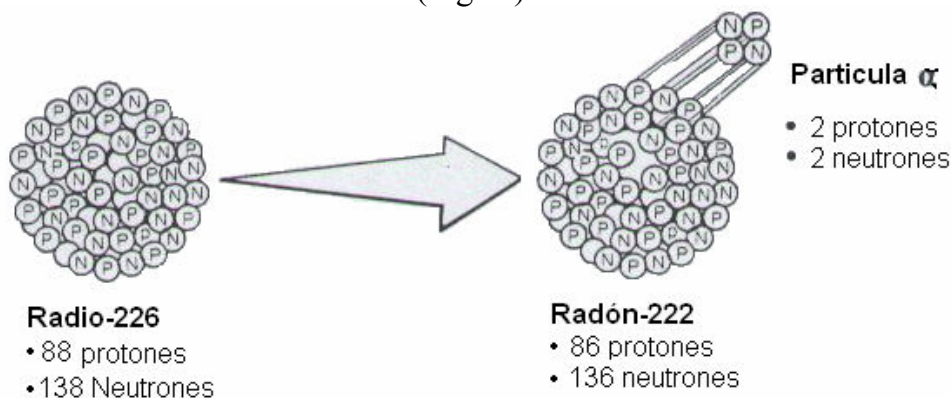


Figura B. La figura muestra el decaimiento α que se da en un Radionúclido pesado como el radio-226.

La partícula α es idéntica en carga y masa al núcleo del átomo de He. Debido a que son partículas relativamente pesadas, ^{34,36,42} interactúan intensamente con los átomos del material que les acoge, transfiriendo su energía intensamente (Transferencia lineal de energía "LET" o poder de frenado "SP"). Ejemplos de emisores de partículas α son Ra, Rn, Th y U. ³⁰

Debido a este tipo de desprendimiento, el núcleo puede tener neutrones en exceso, entonces una emisión α suele ir acompañada de un decaimiento β .

Decaimiento β :

En núcleos inestables con un exceso de neutrones o protones se presenta la desintegración β , esta existe en dos modalidades: β^+ y β^- . Si se tiene un exceso nuclear de n , entonces un neutrón se transforma en un p^+ , un antineutrino ($\bar{\nu}^0$) y un electrón (e^-). El electrón formado en el núcleo escapa de él como partícula β^- (radiación β^-).^{30,36,42,97}

Si el exceso es de p^+ , entonces un p^+ se transforma en un n , un positrón (e^+) y un neutrino (ν^0). El positrón formado en el núcleo escapa de él y se anula con su antimateria (e^-) formando dos rayos γ coplanares de direcciones contrarias entre sí (reacción de aniquilación) (Fig. C).^{30,42,97}

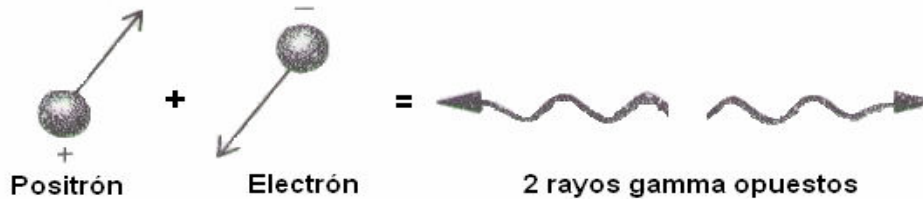


Figura C: creación de dos fotones por la aniquilación de un par electrónico electrón-positrón en colisión.

Radiación γ :

Los rayos gamma, son un tipo de radiación electromagnética muy utilizada en radioterapia, estos son emitidos espontáneamente por núcleos radioactivos como el ^{226}Ra , U y ^{60}Co por mencionar algunos. Cada elemento decae a una tasa específica, y desprende energía en forma de rayos gamma principalmente y mediante la emisión de partículas como forma secundaria de estabilización. Si es emitido un fotón en un núcleo inestable, este es llamado radiación γ .^{30,34,97} La energía asociada al fotón esta dada por la siguiente ecuación:³⁴

$$\lambda(\text{\AA}) = \frac{12.4}{E(\text{keV})}$$

Radiación X:

La radiación X no es un fenómeno radioactivo, es decir, no se producen al estabilizarse un núcleo, son una consecuencia de ello. Hay ciertos núcleos con exceso de p^+ que no poseen la energía suficiente para producir un e^+ (decaimiento β^+), entonces el núcleo capta un e^- de su orbital electrónico más próximo (captura electrónica CE) para ser unido a un p^+ y formar un n . El espacio dejado por el e^- , es remplazado por un movimiento en cascada de e^- de los niveles energéticos próximos, lo que trae como consecuencia la liberación de un *quantum* de energía o fotón en forma de un rayo X característico (Fig. D).^{30,34,39,42,97}

También un rayo X puede ser producido al ser desplazado un electrón mediante un fotón proveniente del núcleo (rayo γ). La única diferencia entre radiación γ y X es el lugar donde se origino el fotón, si este proviene de fenómenos originados en los orbitales es llamado X, si proviene de fenómenos nucleares es llamado γ .^{30,34,97}

Los rayos X producidos por los equipos para radioterapia son generados mediante el fenómeno llamado radiación de frenado. Los equipos que emplean

este tipo de fenómeno para producir radiaciones son las fuentes de ortovoltaje y los aceleradores lineales (Fig. E). De manera general, una fuente de orto-voltaje produce e^- libres de un filamento caliente de W (proceso termoiónico), que por diferencia de potencial llegan a un blanco del mismo material y producen un haz de rayos X, la energía del haz de radiación producido es de 10-50kV.^{24,29}

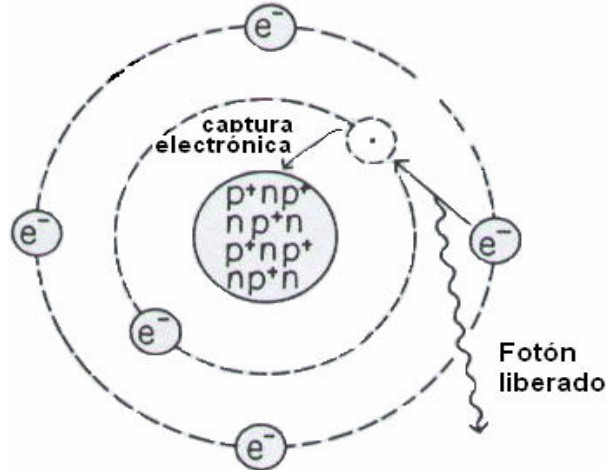


Figura D: la captura electrónica produce un rayo gamma no nuclear.

Un acelerador lineal (Linac), se encarga de acelerar partículas cargadas (e^-) que al interactuar con un blanco produce el haz de radiación.^{24,25} El Linac impulsa electrones, generados al calentar un filamento de W (emisión termoiónica), mediante microondas hacia un blanco del mismo material; como resultado de la interacción se obtiene un espectro continuo de rayos X cuya energía corresponde a la energía cinética de los electrones, el haz de radiación producido es mas energético que el de la fuente de orto-voltaje, la energía de su haz de radiación puede llegar hasta los 8 MV.^{24,25,34}



Figura E: la fotografía muestra un acelerador lineal (Linac).

Efecto fotoeléctrico:

Se le denomina así al fenómeno mediante el cual un fotón de energía T interacciona con un electrón ligado. El fotón desaparece y el electrón es expulsado del átomo. La energía cinética máxima de los electrones liberados es:

$$k = T - \phi$$

donde ϕ es la energía de ligadura del electrón en el orbital atómico (Fig. F).^{34,39}

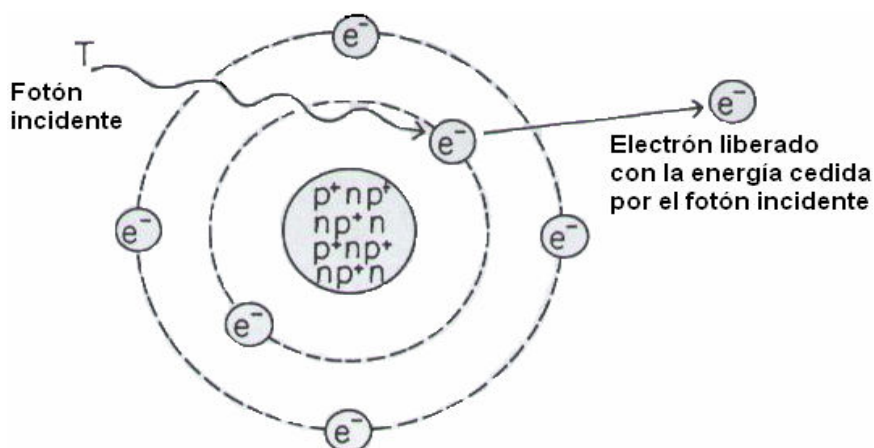


Figura F: En el esquema se aprecia la liberación de un e^- debido a la absorción completa por parte de este de la energía de un fotón.

Efecto Compton:

Este fenómeno también produce ionizaciones a causa de radiaciones electromagnéticas. Si se tiene un e^- en un orbital de energía $h\nu$. Si este e^- interactúa con un fotón proveniente de una radiación electromagnética de energía $T=h\nu$ mayor que la del e^- , habrá transferencia de esta energía cinética que desencadena la expulsión del e^- de su orbital y producción de un fotón de energía igual a la diferencia entre $h\nu_{\text{fotón}} - h\nu_{e^-}$ (Fig. I).³⁴

El fotón de menor energía producido puede seguir interactuando con más e^- del medio y producir así más expulsiones de estas partículas. Debido a que las energías de los orbitales de enlace en una molécula son más bajas que las energías de los orbitales de un átomo y debido a la composición de los organismos vivos, tanto el efecto fotoeléctrico como el Compton participan en la expulsión o excitación de e^- de enlaces.^{34,39}

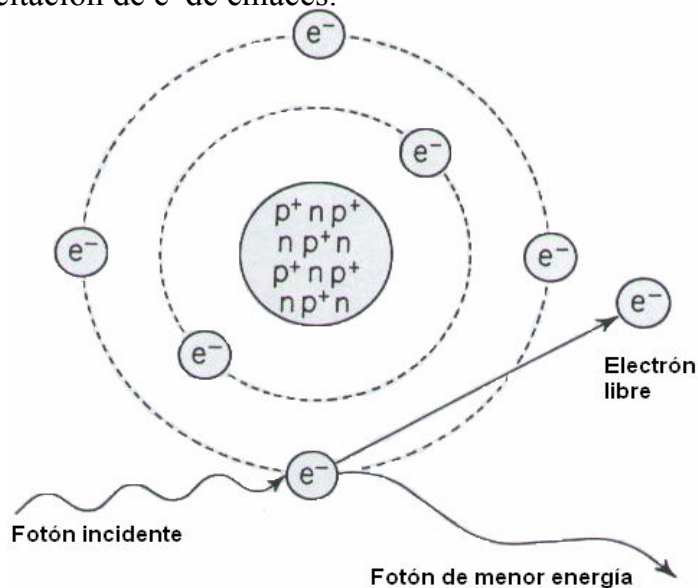


Figura I: Esquema representativo del efecto Compton.

A.2 Radioterapia

Radioterapia externa o teleterapia:

Se entiende a la teleterapia como el uso de RI sobre una cierta parte del cuerpo a una cierta distancia con el fin de tratar masa tumorales malignas.^{24,29} El haz de radiación puede ser producido por una fuente radioactiva como el ^{60}Co ampliamente usado hasta antes de los 90 (irradiador de cobalto), aceleradores lineales o por tubos convencionales de rayos X comúnmente conocido como fuentes de orto-voltaje.^{24,29}

Radioterapia interna o braquiterapia:

Este tipo de terapia es ampliamente usado para el tratamiento de cáncer de útero y cervix, consiste en dar dosis de radiación γ en pequeñas áreas del cuerpo.^{24,29} En la modalidad intracavitad se insertan pequeñas fuentes radioactivas selladas cerca de la masa tumoral de manera temporal,^{24,25,29,35} las fuentes más usadas en esta modalidad son ^{137}Cs ,^{24,29,35} ^{60}Co ,³⁵ ^{192}Ir ,^{24,35} ^{198}Au ,³⁵ ^{125}I ³⁵ y ^{103}Pd .³⁵ En la braquiterapia intersticial se colocan las fuentes radioactivas dentro del tumor, colocadas mediante cirugía por lo que el paciente requiere hospitalización (Fig. J).^{24,25,29} La ventaja de esta modalidad de radioterapia, es que ofrece dosis mejor localizadas sobre el tumor, gracias a la cercanía entre la masa tumoral y el implante que permite un mayor aprovechamiento de la radiación emitida.^{24,25,35}



Figura J: la imagen corresponde a una radiografía que muestra semillas de ^{125}I en un paciente con cáncer de próstata..

A N E X O III

Parámetros cromatográficos^{88,89}

Especificidad del método.

La fase móvil de elección (apartado 3.4.1) resolvió el cisplatino con eficacia (Fig. I y II). El tiempo de retención para el fármaco fue de 3.9 minutos.

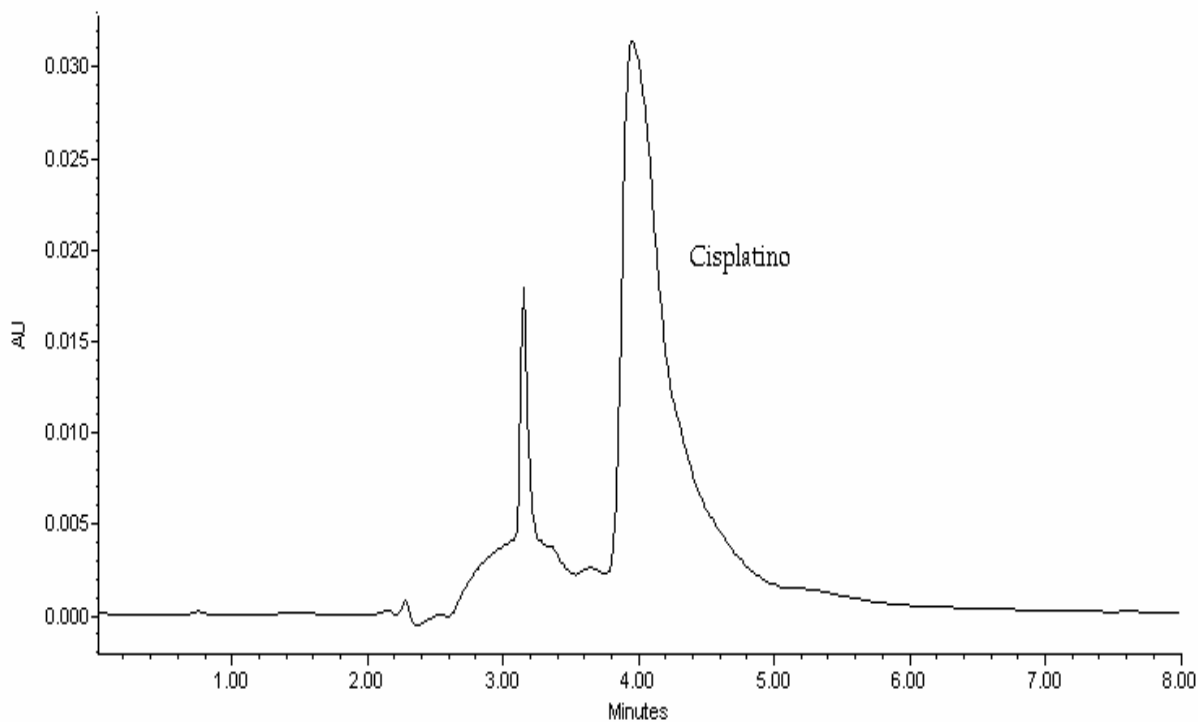


Figura I. Se aprecia un cromatograma de la mezcla de 40 μ l de solución de cisplatino (40 μ g/ml), 60 μ l de nanoesferas blanco y 10 μ l de dietilditiocarbamato de sodio (DDTC).

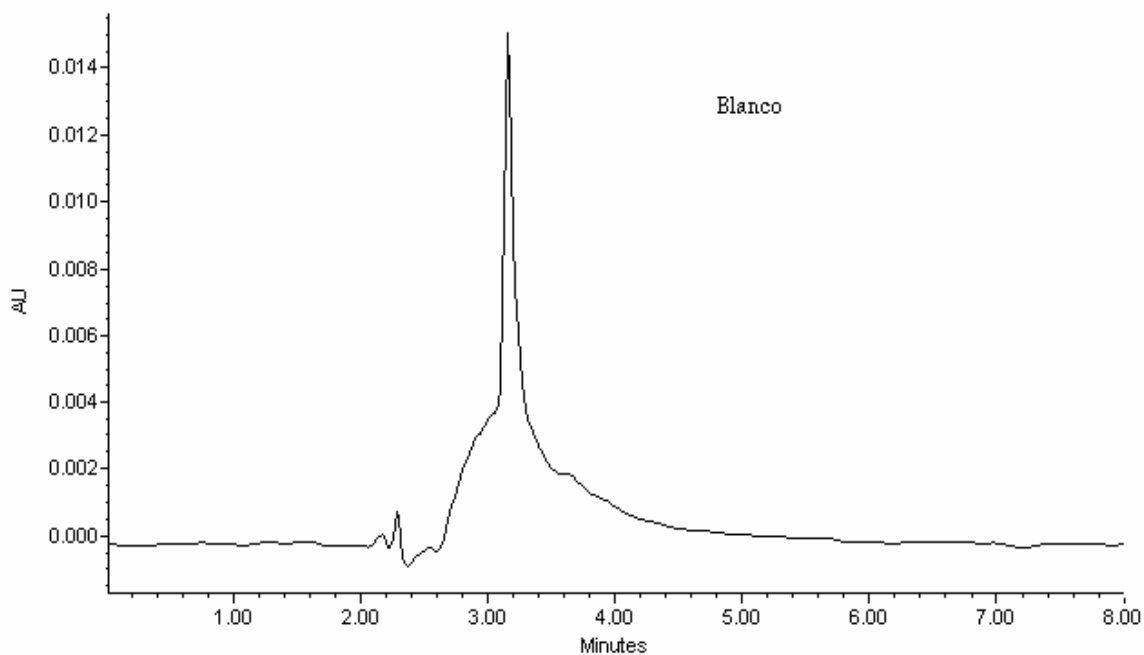


Figura II. Cromatograma correspondiente a 100 μ l de nanoesferas blanco y 10 μ l de dietilditiocarbamato de sodio (DDTC).

Linealidad y precisión del método.

Se determinó la linealidad mediante 6 concentraciones diferentes de cisplatino (0, 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g/ml}$), cada una fue inyectada en el equipo 6 veces, a cada pico obtenido en los respectivos cromatogramas se les determinó el valor de área (tabla III y Figura IV).

Tabla III

Cisplatino ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio (n=6)	% Precisión (CV)
0	0	0
10	377068.25	8.33960
20	649851.833	6.79118
40	1240779.67	8.69023
60	2045089.67	10.48646

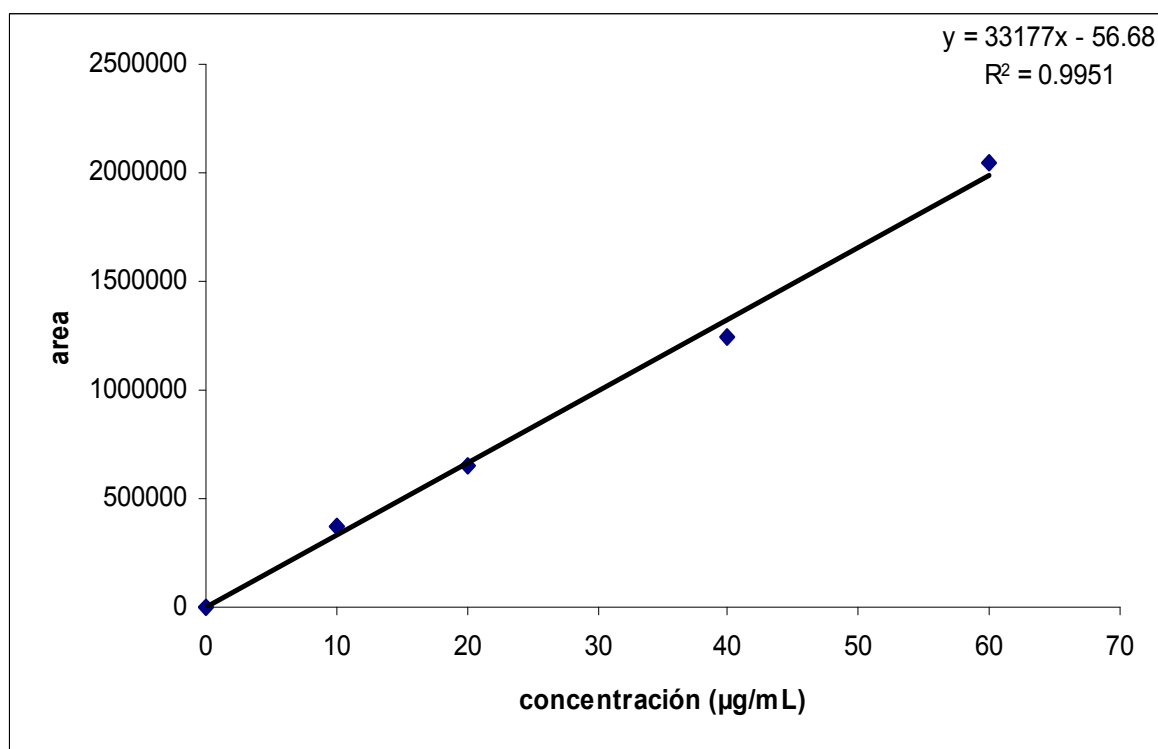


Figura IV. Curva para la determinación de la linealidad del método cromatográfico basada en los datos de la tabla III.

Como se puede observar, el método posee una linealidad y precisión aceptables ($r^2 = 0.9951$ y $\text{CV} < 15\%$).