



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO.

---

FACULTAD DE QUÍMICA.

**“ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN Y  
FARMACOCINÉTICA DE NANOESFERAS  
LIPÍDICAS CARGADAS CON CIS-  
DIAMINODICLOROPLATINO (II) Y MARCADAS  
CON NÚCLEOS RADIATIVOS DE INDIO-111 EN  
UN MODELO TUMORAL DE CÁNCER CÉRVICO  
UTERINO EN ROEDORES ”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA.**

PRESENTA:

VICTORIA LÓPEZ RODRÍGUEZ.



MÉXICO, D.F.

2008.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Juan José Mandoki Weitzner  
Vocal: Lauro Misael Del Rivero Ramírez  
Secretario: Luís Alberto Medina Velázquez  
Primer suplente: Andrés Navarrete Castro  
Segundo suplente: Alejandro Ortiz Osornio

### **Sitio donde se desarrollo el tema:**

Laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en  
Cáncer INCAN-UNAM, Instituto Nacional de Cancerología.

Asesor: 

---

Dr. Luis Alberto Medina Velázquez

Supervisora técnica: 

---

Dra. Patricia García López

Sustentante: 

---

Victoria López Rodríguez

**DEDICATORIA.**

El término de este trabajo no puede estar más que dedicado a la persona que más amo, que el día de hoy ya no esta conmigo físicamente, pero tú sabes que siempre estarás en mi corazón.

Por que en ti encontraba todo lo que necesitaba amor, comprensión, diversión, regaños (los cuales hoy extraño mucho), pero sobre todo tu apoyo incondicional. Te doy las gracias por los 24 años que pasaste conmigo, por haberme cuidado, por haber sido tu niña consentida. La única manera que encuentro el día de hoy de darte las gracias por todo lo que tu me diste es dedicándote esta tesis como el principio de los muchos sueños que tenemos por cumplir.

Esta tesis esta dedicada a la memoria de Alfredo López Victoria mi padre querido.

## **AGRADECIMIENTOS**

Muchas han sido las personas que de manera directa o indirecta me han ayudado en la realización de esta tesis. Quisiera agradecer con todo cariño su participación.

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor de tesis el Dr. Luis Alberto Medina Velázquez, por su paciencia, su apoyo y confianza mostrada a lo largo de este año de trabajo.

A mis sinodales, por sus valiosos comentarios y asesoría en la realización de este trabajo.

Al M C. Enrique Pérez Cárdenas, por su apoyo y ayuda en el manejo de los animales de laboratorio.

A mis padres, Alfredo y Victoria les agradezco su apoyo, su guía, su cuidado, su comprensión y su cariño incondicional. Ustedes han hecho posible que el día de hoy terminé una importante etapa de mi vida. Gracias por estar siempre conmigo.

A mi hermana Silvia, por su apoyo, por su cariño, por ser mi mejor amiga y mi confidente, no puedo imaginar ni un sólo momento de mi vida, sin ti, “gracias por todo oppa gum”.

A Virginia, Mirna, Manuel y Julia por su gran amistad, cariño, apoyo, compañía, pero sobre todo por todas las aventuras que hemos pasado juntos y las que nos faltan por vivir.

A Bere, Gaby, Viole y Luis, por su apoyo, compañía, pero sobre todo por haberme brindado una sincera amistad que durará toda la vida.

A Claudia por su amistad, por su ayuda y por toda tu comprensión en los momentos más difíciles de mi vida.

## *Agradecimientos*

---

A mis compañeros de laboratorio (Fis Med) Carlos, Chela, Deirdre, Ivone y Mayra por haber hecho más ligero el trabajo y por todas esas platicas interminables que tuvimos. En ustedes no sólo encontré buenos compañeros sino a grandes amigos.

A la Facultad de Química por mi formación académica y por convertirse en mi segunda casa.

Agradezco al departamento de Medicina Nuclear del INCAN por la atención, el material radioactivo y los equipos proporcionados, en especial al Dr. Enrique Estrada Lobato y al M C. Flavio Ernesto Trujillo Zamudio.

Agradezco el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto J46227R.

Agradezco también el apoyo financiero otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México.

# ÍNDICE

<b>2.</b>	<b><u>OBJETIVOS.</u></b>	<b>10</b>
2.1	<u>OBJETIVO GENERAL.</u>	10
2.2	<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</u>	10
<b>3.</b>	<b><u>INTRODUCCIÓN.</u></b>	<b>11</b>
3.1	<u>CIRUGÍA.</u>	11
3.2	<u>QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA.</u>	11
3.3	<u>CISPLATINO.</u>	16
3.5	<u>QUIMIO-RADIOTERAPIA.</u>	24
3.6	<u>NANOMEDICINA.</u>	25
3.7	<u>LIPOSOMAS.</u>	28
3.7.1	<u><i>Tipos de liposomas.</i></u>	31
3.8	<u>FARMACOCINÉTICA.</u>	33
3.8.1	<u><i>Factores que modifican la farmacocinética.</i></u>	34
3.9	<u>MECANISMO DE ENTREGA DEL PRINCIPIO ACTIVO EN EL TEJIDO TUMORAL.</u>	37
3.9.1	<u><i>Entrega pasiva:</i></u>	37
3.9.2	<u><i>Entrega activa.</i></u>	39
3.10	<u>MECANISMOS DE INTERACCIÓN DE LOS LIPOSOMAS CON LAS CÉLULAS.</u>	39
3.11	<u>MARCADORES APROPIADOS PARA EL ESTUDIO FARMACOCINÉTICO.</u>	40
3.12	<u>MODELOS FARMACOCINÉTICOS.</u>	42
3.12.1	<u><i>Modelo Abierto de Un Compartimiento (MADC).</i></u>	43
3.12.2	<u><i>Modelo no compartimental.</i></u>	45
3.12.3	<u><i>Teoría de los momentos estadísticos.</i></u>	46
<b>4.</b>	<b><u>MATERIAL Y MÉTODOS:</u></b>	<b>48</b>
4.1	<u>ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS.</u>	50
4.1.1	<u><i>Elaboración de liposomas cargados con cisplatino (cis-DDP) en solución salina isotónica.</i></u>	50
4.1.2	<u><i>Elaboración de liposomas cargados con cisplatino (cis-DDP) en una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS).</i></u>	50
4.2	<u>MARCADO DE LOS LIPOSOMAS.</u>	51
4.2.1	<u><i>Marcado de los liposomas con In-111.</i></u>	51
4.2.2	<u><i>Marcado de los liposomas con Tc-99m.</i></u>	51
4.2.3	<u><i>Marcado de los liposomas con In-111 en una solución amortiguadora de citrato de sodio.</i></u>	51
4.3	<u>CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS LIPOSOMAS.</u>	52
4.3.1	<u><i>Cuantificación de fosfolípidos.</i></u>	52
4.3.2	<u><i>Cuantificación de cisplatino (Cis-DDP) encapsulado.</i></u>	53
4.3.3	<u><i>Eficiencia y estabilidad de marcado</i></u>	53
4.4	<u>ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN Y FARMACOCINÉTICA DE LOS LIPOSOMAS.</u>	54
4.4.1	<u><i>Estudio de biodistribución en ratas Wistar normales.</i></u>	54
4.4.2	<u><i>Estudio de biodistribución en un modelo tumoral.</i></u>	56
4.4.3	<u><i>Análisis estadístico.</i></u>	57
<b>5.</b>	<b><u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u></b>	<b>58</b>

<u>6. CONCLUSIONES.</u>	70
<u>7. BIBLIOGRAFÍA.</u>	71
<u>ANEXO 1.</u>	77
<u>ANEXO 2.</u>	85
<u>ANEXO 3.</u>	91



## **RESUMEN.**

En México, el cáncer cérvico uterino (CaCu) representa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. El uso de quimio-radioterapia concomitante basada en cisplatino es el tratamiento estándar utilizado clínicamente en pacientes con etapas avanzadas de cáncer. A pesar de los buenos resultados obtenidos en esta modalidad, los efectos secundarios asociados a ambos agentes terapéuticos siguen siendo considerables debido a su falta de especificidad. En este contexto, en el laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCAN-UNAM trabajó en el desarrollo de nanoesferas lipídicas cargadas en su interior con cisplatino y marcadas en su superficie con núcleos radiactivos que permitan un efecto terapéutico mejor localizado en el tumor, reduciendo los efectos secundarios asociados al cisplatino y a la radiación.

El presente trabajo consistió en la evaluación de la biodistribución y farmacocinética de nanoesferas lipídicas (liposomas) que transportan un agente de quimioterapia (cisplatino) y núcleos radiactivos (In-111) en animales de laboratorio utilizando técnicas de imagenología en medicina nuclear.

## **1. HIPÓTESIS.**

Mediante el empleo de técnicas de imagenología nuclear se podrá realizar la determinación de la biodistribución y el análisis farmacocinético de las nanoesferas lipídicas cargadas con cis – Dianimodichloroplatino (II) y marcadas con núcleos radioactivos de Indio-111 y así poder conocer los principales órganos de acumulación y su perfil farmacocinético.

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1 Objetivo General.**

Evaluar la biodistribución y farmacocinética de nanoesferas lipídicas cargadas con cis- Diaminodichloroplatino (II) (cis-DDP) y marcadas con núcleos radioactivos de Indio -111 en ratas Wistar y en un modelo tumoral en ratones atómicos.

### **2.2 Objetivos específicos.**

- ✓ Elaboración y caracterización fisicoquímica de las nanoesferas lipídicas de quimio-radiación.
- ✓ Estudio de biodistribución y farmacocinética de las nanoesferas lipídicas de quimio-radiación.

---

### **3. INTRODUCCIÓN.**

El cáncer<sup>†</sup> se presenta en la actualidad como una de las principales enfermedades humanas con un elevado índice de mortalidad, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial.

Uno de los tipos de cáncer más común en México es el cáncer cérvico uterino (CaCu) y se estima que representa el 42.8% de las neoplasias malignas en mujeres en etapa reproductiva<sup>14</sup>, presentando un índice alto de mortalidad. Su incidencia está relacionada con la infección de los Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, los genomas virales se encuentran presentes en el 99.7% de los carcinomas cervicales<sup>66</sup>.

El pronóstico de la enfermedad se ve afectado por diversos factores, como son: etapa, volumen del tumor, tipo histológico, grado de propagación y edad del paciente. Dependiendo de la etapa en la que se encuentre el tumor, existen diversas opciones de tratamiento entre las cuales se encuentran la cirugía, radioterapia, quimioterapia y en años recientes se ha empezado a utilizar la quimio-radioterapia con muy buenos resultados.

#### **3.1 Cirugía.**

Es la principal estrategia para el tratamiento contra el cáncer; permite eliminar todas las células malignas y cuando no es posible extirparlas completamente se extrae la mayor parte para que otros tratamientos, como la radioterapia y la quimioterapia, sean más efectivos.

#### **3.2 Quimioterapia antineoplásica.**

Es un tratamiento farmacológico, que permite la destrucción de la masa tumoral mediante la administración de fármacos que impiden la reproducción celular. En general su mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, en la división celular, o en la síntesis de proteínas. Sin embargo, la gran limitante de la quimioterapia antineoplásica es su inespecificidad ya que también daña a células y tejidos normales que

---

<sup>†</sup> El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células (por un aumento de su proliferación y por la inhibición de los procesos de muerte celular) y por la posterior capacidad de invasión (proceso conocido como metástasis) que les permite proliferar en otros tejidos.

proliferan con rapidez (medula ósea, folículos pilosos y epitelio intestinal), provocando efectos adversos<sup>14, 27,33</sup>.

En la tabla 1 se resumen diversos agentes quimioterapéuticos útiles en enfermedades neoplásicas.

Tipos de quimioterapia.

- ✓ **Poliquimioterapia:** Es la asociación de varios citotóxicos que actúan con diferentes mecanismos de acción, sinérgicamente, con el fin de disminuir la dosis de cada fármaco individual y aumentar la potencia terapéutica de todas las sustancias juntas.
- ✓ **Quimioterapia adyuvante:** Es la quimioterapia que se administra generalmente después de un tratamiento principal, como es la cirugía o radioterapia, para disminuir la incidencia de diseminación a distancia del cáncer o destruir la enfermedad residual.
- ✓ **Quimioterapia neoadyuvante o de inducción:** Es la quimioterapia que se inicia antes de cualquier tratamiento quirúrgico o de radioterapia con la finalidad de reducir al máximo el volumen tumoral. La quimioterapia neoadyuvante permite además un alto índice de cirugía conservadora, evitando intervenciones mutilantes.
- ✓ **Radioquimioterapia concomitante:** También llamada quimio-radioterapia, que se administra de forma concurrente o a la vez con la radioterapia con el fin de potenciar el efecto local de la radiación y actuar de forma sistémica con la quimioterapia.

Tabla 1. Quimioterapéuticos útiles en enfermedades neoplásicas<sup>14, 27, 33, 35,43</sup>.

Clase	Tipo de agente	Prototipo	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Carcinoma
Agentes de alquilación	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina	Tienen la propiedad de formar enlaces covalentes con las bases púricas y pirimidínicas del ADN y ARN. Estos agentes forman intermediarios electrófilos que reaccionan con diversas fracciones nucleófilas, como los grupos fosfatos, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo del ADN o proteínas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Menor penetración del fármaco a la célula cancerosa.</li> <li>✓ Mayor producción de sustancias nucleófilas (glutación).</li> <li>✓ Aumento en la velocidad de reparación del ADN.</li> <li>✓ Mayor metabolismo de las formas activas del fármaco.</li> </ul>	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin
	Etileniminas y metilmelaminas	Hexametilmelamina			Cánceres de vejiga, seno y ovario
	Nitrosoureas	Carmustina			Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, tumores cerebrales primarios, mieloma múltiple.
Antimetabolitos	Análogos del ácido fólico	Metotrexato	Son análogos estructurales de compuestos endógenos, actúan como antagonistas del ácido fólico, purinas o pirimidinas. Inhiben enzimas (dihidrofolato reductasa (DHFR), timidilatosintasa) y procesos de transformación de moléculas para alterar o detener el proceso de síntesis de ADN y ARN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Transporte deficiente al interior de las células.</li> <li>✓ Producción de formas alteradas de DHFR con menor afinidad por el inhibidor.</li> <li>✓ Pérdida de la actividad de las enzimas que activan al fármaco.</li> <li>✓ Mayor metabolismo de las formas activas del fármaco.</li> </ul>	Leucemia linfocítica aguda, cánceres de seno, cabeza y cuello, pulmones.
	Análogos de pirimidina	Fluorouracilo			Cánceres de seno, colon, estómago, páncreas, ovario, vejiga.
	Análogos de purina	Mercaptopurina			Leucemias linfocítica y granulocítica agudas y crónica.

Productos naturales	Antibióticos	Dactinomicina	Actúa intercalándose entre pares de bases adyacentes de ADN con lo cual bloquea la transcripción de ADN por la RNA polimerasa. Además forma radicales libres que rompen al ADN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mayor producción de glutatión, peroxidasa.</li> <li>✓ Perdida de la actividad de la enzima RNA polimerasa.</li> </ul>	Coriocarcinoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma, tumores de testículos, sarcoma de Kaposi.
		Doxorrubicina	Actúa intercalándose entre pares de bases adyacentes de ADN con lo cual bloquea a la topoisomerasa II. Además forma radicales libres que rompen al ADN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mayor producción de glutatión, peroxidasa.</li> <li>✓ Perdida de la actividad de la enzima topoisomerasa II.</li> </ul>	Sarcomas de tejidos blandos, osteógeno, cáncer de mama, tiroides, pulmones, estómago y neuroblastoma.
		Mitomicina	Después de sufrir una biotransformación intracelular (reducción) actúa como un agente alquilante. Además forma radicales libres que rompen al ADN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Activación deficiente del fármaco.</li> <li>✓ Mayor metabolismo de la forma activa del fármaco.</li> </ul>	Cánceres de estómago, cuello uterino, colon, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello.
	Enzimas	L-asparaginasa	Es una enzima hidroliza la asparagina en ácido aspártico y amoníaco. La reducción plasmática de asparagina inhibe la síntesis de proteínas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Inducción de las células tumorales para sintetizar L-asparagina.</li> </ul>	Leucemia linfocítica aguda.
	Inmuno-modificadores	Interleucina - 2	Induce y amplía las respuestas citolíticas de los linfocitos T contra células tumorales.	Hasta ahora no se conocen mecanismos de resistencia.	Cáncer renal, leucemia granulocítica crónica.

		Vincristina	Estos alcaloides penetran en la célula, dentro de ella interaccionan con la tubulina, proteína que forma los microtúbulos del huso acromático en la mitosis, impide su polimerización para formar los microtúbulos. Por la alteración de los microtúbulos del aparato mitótico se detiene la división celular en metafase.	✓ Mutaciones de la tubulina que impida la unión eficaz de los inhibidores.	Leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, tumor pulmonar de células pequeñas.
		Vinblastina			Enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, próstata.
Otros tratamientos	Urea sustitutiva	Hidroxiurea	Es un análogo de la urea que inhibe la ribonucleótido-reductasa, enzima que transforma los ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos. Actúa en la fase S del ciclo celular y ocasiona detención en la interfaz G <sub>1</sub> -S.	✓ Mayor producción la enzima ribonucleótido reductasa o con menor afinidad	Leucemia granulocítica crónica, policitemia vera, melanoma maligno.
Hormonas y antagonistas	Antiestrógeno	Tamoxifeno	Bloquea la unión del estrógeno a los receptores en las células cancerígenas sensibles a esta hormona.	Hasta ahora no se conocen mecanismos de resistencia.	Cáncer de mama
	Progestágenos	Caproato de hidroxiprogesterona	Inhibe a nivel hipotálamo-hipofisario la secreción de estrógenos y contrarrestan a nivel celular el estímulo proliferativo de los estrógenos.		Cáncer de endometrio y mama.

El agente quimioterapéutico estándar utilizado en el tratamiento contra el cáncer cérvico uterino es el cisplatino (cis-Diaminodicloroplatino) por ello se explicará mas detalladamente su mecanismo de acción.

### **3.3 Cisplatino.**

El cisplatino es un agente antineoplásico descubierto en 1965 por Rosenberg, utilizado en el tratamiento de cáncer cérvico uterino, testicular, ovario, vejiga, cabeza y cuello. Es un complejo de coordinación de platino, que es hidrosoluble, inorgánico y divalente.

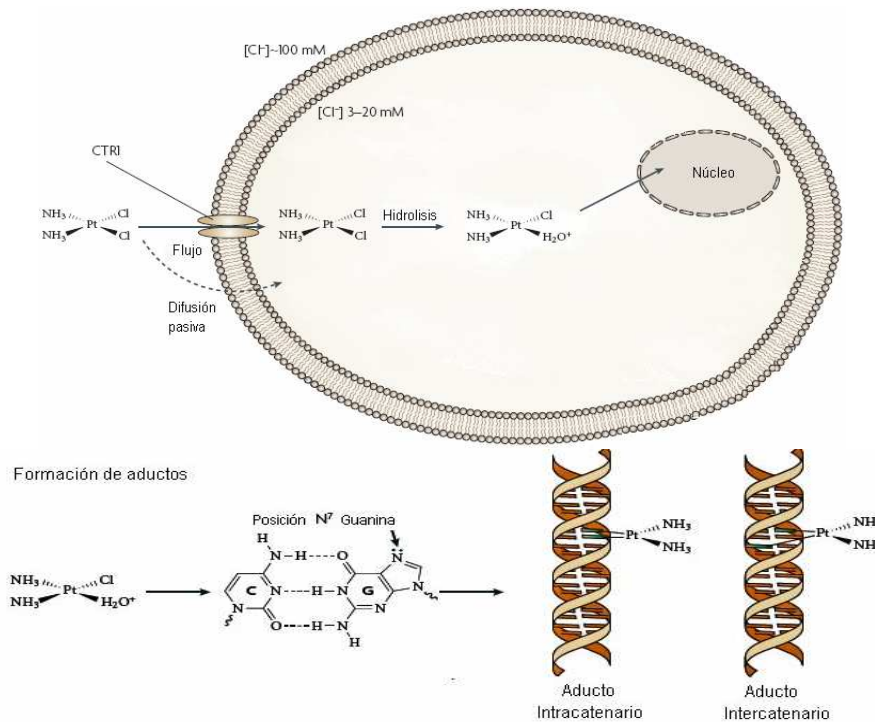
#### *Mecanismo de acción:*

El cisplatino (cis-DDP) penetra a la célula generalmente por difusión pasiva, sin embargo en estudios recientes se ha observado que también puede penetrar a la célula por medio de transportadores de cobre (CTR1)<sup>1,33</sup>.

Dentro de la célula, la baja concentración de cloro (3-20mM) hace que los átomos de cloro puedan ser desplazados por moléculas de agua, resultando una especie electrófila cargada positivamente, encargada de reaccionar con el nitrógeno 7 (<sup>7</sup>N) de la guanina o adenina del ADN formando enlaces covalentes conocidos como aductos (Figura 1). Estas uniones pueden ser de dos tipos intracatenarias (unión con dos nucleótidos en la misma hebra) o intercatenarias (unión con dos nucleótidos en las dos hebras).

Los aductos de ADN formados con el cisplatino inhiben la duplicación, la transcripción del ADN y la reparación, activando las vías de transducción de señales que desencadenan la apoptosis provocando la muerte celular<sup>27, 48, 31, 33,35</sup>.





**Figura 1.** Efecto antineoplásico del cisplatino y la formación de aductos con el ADN

**Mecanismo de resistencia:**

Estudios en líneas celulares resistentes a cisplatino muestran que la resistencia esta mediada por dos mecanismos:

- I. No hay unión o es insuficiente la unión de cisplatino (cis-DDP) al ADN; esto puede ser debido a:
  - ✓ Una alteración en los transportadores de cobre (CTR1), presentando una menor afinidad por el cisplatino (cis-DDP) lo cual impide que este llegue a su sitio de acción<sup>1, 33</sup>.
  - ✓ Los grupos tioles presentan avidez por el platino y lo desplazan de su unión al ADN, principalmente se conjuga con el glutati6n mediante la enzima Glutati6n S- Transferasa (GSTs), la cual hace al compuesto m1s aniónico para expulsarlo de la célula por medio de la bomba ATP-glutati6n S- Conjugada ( GS-X)<sup>32,33,35,43,48</sup>.
  - ✓ Puede ser secuestrado por enzimas como la metalotioneina impidiendo que se formen los aductos con el ADN<sup>35, 43,48</sup>.
  - ✓ Puede presentar resistencia múltiple (MDR) lo cual es causado por una sobre expresi6n de la bomba ATP – Glucoproteína P, esta generalmente secuestra al platino por medio de su subunidad ATP7A<sup>24, 33, 43,48</sup>.

- II. No se lleva a cabo la muerte celular después de unión entre el ADN y el cisplatino esto puede ser debido a:
- ✓ Un incremento en la capacidad de reparar el ADN por una sobreexpresión del mecanismo de reparación por escisión del nucleótido (NER), el cual al reconocer las regiones dañadas, las suprime y substituye<sup>32, 33, 48</sup>.
  - ✓ Defectos en el sistema reparador MMR (mismatch repair); no se elimina el aducto, sino que elimina los nucleótidos desapareados en la cadena de ADN sintetizada opuesta al aducto, entonces se llevan a cabo varios ciclos de escisión y resíntesis<sup>32, 33</sup>.
  - ✓ Incremento de la tolerancia de los aductos con el ADN, por alteración de los componentes de la vía apoptótica, mediada por varias proteínas como p53, BCL2<sup>33, 48</sup>.

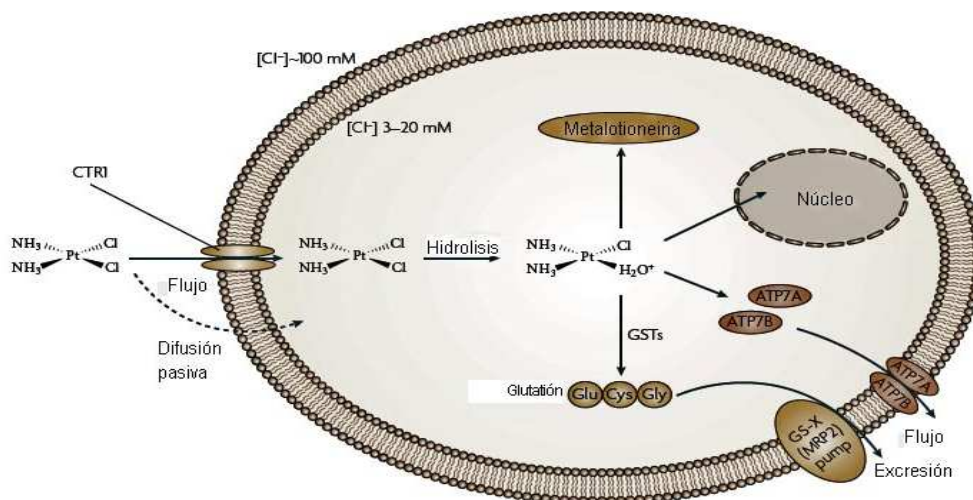


Figura 2. Mecanismos de resistencia del tumor al cisplatino.

**Toxicidad:**

Entre los principales efectos tóxicos se encuentran la nefrotoxicidad, en función de la dosis, produciendo principalmente necrosis en los túbulos proximales y apoptosis en los túbulos distales, lo cual lleva a una pérdida de la función renal. Para disminuir el riesgo de la nefrotoxicidad se lleva a cabo una hidratación sistémica con solución salina al 9% para disminuir la presencia de la forma activa en el riñón. También se presenta neurotoxicidad y ototoxicidad, la cual consiste en la pérdida de la audición de frecuencias altas.

### **3.4 Radioterapia.**

La radioterapia es una forma de tratamiento basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma, electrones, ect. ver Anexo 1 y 2). En el tratamiento se utilizan dosis fraccionadas múltiples, diarias o periódicas de radiación durante un periodo de tiempo determinado. La radioterapia puede ser dividida en:

- ✓ **Teleterapia:** Es un tratamiento en que se utiliza un haz de fotones para irradiar el tumor desde fuera del organismo del paciente.

Los equipos de teleterapia generalmente son bombas de cobalto y aceleradores lineales; los cuales generalmente están compuestos de una fuente de radiación, un sistema de colimación del haz de radiación y una mesa en la que se coloca el paciente que tiene la posibilidad de moverse en tres direcciones, así como rotar sobre su eje transversal, lo que permite dirigir haces múltiples hacia el centro del tumor con gran precisión<sup>58</sup>.

- ✓ **Braquiterapia:** es una técnica en la que las fuentes radiactivas se colocan directamente en el tumor y los tejidos circundantes (implantes intersticiales), en cavidades corporales (endocavitaria o endoluminal), o en las superficies epiteliales (de contacto superficial)<sup>34,58</sup>.

La ventaja de esta modalidad es que se consigue una dosis elevada de radiactividad local en el tumor, con dosis escasas a los tejidos normales de alrededor. Sin embargo, este tipo de tratamiento sólo se puede emplear cuando el tumor es accesible y se puede determinar su tamaño o extensión con precisión.

Las fuentes más utilizadas son la de cesio (<sup>137</sup>Cs) para baja tasa de dosis y de Cobalto (<sup>60</sup>Co) o Iridio (<sup>192</sup>Ir) para alta tasa de dosis.

- ✓ **Radioterapia interna con radionúclidos:** Las primeras aplicaciones terapéuticas de los radionúclidos como fuentes abiertas se producen a comienzos de la década de los 40's mediante el uso de soluciones radiactivas de Yodo (<sup>131</sup>I), Fósforo (<sup>32</sup>P) y Estroncio (<sup>89</sup>Sr); empleados en el diagnóstico y el tratamiento médico<sup>11, 40</sup>.

Las moléculas acarreadoras más utilizadas son anticuerpos monoclonales específicos, péptidos (somatostatina), moléculas como ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y nanopartículas (liposomas); este tipo de terapia es conocido como radioterapia de blancos moleculares.

La ventaja de esta modalidad terapéutica es promover una dosis de radiación mejor localizada en el tejido tumoral y minimizar los efectos secundarios en tejido y órganos sanos a corto como a largo plazo.

Con el fin de destruir el tejido tumoral, son necesarios núcleos radioactivos emisores de partículas con un alto valor de transferencia lineal de energía (LET), partículas alfa y electrones Auger<sup>49, 58</sup>.

#### *Mecanismo de acción.*

La radiación al interactuar con el tejido puede tener como blanco de interacción cualquiera de los constituyentes celulares (membrana celular, citoplasma, orgánulos y núcleo); pero de todos, el blanco más crítico es el ADN. El daño al ADN (Figura 3) puede ser originado de dos maneras:

- ✓ **Acción directa:** la radiación interactúa directamente con los átomos del ADN que pueden ser ionizados o excitados por medio de la interacción Coulumbiana. Esta es la principal forma de interacción de las radiaciones de alto LET en materiales biológicos<sup>34, 58</sup>.
  
- ✓ **Acción indirecta:** La radiación interactúa con otras moléculas y átomos, principalmente con agua, produciendo radicales libres, los cuales reaccionan con el ADN celular.

Al ser el agua el componente más abundante de las células, el mecanismo de acción indirecto es cuantitativamente más importante que el directo.

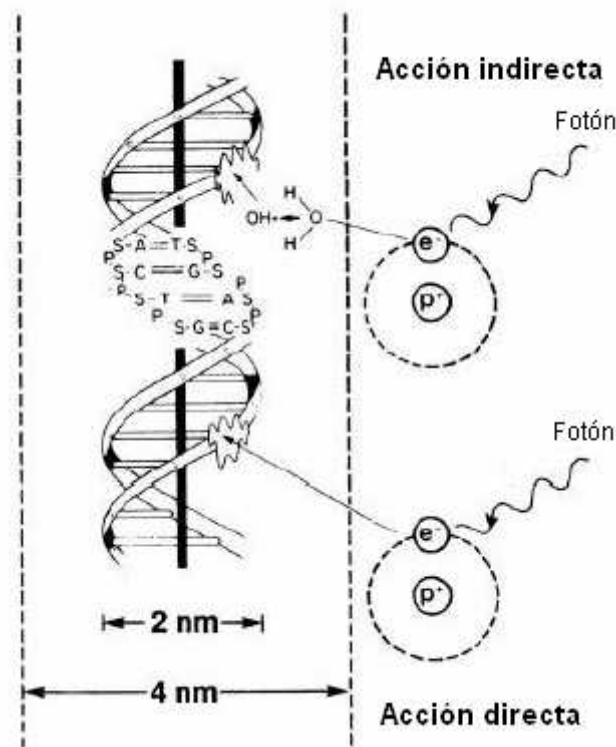


Figura 3. Mecanismo de acción de las radiaciones ionizantes.

En la interacción de la radiación con el agua se originan radicales como el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) y el ión de agua ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ), los cuales son de vida corta y extremadamente reactivos (Figura 4.). Esta es la principal forma de interacción de las radiaciones de bajo LET, tales como rayos X y electrones de media y alta energía<sup>34, 49,58</sup>.

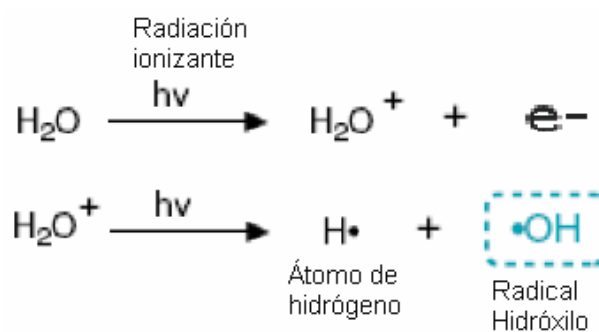


Figura 4. Producción de radicales libres.

El aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se da gracias a la reacción entre los electrones libres (de la ionización) y el oxígeno que generan la producción de anión superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ),

radical dióxido de nitrógeno ( $\bullet\text{NO}_2$ ), además de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y electrones libres<sup>13</sup> que son muy reactivos frente a moléculas nucleofílicas como el ADN o componentes celulares (Figura 5).

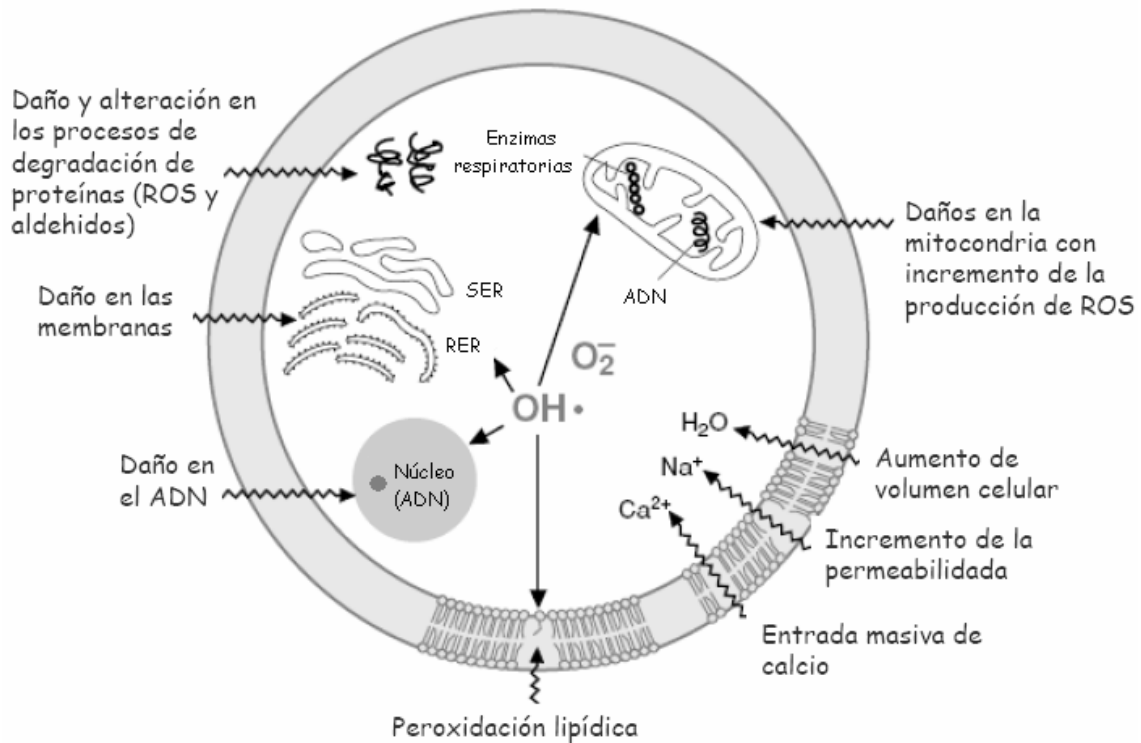


Figura 5. Daño celular causado por radicales libres.

El daño molecular del ADN consistirá en la aparición de rupturas simples (en una cadena del ADN), dobles (en ambas cadenas del ADN), pérdidas o cambios de bases y/o en el establecimiento de uniones aberrantes ADN-ADN o ADN-proteína (Figura 6). El número de lesiones inducidas por la radiación ionizante depende de la dosis total administrada, de la tasa de dosis (velocidad a la que se administra la radiación) y de la LET<sup>49</sup>.

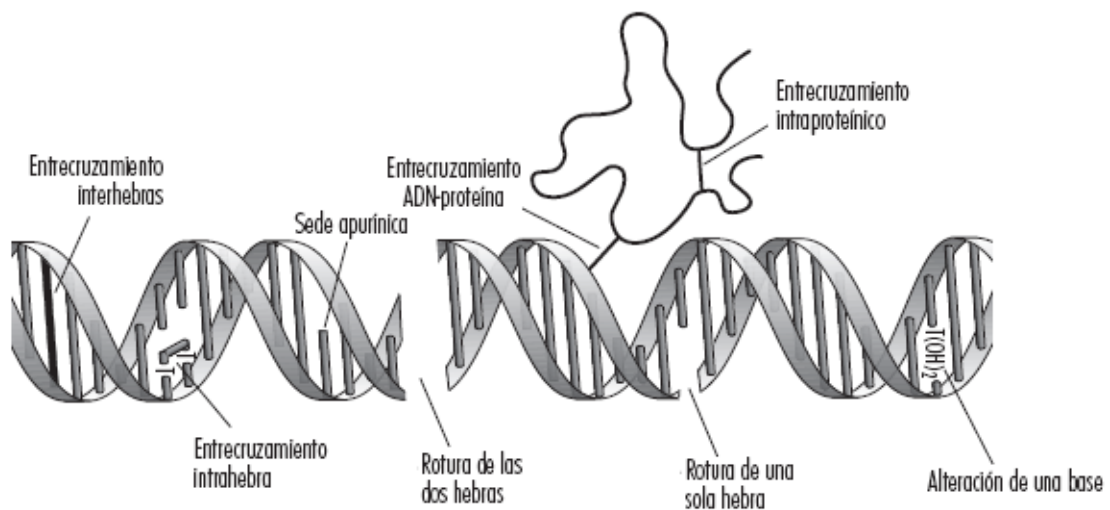


Figura 6. Daños sobre el ADN inducidos por la radiación ionizante.

La muerte celular inducida por la radiación ionizante es consecuencia del daño ocasionado al ADN y de la incapacidad de la célula para repararlo. La acumulación de aberraciones cromosómicas durante ciclos mitóticos consecutivos conduce rápidamente a la muerte celular por necrosis o apoptosis.

*Mecanismo de resistencia:*

La resistencia que presentan algunos tumores a la radioterapia se debe principalmente a:

- ✓ **Fase del ciclo celular:** La fase del ciclo celular en que se encuentre la célula también modifica la supervivencia celular. Las células más sensibles a la radiación (las que más mueren con menos dosis) son las que están en G2 y M, a continuación en G1 y, finalmente, las más resistentes son las que están en S.

Cuando la célula progresa en el ciclo celular, si se somete a irradiación en las fases iniciales, tiene tiempo de reparar el daño producido, y aunque retrase su avance en el mismo, consigue llegar a la fase de mitosis<sup>45</sup>.

- ✓ **Grado de oxigenación:** El oxígeno reacciona con los radicales libres y electrones del medio acuoso para formar productos más tóxicos e inestables, como el peróxido de hidrógeno y el ión superóxido, que a su vez reaccionan con el ADN. El oxígeno evita la reparación y favorece la fijación

del daño radio-inducido. En presencia de oxígeno, la radiación electromagnética (rayos gamma y rayos X) produce entre 2.5 y 3 veces más destrucción celular que en su ausencia<sup>45</sup>.

Cuando hay hipoxia o una muy poca cantidad de oxígeno no se forman más radicales libres por lo cual muy pocas células tumorales mueren.

- ✓ **Reparación del ADN:** Un incremento en la capacidad de reparar el ADN por sobre expresión del mecanismo NER, que al reconocer las regiones dañadas, las suprime y substituye.

#### *Toxicidad:*

La toxicidad se suele localizar sólo en la zona irradiada, aparecen reacciones locales agudas cuando se destruyen células sanas, puede haber eritema y descamación cutánea. La mucosa gástrica puede resultar afectada apareciendo irritación esofágica con dolor torácico y disfagia; puede haber también vómitos y diarrea en la irradiación del estómago y del colon. Estos síntomas suelen desaparecer al interrumpir la terapia<sup>45</sup>.

Numerosos estudios han demostrado que las reacciones tardías se ocasionan en tejidos con escaso recambio celular, donde la radiación produce alteraciones en la maduración de células ya diferenciadas, y por ello no hay cambios funcionales inmediatos<sup>44,45</sup>. Meses o años después, tras la desaparición gradual de las células maduras, el tejido intenta reemplazarlas por células en división, pero debido al daño que recibieron por la radiación son incapaces de producir células hijas viables. Sin embargo, aquellos tejidos que poseen un recambio celular de horas o días (la piel, la mucosa etc.), aunque sean agredidos por agentes físicos ionizantes ponen en marcha mecanismos que aceleran la proliferación celular para compensar la pérdida<sup>45,49</sup>.

### **3.5 Químio-radioterapia.**

El objetivo de la combinación de quimioterapia y radioterapia es mejorar el control local, disminuir el riesgo de metástasis y aumentar la supervivencia sin aumentar significativamente la toxicidad. En la última instancia, se persigue alcanzar un claro beneficio comparado con los resultados de tratamientos administrados separadamente.



El mecanismo de acción entre ambos no se conoce completamente, se cree que hay un efecto de sinergismo en la acción de los radicales libres (ROS)<sup>46,54</sup>. La quimio-radioterapia se usa en el tratamiento de cáncer cérvico uterino (CaCu) y recientemente se ha empezado a utilizar en cáncer de cabeza y cuello; ha sido estudiada principalmente en dos modalidades:

- ✓ **Quimio-radioterapia neoadyuvante:** Es administrada en un esfuerzo por reducir el volumen tumoral antes de la radioterapia, pero en la actualidad su indicación se limita a muy pocas localizaciones<sup>49</sup>.
- ✓ **Quimio-radioterapia concurrente:** Es la administración simultánea de los dos tratamientos. Esta modalidad se ha llevado a cabo buscando, fundamentalmente, sensibilización a la irradiación para tratar de incrementar su efecto. Se administran los agentes de quimioterapia a dosis más bajas de su uso habitual, junto con agentes radiosensibilizantes y con la radioterapia; o bien administrando a la vez del tratamiento de radioterapia un tratamiento de quimioterapia a dosis completas buscando la sumación de sus efectos, sin embargo, este procedimiento se debe realizar con mucho cuidado debido a los efectos tóxicos secundarios<sup>10, 46, 52,54</sup>. Una variante de esta última pauta terapéutica ha sido la utilización de ciclos de quimioterapia y radioterapia de forma alternante con la finalidad de disminuir la toxicidad derivada de la suma de los efectos de ambos tratamientos. El tratamiento de CaCu con quimio-radioterapia concurrente ha mostrado resultados positivos puesto que ha aumentado la esperanza de vida en hasta 60% con respecto al 12% que presentan pacientes tratados únicamente con radioterapia<sup>65</sup>.

### **3.6 Nanomedicina.**

En la actualidad se está tratando de disminuir la toxicidad de los agentes de quimioterapia y de radioterapia, lo cual ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías siendo la más prometedora la nanomedicina<sup>9, 22, 23, 41, 50,59</sup>.

Esta disciplina consiste en la aplicación de técnicas procedentes del campo de la nanotecnología<sup>‡</sup> a la salud humana. El desarrollo de ésta ha significado un gran avance en el tratamiento de diversas enfermedades, ya que la interacción con el fármaco se da a nivel de componentes celulares o moleculares, como se puede observar en la figura 7.

Los avances en medicina producidos por el desarrollo de la nanotecnología se concretan principalmente en mejoras en los métodos diagnósticos, en la liberación de fármacos y en la medicina regenerativa<sup>§</sup>. Los métodos diagnósticos<sup>54, 59</sup> son esenciales para poder detectar la presencia de una enfermedad de forma precoz y, a partir de ahí, comenzar un tratamiento que pueda combatir la enfermedad causando el menor daño posible al resto del organismo.

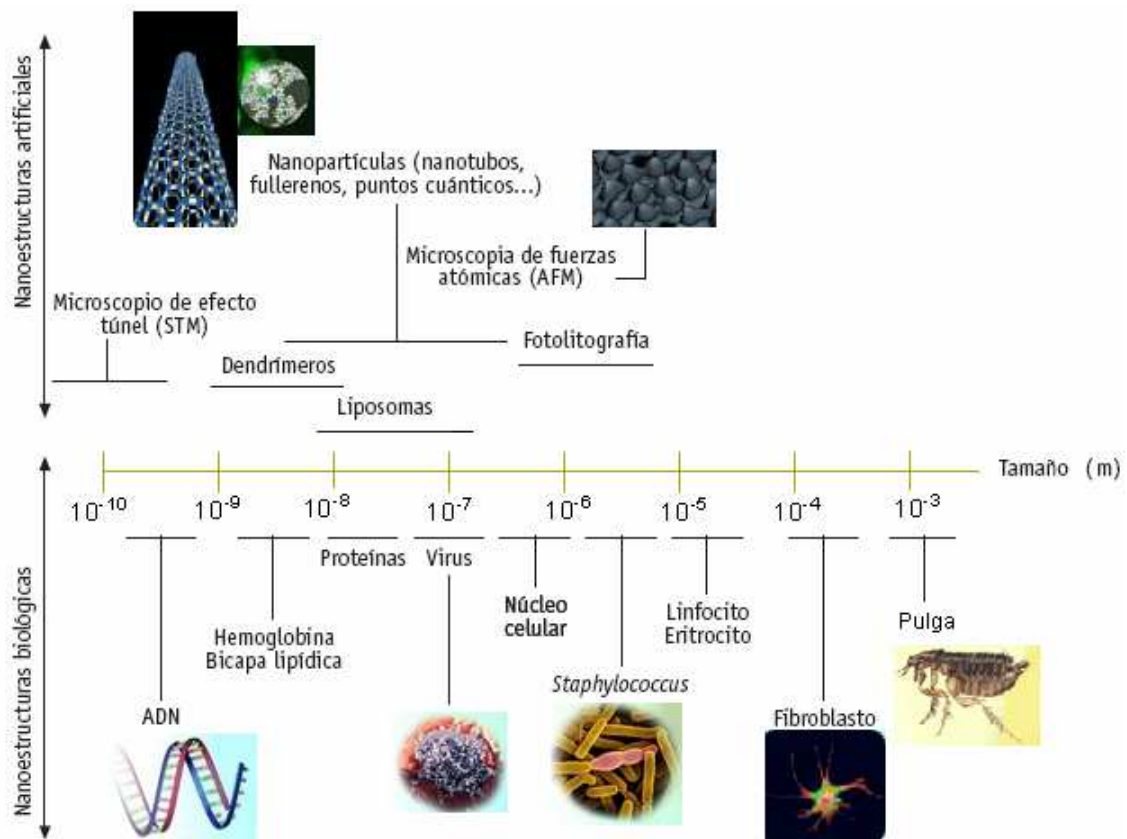


Figura 7. Nanoestructuras artificiales y biológicas.

<sup>‡</sup> Es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nano escala.,

<sup>§</sup> Busca potenciar mecanismos de reparación a través de terapia génica, terapia celular, ingeniería tisular, biomateriales y moléculas de señalización

Los sistemas de liberación de fármacos surgen como consecuencia de la imposibilidad de trasladar de forma directa al organismo los principios activos que constituyen los medicamentos. Estos sistemas de liberación de fármacos están formados por un fármaco y un sistema transportador que puede dirigir la liberación del fármaco al sitio adecuado y en la cantidad apropiada. Es decir, los transportadores de fármacos son sistemas cuya función es transportar el fármaco hasta el lugar donde debe ser liberado de manera específica<sup>22, 41, 54,59</sup>. Las características que deben cumplir estos vehículos son baja toxicidad, propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco, y vida media larga. Existen distintos tipos de sistemas de liberación de fármacos. Éstos se diferencian en su composición y estructura, pero todos tienen en común los mismos objetivos:

- ✓ Evitar la degradación e inactivación del fármaco.
- ✓ Aumentar la biodisponibilidad del fármaco.
- ✓ Ser capaces de transportar fármacos de manera específica y altamente controlada.
- ✓ Evitar o disminuir los efectos secundarios del fármaco.

Los principales nanosistemas para el transporte y liberación de fármacos en nanomedicina (Figura 8) son las micelas, los liposomas, los dendrímeros, las nanopartículas, los nanotubos y los conjugados poliméricos<sup>9, 22, 41, 54,59</sup>.

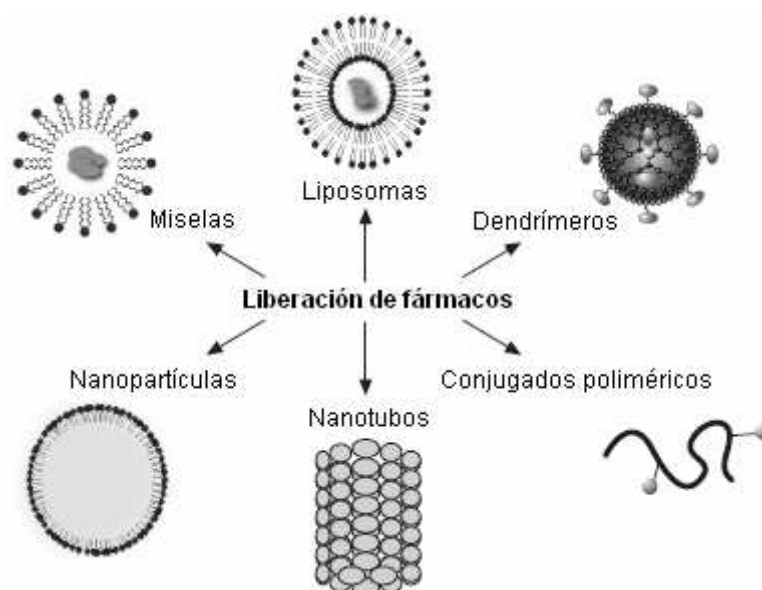


Figura 8. Algunos sistemas de liberación de fármacos.

Estos nanosistemas pueden ser diseñados para que contengan no solo un fármaco sino un agente de diagnóstico o de imagen, un núcleo radioactivo que permita una irradiación mejor localizada, un vector que oriente el sistema hacia determinadas áreas del organismo e incluso un biosensor indicativo de que el fármaco ha producido el efecto deseado.

### 3.7 Liposomas.

Desde su descubrimiento en 1961, los liposomas han sido objeto de extensas y profundas investigaciones para utilizarlos como transportadores de principios activos, agentes de diagnóstico (radionúclidos) y de productos biológicos (terapia génica).

Los liposomas están constituidos por fosfolípidos de una cadena polar y doble cadena hidrofóbica que al encontrarse en medio acuoso presenta una organización de bicapas lipídicas similares a la membrana celular (Figura 9).

Además de fosfolípidos, otros compuestos pueden formar parte de la estructura de los liposomas, como es el caso del colesterol, que también es un componente de la mayoría de membranas celulares. Como componente estructural de los liposomas, el colesterol reduce la capacidad de movimiento de las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos confiriendo rigidez a las nanoesferas lo que influye principalmente en su permeabilidad<sup>36, 37,38</sup>.

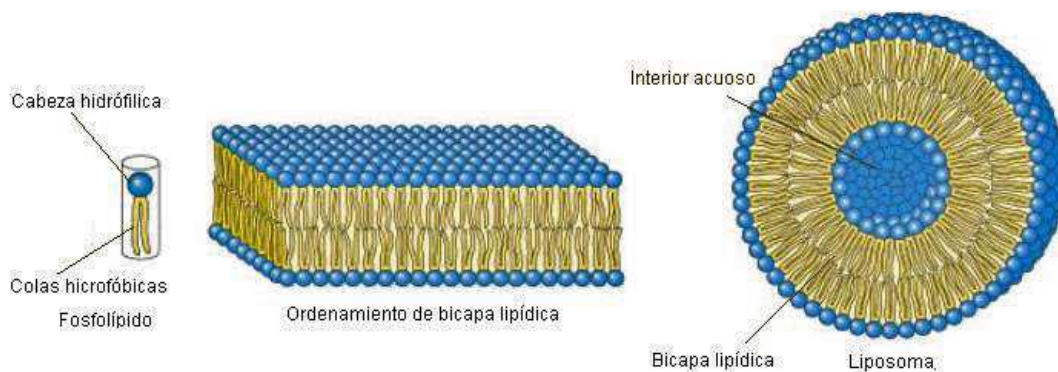


Figura 9. Esquema representativo de un liposoma.

Los liposomas pueden transportar a moléculas o fármacos lipofílicos intercalados en la bicapa lipídica, mientras que los hidrófilos pueden ir disueltos en el compartimiento acuoso interior o unidos a la membrana (enzimas, antígenos, material genético, etc.).

Según el número de bicapas lipídicas los liposomas se definen como vesículas unilaminales, grandes (LUV)<sup>§</sup>, o pequeñas (SUV)<sup>§</sup>, o multilaminales (MLV)<sup>\*\*</sup>, varían en su tamaño que va desde 20nm hasta 100µm. En medicina los más usados son los unilaminales con un tamaño de 80 hasta 200nm.

Los procedimientos actuales de elaboración de liposomas son bastante numerosos, tal como se muestra en la Tabla 2, pudiéndose seleccionar el método en función del tipo de liposoma que se desea obtener, la necesidad o no de utilizar disolventes orgánicos, etc.

Tabla 2. Principales métodos de elaboración de liposomas.

<b>Tipo de liposoma</b>	<b>Método de elaboración</b>	<b>Descripción</b>
MLV y SUV	Método de hidratación de lípidos.	Tras disolver los fosfolípidos y el resto de los componentes de la membrana en un disolvente orgánico volátil, se efectúa su evaporación a presión reducida para lograr la formación de una fina película. Rehidratando la película con una solución acuosa.
SUV	Método de inyección rápida en etanol o éter	Los fosfolípidos disueltos en etanol o éter se inyectan a gran velocidad con ayuda de una jeringa sobre la fase acuosa.
SUV	Método de eliminación del detergente	La formación de liposomas se produce tras eliminar el detergente de una suspensión previamente preparada de micelas mixtas detergente/ fosfolípidos.
LUV	Método de evaporación en fase reversa	La adición de un pequeño volumen de fase acuosa sobre la solución orgánica con los fosfolípidos (relación 1:3) y posterior sonicación produce la formación de una emulsión. La eliminación de la fase orgánica a presión reducida induce la formación de liposomas a través de un estadio de gel intermedio.
MLV/SUV/LUV	Método por sonicación	Se prepara una dispersión de fosfolípidos en agua, la muestra es entonces sometida a sonicación por 10-15 minutos.

El problema de la reproducibilidad y homogenización de tamaño ha sido resuelto con la extrusión a través de membranas de policarbonato de diferente tamaño de poro. La estabilización de los liposomas se ha logrado por medio de la liofilización en presencia de crioprotectores como carbohidratos u oligómeros

<sup>\*\*</sup> Por sus siglas en inglés.

de la glucosa<sup>15,16,37</sup>. Se cree que la forma de evitar la inestabilidad, tanto física como química, es la conservación en ausencia de agua<sup>37</sup>.

La purificación de la suspensión tiene como 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; los principales métodos de purificación son ultracentrifugación, cromatografía de exclusión molecular, diálisis y el uso de resinas de intercambio.

Para el uso médico la suspensión de liposomas debe ser caracterizada con mucha precisión, las principales pruebas que se le realizan se muestran en la tabla 3<sup>29,38</sup>.

Tabla 3. Técnicas para la caracterización fisicoquímica y microbiológica de los liposomas.

Propiedad	Parámetro	Técnica
Física	Distribución de tamaño	Microscopía electrónica.
		Dispersión dinámica de luz.
		Cromatografía de exclusión molecular.
	Número de laminas	Espectroscopía NMR
		Angulo de dispersión de los rayos X
	Potencial Z	Microelectroforesis
Conductividad	Conductímetro	
Química	Concentración de fosfolípidos	Ensayo de Barlett
		Reacción de Stewart
		Cromatografía en capa fina (TLC)
		Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)
	Concentración de colesterol	Prueba de colesterol oxidasa
		Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)
	Concentración del fármaco encapsulado	Método espectrofotométrico
		Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)
		Cromatografía de gases
		Resonancia magnética nuclear (NMR)
	Oxidación de fosfolípidos	Determinación de peroxidación de lípidos
		Composición de ácidos grasos
		Concentración de aldehídos y cetonas
	Residuo de disolventes orgánicos	Cromatografía de gases
		Resonancia magnética nuclear (NMR)
Microbiológica	Esterilidad	Cultivos en medio aeróbico y anaeróbico
	Pirógenos y endotoxinas	Prueba lisado de limulus amebocito (LAL)

### 3.7.1 Tipos de liposomas.

Los liposomas se pueden clasificar de acuerdo a su funcionalidad en:

- ✓ **Liposomas convencionales:** Son nanoesferas formadas por fosfolípidos (neutros o negativos) y colesterol. Pueden variar en sus propiedades como tamaño, composición lipídica, carga superficial y fluidez de las bicapas lipídicas<sup>17,29,36,38,60</sup>. Una grave limitación de estos liposomas, es que el cuerpo normalmente los trata como partículas extrañas, de modo que son fácilmente opsonizados y retirados de la circulación sanguínea por el sistema reticuloendotelial (RES), antes de la finalización de su función. Estos liposomas son ampliamente usados en el direccionamiento hacia macrófagos, principalmente en vacunas<sup>29,60</sup>.
- ✓ **Liposomas de larga duración o conocidos como Stealth:** El desarrollo de estos sistemas constituyó un gran avance en 1980, ya que se creía que los liposomas no eran un buen transportador de fármacos por su corto tiempo de permanencia en circulación sanguínea.  
Este tipo de liposomas tienen en su superficie polímeros hidrófilicos como polioxazolina, polivinilalcohol, polietilenglicol (PEG) y el metoxipolietilenglicol (mPEG)<sup>9,50,59</sup>. Este polímero sirve de escudo en la superficie de los liposomas, con lo cual se reduce la opsonización por proteínas de la sangre y la consecuente remoción de la circulación sanguínea por macrófagos del sistema reticuloendotelial (RES).  
Sin embargo, algunos investigadores han planteado que el recubrimiento con el polímero puede dificultar la liberación del fármaco o la interacción con la célula, pudiendo esto ser un obstáculo en la respuesta terapéutica<sup>9,59,61</sup>.  
Se ha intentado mejorar la eficacia terapéutica de estos liposomas con la pérdida del recubrimiento después de la llegada al sitio de acción<sup>50,59</sup>.
- ✓ **Liposomas catiónicos:** Esta clase de sistemas son los más recientemente desarrollados. Estos liposomas se preparan a base de mezclas de lípidos catiónicos y “zwitterion”. Los grupos funcionales más utilizado para la fabricación de fosfolípidos catiónicos son las aminas cuaternarias y poliaminas (espermina, espermidina, etc)<sup>59,60</sup>.

Los componentes catiónicos de la parte exterior del liposoma interactúan con las moléculas cargadas negativamente como el DNA, por lo cual su aplicación se concentra en la terapia génica<sup>17,59,60</sup>.

- ✓ **Liposomas activados:** Este tipo de liposomas tienen en su superficie anticuerpos específicos, fragmentos de anticuerpos, receptores de folato, receptores a transferinas, antígenos, péptidos, carbohidratos, etc. y de esta manera promueven una acción específica<sup>9,17,50,59,60,61</sup>.

Si bien esta clase de sistemas han sido estudiados para variadas aplicaciones terapéuticas, su principal uso es la liberación dirigida de fármacos antineoplásicos<sup>50,59</sup>.

- ✓ **Liposomas pH sensibles:** Existen varios sistemas que permiten preparar liposomas pH sensibles como mezclas de lípidos, lípidos con tensoactivos, lípidos asociados a péptidos y lípidos asociados a polímeros biodegradables<sup>9,19,59,60</sup>.

A pH 7 estos fosfolípidos mantienen la estructura de la bicapa lipídica pero después de su internalización en el endosoma sufren una protonización (pH 5.5), se colapsan y sufren una desestabilización y rotura de la bicapa lipídica, lo que establece una rápida liberación del fármaco en el citoplasma<sup>19</sup>.

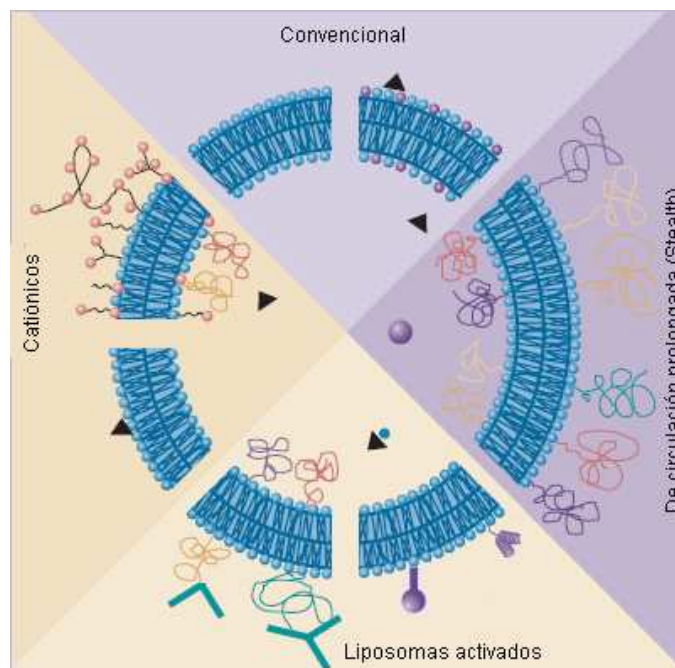


Figura 10. Representación esquemática de los principales tipos de liposomas.



Una de las mayores ventajas que tienen los liposomas sobre los otros sistemas de transporte, es que al estar constituidos por colesterol y fosfolípidos son fácilmente metabolizados, son relativamente carentes de toxicidad y no son antigénicos<sup>22,36,59,60</sup>.

Además que estudios recientes sobre el transporte de fármacos han revelado una disminución de la toxicidad, esto como resultado de una biodistribución alterada, pero también del estado de agregación del fármaco en estos vectores<sup>59</sup>. Por ejemplo, la doxorubicina es utilizada como tratamiento contra un amplio tipo de tumores pero su dosis se ve limitada por su elevada cardiotoxicidad. Su asociación con liposomas o nanopartículas disminuye su toxicidad al reducirse su concentración a nivel del miocardio. De hecho, formulaciones liposomales de doxorubicina y daunorrubicina ya han sido comercializadas (DaunoXone®, Caelyx® y DOX-SL®)<sup>6,59</sup>.

### **3.8 Farmacocinética<sup>††</sup>.**

La unión del fármaco con un transportador como los liposomas puede dar lugar a grandes cambios en la farmacocinética y biodistribución del fármaco. Los principios activos que se encuentran unidos con un liposoma son secuestrados fuera de su vía normal de biodistribución, llegando a su sitio de acción hasta que son liberados del liposoma. La farmacocinética de las formulaciones liposomales depende de cómo se encuentra asociado el principio activo al liposoma, si la liberación es muy rápida su farmacocinética es muy similar a la farmacocinética del fármaco libre, pero si el fármaco es retenido en el liposoma su farmacocinética es la del transportador. Por lo tanto los parámetros farmacocinéticos dependen del grado de unión del principio activo con el liposoma<sup>29</sup>.

Una vez que los liposomas son absorbidos en la sangre después de la administración por vía, subcutánea o intraperitoneal, se observa la misma farmacocinética que cuando son administrados por vía intravenosa. Las

---

<sup>††</sup>Es la rama de la farmacología que estudia el paso de los fármacos a través del organismo en función del tiempo y de la dosis. Comprende los procesos de absorción, distribución, metabolismo o biotransformación y excreción de los fármacos.

principales características de la farmacocinética de los liposomas de larga duración son<sup>18,29</sup>.

- ✓ Comportamiento de lineal y no saturable.
- ✓ Eliminación de la circulación sanguínea fuertemente correlacionado con las características fisicoquímicas de los liposomas.
- ✓ Saturación del sistema reticuloendotelial (RES) no es evidente, incluso en dosis altas, por lo cual tiene un reducido potencial terapéutico para el sistema monofagocítico.
- ✓ Incremento en el porcentaje de absorción en vías de administración, como la tópica y respiratoria (aerosoles).

### **3.8.1 Factores que modifican la farmacocinética.**

La farmacocinética y la biodistribución de los liposomas esta directamente relacionada con sus propiedades fisicoquímicas:

- ✓ **Tamaño:** Es uno de los principales aspectos que modifican la biodistribución y farmacocinética de un liposoma. Para preparar liposomas de un tamaño homogéneo se utiliza la extrusión a través de filtros de policarbonato, con un tamaño de poro similar al deseado para los liposomas. En estudios recientes se ha observado la tendencia de una mayor eliminación de la circulación sanguínea al aumentar el tamaño de los liposomas con una similar composición<sup>18, 20</sup>.

La eliminación de la circulación sanguínea es mucho menor cuando los liposomas tienen un diámetro aproximadamente entre 50 y 250 nm, el tamaño considerado como el ideal es alrededor de los 100 nm.

La captura del sistema reticuloendotelial (macrófagos) se produce lentamente en este rango de tamaño, los liposomas se acumulan principalmente en las células Kupffer del hígado<sup>18, 20,29</sup>. Por encima de 300 nm, hay una mayor acumulación de los liposomas en el bazo, aparentemente por el mecanismo de filtración pasiva, con muy poco o ningún aumento en la acumulación hepática<sup>20</sup>.

- ✓ **Fluidez de la bicapa lipídica:** La fluidez de la bicapa lipídica varía según el grado de saturación de los fosfolípidos, cuando predominan los ácidos grasos saturados a la temperatura corporal los liposomas adquieren el estado de gel, siendo estructuras más rígidas y menos permeables a los contenidos atrapados. Su principal desventaja es que tienden a agregarse cuando se les almacena y son removidos más rápidamente de la circulación que los liposomas con membranas fluidas. Cuando predominan los ácidos grasos insaturados a temperatura corporal, adquieren un estado líquido y son menos estables<sup>18</sup>.

La incorporación de colesterol a la membrana aumenta dramáticamente la vida media en la circulación de los liposomas administrados por vía intravenosa, éste interactúa con las cadenas acil de los fosfolípidos otorgándole una mayor rigidez a la membrana lipídica al inmovilizar de manera relativa a los grupos polares de los fosfolípidos adyacentes atrayéndolos hacia sí (Figura 11)<sup>29</sup>.

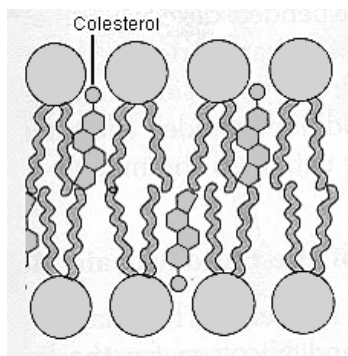


Figura 11. Esquema de la inserción de moléculas de colesterol con los fosfolípidos de la membrana de un liposoma.

La fluidez de la bicapa lipídica es un factor esencial para prolongar el tiempo de circulación de los liposomas, al disminuir la interacción con las proteínas plasmáticas. Sin embargo una excesiva flexibilidad puede dar lugar a la desestabilización de la membrana y a la liberación del fármaco encapsulado.

- ✓ **Carga eléctrica superficial:** La carga de los liposomas es uno de los factores que influyen en la fagocitosis de los mismos. Estudios han demostrado que la presencia de lípidos cargados negativamente en liposomas, aumenta la captura por RES. Por otra parte los liposomas que

presentan carga positiva o neutra se mantienen por más tiempo en la circulación sanguínea<sup>18, 20,29</sup>. Esto es importante a la hora de seleccionar los componentes de la membrana, ya que como se sabe esta varía dependiendo de su naturaleza.

- ✓ **Presencia de compuestos hidrófilicos:** Como ya se había mencionado antes, los liposomas al estar en la circulación sanguínea son opsonizados por las proteínas plasmáticas (Apo J, Apo C-III, fibrinogeno,  $\gamma$ -globulina), sobre todo por factores del complemento (C3, C4 y C5), y son entonces fagocitados por los macrófagos del RES<sup>18</sup>.

El que los macrófagos fagociten o no a los liposomas depende especialmente de tres factores:

- ✓ Las estructuras naturales de los tejidos tienen superficies lisas que resisten a la fagocitosis. Pero si la superficie es rugosa aumenta la posibilidad de fagocitosis.
- ✓ La mayor parte de las sustancias naturales del cuerpo tienen cubiertas proteicas protectoras que repelen a los macrófagos.
- ✓ El sistema inmune produce anticuerpos contra agentes infecciosos y extraños, que se adhieren a las superficies de los agentes, y por lo tanto favorecen su fagocitosis. Para conseguirlo, el anticuerpo se combina con el producto C3 de la cascada del complemento, con lo cual se inicia la fagocitosis.

Principalmente se ha empleado la incorporación de polímeros hidrófilicos (polietilenglicol (PEG), metoxipolietilenglicol (mPEG), polioxazolina, poliacrilamida, gangliosido GM1)<sup>2, 20, 28,61</sup> para tratar de mantener los liposomas en la circulación sanguínea durante periodos relativamente prolongados, evitando ser reconocidos por el RES.

El PEG ha superado a otros polímeros debido a que ha disminuido la captación por el RES, ha aumentado el tiempo de residencia en la sangre y la flexibilidad de la bicapa lipídica<sup>2,9,28,29</sup>. En diversos estudios se ha determinado que para incrementar el tiempo de circulación sanguínea, el

peso molecular de PEG debe estar en el rango de 1000 a 5000 Da (2000Da es considerado el óptimo) y el rango de concentración utilizado se encuentra entre 3-10% (5-7% es considerado el óptimo)<sup>2, 28,29</sup>. En liposomas elaborados con PEG, la presencia de éste en la superficie redujo notablemente el potencial zeta.

Esto ha hecho pensar que además de la hidrofília, la flexibilidad (libre rotación de unidades de polímeros individuales alrededor de la unión Inter-unidad) de las cadenas es otro de los requisitos necesarios para el recubrimiento de polímeros<sup>44</sup>. Quizás el bajo carácter inmunogénico y antigénico que sufre el PEG se deba a los cambios transitorios de flexibilidad y estructurales, dificultando la respuesta del sistema inmune<sup>2, 44</sup>.

En resumen la farmacocinética de los liposomas es afectada por diversos factores como se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Factores que afectan la eliminación de los liposomas.

<b>Factor</b>	<b>Efecto en la eliminación de la circulación sanguínea.</b>
Tamaño	Se incrementa al incrementarse el tamaño.
Carga superficial	Liposomas cargados positiva o negativamente se eliminan más rápido que los liposomas neutros.
Fase de transición	Liposomas con una fase de transición alta son eliminados más lentamente que los liposomas con una bicapa mas fluida.
Presencia de colesterol	La incorporación de colesterol a la membrana incrementa la estabilidad de la bicapa haciéndola menos fluida, por lo que disminuye la eliminación de los liposomas.
Presencia de compuestos hidrófilicos (PEG)	El recubrimiento de los liposomas con un compuesto hidrofílico que actúa como impedimento estérico evitando la opsonización, disminuye la eliminación de los liposomas.

### **3.9 Mecanismo de entrega del principio activo en el tejido tumoral.**

La liberación de fármacos al tejido tumoral se lleva acabo principalmente por dos mecanismos:

#### **3.9.1 Entrega pasiva:**

El crecimiento y la ampliación de tejido tumoral por lo general va acompañado de la formación de una microvasculatura (angiogénesis)<sup>55</sup>.

Los vasos tumorales presentan una distribución mucho más heterogénea, son más grandes y más permeables, lo que facilita el acceso a fármacos

quimioterapéuticos. Algunos medicamentos pueden ser administrados como profármacos o fármacos inactivos, que una vez expuestos al microambiente tumoral, pueden convertirse a su forma activa<sup>50, 59</sup>.

### 3.9.1.1 Morfología de la vasculatura.

La mayoría de nanopartículas utilizan el aumento de la permeabilidad y retención (EPR) para la acumulación de fármacos quimioterapéuticos en el tejido tumoral (Figura 12). El efecto ERP consiste en que la vasculatura tumoral, a diferencia de la vasculatura de tejido sano, presenta poros (el tamaño varia de 100 hasta 780 nm dependiendo de la localización anatómica del tumor), es decir, puede ser penetrable por moléculas grandes y por partículas pequeñas, este fenómeno es conocido como extravasación y permite su acumulación en el espacio intersticial del tumor. Esa acumulación es facilitada por la falta de sistema linfático, responsable de eliminar a las macromoléculas en tejidos normales<sup>17, 36, 38, 50, 59,60</sup>.

Como resultado de estas características, la concentración del fármaco en el tejido tumoral puede ser de 10 a 100 veces mayor que cuando se administra en tejido sano.

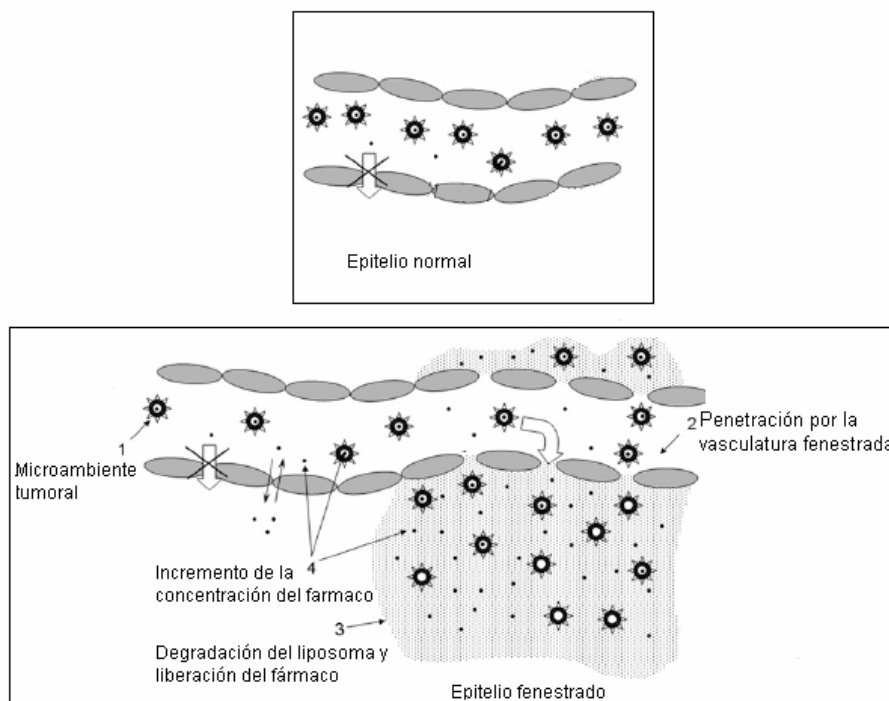


Figura 12. Aumento de la permeabilidad y retención (EPR).

### 3.9.2 Entrega activa.

La entrega específica (activa) es usualmente lograda por la conjugación del liposoma a una molécula de orientación (anticuerpos, fragmento de anticuerpos, receptores de folato, receptores de transferrinas, lectinas, péptidos, aptómeros, etc.) permitiendo una mayor acumulación del fármaco en el tejido tumoral, dentro de las células cancerosas, o en organelos intracelulares<sup>9, 50, 59,60</sup>.

Los criterios que se toman en cuenta para seleccionar al ligando son<sup>50</sup>:

- ✓ Que se incorpore fácilmente al liposoma.
- ✓ Alta afinidad a los receptores de la superficie celular.
- ✓ Sólo se encuentran en las células tumorales.
- ✓ Una eficiente capacidad de internalización.

### 3.10 Mecanismos de interacción de los liposomas con las células.

Una vez dentro del tejido tumoral los liposomas liberan el principio activo a través de cuatro posibles mecanismos: endocitosis, fusión, liberación del fármaco fuera de la célula, e intercambio de lípidos, como se muestra en la figura 13.

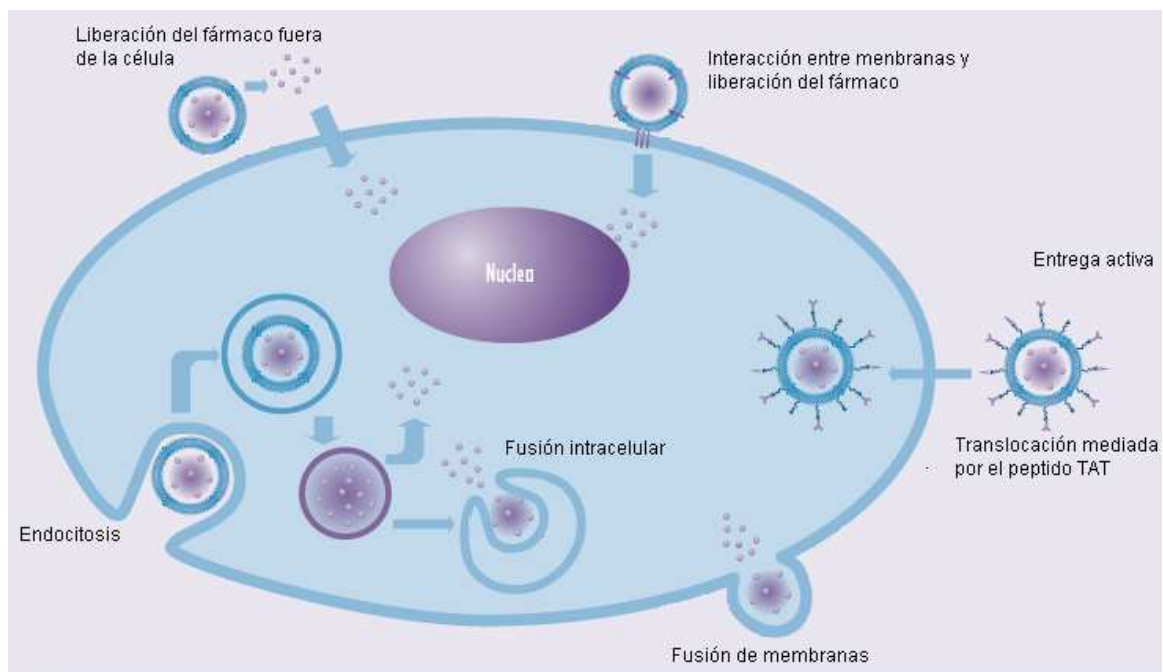


Figura 13. El esquema representa los cuatro posibles mecanismos de entrega del principio activo encapsulado en liposomas.

La interacción más importante es por endocitosis, donde la célula introduce en su interior al liposoma, englobándolas en una vesícula (endosoma) que termina por desprenderse e incorporarse al citoplasma. Luego de ser digerido el liposoma por agentes líticos (enzimas, protones, pH ácidos) en el endosoma el fármaco es liberado<sup>17, 38,60</sup>.

La fusión de las membranas es un mecanismo bastante raro, ya que depende de la temperatura, una vez fusionadas las membranas se libera el fármaco al interior de la célula. También los liposomas pueden intercambiar fosfolípidos con la membrana de la célula y así liberar su contenido dentro ella<sup>38</sup>.

Cuando el fármaco es liberado fuera de la célula sin necesidad interaccionar con esta, después es introducido por difusión pasiva.

Cuando el liposoma tiene en su superficie una molécula de orientación (conocidos como blancos moleculares) este interacciona con el receptor de superficie y deja penetrar al liposoma dentro de la célula para posteriormente liberar el fármaco dentro de ella<sup>19, 38,60</sup>.

### **3.11 Marcadores apropiados para el estudio farmacocinético.**

En este proyecto de investigación estamos utilizando al liposoma como un multitransportador, ya que transporta a un agente de quimioterapia como es el cisplatino (Cis-DDP) en su interior y acarrea a un agente de radioterapia en su superficie. Podemos utilizar las propiedades físicas del radionúclido como mecanismo para determinar la farmacocinética del liposoma.

Entre los radionúclidos terapéuticos más utilizados se encuentran: Holmio-166, Yodo -131, Samario-153, Renio-186, Renio-188, Lutecio-177, Disproso-165, Itrio-90, Estroncio-89 y Disproso-166, entre otros. Los radionúclidos más utilizados para diagnostico son el Tecnecio-99m, Indio-111, Galio-67.

Para seguir la farmacocinética y biodistribución de los liposomas *in vivo* o *in situ* se necesitan radionúclidos apropiados, los cuales deben mantener intacta la estructura del liposoma. Varios marcadores utilizados para seguir la biodistribución de los liposomas figuran en la tabla 5<sup>29</sup>.



Un trazador ideal es aquel que cumple los siguientes requisitos:

- ✓ Marcaje estable.
- ✓ Resistencia a descomponerse y al metabolismo que puede sufrir una vez dentro del organismo (metabólicamente inértes).
- ✓ Debe presentar una rápida eliminación del organismo y no debe distribuirse sobre tejidos o unirse a proteínas plasmáticas.
- ✓ Poseer una fácil medición en la sangre y en tejidos.

Tabla 5. Principales marcadores utilizados para determinar la farmacocinética.

<b>Marcador</b>	<b>Localización del marcador</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Fosfolípidos o colesterol radiomarcados ( <sup>14</sup> C)	Membrana del liposoma	Fácil de incorporar a la membrana. Baja perturbación en la estructura del liposoma.	Tendencia a disociarse del liposoma por interacción con lipoproteínas. Requiere de prolongada digestión en tejido. Es necesario utilizar factores de corrección.
Esteres del colesterol radiomarcados ( <sup>3</sup> H)	Membrana del liposoma	Fácil de incorporar a la membrana. Baja perturbación en la estructura del liposoma. Bajo porcentaje de intercambio fuera de los liposomas	Requiere de prolongada digestión en tejido. Es necesario utilizar factores de corrección.
γ - emisores ( <sup>67</sup> Ga, <sup>111</sup> In, <sup>125</sup> I, <sup>99</sup> Tc)	Interior o exterior del liposoma	Metabolitamente inerte. Rápida eliminación. No requiere solubilizarse en el tejido.	Baja eficiencia de encapsulación. Requiere de purificación, lo que no se encapsula en el liposoma es removido.

Dado que el radionúclido es un emisor gamma o de positrones, se pueden obtener imágenes del funcionamiento *in vivo* de diversos órganos o sistemas por medio de métodos de detección externos llamados cámara gamma (ver anexo 3) y equipos de tomografía de emisión de positrones (PET).

Las imágenes gamma-gráficas pueden ser una herramienta muy útil en el desarrollo de formulaciones liposomales. Por ejemplo para determinar la formulación óptima de los liposomas, la determinación de la biodistribución y farmacocinética en las fases preclínicas, el seguimiento de la respuesta terapéutica, siendo posible la cuantificación absoluta de la radiactividad presente en los tejidos en cada momento y además es una técnica de

cuantificación no invasiva<sup>25,47</sup>. Las desventajas de esta cuantificación es que requiere:

- ✓ Corrección por decaimiento del isótopo.
- ✓ Corrección por la atenuación que se produce cuando algunas partes del cuerpo absorben la radiación emitida antes de que sea eliminada del organismo.
- ✓ Exposición a la radiación.

La biodistribución y farmacocinética se puede determinar por medio de la cuantificación de la radiactividad en los diferentes órganos o regiones de interés a partir de las imágenes gamma-gráficas, y mediante la determinación de la concentración de la radioactividad en muestras seriadas de sangre y/o orina comparada con la radioactividad de una muestra patrón o testigo igual a la actividad inyectada.

Para el tratamiento matemático de los datos se utilizan modelos. Para fines prácticos los modelos más utilizados son el análisis no compartimental (momentos estadísticos) y el monocompartimental con dosis única intravascular.

### **3.12 Modelos farmacocinéticos.**

El objetivo de estos modelos es evaluar el comportamiento *in vivo* de la formulación de liposomas desarrollada en la investigación. Con este fin, se recurrirá al análisis farmacocinético de los datos obtenidos tras la administración intravenosa a roedores normales y en un modelo tumoral.

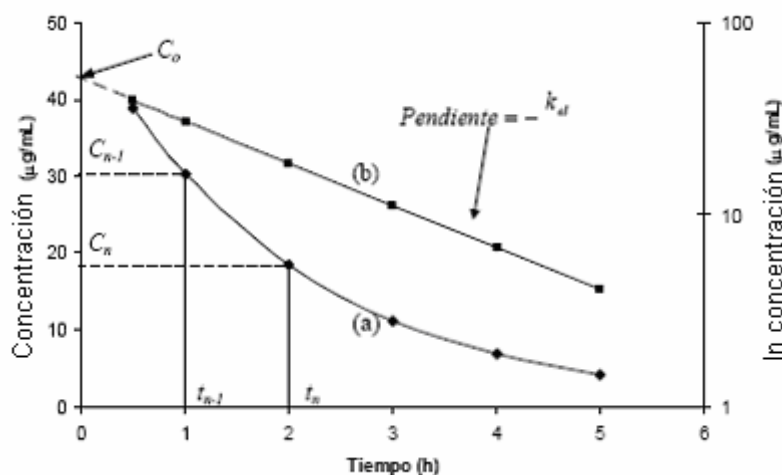


Figura 14. Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los niveles plasmáticos de un fármaco después de su administración intravenosa. (a) Concentración vs tiempo; (b) ln concentración vs tiempo.

Una vez dentro de la circulación sanguínea, los liposomas están sujetos a diferentes transformaciones, sobre todo en su paso por el hígado, el cual es el principal órgano de eliminación. En este sentido se hace necesario conocer los procesos de distribución y eliminación, los cuales se caracterizan por los siguientes parámetros (Figura 14): constante de eliminación, tiempo de vida media de eliminación, área bajo la curva (concentración plasmática vs tiempo), aclaración plasmática, tiempo medio de residencia y volumen aparente de distribución.

A continuación, se describirá el modelo no compartimental y el modelo monocompartimental, así como las ecuaciones utilizadas en el cálculo de los parámetros farmacocinéticos; estos son los modelos más frecuentemente empleados para describir la farmacocinética de los liposomas.

### 3.12.1 Modelo Abierto de Un Compartimiento (MADC).

En el análisis compartimental, los datos de concentración plasmática – tiempo se ajustan a modelos matemáticos originados al suponer que el organismo está dividido en una serie de compartimentos. El más sencillo se conoce como monocompartimental. A medida que se incrementa el número de compartimentos en el modelo, se aumenta la complejidad del tratamiento matemático y por ello, los modelos utilizados con más frecuencia no pasan de cuatro compartimentos.

En el modelo monocompartimental el individuo se considera como un compartimento único en el que el fármaco se distribuye instantáneamente. El fármaco se introduce, mediante un bolo intravenoso, en el organismo y se elimina de éste a una velocidad determinada por la constante de eliminación ( $K_{el}$ ). Se asume que el proceso de eliminación es de primer orden, la ecuación que representa el modelo es la siguiente:

$$C = \frac{D}{V_d} e^{-k_{el}t}$$

donde C representa la concentración, D la dosis administrada,  $V_d$  es el volumen aparente de distribución,  $K_{el}$  es la constante de velocidad de eliminación del fármaco y t es el tiempo.

Aplicando el logaritmo natural (ln) a ambos miembros de la ecuación y teniendo en cuenta que  $D/V_d = C_0$ , donde  $C_0$  es la concentración inicial de principio activo en el organismo antes de que comience a eliminarse, se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln C = -K_{el}t + \ln C_0$$

La constante de eliminación indica la velocidad a la cual el fármaco se elimina irreversiblemente del organismo. En la mayoría de los casos, esta velocidad es proporcional a la cantidad de fármaco que permanece en el organismo. El tiempo de vida media de eliminación, el área bajo la curva, la aclaración plasmática y el tiempo medio de residencia se calculan mediante las siguientes ecuaciones:

El tiempo de vida media de eliminación se define como el tiempo necesario para que una determinada concentración del fármaco en el organismo se reduzca a la mitad.

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_{el}}$$

El área bajo la curva ( $ABC_0^\infty$ ) se realiza en dos partes, la primera calcula el área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo, y en la segunda, desde el último tiempo de muestreo hasta infinito. El  $ABC_0^\infty$  corresponde a la suma de estos dos valores.

$$ABC_0^\infty = ABC_0^t + ABC_t^\infty$$

El método más común para calcular el  $ABC_0^t$  es el método trapezoidal (Figura 15), que consiste en sumar las áreas de cada uno de los trapecios formados por cada intervalo de tiempo y sus correspondientes concentraciones.

$$ABC_0^t = \frac{C_n + C_{n-1}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

El área bajo la curva desde el tiempo  $t$  a infinito se calcula mediante la siguiente ecuación, donde  $C_t$  es la concentración del último tiempo de muestreo.

$$ABC_t^\infty = \frac{C_t}{K_{el}}$$

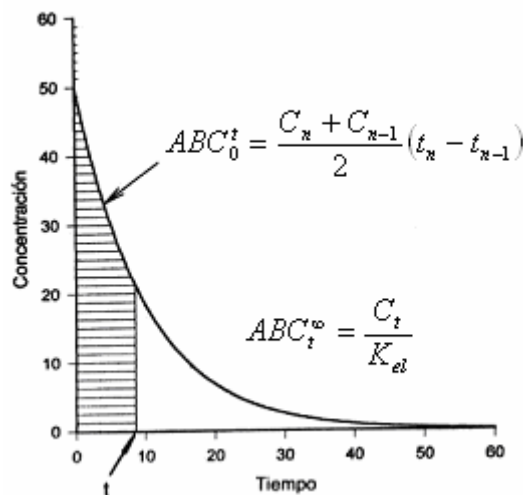


Figura 15. Representación gráfica del método de trapecios para determinar el área bajo la curva.

El área bajo la curva representa la cantidad de fármaco que se incorpora de forma inalterada al organismo tras la administración de una dosis determinada.

### 3.12.2 Modelo no compartimental.

Este tipo de modelos consisten en estimar los parámetros farmacocinéticos sin la necesidad de ajustar a un modelo determinado. Para ello, es preciso asumir un proceso cinético de eliminación determinado y, en algunos casos, es necesario efectuar cálculos matemáticos sencillos, comparados con los que se utilizan en el análisis compartimental.

### 3.12.3 Teoría de los momentos estadísticos.

Las teorías estadísticas de probabilidad y distribución se utilizan para describir o predecir la cinética del fármaco desde su administración hasta el momento de la medida. Al realizar el análisis farmacocinético, las curvas de concentración plasmática frente al tiempo se tratan como si fueran curvas de distribución estadística. Debido a la simplificación que implica el análisis no compartimental es posible que se pierda información.

El tiempo medio de residencia se obtiene a partir de la siguiente ecuación

$$TMR = \frac{ABMC_0^\infty}{ABC_0^\infty}$$

donde  $ABMC_0^\infty$  se conoce como área bajo la curva del primer momento, el calculo se realiza en dos partes, la primera se calcula desde el tiempo cero hasta el ultimo tiempo de muestreo y, en la segunda, desde el último tiempo de muestreo hasta infinito.

$$ABMC_0^t = \frac{C_n t_n + C_{n-1} t_{n-1}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

$$ABMC_t^\infty = \frac{t C_t}{K_{el}} + \frac{C_t}{K_{el}^2}$$

El área bajo la curva ( $ABC_0^\infty$ ) se calcula con las ecuaciones previamente mencionadas en el modelo monocompartimental.

Para el cálculo de la constante de eliminación, se asume que el proceso de eliminación es de primer orden y los datos de concentración plasmática se transforman para obtener una línea recta con la siguiente ecuación

$$\ln C = -K_{el} t + \ln C_0$$

donde log C es el logaritmo de la concentración a través del tiempo, log  $C_0$  es el logaritmo de la concentración de fármaco en plasma a tiempo cero.

La constante de eliminación se determina por regresión lineal y se obtiene a partir de la pendiente de la línea recta. Pero también se puede calcular a partir del tiempo medio de residencia, con la siguiente ecuación

$$K_{el} = \frac{1}{TMR}$$

El aclaramiento plasmático se determina a partir de la siguiente ecuación

$$Cl = \frac{D}{ABC_0^\infty}$$

donde D es la dosis administrada y  $ABC_0^\infty$  es el área bajo la curva.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS:**

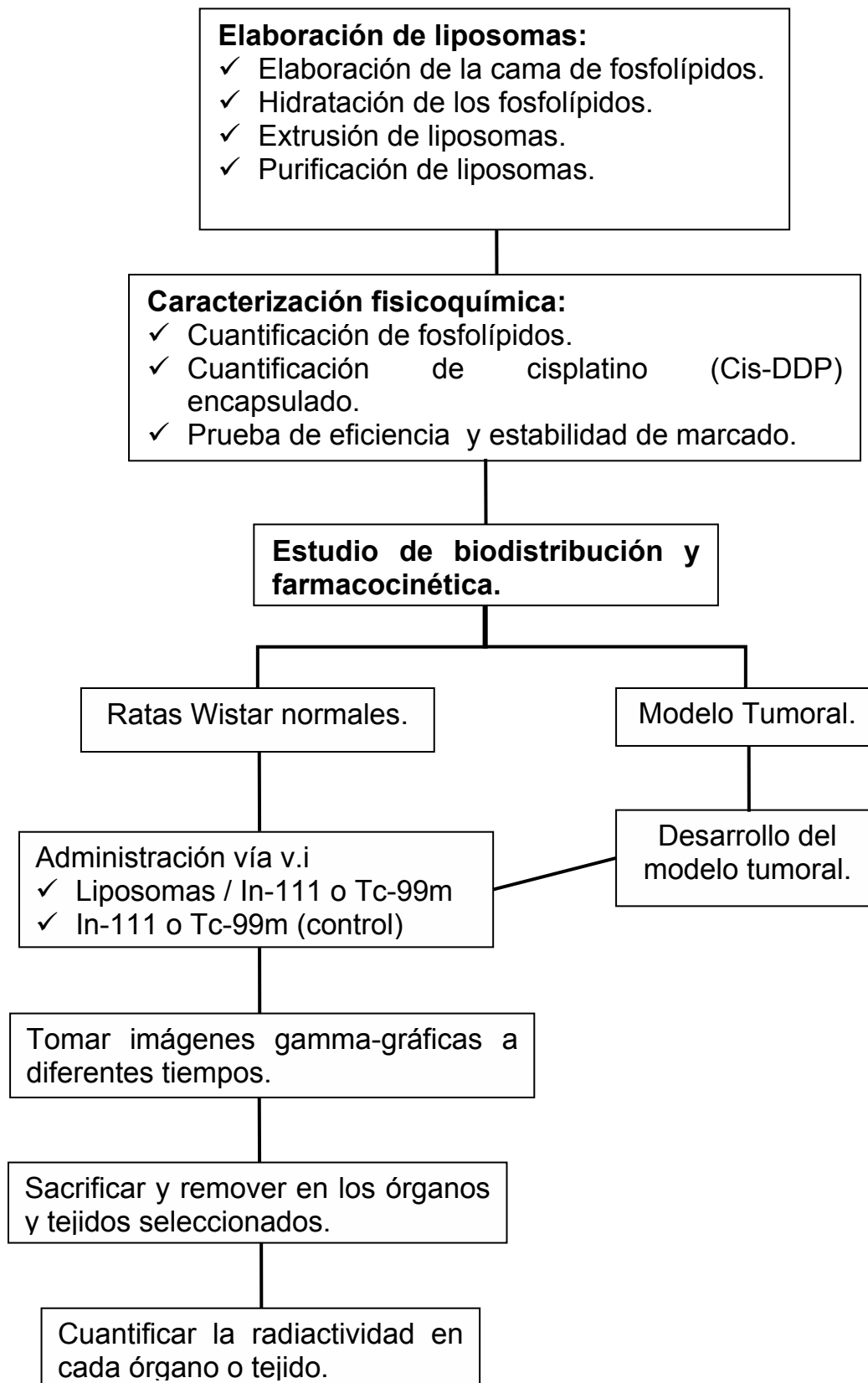
El siguiente diagrama de flujo describe la metodología utilizada en el desarrollo de este trabajo de tesis la cual se dividió en tres etapas:

La elaboración de los liposomas se realizó mediante la técnica de hidratación de lípidos, para homogenizar el tamaño se realizó la extrusión con filtros de policarbonato de 100 nm. Posteriormente se realizaron las pruebas fisicoquímicas para caracterizar a los liposomas.

Por ultimo se efectuó el estudio de biodistribución y farmacocinética en ratas normales y en un modelo tumoral, para lo cual se utilizaron liposomas marcados con un radionúclido; en un principio se pensaba utilizar como radionúclido al Holmio-166 (Ho-166) que es un emisor de partículas betas, además emite rayos gamma lo cual permitiría su seguimiento mediante una cámara gamma, sin embargo, por razones administrativas no se completo el procesamiento de licenciamiento para la adquisición de Ho-166; por tener las mismas características químicas se utilizó el Indio-111 (In-111), durante el transcurso del trabajo se cambio a Tecnecio-99 metaestable (Tc-99m) por ser más fácil de adquirir y más barato.



**Esquema general de trabajo.**



#### **4.1 Elaboración de liposomas.**

##### **4.1.1 Elaboración de liposomas cargados con cisplatino (*cis*-DDP) en solución salina isotónica.**

Los liposomas se prepararon con fosfatidilcolina de soya hidrogenada (HSPC) (Northern lipids Inc. Vancouver Canada), Colesterol (Calbiochem. Canada), 1,2 Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil polietilenglicol) 2000 (PEG<sub>2000</sub>DSPE) (Northern lipids Inc. Vancouver Canada), 1,2 Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-dietilentriaminopentacetato (DSPC-DTPA) (Avanti Polar Lipids, USA) y Vitamina E (Biochemka, Suiza) en una proporción molar 50:46:1.5:1.5:1, mediante la técnica reportada por Juárez Osornio C<sup>30</sup>.

##### **4.1.2 Elaboración de liposomas cargados con cisplatino (*cis*-DDP) en una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS).**

- ***Preparación de la solución amortiguadora de PBS con sacarosa 300µM.***

Se disolvieron 5 tabletas de PBS (Sigma –Aldrich, Alemania) en un litro de agua desionizada estéril, se agregó 104 g de sacarosa y se ajustó el pH a 6.3.

Para la elaboración de estos liposomas se modificó la proporción molar de los componentes de la siguiente manera 50:42.5:5:1.5:1 de HSPC: colesterol: mPEG<sub>2000</sub>DSPE: DSPC-DTPA: vitamina E, respectivamente. En un matraz de bola para rotavapor se colocaron los fosfolípidos, los cuales fueron disueltos con cloroformo (Sigma grado HPLC, USA). La mezcla fue sometida a agitación en rotavapor (Laborota 400, Heidolph, Alemania) a 90 rpm por 10 minutos. Se retiró el disolvente orgánico a presión reducida manteniendo el sistema a 40°C y 240 rpm durante 30 minutos. Para secar completamente la cama de fosfolípidos el matraz de bola fue introducido en una campana de vacío por 5 horas. La cama de fosfolípidos fue rehidratada con una solución de 8.5 mg/mL de *cis*-DDP (Sigma-Aldrich, Alemania) en PBS con sacarosa a 65°C por 1h. Al término, la suspensión fue sometida a proceso de extrusión (Lipex<sup>TM</sup> Extruder, Northern Lipids, Canada) por filtros de policarbonato (Whatman Nucleopore. Vancouver Canadá), 2 veces por filtros de 400 nm, 2 por 300 nm y 4 por 100

---

nm a 65°C. Posteriormente la suspensión fue purificada mediante diálisis en medio PBS con sacarosa por 48 h.

## **4.2 Marcado de los liposomas.**

### **4.2.1 Marcado de los liposomas con In-111.**

El marcado de los liposomas se realizó mediante la técnica por Juárez Osornio C<sup>30</sup>.

### **4.2.2 Marcado de los liposomas con Tc-99m.**

- **Preparación del cloruro estañoso (SnCl<sub>2</sub>).**

Se disolvieron 34 mg de cloruro estañoso (Química Meyer, México) en 5 mL de solución salina isotónica al 0.9% previamente desgasificada con N<sub>2</sub>.

Para el marcado de los liposomas se agregaron 100 µL de cloruro estañoso (SnCl<sub>2</sub>) y pertecneciato de sodio (Na <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) (MIYMSA Radiofarmacia, México) en una relación 6.0 mCi/mL con respecto al volumen de los liposomas, y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 1h. EL material radiactivo no marcado a la superficie del liposoma fue separado mediante columnas para cromatografía de filtración Sephadex G-25 (Amersham Biosciences. USA) usando como eluyente amortiguador de PBS con sacarosa (300µM).

### **4.2.3 Marcado de los liposomas con In-111 en una solución amortiguadora de citrato de sodio.**

Para el marcado de los liposomas se agregó 100 µL de amortiguador de citrato de sodio pH 5.0 (Fluka, Suiza), cloruro de indio (<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub>) (MIYMSA Radiofarmacia, México) en una relación 2.0 mCi/ml, se incubó a temperatura ambiente por 1 h. EL material radiactivo no marcado a la superficie del liposoma fue separado mediante columnas para cromatografía de filtración Sephadex G-25 (Amersham Biosciences. USA) usando como eluyente amortiguador de PBS con sacarosa (300µM). Se ajustó el pH a 7 con NaOH estéril.

### 4.3 Caracterización fisicoquímica de los liposomas.

#### 4.3.1 Cuantificación de fosfolípidos.

La cuantificación de fosfolípidos fue determinada mediante reacción de Stewart<sup>56</sup>.

- **Preparación de Ferrotiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{FeSCN}$ ).**

Se disolvieron 27.03 g de cloruro ferico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania) y 30.4 g de tiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania) en 1 litro de agua desionizada.

- **Preparación de la curva patrón:**

Se preparó una solución stock de HSPC (0.1 mg/mL) en cloroformo, se realizó una dilución para obtener una concentración de 0.02 mg/mL, de la cual fueron preparadas por triplicado diluciones para la realización de la curva patrón.

Tabla 6. Preparación de la curva patrón.

Concentración HSPC (mg/mL)	Volumen de sol. HSPC (mL)	Volumen de cloroformo (mL)	Volumen de $\text{NH}_4\text{FeSCN}$ (mL)
0	0	2.0	2
0.001	0.1	1.9	2
0.002	0.2	1.8	2
0.003	0.3	1.7	2
0.004	0.4	1.6	2
0.005	0.5	1.5	2

Se agitó durante 1 minuto en el vórtex y al termino se centrifugó (Centrifuge 5702 R, Eppendorf, U. S. A.) a 1000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica fue leída a 488 nm en un espectrofotómetro (DU 500 Beckman, USA), empleando como blanco cloroformo.

- **Preparación de las muestras de liposomas.**

Se agregaron 10 $\mu\text{L}$  de la suspensión de liposomas en un tubo, se removió el agua con vapor de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) líquido, y una vez secas las muestras se les adicionó 2 ml de cloroformo. Al término se agregó 2 ml de la solución de  $\text{NH}_4\text{FeSCN}$  para posteriormente agitarla durante 1 minuto en el vórtex y centrifugarla a 1000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica fue leída a 488nm, empleando como blanco de ajuste cloroformo.

---

### **4.3.2 Cuantificación de cisplatino (Cis-DDP) encapsulado.**

La cuantificación de cisplatino (Cis-DDP) encapsulado fue determinada mediante la técnica analítica previamente validada y reportada por López Flores A<sup>39</sup>.

La cuantificación se realizó mediante HPLC (Waters, modelo 2690) en una columna Synmetry C-18 (3.9 x 150mm con 5µm de poro), utilizando un detector de UV a 254nm.

### **4.3.3 Eficiencia y estabilidad de marcado**

La eficiencia del marcado se realizó por comparación de la actividad detectada en la suspensión de liposomas antes y después de pasar por la columna de cromatografía Sephadex G-25 (Amersham Biosciences. USA). La medición de actividad se realizó con un activímetro (Deluxe, Nuclear Associates). El cálculo de la eficiencia del marcado se realizó a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Actividad\ específica = \frac{Actividad}{volumen}$$

$$Eficiencia = \frac{Actividad\ específica\ postcolumna}{Actividad\ específica\ precolumna} \times 100$$

Para evaluar la estabilidad del marcado se utilizó la técnica de cromatografía en papel impregnado de sílica gel (ITLC) (Gelman Sciences, USA), a la cual se le colocó una alícuota de la suspensión de nanoesferas marcadas con el In-111 en solución salina o PBS con sacarosa (a temperatura ambiente) y en plasma humano (a 37 °C), se eluyó con una fase móvil de ácido acético:metanol:agua (1:1:1) a pH de 3. Al término de la separación, cada papel fue cortado a la mitad. Las mezclas fueron muestreadas a diferentes tiempos y la actividad (expresada en cpm) fue cuantificada en un contador de pozo de centelleo (LUDLUM, modelo 2200, USA).

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

$$\% \text{ libre} = \frac{\text{Actividad en mitad superior}}{\text{Actividad en mitad inferior} + \text{Actividad en mitad superior}} \times 100$$

$$\% \text{ unido} = \frac{\text{Actividad en mitad inferior}}{\text{Actividad en mitad inferior} + \text{Actividad en mitad superior}} \times 100$$

#### 4.4 Estudio de Biodistribución y farmacocinética de los liposomas.

##### 4.4.1 Estudio de biodistribución en ratas Wistar normales.

Ratas Wistar de aproximadamente 250g (hembras) fueron inyectadas por vía intravenosa con los liposomas marcados con el radionúclido y como control el radionúclido (In-111 o Tc-99m) diluido en SSI o PBS ( $25.4 \pm 0.43$  MBq ( $0.69 \pm 0.012$ mCi)) a través de la vena de la cola. Después de la administración, las ratas fueron colocadas en cajas metabólicas, con el fin de colectar toda la orina y heces por separado de las 24 h. Se tomaron imágenes gamma-gráficas en una cámara gamma (E.CAM Siemens, Software E-soft Ver. 4) a varios tiempos.

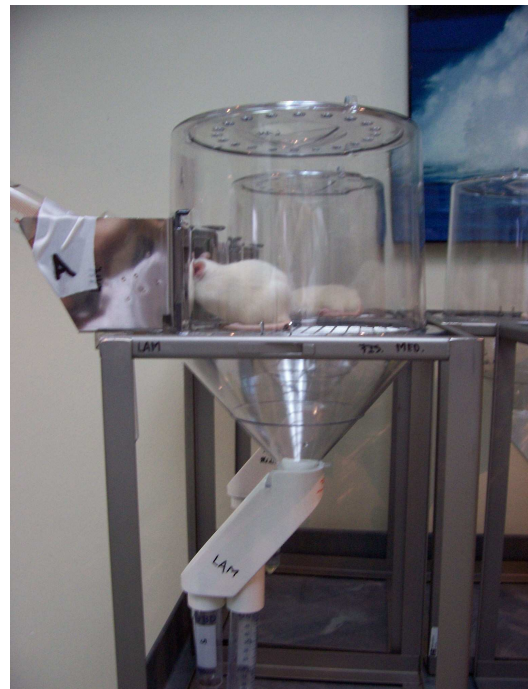


Figura 16. Imagen de la caja metabólica.

Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca a las 24 horas post-inyección, posteriormente los animales fueron sacrificados y órganos de interés fueron removidos y lavados con solución salina isotónica al 9%. Los órganos colectados fueron pesados (OHAUS, Adventure, China) y la radiactividad cuantificada en cada órgano utilizando un contador de pozo de centelleo (LUDLUM, modelo 2200); esto con el fin de determinar el porcentaje de dosis inyectada por órgano y por gramo de tejido (% ID/órgano o % ID/g). La actividad del sistema digestivo y de las heces fue determinada cuantificando

una alícuota de una suspensión del material digerido con solución de NaOH 1M. Se cuantificó una muestra de los liposomas marcados con el radionúclido y el radionúclido como estándar. El volumen total de sangre y la masa muscular fueron estimadas como 5.4% y el 40% respectivamente del peso total del animal<sup>24</sup>. La actividad cuantificada en la sangre y órganos fue corregida por el decaimiento radiactivo con la siguiente ecuación:

$$Ac = Ac_0 \cdot e^{+\lambda t}$$

donde Ac representa a la actividad del radionúclido a cualquier tiempo,  $Ac_0$  es la actividad del radionúclido al tiempo cero, t es el tiempo y  $\lambda$  es la constante de desintegración. La ecuación presenta el signo positivo a diferencia de la ecuación de decaimiento radiactivo por que la actividad cuantificada en los órganos y tejidos de interés la expresamos como dosis inyectada (ID) y nosotros de la cuantificación obtenemos la actividad al tiempo t.

#### **4.4.1.1 Adquisición de las imágenes gamma-gráficas.**

Para tomar las imágenes las ratas fueron anestesiadas con Lisorane (Isoflurano, Baxter Healthcare Corporation) utilizando una mezcla 97-3% de isoflurano-oxígeno, en una máquina de inhalación anestésica (Vapomatic™, Modelo 2, Bickford Inc., Wales Center N.Y. USA).



Figura 17. Imagen de la cámara gamma durante la adquisición de una imagen.

Las imágenes gamma-gráficas fueron adquiridas con una cámara gamma (E.CAM Siemens, Software E-soft Ver. 4) con un colimador de media energía para el In-111 y de baja energía para Tc-99m a las 0, 1, 3, 5, 24 h post-inyección. Con una matriz de 128 x 128, un zoom de 2 y un tiempo de adquisición de 3 y 5 minutos para In-111 y para Tc-99m 3, 5, 7, 15 minutos.

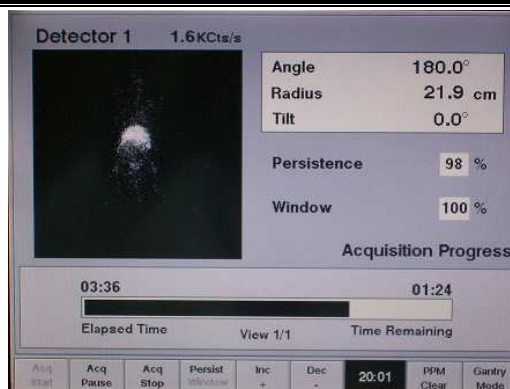


Figura 18. Ventana de adquisición de una imagen gamma-gráfica.

#### 4.4.1.2 Estudio de farmacocinética de los liposomas.

Para determinar la biodistribución y farmacocinética en las imágenes gamma-gráficas, regiones de interés (ROI) fueron dibujadas (cuerpo entero, hígado, bazo, corazón, tumor en el caso del modelo tumoral) utilizando el paquete Image J ver. 1.34s. Para calcular la actividad remanente en la circulación sanguínea a cada tiempo, se calculó la actividad inicial de la ROI del cuerpo entero a esta se le restó la actividad acumulada en las otras ROI (hígado, bazo, tumor en el caso del modelo tumoral), todo se corrigió por decaimiento radiactivo. Los parámetros farmacocinéticos se determinaron mediante el modelo no compartimental de la teoría de los momentos estadísticos y el modelo abierto de un compartimento (Excel versión 2003). La capacidad de los liposomas de permanecer en la circulación sanguínea fue expresada como el cociente sangre/RES, calculada dividiendo la actividad en la sangre por la actividad acumulada en el hígado y bazo. La capacidad de los liposomas de acumularse en la zona tumoral fue expresada como el cociente tumor/RES, calculada dividiendo la actividad en el tumor por la actividad acumulada en el hígado y bazo.

#### 4.4.2 Estudio de biodistribución en un modelo tumoral.

##### 4.4.2.1 Desarrollo del modelo tumoral en ratones.

Ratones atómicos (hembras de 24 g) fueron inoculados con  $5 \times 10^6$  células del tipo HeLa en ambas extremidades inferiores. Cuando los tumores alcanzaron un volumen superior a los  $200 \text{ mm}^3$  los ratones fueron separados en dos



grupos; el grupo control y el grupo experimental cada uno constituido por 3 ratones.

Para el estudio de biodistribución y farmacocinética en el modelo tumoral el procedimiento utilizado fue el mismo que se describió anteriormente.

#### **4.4.3 Análisis estadístico.**

Todos los datos de biodistribución y farmacocinética son reportados en base a los promedios  $\pm$  el error estándar promedio (SEM); el análisis estadístico fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía usando el software SPSS Base 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Pruebas de control de calidad.

La Tabla 7, muestra los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de las tres formulaciones de liposomas después de ser sometidas a extrusión y purificación.

Tabla 7. Resultados de la caracterización fisicoquímica.

<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>
Cuantificación de fosfolípidos	77.8 ± 4.1 mM (23.4 ± 1.2 mg/mL)
Cuantificación de Cis-DDP	53.6 ± 4.9 µg/mL
Eficiencia del marcado con In-111	Mayor al 90%
Estabilidad del marcado en SSI	Superior al 90% al término de las 72 h
Estabilidad del marcado en Plasma	Superior al 80% al término de las 72 h
Eficiencia del marcado con Tc-99m	Mayor al 70%
Estabilidad del marcado en SSI	Superior al 80% al término de las 72 h
Estabilidad del marcado en Plasma	Superior al 70% al término de las 72 h

Respecto al marcaje con el In-111 la eficiencia del marcado es muy buena, no así cuando se utiliza como radionúclido el Tc-99m, esto es debido a que el Tc-99m se tiene que reducir para que se lleve a cabo la trasquelación con el DTPA; la eficiencia del marcado depende de la cantidad de Tc-99 (III) que se encuentre en el medio de reacción.

### Biodistribución de liposomas marcados con In-111.

El estudio de biodistribución muestra que los liposomas marcados con In-111 (Lip-In-111) se acumulan mayoritariamente en hígado (15.3 ± 8.9%), bazo (4.2 ± 2.4%), mientras que con el control (In-111) la acumulación se da en el hígado (12.1 ± 1.5 %) y los riñones (6.0 ± 0.5%); en la tabla 8 se muestran los demás resultados de la biodistribución.

Tabla 8. Estudio de biodistribución en ratas Wistar normales a las 24 h post inyección.

Porcentaje de Dosis inyectado por gramo de órgano/ tejido ( $\pm$ SEM)		
Órganos	Lip-In-111 (n=3)	Control (In-111) (n=3)
Sangre *	0.07 $\pm$ 0.04	1.7 $\pm$ 0.3
Bazo *	4.2 $\pm$ 2.4	1.9 $\pm$ 0.2
Riñón *	0.14 $\pm$ 0.08	6.0 $\pm$ 0.5
Hígado	15.3 $\pm$ 8.9	12.1 $\pm$ 1.5
Corazón *	0.005 $\pm$ 0.003	0.07 $\pm$ 0.006
Pulmón *	0.04 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.09
Orina	0.001 $\pm$ 0.001	0.001 $\pm$ 0.0001
Músculo *	0.20 $\pm$ 0.03	2.4 $\pm$ 0.25
Estómago *	0.28 $\pm$ 0.17	2.3 $\pm$ 0.3
Heces *	22.7 $\pm$ 4.9	0.35 $\pm$ 0.05

\* Estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

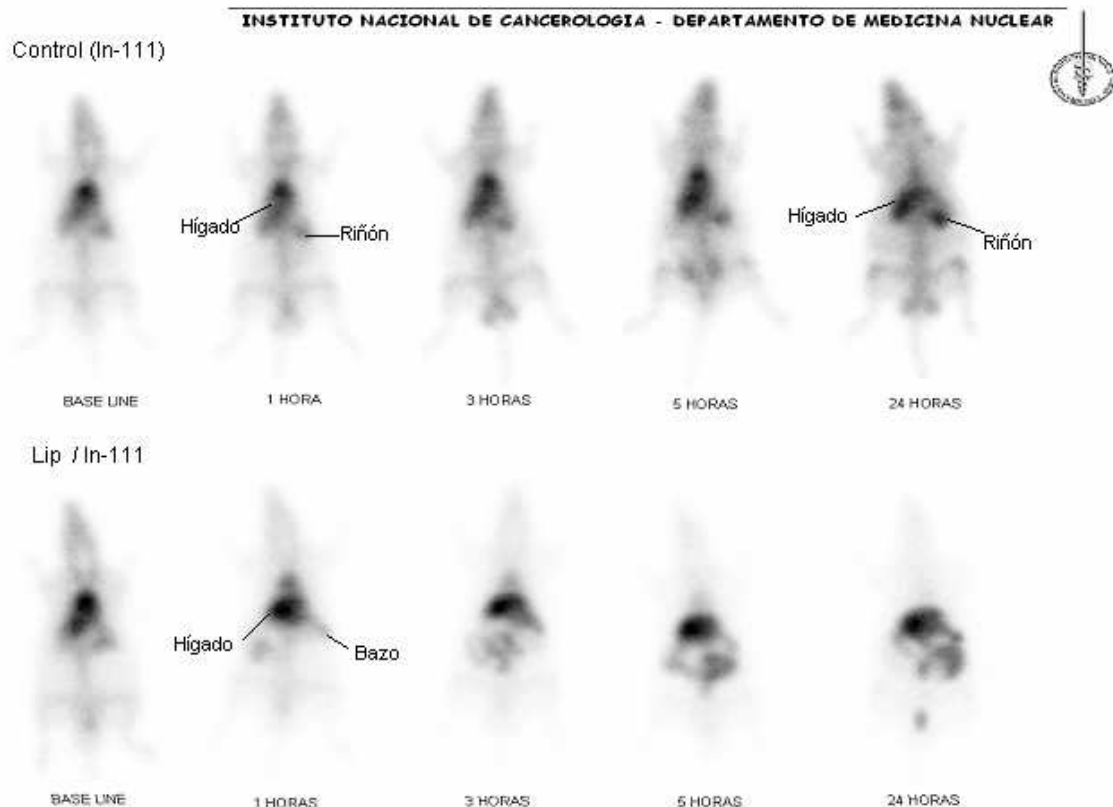


Figura 19. Imágenes gamma-gráficas de los liposomas marcados con In-111.

En las imágenes gamma-gráficas podemos observar que los liposomas se están eliminando muy rápido de la circulación sanguínea por la captura de

RES, ya que la acumulación de los liposomas se o *Resultados y discusión* hígado y bazo desde la primera hora después de la inyección de estos. Mientras que en las imágenes gamma gráficas del control (In-111) podemos observar como se empieza acumular en hígado y riñones a partir de la primera hora después de la inyección y a las 24 horas se encuentra acumulado principalmente en los riñones, también se observa una ligera acumulación en hueso.

El que los liposomas presenten una muy rápida eliminación de la circulación sanguínea debido a la captura del RES, nos indica que el organismo los está reconociendo como intrusos. Como resultado de esta observación, se procedió a la modificación de la formulación que permita que los liposomas permanezcan largos periodos de tiempo en circulación sanguínea. El primer componente de la formulación que se modificó fue la cantidad de PEG, esto debido a que en la literatura indican que la cantidad ideal de PEG esta entre 5-7% y nosotros estábamos utilizando 1.5%; además de modificar la cantidad de PEG se cambió a mPEG.

### **Biodistribución de liposomas marcados con Tc-99m.**

Los resultados del estudio de biodistribución con los liposomas elaborados con 5% de mPEG se utilizó como radionúclido el Tc-99m, que también es un emisor de rayos gamma, pero es más fácil de conseguir y es más barato. En la tabla 9 se muestran los resultados del estudio de biodistribución de los liposomas elaborados en SSI y en PBS, marcados con Tc-99m (Lip-Tc-99m).

Tabla 9. Estudio de biodistribución en ratas Wistar a las 24 h postinyección.

<b>Porcentaje de Dosis inyectado por gramo de órgano/ tejido (<math>\pm</math> SEM)</b>				
<b>Órganos</b>	<b>Elaborados en SSI</b>		<b>Elaborados en PBS</b>	
	<b>Lip-Tc-99m (n=2)</b>	<b>Control (Tc-99m) (n=2)</b>	<b>Lip-Tc-99m (n=4)</b>	<b>Control (Tc-99m) (n=4)</b>
Sangre	3.02 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.06	2.5 $\pm$ 0.11	3.78 $\pm$ 1.57
Bazo	0.27 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01
Riñón *	0.26 $\pm$ 0.00	0.2 $\pm$ 0.01	5.2 $\pm$ 0.5	1.65 $\pm$ 0.33
Hígado	0.51 $\pm$ 0.10	2.6 $\pm$ 0.45	0.19 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02
Corazón	0.27 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.03
Pulmón	0.26 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.35	0.14 $\pm$ 0.02
Músculo	24.17 $\pm$ 1.98	20.2 $\pm$ 1.02	17.9 $\pm$ 1.3	12.95 $\pm$ 3.76
Orina	2.4 $\pm$ 0.65	1.5 $\pm$ 0.16	2.2 $\pm$ 0.29	1.78 $\pm$ 0.6

Heces *	6.14 ± 10	4.7 ± 0.09	2.1 ± 0.	<i>Resultados y discusión</i>
Estomago	6.5 ± 1.4	5.7 ± 1.14	1.7 ± 0.	

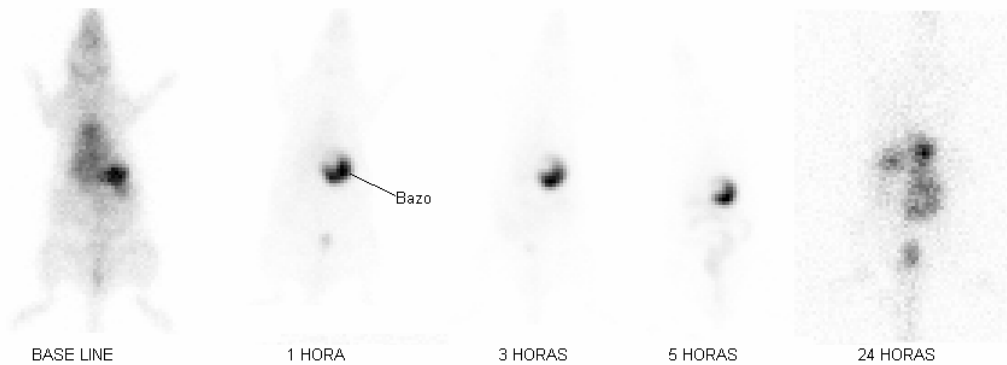
\* Estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

Los resultados del estudio de biodistribución con los liposomas marcados con Tc-99m no son confiables, debido a que cuando se cuantificó la radioactividad acumulada en los órganos y tejidos ésta estaba al nivel del fondo, pues habían pasado 4 vidas medias del radionúclido (la vida media del Tc-99m son 6.2 h); por lo cual el análisis de biodistribución se llevo a cabo con la imágenes gamma- gráficas.

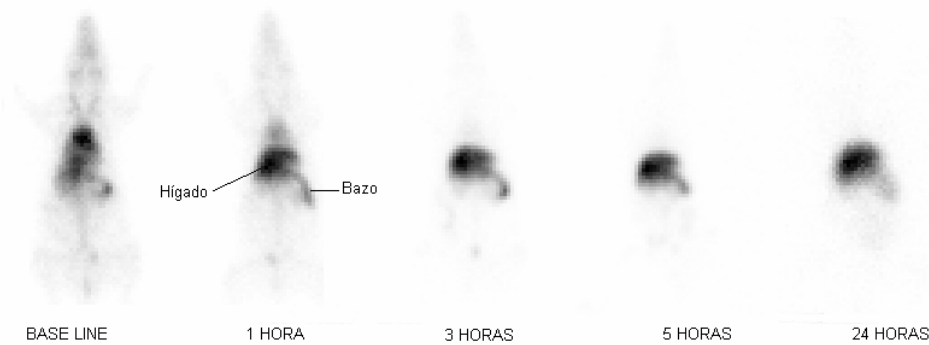
En las imágenes gamma-gráficas (Figura 20) podemos observar que los liposomas se acumulan en el hígado y bazo a los 5 minutos de ser administrados, y a las 2 horas se encuentran casi en su totalidad en estos órganos. Esto nos indica que los liposomas se están eliminando más rápido que antes que se hiciera la modificación a la formulación. En las imágenes gamma-gráficas del control podemos observar como se empieza acumular en el bazo a los 5 minutos (base line) de administrado.



Control (Tc-99m)



Lip / Tc-99m



### *Resultados y discusión*

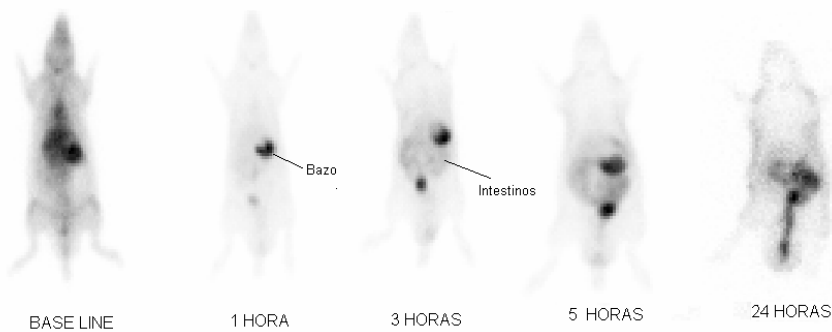
Figura 20. Imágenes gamma-gráficas de los liposomas elaborados en PBS y marcados con Tc-99m.

Considerando que entre los factores que modifican el tiempo de circulación de los liposomas se encuentra la carga superficial, se midió el pH de la suspensión de liposomas sin marcar, marcados con Tc-99m y con In-111; obteniéndose que el pH se encontraba en 7, 5 y 2 respectivamente. Por lo anterior se decidió cambiar el medio de resuspensión a una solución amortiguadora que mantuviera estable el pH de 7 cuando se colocara el radionúclido.

Se utilizó la solución amortiguadora de fosfato salino (PBS), debido a que mantiene el pH entre 5-7 y se adicionó sacarosa para mantener la estabilidad de los liposomas.



Control (Tc-99m)



Lip / Tc- 99m

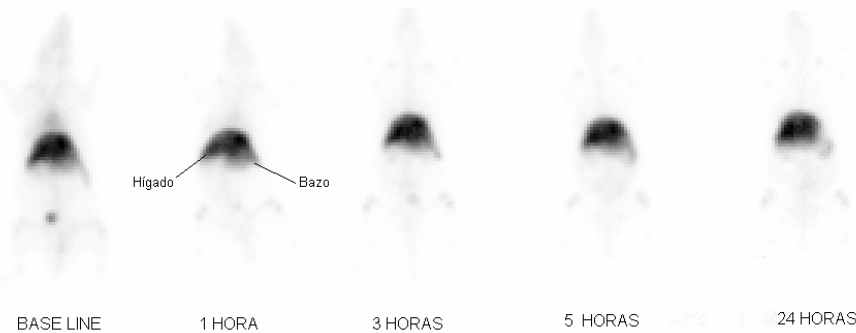


Figura 21. Imágenes gamma-gráficas de los liposomas elaborados en PBS y marcados con Tc-99m.

En las imágenes gamma-gráficas de los liposomas elaborados en PBS (Figura 21) podemos observar que estos se empiezan a acumular en el hígado y bazo a los 5 minutos (base line) de ser administrados, y a la hora se encuentran casi en su totalidad en estos órganos. Mientras que en las imágenes gamma gráficas del control podemos observar que se acumula en el bazo y que a las 3 horas se encuentra metabolizando en los intestinos.

El que los liposomas se estén eliminando de la circulación sanguínea igual de rápido que antes de cambiar el medio de resuspensión, hace pensar que cuando se lleva a cabo el marcaje con Tc-99m hay una modificación en los liposomas, por lo cual son más susceptibles al reconocimiento de los macrófagos. Se observó que después de cierto tiempo la suspensión de liposomas marcados con Tc-99m adquirían un color amarillento. Esto se debe a que los fosfolípidos se estaban oxidando con el  $\text{Sn}^{4+}$  que se produce de la reducción del Tc-99m para que se lleve a cabo la quelación con el DTPA (Figura 22).

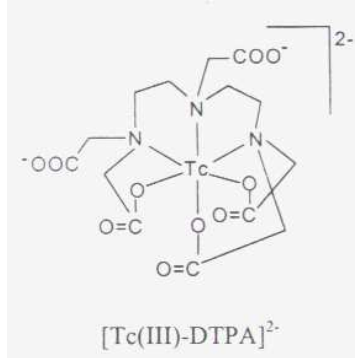
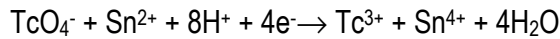


Figura 22. Ecuación de reducción del Tc-99m y esquema de transquelación del Tc-99m con el DTPA.

Pensando en que el marcaje con Tc-99m sea lo que esta oxidando a los fosfolípidos, se volvió a utilizar como radionúclido al In-111.

### Biodistribución de los liposomas elaborados con PBS y marcados con In-111.

Para el estudio de biodistribución de los liposomas marcados con In-111 se utilizó un amortiguador de citrato de sodio pH 5, con la intención de mantener el pH de 7 después de agregar al radionúclido.

El estudio de biodistribución muestra que los liposomas se acumulan mayoritariamente en hígado ( $30.7 \pm 2.3\%$ ), bazo ( $3.6 \pm 0.6\%$ ) y heces ( $35.2 \pm 9.7\%$ ), mientras que con el control (In-111) la acumulación se da en el hígado ( $37.1 \pm 14.8\%$ ) y los riñones ( $7.7 \pm 0.3\%$ ); en la tabla 10 se muestran los demás resultados de la biodistribución.

### Resultados y discusión

Tabla 10. Estudio de biodistribución en ratas Wistar.

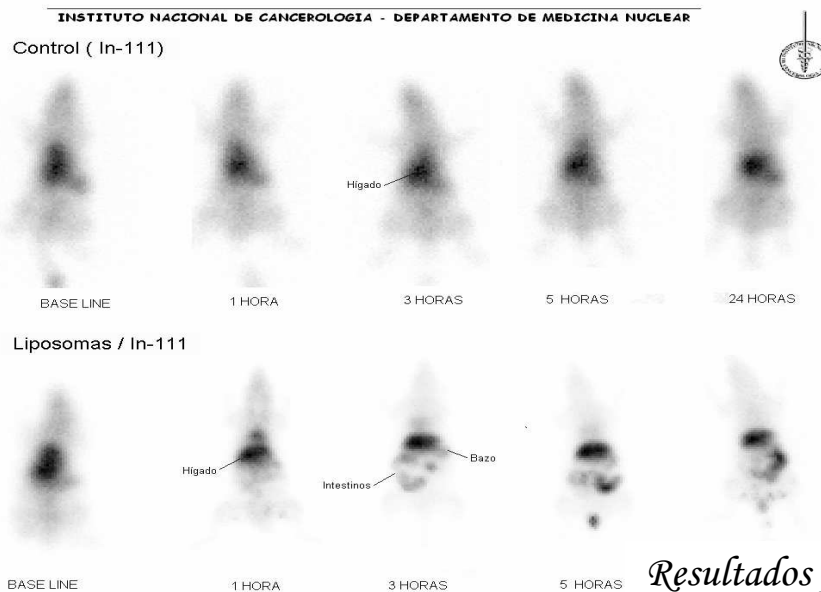
Porcentaje de Dosis inyectado por gramo de órgano/ tejido ( $\pm$ SEM)		
Órganos	Lip-In-111 (n=5)	Control (In-111) (n=3)
Sangre	$9.8 \pm 2.1$	$8.5 \pm 3.9$
Bazo	$3.6 \pm 0.6$	$2.3 \pm 0.9$
Hígado *	$30.7 \pm 2.3$	$37.5 \pm 14.8$
Riñón	$2.1 \pm 1.7$	$7.7 \pm 0.3$
Corazón	$0.1 \pm 0.02$	$0.1 \pm 0.04$
Pulmón	$0.9 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.4$



Músculo	1.8 ± 1.2	4.1 ± 1.1
Estomago	5.1 ± 2.5	1.4 ± 0.7
Heces	35.2 ± 9.7	2.8 ± 1.0
Orina *	7.0 ± 4.6	1.0 ± 1.2

\* Estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

En las imágenes gamma-gráficas de los liposomas elaborados en PBS y marcados con In-111 (Figura 23) podemos observar que permanecen por más tiempo en circulación sanguínea y que acumulan en hígado a la hora de ser administrados y en el bazo e intestinos hasta las 3 horas. En las imágenes gamma gráficas del control podemos observar que se acumula principalmente en el hígado, el que la imagen sea sucia (borrosa) nos indica que se esta acumulando en todos los tejidos.



### Resultados y discusión

Figura 23. Imágenes gamma-gráficas de los liposomas elaborados en PBS y marcados con In-111.

En la figura 24 se muestra los resultados de biodistribución de los diferentes liposomas elaborados, así como los datos que mostraron diferencias significativas en el análisis de varianza ( $p < 0.05$ ).

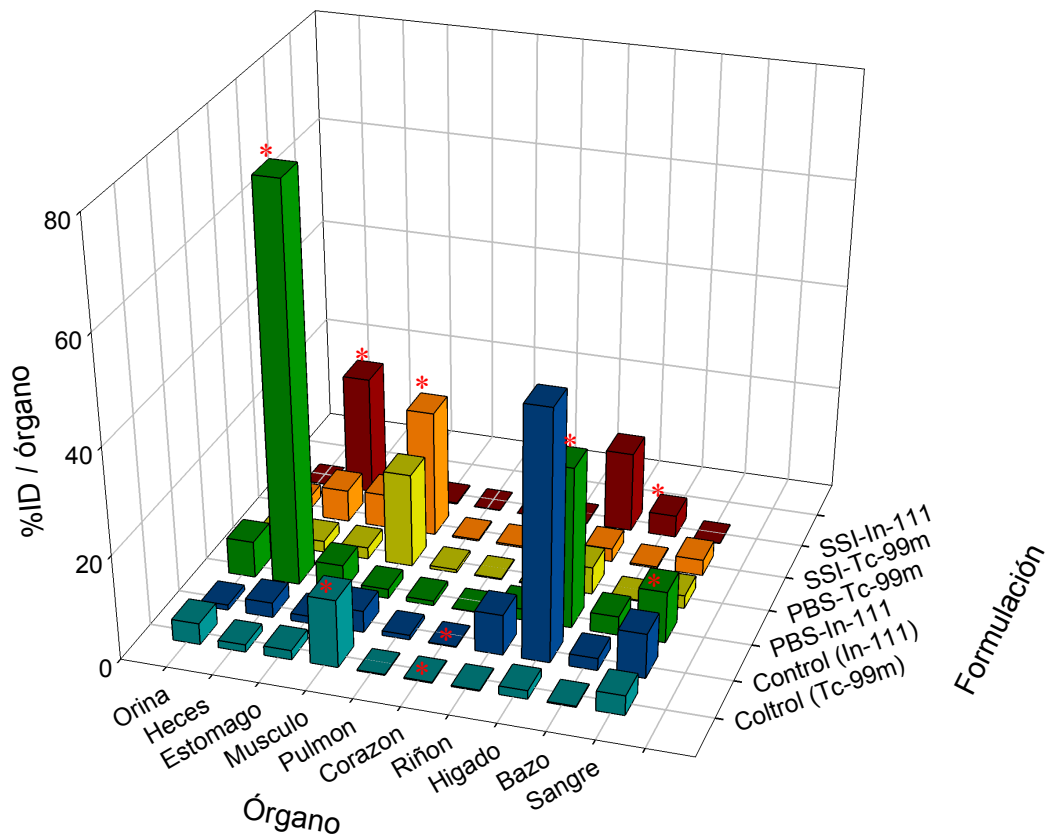


Figura 25. Gráfica de los estudios de biodistribución.

\* Estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

En la gráfica podemos observar que la acumulación en la sangre a las 24 horas después de la administración de los liposomas en PBS marcados con In-111 se incrementó con respecto a las demás formulaciones de liposomas, lo cual nos indica que aumentó el tiempo de residencia en la circulación sanguínea.

### Biodistribución de los liposomas en un modelo tumoral.

El estudio de biodistribución en el modelo tumoral muestra que los liposomas marcados con In-111 y elaborados con SSI se acumulan mayoritariamente en hígado ( $44.3 \pm 0.7\%$ ), bazo ( $2.7 \pm 2.4\%$ ) y el tumor ( $0.33 \pm 0.12$ ), mientras que el control (In-111) se acumula en el hígado ( $12.9 \pm 0.4 \pm 5.1\%$ ) y el tumor ( $0.26 \pm 0.06\%$ ). Todos los datos de biodistribución se muestran en la figura 25, así como los datos que mostraron diferencias significativas en el análisis de varianza ( $p < 0.05$ ).

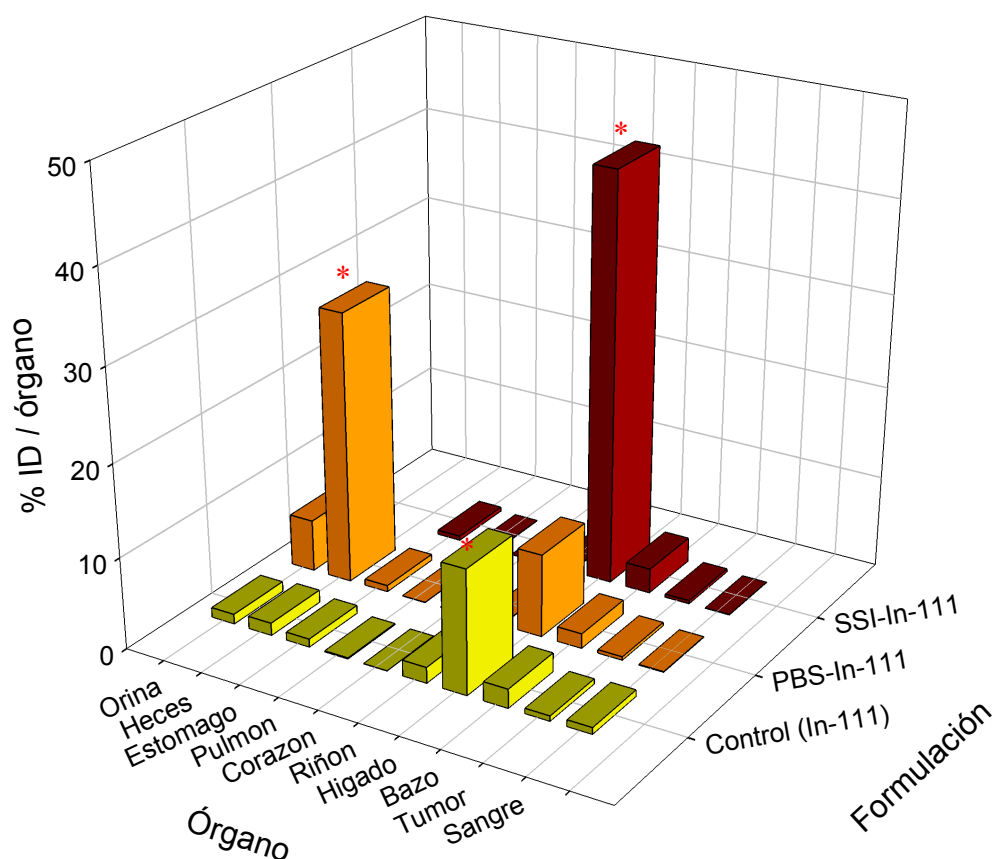


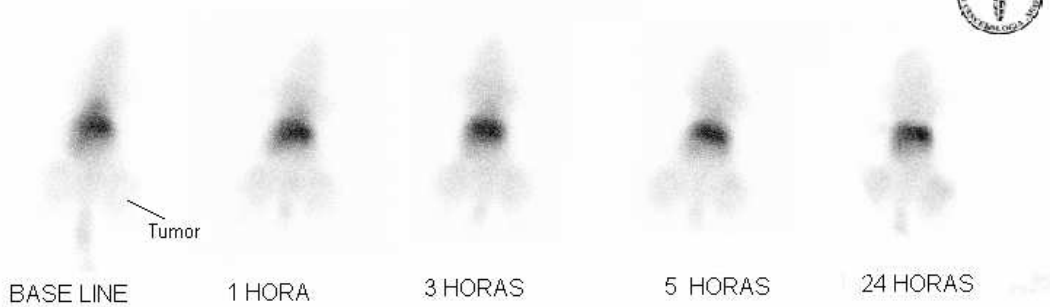
Figura 25. Gráfica del estudio de biodistribución en un modelo tumoral de CaCu.

El estudio de biodistribución en el modelo tumoral muestra que los liposomas marcados con In-111 y elaborados con PBS se acumulan mayoritariamente en hígado ( $8.45 \pm 0.6\%$ ), bazo ( $11.05 \pm 2.7\%$ ) y el tumor ( $0.28 \pm 0.03$ ).

Se probaron estos liposomas en el modelo tumoral para ver que tanto se acumulaba en la zona tumoral, obteniéndose como resultado que se acumula muy poco. Como la entrega de fármaco es de manera pasiva es necesario que el tiempo de circulación sea prolongado para que se pueda acumular en el tumor y así el cisplatino y la radiación puedan realizar el efecto terapéutico.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA - DEPARTAMENTO DE MEDICINA NUCLEAR

Control (In-111)



Lip- SSI / In-111



Lip- PBS / In-111



Figura 27. Imágenes  $\gamma$ -gráficas de los liposomas en un modelo tumoral.

En las imágenes gamma gráficas de los liposomas elaborados en SSI y PBS podemos observar que los liposomas no se acumularon en la zona tumoral, ya que son eliminados por captura de RES, en cambio en las imágenes del control (In-111) podemos observar una alta acumulación en los tumores desde la administración, pero también se esta acumulando en todos los tejidos.

**Parámetros farmacocinéticos.**

En la tabla 11 se muestra los resultados del análisis farmacocinético.

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos.

Formulación de liposomas	$K_{el} (h^{-1})$	$ABC_0^{5h}$	$ABMC_0^{5h}$	TMR ( h)	T 1/2
SSI-In111	0.1471	635.67	4460.40	7.02 ± 1.4	4.71± 0.9
SSI - Tc-99	0.4128	200.23	506.67	2.53 ± 0.3	1.68 ± 0.2
PBS-Tc-99	0.2404	363.19	1607.88	4.43 ± 0.5	2.88 ± 0.4
PBS-In111	0.0471	2086.02	44702.51	21.43 ± 10.1	14.72 ± 6.5

El análisis farmacocinético indicó que tanto los liposomas elaborados en SSI como los preparados en PBS y marcados con Tc-99m se eliminan muy rápido del torrente sanguíneo ya que el TMR es de aproximadamente 2 h. Se observa un aumento del TMR en los liposomas que fueron preparados en PBS y marcados con In-111, aunque el resultado no es confiable, ya que la cámara gamma sufrió una descalibración lo que hizo que perdiera resolución y que el análisis de las regiones de interés de dos de las cinco imágenes gamma gráficas fuera menos preciso. Por lo anterior se recomienda hacer el estudio nuevamente con la cámara calibrada, aumentar el número de animales y volver hacer el análisis farmacocinético.

En la gráfica 27 se evalúa la capacidad de los liposomas para permanecer en la circulación sanguínea, observándose que los liposomas marcados con Tc-99m son rápidamente eliminados por una pronta respuesta del RES; no así los liposomas elaborados en PBS y marcados con In-111 que aumentan su estadía en la circulación sanguínea. Lo cual quiere decir que las modificaciones que se le realizaron a la primera formulación de liposomas ayudaron a aumentar su tiempo de circulación sanguínea.

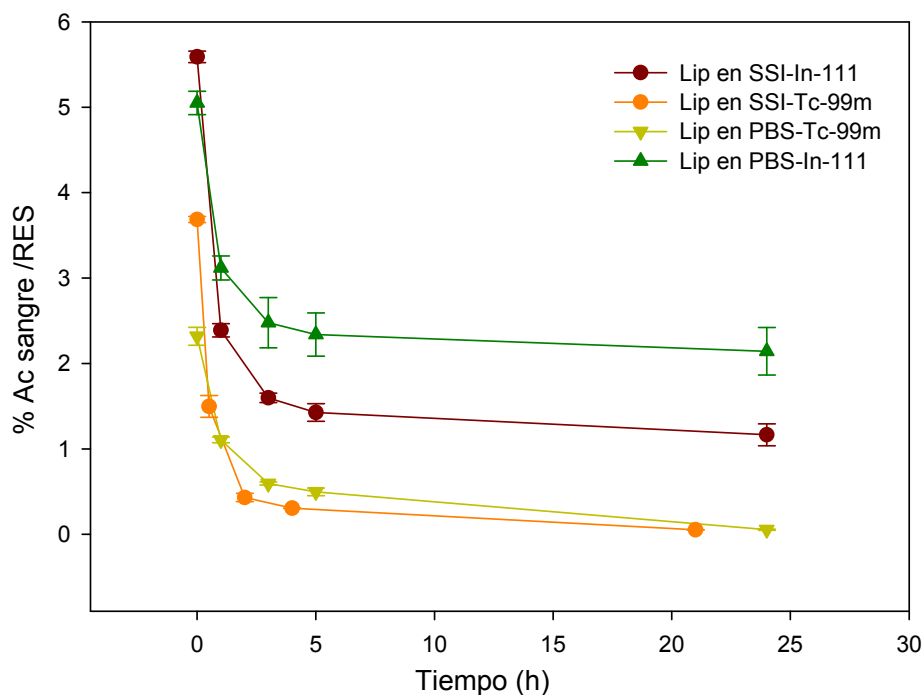
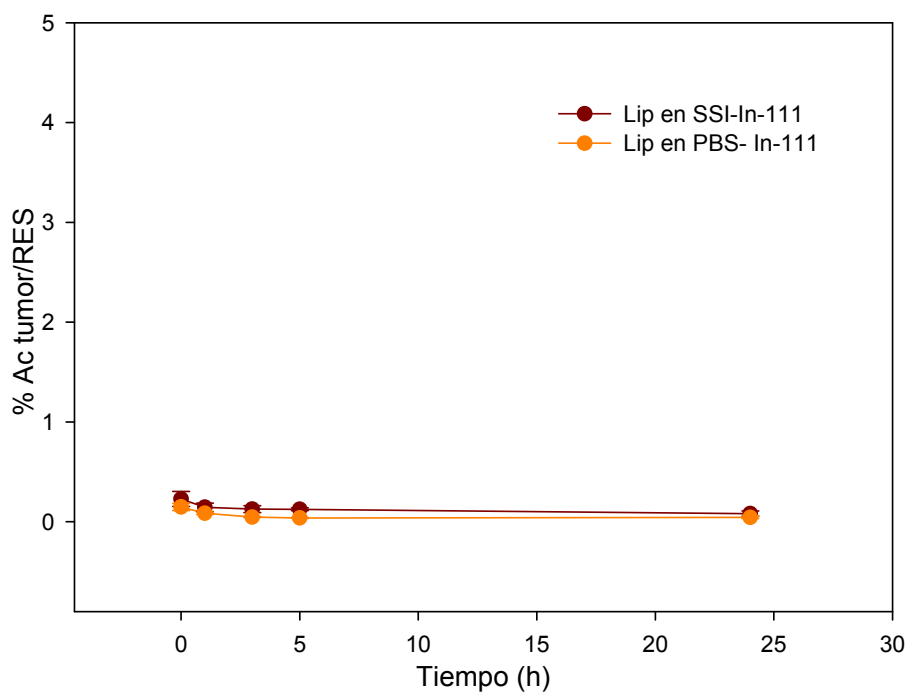


Figura 27. Gráfica de permanecía de los liposomas en circulación sanguínea.

En la figura 28 se evalúa la capacidad de los liposomas a acumularse en el tumor, observándose que los liposomas elaborados tanto en SSI como en PBS y marcados con In-111 no se están acumulando en el tumor, debido a que están siendo capturados por el RES.



---

Figura 28. Gráfica de acumulación en el tumor.

## **6. CONCLUSIONES.**

Los resultados en el presente trabajo de investigación mostraron que todas las formulaciones de liposomas estudiadas presentaron una rápida eliminación, posiblemente asociada a una rápida respuesta del sistema reticuloendotelial (RES), lo cual impidió que éstos se acumularan de forma significativa en el tejido tumoral.

Por otra parte, los resultados también mostraron que la biodistribución de los liposomas fue “muy limpia”, es decir, no se acumularon en todos los tejidos del organismo, y sólo en algunos órganos específicos, lo cual nos sugiere una reducción significativa de los efectos tóxicos secundarios del cisplatino y del agente de radioterapia. El estudio mostró que los órganos de mayor acumulación fueron el hígado y el bazo, los cuales se caracterizan por una gran tolerancia a la quimioterapia y a la irradiación.

En la literatura se encontró que formulaciones similares a las desarrolladas en este trabajo de tesis tenían un tiempo de vida media de 17.3 h<sup>6,8,20,59</sup>, encontrándose que la única diferencia entre ellas es que el radionúclido utilizado en nuestro marcaje, está unido a la superficie del liposoma. Se cree que esto influye en un rápido reconocimiento por parte del sistema inmune que promueve su eliminación de la circulación sanguínea. Se plantea en un futuro, y como parte de la investigación, la posibilidad de encapsular el radionúclido al interior del liposoma, con el fin de evaluar el tiempo de residencia en la circulación sanguínea.

Si bien los resultados no han sido del todo favorables, se espera que al hacer modificaciones a la formulación para encapsular el radionúclido, se incremente el tiempo de residencia en la circulación y permita una mayor acumulación en el tumor; para posteriormente evaluar su potencial terapéutico.

-



---

**7. BIBLIOGRAFÍA.**

- 1 Alison K. Holzer, Gerald H. Manorek, and Stephen B. Howell. Contribution of the Major Copper Influx Transporter CTR1 to the Cellular Accumulation of Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. *Molecular Pharmacology*. 2006, 70 (4) 1390-1394.
- 2 Allen, T.M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv.* 1994. 13, 285-309.
- 3 Armes Chandra. *Nuclear Medicine Physics. The basics.* Lippincott Williams and Wilkins. USA, 1992, 99-115.
- 4 Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.*2003, 23(5) 460- 464.
- 5 Attix, F.H., *Introduccion to Radiological Physics and Radiation Dosimetry.* 1986, New York: Wiley.
- 6 Bao Ande, Goins Beth, Klipper Robert, Negrete George, and Phillips T William. Direct <sup>99m</sup>Tc Labeling of Pegylated Liposomal Doxorubicin (Doxil) for Pharmacokinetic and Non-Invasive Imaging Studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2004, 308:419–425.
- 7 Bao Ande, Goins Beth, Klipper Robert, Negrete George, and Phillips T William. <sup>186</sup>Re-Liposome Labeling Using <sup>186</sup>Re-SNS/S Complexes: In Vitro Stability, Imaging, and Biodistribution in Rats. *The Journal of Nuclear Medicine.* 2003, Vol. 44 (12), 1992-1999.
- 8 Bao Ande, Goins Beth, Klipper Robert, Negrete George, and Phillips T William. A Novel Liposome Radiolabeling Method Using <sup>99m</sup>Tc-“SNS/S” Complexes: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2003, Vol 92 (9), 1893-1904.
- 9 Birgit Romberg, Wim E. Hennink, and Gert Storm. Sheddable Coatings for Long-Circulating Nanoparticles. *Pharmaceutical Research.* June, 2007.
- 10 Bradley J., Monk M. D. Development of an in vitro chemo-radiation response assay for Cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology.* 2002;87:193-199.

- 
- 11 Carlsson J. Aronsson E. F. Tumour therapy with radionuclides: assessment of progress and problems. *Radiotherapy and Oncology*. 2003;66:107-117.
  - 12 Carrió Ignasi, Gonzalez Patricio. *Medicina Nuclear. Aplicaciones clínicas*. Masson. España, 2003, 19-33
  - 13 Cherry N. Robert. *Radiaciones ionizantes. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. España, 2001.
  - 14 Compendio de cáncer / RHNM / 2001 / Morbilidad / Mortalidad. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm-01.htm>
  - 15 Crowe L.M., Womersley C., Crowe J.H., Reid D., Appel I, Rudolph A. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates: *Acta Biochem Biophys* (1986): 861; 131.
  - 16 Crowe L.M., Crowe J.H., Rudolph A., Womersley C., Appel I. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose: *Arch. Biochem. Biophys.*(1985): 242; 240.
  - 17 Daan J, Crommelin, Gert W. Bos and Gert Storm. *Liposomes. Successful Carrier Systems for Targeted Delivery of Drugs*. Business briefing. Pharmatech 2003 209-213.
  - 18 Daryl C. Drummond,<sup>1</sup> Olivier Meyer,<sup>2</sup> Keelung Hong, Dmitri B. Kirpotin, and Demetrios Papahadjopoulos. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmacological Reviews*. 1999. 691-743.
  - 19 Dedaly J.A., Low P.S. Enhanced folate receptor mediated gene therapy using a novel pH-sensitive lipid formulation: *J. Control Release*, (2000) 64; 27.
  - 20 Donald E. Owens III a, Nicholas A. Peppas. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 307 (2006) 93–102.
  - 21 Doménech J y Lauroba J. *Biofarmacia y farmacocinética: Volumen I: Farmacocinética*. Madrid. Síntesis S.A. 1997, 392-420.
  - 22 Duncan Ruth. Nanomedicines in action. *The Pharmaceutical Journal* (Vol 273), 2004. 485-488.

- 
- 23 Ebbesen Mette and Jensen Thomas G. Nanomedicine: Techniques, Potentials, and Ethical Implications. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2006.
  - 24 Goins A. Beth, Awasthi V.D., Klipper Robert and Phillips T. William. Dual radiolabeled liposomes: Biodistribution studies and localitation of focal sites of infection in rats. Nuclear Medicine and Biology. Vol. 25,1998,155-160.
  - 25 Goins A. Beth and Phillips T. William. The use of Scintigraphic Imaging during liposome drug development. Journal of Pharmacy Practice. Volumen 14, No 5, October 2001, 397-406.
  - 26 Hall J. Erick. Radiobiology for the radiologist. Lippincott Company. 4<sup>a</sup> edición. Philadelphia, 1994.
  - 27 Hardman G. Joel, Limbirol E. Lee, Ruddon W. Raymond y Gilman Goodman Alfred. Las bases biológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill. Interamericana. 9<sup>a</sup> edición, vol II. 1996.
  - 28 Harris J. Milton and Chess B Robert. Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nature Reviews. Drug Discovery. 2003. Volumen 2. 214-221.
  - 29 Janoff S. Andrew. Liposomes Rational design. Marcel Dekker, Inc. 1999. USA.
  - 30 Juárez Osornio Carlos. 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. Tesis Facultad de Química, UNAM. México, 2006
  - 31 Katzung Bertran G. Compendio de farmacología. Manual moderno, México. 1987.
  - 32 Katarzyna Woźniak and Janusz B Asiak. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. Acta Biochimica Polonica. 2002, 49(3) 583-596.
  - 33 Kelland Lloyd. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nature Reviews cancer. 2007, 574 – 584.
  - 34 Khan, F.M.,The Physics of Radiation Therapy, L.W.A. Wilkins, Editor. 1984: Baltimore.
  - 35 Koda Kimble Mary A. Young Yee L., Kradjan A. Wayne. Aplied therapeutics the clinical use of drugs. 8<sup>a</sup> edición.

- 
- 36 Lasic D. Danilo. Basic. Liposomes. Science and Medicine. May/ June, 1996
- 37 L.M Crowe and Crowe J.H. Factors affecting the stability of dry liposomes: Acta Biochim Biophys. (1998): 939; 327.
- 38 Lasic D. Danilo. Liposomes in gene delivery. CRC press. 1997. U.S.A. pp 67-113.
- 39 López 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 Pharmacological and Toxicological Methods. 2005, (52), 366-372.
- 40 McDugall R. Systemic Radiation Therapy with Unsealed Radionuclides. Seminaris in Radiation Oncology. 2000(10)2:91-102.
- 41 Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI and Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. British Journal of Pharmacology (2007) 150, 552–558.
- 42 Moghimi S.M., Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Progress in Lipid Research. 2003.
- 43 Morales A. José. “Quimioterapia antineoplásica”. Biocáncer 1, 2004.
- 44 Pain, D., Das, P.K., Ghosh, P.C., Bachhawat, B.K. Increased circulatory half-life of liposomes after conjugation with dextran. J. Biosci. 1984, 6, 811-816.
- 45 Pinar Sedeño Beatriz y Lara Jiménez Pedro C. Generalidades en oncología radioterápica (II) radiobiología. Biocancer. 2004,1,1-14
- 46 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.
- 47 Phillips T. William. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. Advanced Drug Delivery. 1998.
- 48 Placencia C. Carmen y Esteve A. Albert. Actividad in vitro de Oxoplatino y otros fármacos y demostración de la reversión de la resistencia a 5-fluorouracilo. Tesis Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. 2002.
- 49 Ramos Alfredo, Hervás Asunción, Montero Ángel, Morera Rosa, Sancho Sonsoles, Córdoba Sofía, Corona Juan Antonio y Rodríguez Isabel. La

- 
- oncológica radioterápica moderna: Situación actual. *Psicooncología*. Vol. 1, Núm. 1, 2004, pp. 13-30.
- 50 Rajni Sinha, Gloria J. Kim, Shuming Nie, and Dong M. Shin. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(8), 1909-1917.
- 51 Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J Radiat Biol*. 1994 Jan;65 (1):27-33.
- 52 Rose P. G. Chemoradiotherapy for cervical cancer. *European J. of Cancer* 2002,38: 270-278.
- 53 Sears W. Francis, Zemansky W. Francis, Young D. Hung, Freedman A. Roger. *Física Universitaria*. Addison wesley. 9ª edición. México, 1999.
- 54 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.
- 55 Seong Hoon Jang, M. Guillaume Wientjes, Dan Lu, and Jessie L.-S. Au. Drug Delivery and Transport to Solid Tumors. *Pharmaceutical Research*, Vol. 20, No. 9, September 2003. 1337-1350.
- 56 Stewart J. Colorimetric Determination of Phospholipids with Amonium Ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1980;104:10-14.
- 57 Teni Boulikas and Maria Vougiouka. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncology Reports*. 2003 ,10 1663-1682.
- 58 Thomas R Stephen. Options for radionuclide therapy: From fixed activity to patient-specific treatment planning. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2002;17(1):71-82.
- 59 Torchilin P. Vladimir. Targeted pharmaceutical nanoacarrriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS journal* 2007;9(2)E128-E147.
- 60 Torchilin P. Vladimir. Recent advances with liposomes pharmaceutical carriers. *Reviews Nature. Drug discovery*. 2005, (4); 145-160.
- 61 Vlerken van Lilian E., Tushar K. Vyas, and Mansoor M. Amiji. Poly(ethylene glycol)-modified Nanocarriers for Tumor-targeted and Intracellular Delivery. *Pharmaceutical Research*, Vol. 24, No. 8, August 2007. 1405 -1414.

- 
- 62 Wang CJ, Leung SW, Chen HC, Sun LM, Fang FM, Huang EY, et al. The correlation of acute toxicity and late rectal injury in radiotherapy for cervical carcinoma: evidence suggestive of consequential late effect (CQLE). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 85-91.
- 63 Woodle, M.C., Newman, M.S., Martin, F.J. Liposome leakage and blood circulation: comparison of adsorbed block copolymers with covalent attachment of PEG. *Int. J. Pharm.* 1992, 88, 327-334.
- 64 Woodle, M.C., Lasic, D.D. Sterically stabilized liposomes. *Acta Biochim. Biophys.* 1992 1113, 171-199.
- 65 Yashar C. M., Spanos W. J. Potentiation of the radiation effect with genistein in cervical cancer cells. *Gynecologic Oncology*. 2005;99:199-205.
- 66 Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from Host-Cell Control in Early events in carcinogenesis. *J. of Nat Cancer Institute*. 1989; 92: 690-698.

## ANEXO 1.

### Conceptos básicos de la física de radiaciones.

**Radiación:** Es la energía transmitida a través del espacio en forma de ondas electromagnéticas o de partículas energéticas<sup>53</sup>.

### Radiación de partículas.

Es la emisión y propagación de energía a través del espacio por partículas subatómicas que se mueven a grandes velocidades. Los protones, las partículas alfa y beta, son algunos de los tipos más comunes de radiación de partículas.

### Radiación electromagnética.

Es una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio transportando energía de un lugar a otro<sup>53</sup>. En la siguiente figura se muestra el espectro electromagnético.

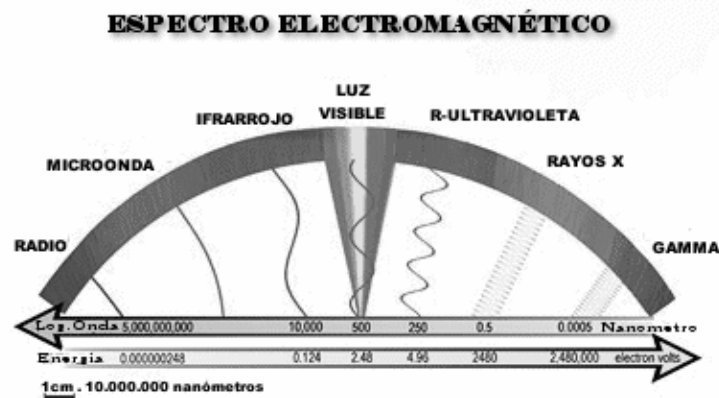
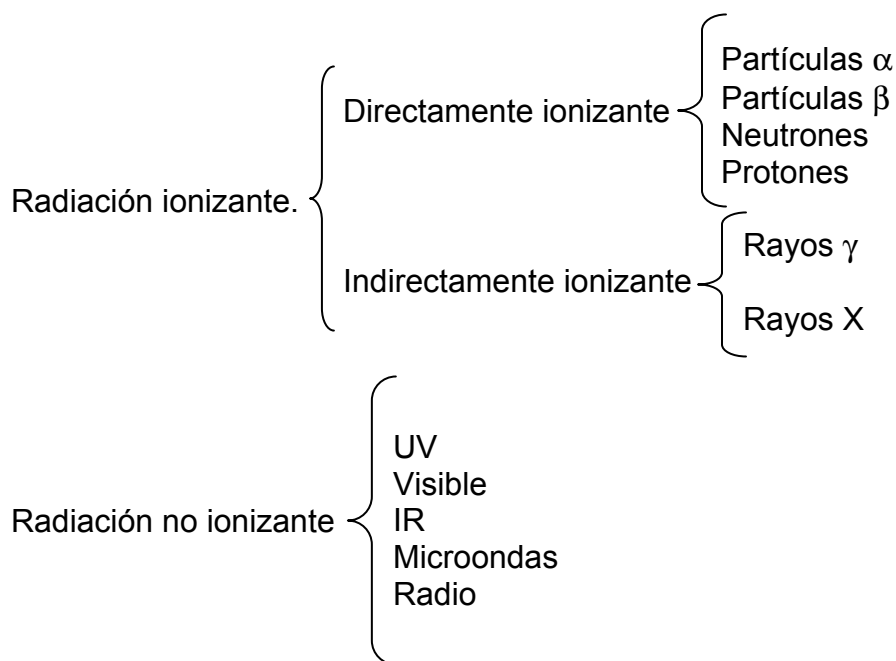


Figura 29. El espectro electromagnético es una escala en la que puede situarse cualquier onda de energía. En dicha escala se representa la frecuencia, así como la longitud de onda de la radiación electromagnética, siendo ambas inversamente proporcionales, es decir, a mayor frecuencia menor longitud de onda.

### Radioactividad.

Es una propiedad de ciertos elementos químicos cuyo núcleo atómico es inestable y se descompone en otro más estable que él, a la vez que hay un desprendimiento de energía conocido como radiación<sup>13,53</sup>.

El núcleo que resulta de la desintegración puede no ser estable, y entonces se desintegra en un tercero, el cual puede continuar el proceso, hasta que finalmente se llega a un núcleo estable. Se dice que los sucesivos núcleos de un conjunto de desintegraciones forman una serie radiactiva o familia radiactiva. Según su naturaleza la radioactividad se divide en:



### Partículas $\alpha$ .

Es un conjunto de dos protones y dos neutrones expulsados del núcleo de un átomo, es idéntica a un núcleo de helio ( $^4\text{He}$ ). Los radionuclidos emisores de partículas  $\alpha$  son en general núcleos relativamente pesados como Radio (Ra), Radón (Rn), Torio (Th) y Uranio (U).

Los emisores alfa emiten partículas  $\alpha$  con energías cinéticas entre unos 4 y 6 MeV; el alcance de estas partículas  $\alpha$  no sobrepasa los 5 cm.

Los emisores  $\alpha$  no representan por lo general ningún peligro de radiación externa. Sólo son peligrosos si se captan al interior del cuerpo; como depositan su energía a corta distancia pueden generar un gran daño en los tejidos<sup>5,13,26,53</sup>.



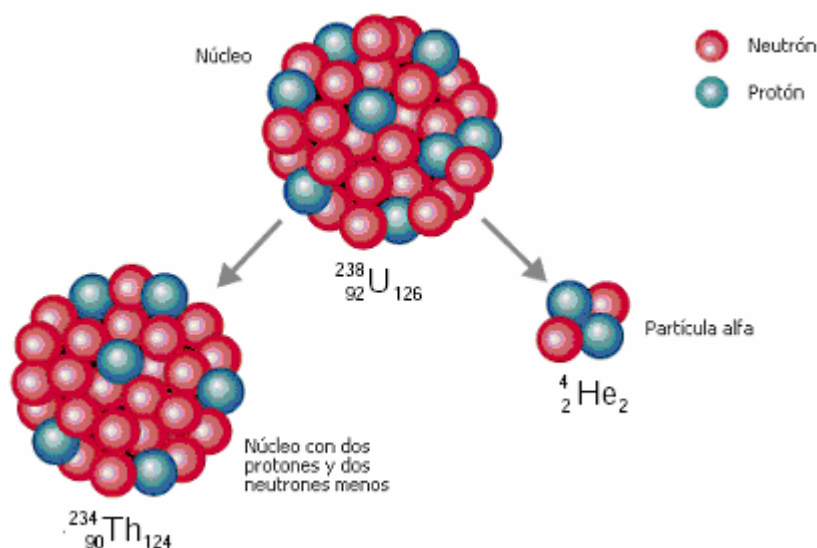


Figura 30. Una partícula  $\alpha$  está formada por dos protones y dos neutrones que actúan como una única partícula. Cuando un núcleo radiactivo inestable emite una partícula alfa, su número atómico (el número de protones) y su número de neutrones disminuyen en dos, mientras que su número másico se reduce en cuatro.

### Partícula $\beta$ .

Una partícula beta es un electrón ( $\beta^-$ ) o positrón<sup>†</sup>( $\beta^+$ ) muy energético. Los radionuclidos emisores beta pueden ser de peso atómico alto o bajo como Tritio ( ${}^3\text{H}$ ), Carbono ( ${}^{14}\text{C}$ ), Fósforo ( ${}^{32,33}\text{P}$ ) y Azufre ( ${}^{32}\text{S}$ ).

La emisión de una partícula beta menos ( $\beta^-$ ) implica la transformación de un neutrón en un protón, un electrón y una tercera partícula llamada antineutrino<sup>‡</sup>. El electrón y el antineutrino son expulsados del núcleo con una energía variable. Como resultado tenemos un núcleo con el mismo número másico y número atómico  $Z+1$ . La desintegración  $\beta^-$  suele ocurrir con núcleos en los que la proporción neutrón-protón ( $N/Z$ ) es demasiado grande para tener estabilidad.

La emisión de una partícula beta más ( $\beta^+$ ) implica la transformación de un protón en un neutrón, un positrón y un neutrino<sup>§</sup> dentro del núcleo. El positrón y el neutrino son expulsados del núcleo con una energía variable. Como

<sup>†</sup> El positrón es la antipartícula del electrón. Tiene la misma masa y la mayoría de las demás propiedades del electrón, salvo su carga, cuya magnitud es exactamente la misma que la del electrón, pero de signo positivo.

<sup>‡</sup> Es la antipartícula de un neutrino. Es una partícula de carga nula, se mueve a una velocidad cercana a la velocidad de luz.

<sup>§</sup> Es una partícula elemental que pertenece al grupo de los leptones. Tiene spin  $\frac{1}{2}$ , y no tiene carga eléctrica.

resultado tenemos un núcleo con el mismo número másico y número atómico  $Z-1$ . La desintegración  $\beta^+$  suele ocurrir con núcleos en los que la proporción neutrón-protón ( $N/Z$ ) es demasiado pequeña para tener estabilidad<sup>53</sup>.

La vida del positrón es muy corta, por lo que no es fácil de observar en la naturaleza. Al difundirse en el medio, los positrones chocan con electrones libres produciéndose una reacción de "aniquilación". Como resultado, la masa de ambas partículas se convierte completamente en energía, produciendo dos fotones (rayos gamma) de alta energía que se proyectan en direcciones totalmente opuestas, a  $180^\circ$  uno del otro.

La desintegración por la emisión de un positrón compite con la captura de un electrón. Ya que hay unos pocos radionúclidos para los cuales  $\beta^+$  no es energéticamente posible.

En la desintegración con captura de electrón, el núcleo absorbe un electrón orbital (A medida que los electrones de las órbitas exteriores caen a niveles de energía más bajos para llenar el hueco dejado por el electrón expulsado, el átomo emite rayos X) y emite un neutrón y un neutrino; esta es posible siempre que el núcleo resultante tenga una energía total menor que la del núcleo inicial. En cambio, la desintegración con positrón exige que la energía total del átomo inicial sea mayor que la del átomo resultante en más de 1.02 MeV (dos veces la energía másica residual del positrón)<sup>5</sup>.

Las energías beta máximas típicas oscilan desde 18.6 keV para el tritio ( $^3\text{H}$ ) a 1.71 MeV para el fósforo 32 ( $^{32}\text{P}$ ). El alcance de las partículas beta en el aire es de unos 3.65 m por MeV de energía cinética.

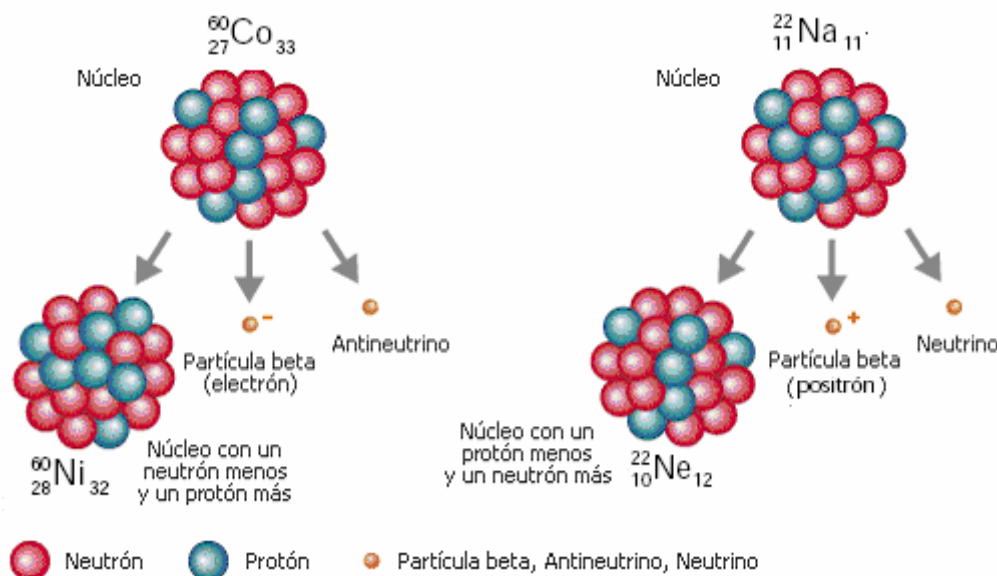


Figura 32. A la izquierda se muestra una desintegración  $\beta^-$ , donde un neutrón se convierte en un protón emitiendo un antineutrino y una partícula beta cargada negativamente. A la derecha se muestra una desintegración  $\beta^+$ , donde un protón se convierte en un neutrón emitiendo un neutrino y una partícula beta positivamente cargada.

### Rayos Gamma.

La radiación gamma es radiación electromagnética emitida por un núcleo cuando experimenta una transición de un estado de energía más alta a un estado energético más bajo<sup>53</sup>. El número de protones y neutrones del núcleo no varía en estas transiciones. Ejemplos de emisores de rayos gamma son el Cobalto ( $^{60}\text{Co}$ ), el Zinc ( $^{65}\text{Zn}$ ), Cesio ( $^{137}\text{Cs}$ ) e Indio ( $^{111}\text{In}$ ).

Los rayos gamma se emiten a menudo inmediatamente después de una desintegración alfa o beta. Los rayos gamma también pueden ser el resultado de la captura de un neutrón y de la dispersión inelástica de partículas subatómicas por núcleos<sup>5</sup>.

La conversión interna compite con la emisión gamma cuando un núcleo se transforma de un estado de más energía a otro de energía menor. En la conversión interna, en lugar de emitirse un rayo gamma desde el núcleo, se expulsa un electrón de una órbita interior del átomo. A medida que los electrones de las órbitas exteriores caen a niveles de energía más bajos para llenar el hueco dejado por el electrón expulsado, el átomo emite rayos X. La probabilidad de conversión interna frente a la probabilidad de emisión gamma aumenta con el número atómico<sup>5,13,53</sup>.

---

Mientras que las partículas alfa y beta tienen alcances definidos en la materia, los rayos gamma experimentan una atenuación exponencial a medida que atraviesan la materia. La atenuación de los rayos gamma viene dada por:

$$I(x) = I(0) \cdot e^{-\mu x}$$

donde  $I(x)$  es la intensidad de los rayos gamma en función de la distancia  $x$  en el material y  $\mu$  es el coeficiente másico de atenuación. El coeficiente másico de atenuación depende de la energía de los rayos gamma y del material con el que interactúan los rayos gamma.

### **Rayos X.**

Los rayos X son una radiación electromagnética y, en ese sentido, son idénticos a los rayos gamma. La distinción entre rayos X y rayos gamma radica en su origen. Mientras que los rayos gamma se originan en el núcleo atómico, los rayos X resultan de interacciones en las capas electrónicas del átomo. Aunque a menudo los rayos X tienen energía inferior a la de los rayos gamma, éste no es el criterio que los diferencia; ya que se pueden producir rayos X con energías mucho más elevadas que las de los rayos gamma procedentes de la desintegración radiactiva. Ejemplos emisores de rayos X son los radioisótopos Yodo ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ )<sup>5,13</sup>.

Los rayos X pueden producirse durante el proceso de desintegración radiactiva (captura de electrón y conversión interna) o como radiación de frenado (bremsstrahlung)<sup>5,13,26,53</sup>.

En la radiación de frenado los rayos X son producidos mediante la aceleración de partículas cargadas (electrones principalmente) que circulan a través de una gran diferencia de potencial eléctrico. Las partículas son después frenadas rápidamente en un material denso y resistente al calor, como el Tungsteno (W) o el Cobre (Cu); como resultado de las interacciones se obtiene un espectro continuo de rayos X de frenado, conocidos como bremsstrahlung, con una energía máxima igual a la energía cinética de los electrones incidentes<sup>13</sup>.

---

Los rayos X interactúan con la materia de igual manera que los rayos gamma, pero una simple ecuación de atenuación exponencial no describe con precisión la atenuación de rayos X con una gama continua de energías<sup>53</sup>.

### **Cantidades, unidades y definiciones.**

A continuación se da la descripción de algunas cantidades, unidades y definiciones que se suelen emplear en seguridad radiológica.

**Actividad.** Esta cantidad representa el número de transformaciones nucleares que se producen por unidad de tiempo. Su unidad es el Bequerel (Bq), esta definida como una desintegración por segundo.

**Constante de desintegración ( $\lambda$ ).** Es la constante de proporcionalidad entre el número de desintegraciones por segundo y el número de átomos radiactivos:

$$\lambda = \frac{dN / N}{dt}$$

donde  $dN/N$  indica la fracción de los átomos de un radionúclido que se desintegran con respecto al total existente. La constante de desintegración se refiere a la fracción de los átomos que se desintegran por unidad de tiempo.

**Tiempo de vida media.** Es el tiempo en el cual la radioactividad decrece hasta la mitad de su valor inicial. El tiempo de vida media se relaciona con la constante de desintegración mediante la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

**Decaimiento radioactivo.** Se refiere al índice mediante el cual un átomo inestable emite energía o se desintegra con respecto al tiempo. La actividad radioactiva decrece exponencialmente de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$A_t = A_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

---

donde  $A_t$  es la actividad radiactiva al tiempo  $t$ ,  $A_0$  es la actividad radiactiva inicial,  $\lambda$  es la constante de desintegración característica de cada radionúclido y  $t$  es el tiempo transcurrido.

**Concentración radiactiva.** La concentración radiactiva de una solución se refiere a la radiactividad por unidad de volumen de la solución (Bq/mL).

---

## ANEXO 2.

### Interacción de la radiación con la materia.

La materia está constituida por átomos, y la radiación ionizante interactúa con los núcleos y los electrones orbitales de los mismos con una probabilidad de ocurrencia que depende del tipo y energía de la radiación, así como también de la naturaleza del medio de interacción. En todos los casos el resultado de la interacción de la radiación con la materia son la excitación<sup>\*\*</sup> o la ionización<sup>††</sup> de los átomos del material de interacción<sup>34</sup>.

### Interacción de la radiación electromagnética con la materia.

La radiación electromagnética que nos interesa como interacciona con la materia, es básicamente la radiación gamma y los rayos X. Existen 3 mecanismos principales de interacción de los fotones de los rayos X y gamma con la materia:

- ✓ **Efecto fotoeléctrico:** Se produce cuando un fotón interacciona con un átomo expulsando uno de sus electrones orbitales de las capas electrónicas K, L, M o N. En este proceso, toda la energía del fotón ( $h\nu$ ) es transferida al electrón atómico; parte de la energía del fotón es usada para vencer la energía de enlace del electrón y el resto de la energía es otorgada al electrón en forma de energía cinética<sup>5</sup>. La energía cinética del electrón expulsado (fotoelectrón) es:

$$E_f = h\nu - W_o$$

donde  $W_o$  es la energía de enlace del electrón al átomo.

El átomo residual que resulta tras un efecto fotoeléctrico, es un ión positivo con una vacante en una capa profunda, por lo general la capa K; tal vacancia puede ser llenada por un electrón orbital de las capas electrónicas externas, dando como resultado la emisión de rayos X característicos que

---

<sup>\*\*</sup> Cuando un átomo recibe un aporte energético y los electrones pasan de una capa interna a una capa más externa.

<sup>††</sup> Cuando un átomo recibe un aporte energético que produce una separación completa del electrón de su átomo.

viajan algunos milímetros antes de volver a sufrir otra interacción (Figura 33)<sup>26</sup>.

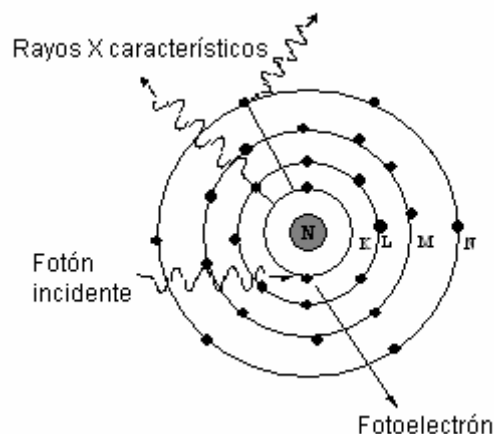


Figura 33. Efecto Fotoeléctrico.

- ✓ **Efecto Compton:** Para que el efecto Compton pueda ocurrir, se requiere que el fotón incidente tenga una energía mucho mayor a la energía de ligadura de los electrones de un átomo<sup>34</sup>. El fotón al chocar con un electrón (considerado libre y en reposo) se dispersa fuera de su dirección original y transmite parte de su energía al electrón; por lo consiguiente el electrón adquiere energía cinética y se aleja del átomo. El fotón dispersado tendrá una frecuencia  $\nu'$  menor a la frecuencia  $\nu$  del fotón incidente y podrá seguir interaccionando con más electrones del medio (Figura 34). La energía del fotón dispersado es:

$$h\nu = \frac{h\nu_0}{1 + \frac{h\nu_0}{m_0c^2}(1 - \cos\theta)}$$

donde  $m_0c^2 = 0.511 \text{ MeV}$  es la energía de la masa del electrón,  $h\nu_0$  es la energía del fotón incidente y  $\theta$  es el ángulo de desviación del fotón incidente.



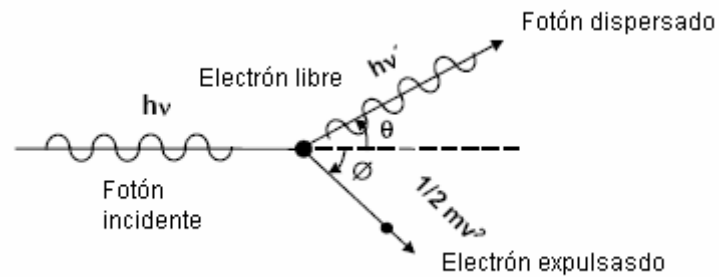


Figura 34. Efecto Compton.

Además el efecto Compton depende de la densidad electrónica del material y es casi independiente al número atómico.

- ✓ **Producción de pares:** Este tercer mecanismo de absorción de la radiación electromagnética por la materia sucede cuando un fotón incidente interactúa con la fuerza Coulombiana de un núcleo<sup>26</sup>. Sólo puede ocurrir cuando los fotones incidentes poseen una energía igual o mayor a 1.022 MeV; debido a que el fotón se materializa en un par electrón-positrón, y la energía electromagnética se convierte en energía en reposo (0.511 MeV tanto para el electrón como para el positrón)<sup>5</sup>. La energía sobrante se convierte en energía cinética de las partículas recién creadas. El principio de conservación de la energía se expresa:

$$h\nu = 1.022\text{MeV} + E_+ + E_-$$

donde  $E_+$  y  $E_-$  representan las energías cinéticas del positrón y del electrón respectivamente

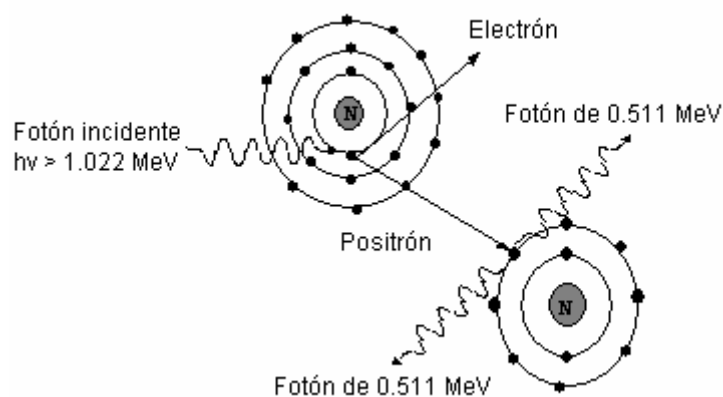


Figura 35. Producción de pares

Puesto que este proceso resulta de una interacción con el campo electromagnético del núcleo, la probabilidad de que ocurra se incrementa rápidamente con el número atómico.

Los positrones resultantes de la creación de pares, al igual que los procedentes de la desintegración  $\beta^+$ , se aniquilan al combinarse con electrones en el medio de interacción, produciendo así dos fotones de 0.511 MeV cada uno. El primer fotón es emitido isotrópicamente y el segundo se crea en dirección opuesta.

La energía del fotón y el material con el que interactúa determinan qué interacción es la más probable. La Figura 36 muestra las regiones en las que predomina cada tipo de interacción en función de la energía del fotón y del número atómico del absorbente<sup>13</sup>.

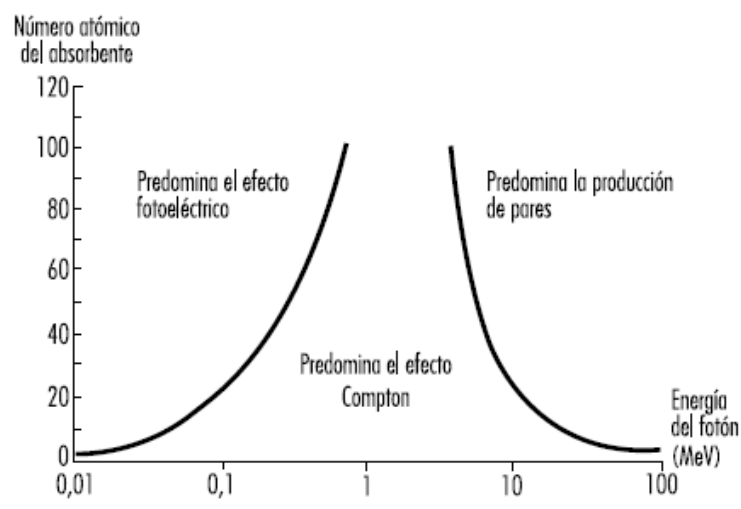


Figura 36. Importancia relativa de las tres interacciones principales de los fotones con la materia.

### **Interacción de partículas cargadas con la materia.**

La interacción de partículas cargadas con la materia tiene lugar a través de colisiones elásticas o inelásticas con núcleos atómicos, con electrones orbitales. Se dice que se tiene una colisión elástica cuando la energía cinética total del sistema, se mantiene constante. En cambio la interacción es inelástica cuando esa energía no se conserva; o sea cuando parte de la misma se transforma en algún otro tipo de energía. En términos generales las partículas

---

cargadas interactúan con la materia por una de las cuatro alternativas siguientes:

- ✓ Colisión elástica con electrones atómicos
- ✓ Colisión elástica con núcleos
- ✓ Colisión inelástica con electrones atómicos
- ✓ Colisión inelástica con núcleos

Cuando una partícula cargada atraviesa un medio se dan, con distintas probabilidades, algunos de los cuatro procesos indicados. En todos ellos la partícula pierde energía cinética ya sea cediéndola como tal a los electrones o al núcleo con el que interactúa y transformándola en energía de excitación, o convirtiéndola en radiación electromagnética (radiación de frenado).

#### **Interacción de partículas alfa.**

Una partícula alfa interactúa fundamentalmente con los electrones atómicos, produciendo principalmente ionización y excitación en los átomos del absorbente<sup>5</sup>. Las partículas alfa producen una ionización específica muy elevada, ya que pierden la totalidad de su energía en un recorrido muy corto.

Las partículas van perdiendo paulatinamente su energía, hasta que se detienen y capturan dos electrones del entorno, convirtiéndose en átomos de helio.

Estas partículas emitidas por los núcleos atómicos con energías comprendidas entre los 3 y los 6 MeV, con un alcance en el aire de 5 cm y 60µm en tejido biológico<sup>5,13</sup>.

#### **Interacción de partículas beta y electrones.**

Los mecanismos de interacción de partículas ligeras, tales como los electrones y partículas beta, son las colisiones con electrones atómicos que producen ionización y excitación a bajas energías de la partícula ligera, y de radiación de frenado, en el caso de partículas de alta energía.

---

Cuando un electrón o una partícula beta de alta energía pasa cerca de un núcleo, sus campos electromagnéticos interactúan y las partículas se atraen. El electrón al ser menos masivo que el núcleo experimenta una desaceleración y su trayectoria sufre una desviación. La velocidad del electrón disminuye, en consecuencia disminuye su momento y su energía. Para no violar las leyes de conservación en este proceso, el electrón emite un fotón en la dirección original de su movimiento, al que se denomina Bremsstrahlung o radiación de frenado<sup>26</sup>.

En el caso de partículas beta o electrones, el alcance depende de su energía cinética, de la densidad de electrones del absorbente, que a su vez depende de  $Z/A$ .

## ANEXO 3.

### Cámara gamma.

En 1960 Hal Anger construyó la primera cámara gamma que permitió hacer imágenes estáticas de la biodistribución de los radiofármacos<sup>‡‡</sup>. En la actualidad la cámara gamma es uno de los principales instrumentos para la obtención de imágenes fisiológicas en medicina nuclear utilizadas en el diagnóstico de enfermedades<sup>3,12</sup>.

La función básica de la cámara gamma es proporcionar una imagen de la distribución del radiofármaco inyectado en el paciente. El radiofármaco emite rayos gamma que escapan del cuerpo y son detectados por la cámara gamma. La cámara gamma consta de cuatro partes básicas: colimador, cristal detector (NaI(Tl)), tubos fotomultiplicadores (TPM) y procesamiento de imágenes (Figura 37).

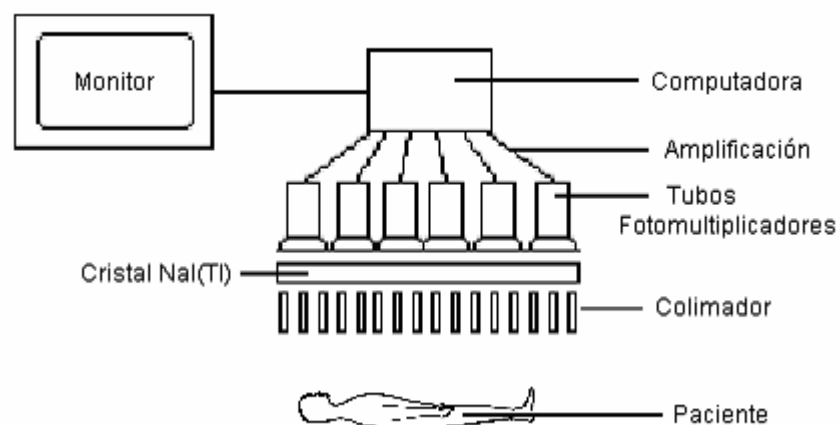


Figura 37. Esquema general de una cámara gamma o gamma cámara

### Colimador.

A poyado sobre el detector está el colimador, elemento intercambiable, que se elige de acuerdo a las necesidades del estudio. Es de plomo o tungsteno y consta de un conjunto de orificios, distribuidos de acuerdo con los distintos patrones geométricos.

*Anexo*

El colimador limita el campo de visión del detector y mejora la detección del sistema. Existen distintos colimadores (Figura 38), la elección de los cuales

<sup>‡‡</sup> Un radiofármaco se encuentra constituido por un fármaco o biomoléculas (anticuerpos monoclonales, policlonales o péptidos) y un radionúclido. Son utilizados en medicina nuclear para el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades.

depende del estudio que se va a realizar. En la selección hay que tener en cuenta la energía del radionúclido administrado y la geometría del órgano del cual hay que realizar la imagen. En los casos de órganos pequeños (tiroides, escafoides, cabeza femoral) se utiliza un colimador pinhole, de un solo agujero convergente, que posee muy buena resolución, muy baja sensibilidad y magnifica la imagen<sup>12</sup>.

Los colimadores utilizados con más frecuencia son los de orificios paralelos. De acuerdo con la geometría de fabricación de este tipo de colimadores, se pueden obtener colimadores de alta resolución (baja sensibilidad), alta sensibilidad (baja resolución), para todo estudio (resolución y sensibilidad intermedia), y ultra resolución (muy baja sensibilidad).

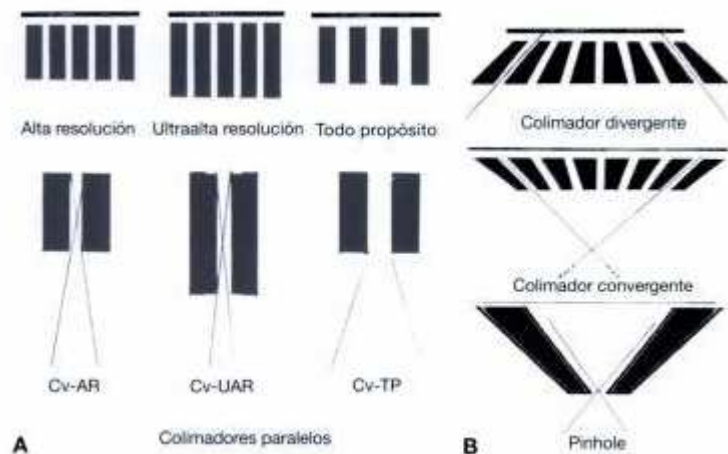


Figura 38. Diferentes tipos de colimadores: de agujero paralelo (A) con diferentes arreglos geométricos; y Pinhole (B) divergente; convergente.

**Detector.**

Los detectores más empleados consisten en un cristal de yoduro de sodio activado con talio (NaI (TI)). El espesor del cristal es habitualmente de ¼ o 3/8 pulgada (6.35mm o 9.52mm, respectivamente). La forma del cristal puede ser circular o rectangular<sup>3,12</sup>.

Cuando la energía de la radiación gamma interacciona con el cristal de NaI (TI), se produce luz en cantidad proporcional a la energía dispersada. Esta luz o fotón puede medirse y es proporcional a la energía absorbida en el cristal de NaI (TI).

### Tubos fotomultiplicadores.

Después de que el cristal de NaI (TI) convierte los rayos gamma en luz. Los tubos fotomultiplicadores convierten la luz en señales eléctricas. Luego, estas señales eléctricas se usan para determinar la posición y la energía de los rayos gamma.

El principio de la operación del PMT se muestra en la Figura 39. Al incidir un fotón en el fotocátodo, se desprende un electrón que es acelerado a una placa llamada dinodo, y éste provoca el desprendimiento de más electrones, los cuales son acelerados a un segundo dinodo. Este proceso se repite varias veces, de modo que ocurre una multiplicación de electrones de  $10^6$  veces desde al fotocátodo hacia el ánodo. Este pulso eléctrico es amplificado y analizado para determinar la energía del fotón absorbido<sup>3,12</sup>.

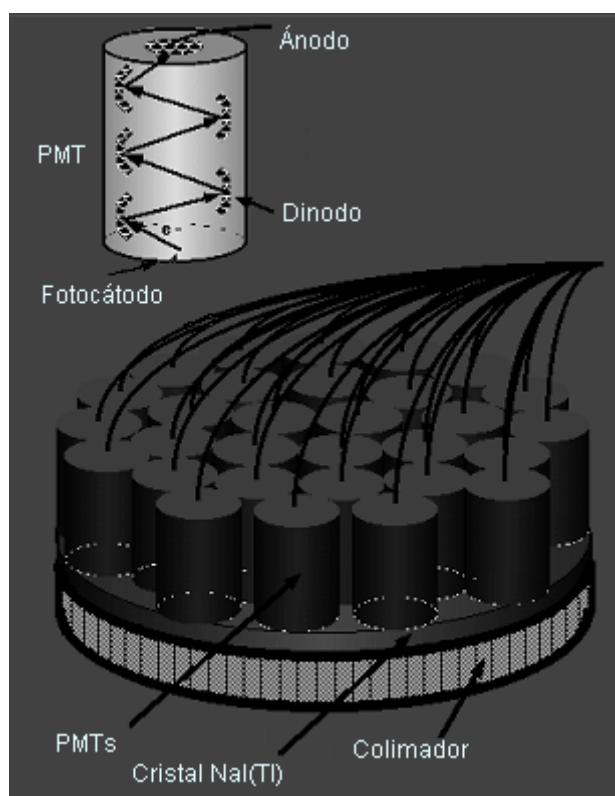


Figura 39. Esquema de un tubo fotomultiplicador.

### Determinación la localización espacial (coordenadas X, Y).

A la salida de cada PMT entra en un amplificador. Las señales de los amplificadores se combinan en cuatro señales ( $x^+$ ,  $x^-$ ,  $y^+$ ,  $y^-$ ). Los pulsos

---

electrónicos (X, Y), generados en los fotomultiplicadores, definen la localización de los sucesos radiactivos.

Las señales son amplificadas y después filtradas, cuando estas se encuentran dentro del rango de energía predeterminado la información se utiliza para formar la imagen del evento<sup>12</sup>.

El propósito de la discriminación de energía que realiza el analizador de altura de pulsos, es aceptar la mayor cantidad posible de cuentas sin dispersión y rechazar la mayor cantidad posible de cuentas dispersas.

Sin embargo los rayos gamma pueden dispersarse cuando atraviesan el tejido, cambiando su dirección. Una vez que el rayo gamma se dispersa, ya no es posible determinar de qué parte del paciente fue originalmente emitido<sup>3,12</sup>.

### **Sistema de cómputo.**

Las computadoras en medicina nuclear se usan para la adquisición, almacenamiento y manipulación de imágenes gamma - gráficas.

Después de que las señales son amplificadas pasan a un convertidor analógico-digital que las transfiere hacia una computadora. A está también ingresa la información sobre la cantidad de fotones que interaccionaron con el cristal. Esta información se guarda en la imagen digital, la cual se puede procesar y copiar sin que se pierda su resolución o se haga más ruidosa<sup>12</sup>.

Cada píxel de la imagen está representado por un número binario. Este número indicará la actividad proveniente de la fuente radiactiva y determinará la intensidad de acuerdo al color asignado en la imagen gamma gráfica. Las escalas de colores o grises pueden ser lineales, exponenciales (resaltan zonas calientes), logarítmica (resalta zonas frías y tibias), etc.<sup>12</sup>.

La matrices que se usan son cuadradas de 64 x 64, 128 x 128, 256 x 256, etc. La elección del tamaño de la matriz depende de la resolución espacial del equipo, tamaño del campo visual del detector y de la estadística de recuento.



En medicina nuclear se hacen estudios estáticos y dinámicos. En los primeros se obtienen imágenes independientes entre si, mientras que en los segundos se obtiene una serie de imágenes en distintos intervalos de tiempo.