



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN TERAPÉUTICA DE UN SISTEMA LIPOSOMAL DE**

**CISPLATINO-MIFEPRISTONA EN UN MODELO TUMORAL DE CÁNCER**

**CERVICOUTERINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**FABRICIO NOEL LEDEZMA GALLEGOS**

TUTORA PRICIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN TERAPÉUTICA DE UN SISTEMA LIPOSOMAL DE**

**CISPLATINO-MIFEPRISTONA EN UN MODELO TUMORAL DE CÁNCER**

**CERVICOUTERINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**FABRICIO NOEL LEDEZMA GALLEGOS**

TUTORA PRICIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 26 de mayo de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **LEDEZMA GALLEGOS FABRICIO NOEL** con número de cuenta **512024844**, con la tesis titulada "**DESARROLLO Y EVALUACIÓN TERAPÉUTICA DE UN SISTEMA LIPOSOMAL DE CISPLATINO-MIFEPRISTONA EN UN MODELO TUMORAL DE CÁNCER CERVICOUTERINO**", realizada bajo la dirección de la **DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ  
Secretario: DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO  
Suplente: DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ  
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de junio de 2014



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)** y al **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** por alojarme y brindarme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente.

Al **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT)** por la beca número 440884/270121, otorgada para la realización de este proyecto. Este trabajo también fue apoyado por el proyecto CONACyT 142062.

A la **Dra. Marcela Lizano Soberón** y al **Dr. Alejandro Zentella Dehesa**, miembros de **COMITÉ TUTORAL**, por sus valiosas aportaciones para mejorar este proyecto.

## **GRACIAS:**

A **DIOS**, por acompañarme en esta travesía y ponerme siempre en el camino correcto; por darme la paciencia y la fuerza en momentos difíciles.

Al **Instituto Nacional de Cancerología** y todas las personas que lo conforman, por albergarme y ofrecerme las facilidades para realizar este proyecto.

A la **Dra. Patricia García López**, por su enseñanza, confianza y apoyo incondicional durante estos años.

Al **Dr. Luis Alberto Medina Velázquez** por su colaboración, atención y tiempo dedicados a mi formación.

A la **Dra. Jazmín Pérez Rojas**, la **Dra. Roser Mir** y al **M. C. Enrique Pérez**, por los consejos, observaciones, enseñanzas y apoyo para culminar este trabajo.

A **Rafael Jurado**, por tu ayuda, confianza, paciencia y pláticas pero sobre todo, por tu amistad.

A **Mario Romero Piña**, por las horas dedicadas en el microPET/CT.

A **Mario** y **César**, por el café y sus amenas pláticas.

A **Mario Flores**, por las bromas, risas y amistad.

A los compañeros del laboratorio, **Alfonso, Héctor, Karla, Itzel, Jose, Vanessa, Érick, Monse, Miriam, Michel, Rosy, Ishell, Carolina, Karen** y **Jannette**, gracias por todo.

A **Adriana Lévianos, Adriana García, Juana, Yadira, Rubí, Ela, Claudia** y **Jocelin**, por su amistad incondicional, consejos y compañía.

A **Axel, Elisa, Naty, Chacha, Danilo** y **Jorge**, por ser mi familia en el D.F. y nunca dejarme solo.

A **Laura**, por aparecer en mi camino cuando más lo necesitaba, por motivarme y darme esperanza, por las alegrías, compañía y cariño, por tu paciencia y por ayudarme a crecer. Siempre habrá algo de ti en mí; siempre te recordaré. Eternamente gracias.



## **DEDICADO A:**

**Mi mamá**, mi ángel de la guarda. Por confiar en mí, por motivarme, por ser mi ejemplo a seguir y enseñarme el verdadero significado de ser una buena persona; por enseñarme que el esfuerzo siempre tiene recompensas.

**Mi papá**, por creer en mí, por tu apoyo incondicional, por tus consejos, por enseñarme la importancia del trabajo y la constancia.

**Mi hermano**, mi mejor amigo. Por tus consejos y motivación diaria, por tu apoyo, por hacerme reír incluso cuando peor estaba. Por acompañarme y recordarme mi camino.

La vida la hacemos todos pero no habría vida sin Ustedes. No hay suficientes palabras que expresen mi gratitud; simplemente gracias por siempre estar conmigo. Nunca los defraudaré.

**Mamá Eva**, por tus enseñanzas, pláticas, apoyo y ejemplo.

**Papá Chucho**, mi maestro de vida. Tu recuerdo va a donde yo voy.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. ABSTRACT</b>	3
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>4. OBJETIVOS</b>	7
4.1. OBJETIVO GENERAL	7
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	7
<b>5. ANTECEDENTES</b>	8
5.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER	8
5.1.1. Definición	8
5.1.2. Incidencia	8
5.2. CÁNCER CERVICOUTERINO	9
5.2.1. Incidencia del cáncer cervicouterino	9
5.2.2. Diagnóstico y estadificación del cáncer cervicouterino	12
5.2.3. Factores de riesgo	14
5.3. TRATAMIENTO	14
5.3.1. Cirugía	14
5.3.2. Radioterapia	14
5.4. QUIMIOTERAPIA	15
5.4.1. Cisplatino	15
5.4.2. Mecanismo de acción	15
5.4.3. Efectos adversos producidos por el cisplatino	17
5.4.3.1. Nefrotoxicidad	18
5.4.3.2. Ototoxicidad	18
5.4.3.3. Neurotoxicidad	18
5.4.3.4. Hematológico	19
5.4.3.5. Gastrointestinal	19
5.4.4. Resistencia al cisplatino	19
5.5. AGENTES ANTIHORMONALES	20
5.5.1. Mifepristona	20
5.5.2. Mecanismo de acción	21
5.5.3. Efectos adversos producidos por la mifepristona	23
5.5.3.1. Efectos a corto plazo	23
5.5.3.2. Efectos a largo plazo	24
5.6. LIMITANTES DE LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	24
5.7. LIPOSOMAS	25
5.7.1. Clasificación de los liposomas	26
5.7.2. Métodos de preparación	28
5.7.2.1. Dispersión de solvente	28

5.7.2.2. Remoción de detergente	28
5.7.2.3. Evaporación de fase reversa	28
5.7.3. Homogenización del tamaño de partícula	29
5.7.3.1. Sonicación	29
5.7.3.2. Extrusión	29
5.7.4. Liposomas de circulación prolongada (Stealth)	29
5.7.5. Acumulación en tumores	30
5.7.6. Mecanismos de acción de los liposomas	31
5.7.7. Farmacocinética de los liposomas	32
5.7.8. Efectos adversos producidos por los liposomas	35
<b>6. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>36</b>
<b>7. HIPÓTESIS</b>	<b>36</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
8.1. REACTIVOS	37
8.2. SOLVENTES	37
8.3. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS DE CISPLATINO	37
8.4. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS DE MIFEPRISTONA	38
8.5. COENCAPSULACIÓN DE CISPLATINO Y MIFEPRISTONA	38
8.6. ELIMINACIÓN DEL FÁRMACO NO ENCAPSULADO	38
8.6.1. Eliminación del cisplatino no encapsulado	39
8.6.2. Eliminación de la mifepristona no encapsulada	39
8.7. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	39
8.7.1. Tamaño de partícula	39
8.7.2. Potencial de membrana (Potencial Z)	40
8.7.3. Cuantificación de fosfolípidos	40
8.8. CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACO ENCAPSULADO	41
8.8.1. Extracción y cuantificación de cisplatino liposomal	41
8.8.2. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de cisplatino liposomal	41
8.8.3. Extracción y cuantificación de cisplatino liposomal	42
8.8.4. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de mifepristona liposomal	42
8.9. ESTUDIOS <i>IN-VITRO</i>	42
8.9.1. Línea celular	42
8.9.2. Inhibición del crecimiento celular	42
8.9.2.1. Ensayo de viabilidad celular por XTT	43
8.9.2.2. Ensayo de viabilidad celular por cristal violeta	43
8.9.3. Análisis del ciclo celular	44

8.9.4. Análisis de apoptosis	44
8.10. ESTUDIO <i>IN-VIVO</i>	44
8.10.1. Animales de experimentación	44
8.10.2. Evaluación terapéutica y toxicidad sistémica	45
8.10.3 Actividad metabólica tumoral	45
8.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
<b>9. RESULTADOS</b>	47
9.1. Elaboración de liposomas	47
9.1.1 Liposomas cargados con cisplatino	47
9.1.2. Liposomas cargados con mifepristona	47
9.1.3. Coencapsulación de cisplatino y mifepristona	47
9.2. ELIMINACIÓN DE LOS FÁRMACOS NO ENCAPSULADOS	48
9.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS LIPOSOMAS	49
9.3.1. Tamaño de partícula	49
9.3.2. Potencial de membrana (Potencial Z)	49
9.3.3. Cuantificación de fosfolípidos	49
9.4. CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACO ENCAPSULADO	50
9.4.1. Cuantificación de cisplatino encapsulado	50
9.4.2. Cuantificación de mifepristona encapsulada	51
9.5. ESTABILIDAD DEL SISTEMA CISPLATINO-MIFEPRISTONA	52
9.6. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR	53
9.7. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR	55
9.8. ANÁLISIS DE APOPTOSIS	55
9.9. EVALUCIÓN TERAPÉUTICA DEL SISTEMA LIPOSOMAL EN XENÓGRAFOS DE CaCu EN RATONES ATÍMICOS	57
9.10. ACTIVIDAD METABÓLICA TUMORAL	59
9.11. TOXICIDAD SISTÉMICA	61
<b>10. DISCUSIÓN</b>	62
10.1. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL	64
10.2. EVALUCIÓN TERAPÉUTICA DEL SISTEMA LIPOSOMAL EN XENÓGRAFOS DE CaCu EN RATONES ATÍMICOS	66
<b>11. CONCLUSIÓN</b>	69
<b>12. PERSPECTIVAS</b>	69
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	70

## Índice de figuras

Figura 1. Incidencia global de cáncer	8
Figura 2. Incidencia mundial de cáncer cervical	9
Figura 3. Porcentaje de defunciones en México por cáncer	10
Figura 4. Tasa de morbilidad hospitalaria en México por CaCu	10
Figura 5. Localización anatómica del cuello uterino	11
Figura 6. Subtipos de VPH de alto riesgo	12
Figura 7. Estadificación del CaCu	13
Figura 8. Estructura molecular del cisplatino	15
Figura 9. Mecanismo de acción del cisplatino	16
Figura 10. Formación de aductos por cisplatino	17
Figura 11. Toxicidad producida por cisplatino	17
Figura 12. Mecanismos de resistencia tumoral	19
Figura 13. Estructura molecular de la mifepristona	21
Figura 14. Mecanismo de acción de la mifepristona	22
Figura 15. Estructura de los liposomas	25
Figura 16. Clasificación de liposomas	26
Figura 17. Clasificación de liposomas	27
Figura 18. Liposomas Stealth	30

Figura 19. Acumulación de liposomas en tumores	31
Figura 20. Mecanismos de acción de liposomas	32
Figura 21. Concentración plasmática de cisplatino liposomal	34
Figura 22. Parámetros farmacocinéticos de cisplatino liposomal	34
Figura 23. Esquema de administración en ensayos <i>in-vivo</i>	45
Figura 24. Perfil de liposomas en cromatografía de exclusión molecular	48
Figura 25. Perfil de mifepristona en cromatografía de exclusión molecular	48
Figura 26. Resultados de análisis fisicoquímico de liposomas	50
Figura 27. Curva de calibración de cisplatino	50
Figura 28. Cromatogramas de cisplatino por HPLC	51
Figura 29. Curva de calibración de mifepristona	51
Figura 30. Cromatogramas de mifepristona por HPLC	52
Figura 31. Estabilidad de liposomas	52
Figura 32. Inhibición del crecimiento celular por XTT	53
Figura 33. Inhibición del crecimiento celular por cristal violeta	54
Figura 34. Análisis de ciclo celular	55
Figura 35. Análisis de apoptosis	56
Figura 36. Comparación de apoptosis 5 y 9 días	56
Figura 37. Volumen tumoral	57

Figura 38. Volumen tumoral final	58
Figura 39. Comparación de tumores	59
Figura 40. Imágenes molecular	60
Figura 41. Comparación inicial y final del volumen de interés	60
Figura 42. Seguimiento del peso corporal	61

## 1. RESUMEN

Actualmente, el cáncer cervicouterino (CaCu) representa un grave problema de salud pública, principalmente en países en vías de desarrollo, entre los que se encuentra México. Los tratamientos convencionales que incluyen cirugía, quimioterapia basada en cisplatino y radioterapia han demostrado efectividad en etapas tempranas de la enfermedad; sin embargo, el porcentaje de sobrevida en estadios avanzados es bajo.

En la búsqueda de nuevos fármacos que potencien el efecto del cisplatino se han probado diferentes agentes terapéuticos, entre los que destacan los antihormonales, no obstante, la baja especificidad de estas combinaciones sobre el tejido tumoral, los graves efectos secundarios producidos y el desarrollo de resistencia, limitan su administración. Dada la problemática, el desarrollo de liposomas capaces de encapsular estos principios activos, que los transporte hasta el sitio blanco, disminuya su toxicidad y aumente la biodisponibilidad, representan una atractiva opción terapéutica.

En el presente trabajo se desarrolló un sistema liposomal que coencapsula el antineoplásico cisplatino y el antihormonal mifepristona -fármacos que han demostrado sinergismo-, y se evaluó su eficacia terapéutica en un modelo *in-vitro* e *in-vivo* de CaCu.

La elaboración de los liposomas de cisplatino-mifepristona se realizó empleando el método de fase reversa y se caracterizó mediante pruebas fisicoquímicas. Una vez descrito el perfil de la formulación se evaluó su capacidad antiproliferativa sobre la línea celular HeLa, donde se determinó el porcentaje de sobrevida mediante los ensayos XTT y cristal violeta; también se evaluó su efecto ciclo celular y sobre la inducción de apoptosis. Los ensayos *in-vivo* se llevaron a cabo en un modelo de xenotransplantes en ratones nu/nu, siguiendo el volumen tumoral y el peso corporal durante 50 días.

Las pruebas fisicoquímicas demostraron la estabilidad de los liposomas, así como concentraciones encapsuladas de los fármacos comparables a las administradas en la terapia convencional. Por otro lado, el porcentaje de viabilidad celular tras la administración de la coencapsulación disminuyó significativamente con respecto al control y liposomas blanco, mostró tendencia a mayor inhibición que los tratamientos individuales convencionales y



mostró el mismo efecto antiproliferativo que el tratamiento combinado convencional. El análisis de apoptosis demostró diferencia significativa con respecto al control y los tratamientos convencionales. De igual manera, la distribución del ciclo celular, la formulación de cisplatino-mifepristona mostró diferencia significativa en la fase sub-G0 con respecto al control y los fármacos convencionales. Finalmente, en los xenotransplantes se observó que la administración del sistema liposomal cisplatino-mifepristona inhibió significativamente el crecimiento tumoral sin mostrar toxicidad sistémica.

## 2. ABSTRACT

Nowadays, cervical cancer is a major public health problem, mainly in developing countries—including Mexico. Conventional treatments comprising surgery, cisplatin-based chemotherapy, and radiotherapy, have proved effectiveness in early stages of the disease; however, the survival rate in advanced stages is low.

In the research for new drugs that enhance the effect of cisplatin, different therapeutics agents have been tested, among them, antihormonal drugs stand out. Nevertheless, the low specificity of these combinations on tumor tissue, severe side effects, and drug resistance, limit their administration. Upon this problem, the development of liposomes capable of encapsulating active molecules that transport them to their target, decrease their toxicity and increase their bioavailability, represent an attractive therapeutic option.

In this study, a liposome system that encapsulates both the antineoplastic drug cisplatin and the antihormonal drug mifepristone was developed (two drugs that have shown therapeutic synergy), and evaluated its therapeutic efficacy in a cervical cancer model *in-vitro* and *in-vivo*.

The elaboration of the cisplatin-mifepristone liposomes was performed by the reverse-phase method and their characterization performed by physical-chemical tests. Having described the formulation profile, its antiproliferative activity was assessed on HeLa cell line, where the survival rate was determined by the XTT and crystal violet assays; cell cycle and apoptosis also were evaluated. The *in-vivo* tests were carried out in a xenograft model in nu/nu mice, following the tumor volume and body weight for 50 days.

The physical-chemical test results showed the stability of the liposomes and the encapsulated drugs concentration, which was equivalent to those given in conventional therapy. On the other hand, the percentage of cell viability after the administration of the co-encapsulation significantly decreased compared to the control and blank liposomes; the formulation showed a tendency to cell inhibition and showed the same antiproliferative effect as the conventional combination. However, the apoptosis analysis demonstrated a significant difference over the control and conventional treatments. As for cell distribution,

the liposome formulation of cisplatin-mifepristone showed significant difference in the sub-G0 phase with respect to control and conventional drugs. Of greater relevance, it was observed in the xenograft study that the administration of the combination-liposomes significantly inhibited the tumor growth without systemic toxicity.

### 3. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas a nivel mundial; es un problema de salud pública que provoca el deceso de al menos 250 000 mujeres anualmente, el 80% de las mujeres que mueren provienen de países de bajo y mediano ingreso (GAVI-UNFPA-WHO, 2009). En México, en el 2006 se registraron 4,114 muertes por esta causa., particularmente en mujeres de 25 a 64 años (NOM-014-SSA2-1994). Entre los factores de riesgo que contribuyen a desarrollar CaCu se encuentran factores genéticos, biológicos y hormonales; sin embargo, el principal factor de riesgo es el virus del papiloma humano (VPH) (OMS, 2007).

Actualmente, el cisplatino es uno de los agentes antineoplásicos más utilizados en el tratamiento del CaCu; sin embargo, también presenta toxicidad en tejidos sanos, especialmente sobre túbulo renal, nervios periféricos, médula ósea y tracto gastrointestinal (Burger J, 2002; Ramachandran S, 2006; Fuertes MA, 2002). Se han realizados diferentes estudios en búsqueda de fármacos capaces de potenciar el efecto antiproliferativo del cisplatino, esto sin incrementar sus efectos adversos. Se ha señalado que existe un efecto sinérgico entre el cisplatino y el antiprogéstágeno mifepristona en cánceres hormonodependientes como ovario, y pulmón (Freeburg EM, 2009. Grott M, 2103). En este camino, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la mifepristona es capaz de incrementar la citotoxicidad del cisplatino tanto en líneas celulares como en xenotransplantes de CaCu, un tipo de cáncer no hormonodependiente (Jurado R, 2009).

A pesar de estos hallazgos, los fármacos convencionales utilizados en la clínica están lejos de ser ideales, particularmente por su dificultad para acumularse de manera selectiva en tejido tumoral. La mayoría de sus efectos adversos, asociados a la alta distribución en tejidos sanos, limitan las dosis que pueden ser administradas. Debido a esta problemática, investigaciones actuales intentan lograr que la distribución de los antineoplásicos sea más selectiva por el tejido tumoral y menos en tejido sano para lograr un aumento en la eficacia y disminuir los efectos secundarios que se presentan. En este contexto, mediante investigaciones en nanotecnología se han podido desarrollar nanosistemas de transporte como los liposomas, capaces de funcionar como acarreadores de moléculas terapéuticas

(Conti M, 2006;Kushwaha S, 2012). Los liposomas son vesículas esféricas que consisten en una bicapa lipídica capaz de encapsular principios activos acuosos en el interior de la esfera o intercalar fármacos hidrofóbicos en su membrana. La posibilidad de encapsular tanto moléculas hidrosolubles como liposolubles los han hecho ideales para transportar simultáneamente varios fármacos (Zhang J, 2006; Mallick S, 2014). El presente proyecto propone la coencapsulación de dos agentes con actividad antineoplásica (cisplatino y mifepristona) cuya combinación ha demostrado efectos sinérgicos en el tratamiento del CaCu, con el fin de lograr un mejor efecto terapéutico aprovechando las características del microambiente tumoral.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Diseñar y desarrollar un sistema liposomal que coencapsule cisplatino y mifepristona y evaluar su eficacia *in-vitro* e *in-vivo* en un modelo tumoral de CaCu.

### **4.2. Objetivos particulares**

- Desarrollo y caracterización fisicoquímica del sistema liposomal de cisplatino – mifepristona.
- Evaluación del efecto citotóxico del sistema liposomal cisplatino – mifepristona en una línea celular de CaCu (HeLa).
- Evaluación terapéutica y toxicidad sistémica del sistema liposomal en xenógrafos de CaCu en ratones atómicos.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER

#### 5.1.1. Definición

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático, a este proceso se le conoce como metástasis (National Cancer Institute of USA, 2014).

#### 5.1.2. Incidencia

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el cáncer es la principal causa de muerte a nivel global (figura 1), con 7.6 millones de decesos anuales, equivalente al 13% del total de muertes; se prevé que esta cifra aumente a 13.1 millones para 2030 (GLOBOCAN, 2014; Siegel R, 2014). 83% de los casos provienen de países en vías de desarrollo con las tasas más altas presentes en América Latina, África Sahariana y en el sur y sureste de Asia (Denny L, 2005).

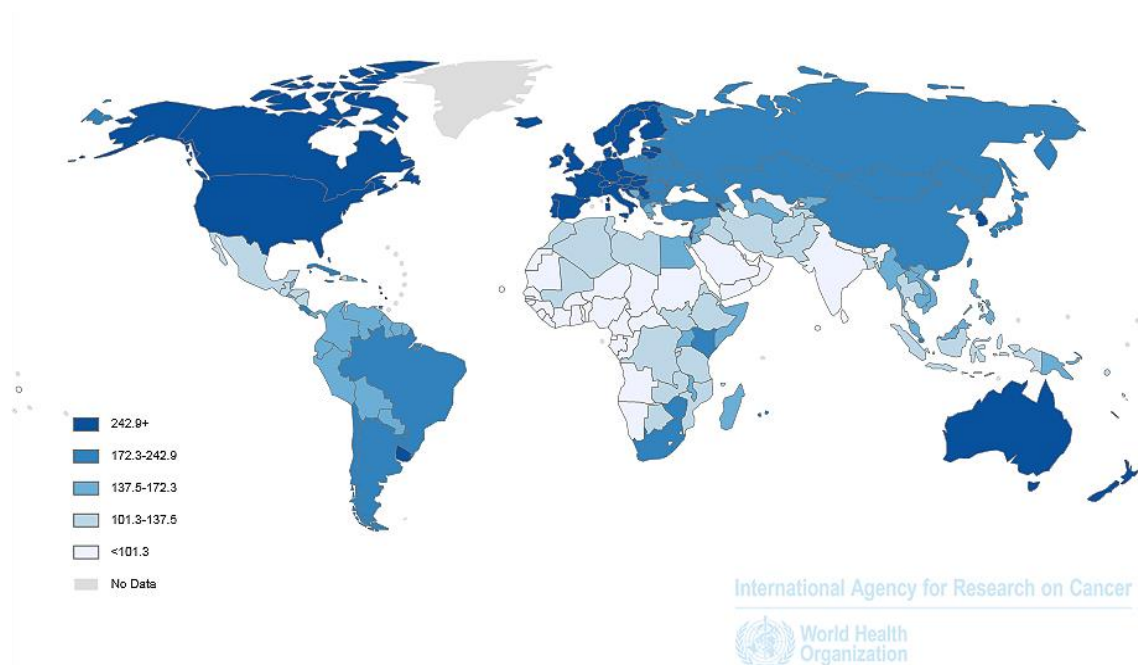


Figura 1. Incidencia global de cáncer estimada en 2012, estandarizada a 100 000 habitantes (GLOBOCAN [IARC], 2012).

En México durante 2009, murieron 65 de cada 100 000 personas a consecuencia de tumores malignos.

## 5.2. CÁNCER CERVICOUTERINO

### 5.2.1. Incidencia del cáncer cervicouterino

El CaCu es el segundo tipo de cáncer más prevalente a nivel global (figura 2), con cerca de 500 000 casos y 270 000 muertes estimadas anualmente (Ibeanu O, 2011, Consenso para la prevención de cáncer cervicouterino en México, 2011). Es una enfermedad íntimamente ligada a países de tercer mundo (Arbyn M, 2011; Pereira-Scalabrino A, 2013; Forman D, 2012)

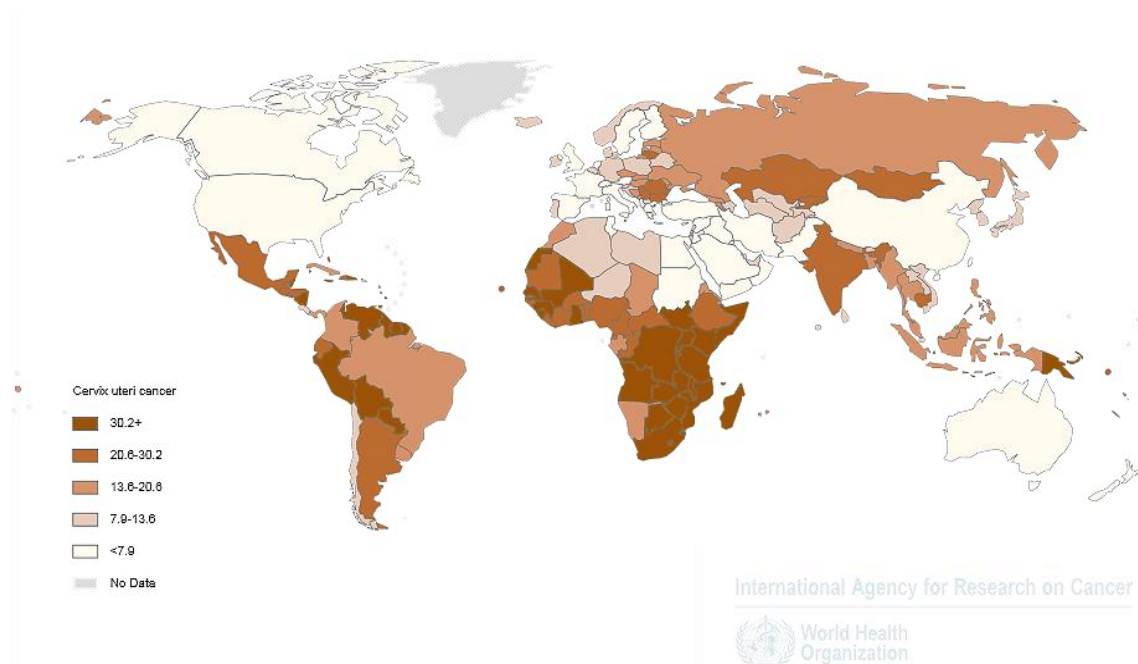


Figura 2. Incidencia global de CaCu estimada en 2012, estandarizada a 100 000 habitantes (GLOBOCAN [IARC], 2014).

En México, el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas (figura 3), particularmente en mujeres de 25 a 64 años, con 13% del total de diagnósticos (INEGI, 2013; Fajardo-Ortiz D, 2014). Se calcula que el costo anual promedio real de tratamiento se encuentra entre 50 000 y 70 000 pesos por paciente (Sánchez-Román F, 2012).



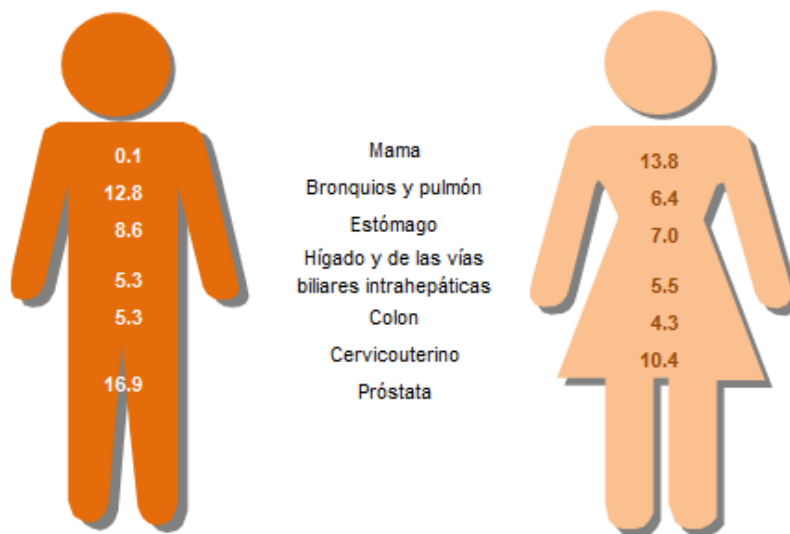


Figura 3. Porcentaje de defunciones en México por principales tumores malignos según sexo, estandarizado a 100 000 habitantes (INEGI, 2013).

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), durante 2009, el Distrito Federal, Chihuahua y Nayarit tuvieron las tasas más altas de morbilidad hospitalaria por CaCu (48.28, 26.66 y 25.21 por cada 100 000 mujeres respectivamente); mientras que en Guerrero, Tlaxcala y Estado de México se presentan las más bajas (5.22, 3.08 y 2.23, cada uno) (figura 4).

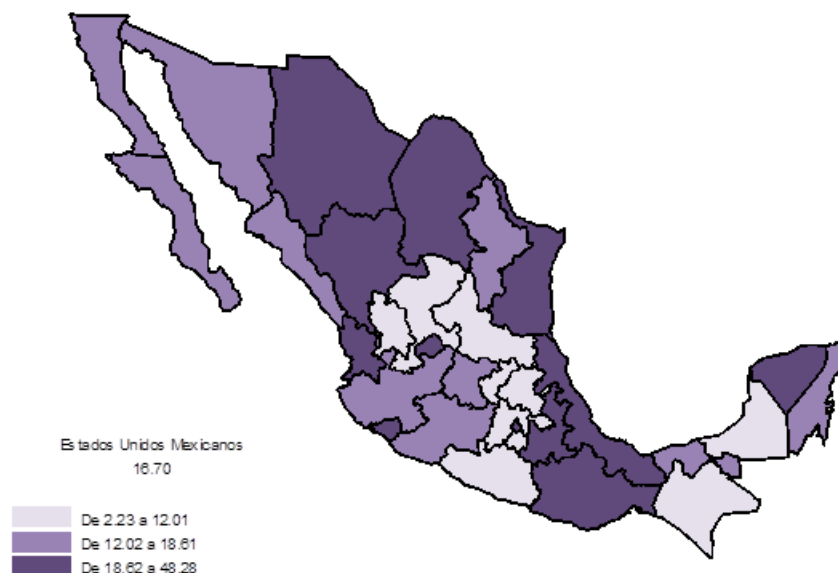


Figura 4. Tasa de morbilidad hospitalaria por CaCu según entidad federativa, estandarizado a 100 000 mujeres (INEGI, 2009).

Anatómicamente, el cuello uterino es la parte inferior al útero que lo conecta con la vagina. La parte proximal al útero se le llama endocervix, cubierto por células escamosas; la porción distal se le conoce como exocervix y está constituido por células glandulares. Esta zona es denominada de transformación, lugar donde predominantemente se origina el cáncer cervicouterino (figura 5).

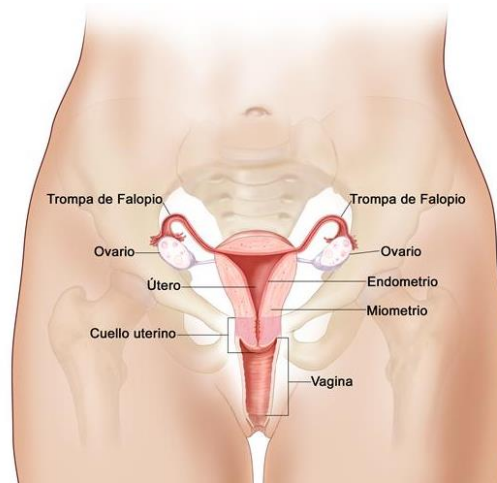


Figura 5. Esquematación anatómica de invasión del CaCu (National Cancer Institute of USA, 2014).

Existen dos tipos principales de cáncer cervical: el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma. Aproximadamente el 80 – 90% de esta variante de cáncer pertenece al primer tipo antes mencionado, prácticamente el resto es adenocarcinoma. Con menor frecuencia, el cáncer puede tener características tanto de carcinoma de células escamosas como de adenocarcinoma. Estos tumores se llaman carcinomas adenoescamosos. (American Cancer Society, 2014).

El cáncer cervicouterino es propuesto como una enfermedad de transmisión sexual, resultado de la infección con ciertos subtipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH) (figura 6) (McLaughlin-Drubin ME, 2012; Stern PL, 2012; Grce M, 2014).

Hasta hoy, se han caracterizado más de 120 subtipos de VPH; está asociado a un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde lesiones autolimitantes hasta poner en riesgo la vida. Su ADN se ha encontrado en el 99.7% del total de diagnósticos de CaCu (Gravitt PE, 2011; O'Connor M, 2014).

HPV classification into high- and low-risk types	
Low-risk types	6, 11, 40, 42-44, 54, 61, 72, 81
High-risk types	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82

Figura 6. Subtipos de VPH de alto riesgo para el desarrollo de CaCu (Pierangeli A, 2012).

El análisis de datos señala que tan solo ocho subtipos de VPH contabilizan el 95% del total de los casos de CaCu (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58) (Juckett G, 2010; Chan PK, 2012). Tan solo el VPH 16 está asociado al 50 – 60% de los diagnósticos y el tipo 18, con el 10 – 12%. (Bosch FX, 2003; Almonte M, 2010).

### 5.2.1. Diagnóstico y estadificación del cáncer cervicouterino

Por lo general, el cáncer cervical presenta un lento desarrollo, puede no tener síntomas evidentes pero existen diferentes métodos de diagnóstico entre los que destacan la histopatología, técnicas citológicas como el Papanicolau, que consiste en examinar por microscopía células superficiales del cuello uterino para determinar si son anormales, y métodos moleculares para la detección de VPH, en las cuales se analiza el ADN o ARN de células uterinas para determinar si existe infección por el virus. (Brown AJ, 2012; Jin XW, 2013).

El proceso para decretar si el cáncer se ha diseminado dentro del cuello uterino o hasta otras partes del cuerpo se le llama estadificación. La información obtenida determina el estadio de la enfermedad, que a su vez es de vital importancia para planificar el tratamiento. Las técnicas más comunes para fijar el estadio son: exploración por tomografía axial computada, tomografía por emisión de positrones, ecografía, radiografía de tórax, cistoscopia y laparoscopia (National Cancer Institute of USA, 2014).

La estadificación fue implementada por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en el año 2009, la cual va del estadio 0 o in situ al IV o metástasis (figura 7).

Figura 7. Lineamientos establecidos por FIGO para la estadificación del carcinoma cervical (FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2009).

Estadio	
<b>0</b>	La neoplasia cervical intraepitelial (NIC) es un crecimiento anormal precanceroso de células escamosas en el cuello uterino. La mayoría de los NIC son eliminados por el sistema inmune del individuo sin atención médica.
<b>I</b>	El carcinoma está estrictamente limitado al cuello uterino (no se debe tener en cuenta la extensión al cuerpo).
<b>IA</b>	Carcinoma invasivo, que se puede diagnosticar sólo mediante microscopía con invasión muy profunda $\leq 5$ mm y mayor extensión de $\geq 7$ mm.
<b>IA1</b>	Invasión estromal de $\leq 3,0$ mm de profundidad y extensión de $\leq 7,0$ mm.
<b>IA2</b>	Invasión estromal de $>3,0$ mm y no $>5,0$ mm con extensión que no es $>7,0$ mm.
<b>IB</b>	Lesiones clínicamente visibles del cuello uterino o cánceres preclínicos más grandes que en el estadio IA.
<b>IB1</b>	Lesión clínicamente visible de $\leq 4,0$ cm en su dimensión mayor.
<b>IB2</b>	Lesión clínicamente visible de $>4,0$ cm en su dimensión mayor.
<b>II</b>	El carcinoma de cuello uterino invade más allá del útero, pero no la pared pélvica ni el tercio inferior de la vagina.
<b>IIA</b>	Sin invasión paramétrica.
<b>IIA1</b>	Lesión clínicamente visible $\leq 4,0$ cm en su dimensión mayor.
<b>IIA2</b>	Lesión clínicamente visible $>4,0$ cm en su dimensión mayor.
<b>IIB</b>	Con invasión paramétrica obvia.
<b>III</b>	El tumor se extiende a la pared pélvica o compromete el tercio inferior de la vagina, o causa hidronefrosis o disfunción renal.
<b>IIIA</b>	El tumor compromete el tercio inferior de la vagina sin extensión hasta la pared pélvica.
<b>IIIB</b>	Extensión hasta la pared pélvica o hidronefrosis o disfunción renal.
<b>IV</b>	El carcinoma se diseminó más allá de la pelvis misma o comprometió (probado mediante biopsia) la mucosa de la vejiga o recto. Un edema de Bullar, como tal, no es suficiente para clasificar en estadio IV.
<b>IVA</b>	Diseminación del crecimiento hasta los órganos adyacentes.
<b>IVB</b>	Diseminación hasta los órganos distantes.

### **5.2.3. Factores de riesgo**

El riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino está influenciado principalmente por la actividad sexual, sin embargo, se involucran diferentes factores como:

Promiscuidad, actividad sexual a temprana edad, persistencia viral, uso prolongado de anticonceptivos orales, coinfección con otros virus, como el herpes simple tipo 2, citomegalovirus, herpesvirus humano tipo 6 y 7, predisposición genética, fumar, sistema inmune debilitado (López-Saavedra A, 2006)

## **5.3. TRATAMIENTO**

La elección del tratamiento es dictaminado por el tipo de lesión así como del estadio en que se encuentre. Se emplean tres tipos de tratamiento estándar:

### **5.3.1. Cirugía**

Es el tratamiento ideal en lesiones en etapas tempranas; la finalidad es la extirpación del tumor. Los procedimientos quirúrgicos varían desde la extirpación de una porción del tejido del cuello llamada conización, hasta histerectomía total y radical que consiste en la remoción total del útero, cuello uterino, parte de la vagina y una amplia área de ligamentos y tejidos que rodean estos órganos. (Mejia-Gomez J, 2012; Reade CJ, 2013; Salicrú SR, 2013).

### **5.3.2. Radioterapia**

Utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación ionizante en regímenes fraccionados para la destrucción de células tumorales. La combinación de radioterapia externa y radiación intracavitaria o braquiterapia son consideradas el tratamiento estándar para el cáncer uterino (Nakano T, 2010; Baskar R, 2012; Markman M, 2013).

## 5.4. QUIMIOTERAPIA

Es el tratamiento a base de agentes antineoplásicos con actividad citotóxica, cuyo objetivo es la destrucción o disminución de las células cancerosas mediante la inhibición de su crecimiento. La forma como se administran depende del tipo y del estadio del cáncer que está siendo tratado.

Los fármacos aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamento de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento del CaCu son; la bleomicina, topotecán, gemcitabina, paclitaxel, carboplatino y el cisplatino, siendo este último el agente quimioterapéutico más utilizado (Pectasides D, 2008; Tao X, 2008; Montalvo G, 2011; Kamura T, 2013).

### 5.4.1. Cisplatino

El cis-diaminodicloroplatino (II) o cisplatino, descubierto como antineoplásico en 1965 por Barnett Rosenberg y aprobado por la FDA en 1978, es un complejo metálico planar que contiene un átomo central de platino rodeado de dos átomos de cloro y dos moléculas de amonio en posición cis (figura 8) (Gonzalez VM, 2001).

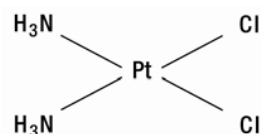


Figura 8. Estructura molecular del antineoplásico cisplatino (Fuentes MA, 2003).

Se utiliza ampliamente en el tratamiento de distintos tumores malignos que incluyen el testicular, ovario, vejiga, cervical, cabeza y cuello y pulmón. (Lokich J, 2001; Monneret C, 2011; Ali I, 2013).

### 5.4.2. Mecanismo de acción

El cisplatino atraviesa la membrana celular mediante difusión pasiva y activa, utilizando canales transmembranales que facilitan el transporte. Una vez dentro de la célula, la concentración de iones cloruro decae a  $\approx 20$  mM, por lo que la molécula de cisplatino es activada mediante hidratación; sus átomos cloruro son remplazados por moléculas de agua

para formar especies cargadas positivamente. De esta manera, la nueva molécula es capaz de interactuar con sitios nucleofílicos del ADN (blanco principal), ARN y proteínas. El cisplatino se une preferencialmente a los anillos de imidazol de guaninas y en menor grado de adeninas, particularmente en la posición N-7 (figura 9) (Fuentes MA, 2003; Todd RC, 2009; Gómez-Ruiz S, 2012).

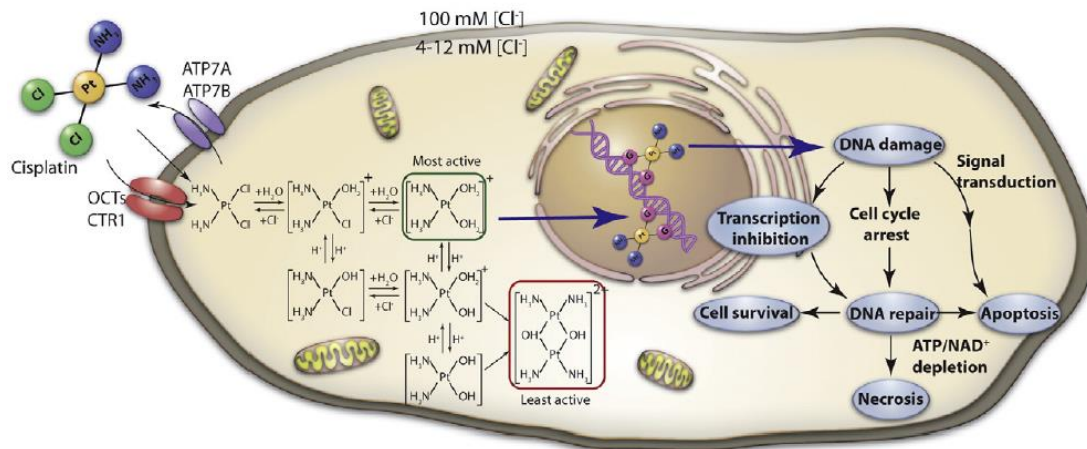
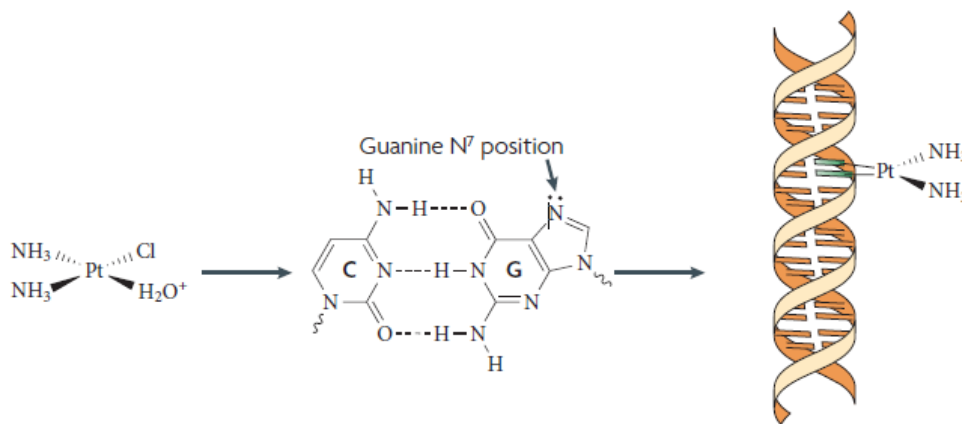


Figura 9. Ilustración esquemática del mecanismo de acción del cisplatino en la célula (Oberoi HS, 2013).

Tres tipos de lesiones diferentes se forman como resultado de la unión covalente del cisplatino con las purinas de ADN: monoadductos, cruzamientos intracatenarios y cruzamientos intercatenarios, lo que induce a la inhibición de la transducción, transcripción y replicación celular, daño que a su vez incita el proceso de apoptosis (figura 10) (Siddik ZH, 2003; Rabik CA, 2007).



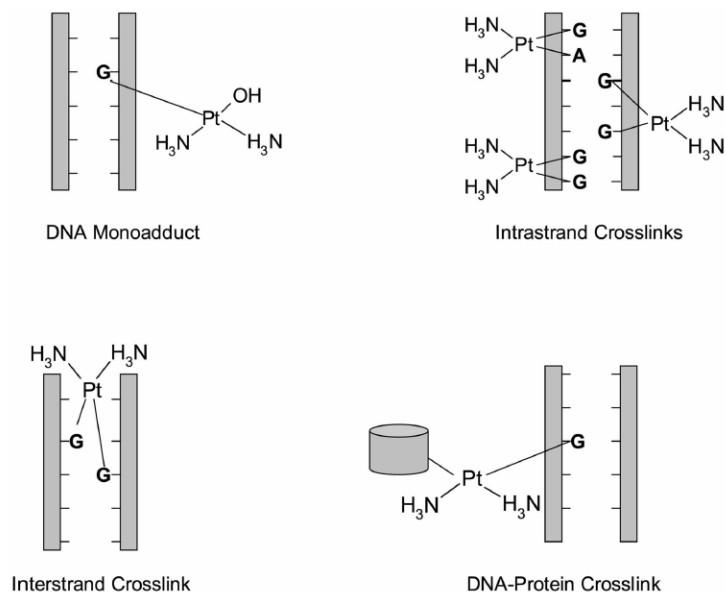


Figura 10. Formación de aductos en ADN por el cisplatino (Rabik CA, 2007).

### 5.4.3. Efectos adversos producidos por el cisplatino

El cisplatino, al igual que otros agentes anticancerígenos, carece de especificidad sobre las células tumorales y afecta tejidos sanos, por lo que su dosificación en la clínica puede verse limitada a causa de sus efectos secundarios (figura 11); a continuación se describirá la toxicidad sobre los órganos afectados por la administración de cisplatino (Ciarimboli G, 2014).

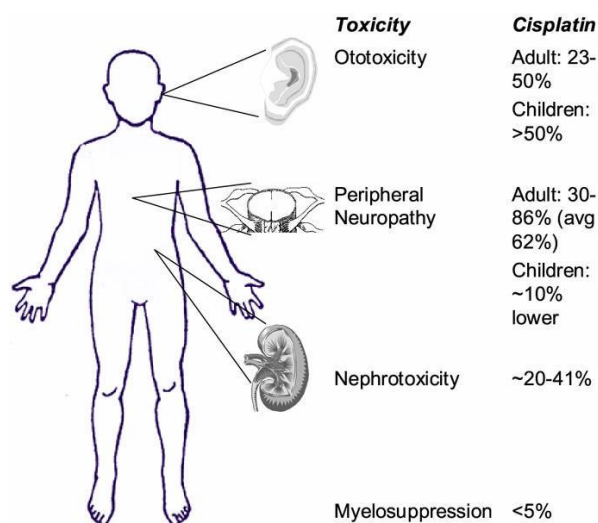


Figura 11. Toxicidad asociada al tratamiento con cisplatino (Rabik CA, 2007).



**5.4.3.1. Nefrotoxicidad.** A causa de su excreción renal, la concentración de cisplatino en el túbulo proximal del riñón es cinco veces superior a la alcanzada en el plasma, causando apoptosis y necrosis celular.

La insuficiencia renal acumulativa que puede llevar a falla renal aguda es la principal limitante en la dosificación del cisplatino. La toxicidad renal se ha observado en el 28-36% de los pacientes después de una dosis única de  $50\text{mg}/\text{m}^2$  y se torna más prolongada y severa con el curso del tratamiento. La función renal debe volver a la normalidad antes de que se administre otra dosis de cisplatino (Kuhlmann MK, 1997; dos Santos NA, 2012).

La nefrotoxicidad puede ser prevenida hasta cierto punto mediante hidratación salina o diuresis con manitol; hasta el momento se desconocen métodos preventivos para la ototoxicidad y neurotoxicidad causada por el cisplatino (Miller RP, 2010).

**5.4.3.2. Ototoxicidad.** La quimioterapia basada en cisplatino daña las células ciliadas cocleares del oído interno, resultando en un déficit funcional. El mecanismo probable causante del daño involucra la producción especies reactivas de oxígeno en la cóclea, lo que dispara la muerte celular (Gonçalves MS, 2013).

Aproximadamente el 23-54% de los pacientes tratados con una dosis de  $50\text{mg}/\text{m}^2$  desarrollan ototoxicidad y se manifiesta con tinnitus y pérdida del oído en el rango de frecuencia alto (4000 a 8000Hz); la pérdida comúnmente es bilateral e irreversible y tiende a volverse más frecuente y severa a dosis repetidas (Rybak L, 2009; Mukherjea D, 2011; Brock PR, 2012).

**5.4.3.3. Neurotoxicidad.** El cisplatino causa daño sobre el sistema nervioso central, particularmente sobre los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal, caracterizado por la disminución en la velocidad de conducción sensorial, posiblemente actuando como bloqueador de los canales de calcio (McWhinney SR, 2009).

Se ha relacionado la vitamina E, la eritropoyetina, el glutatión y la acetilcisteína entre otros como agentes neuroprotectores (Albers JW, 2011).

**5.4.3.4. Hematológico.** Se presenta mielosupresión en el 5-25% de los pacientes tratados con el antineoplásico. Los principales efectos son leucopenia y trombocitopenia; comúnmente se encuentra anemia con la misma frecuencia (Lo-Presti, AC, 2007; Oike T, 2013).

**5.4.3.5. Gastrointestinal.** Prácticamente el total de pacientes presentan nausea y vómito, los efectos pueden ser tan severos que obliguen la suspensión del tratamiento (Percie du Sert, 2011).

#### 5.4.4. Resistencia al cisplatino

Una de las limitantes en el uso de cisplatino en la terapia contra el cáncer es la resistencia adquirida o intrínseca de las células. La resistencia se puede desarrollar como resultado del decremento en la entrada del fármaco o incremento en su expulsión, conjugación con glutatión o metalotioneina, sistemas de detoxificación de fármacos, reparación del ADN (figura 12) (Kartalou M, 2001; Wang D, 2005; Galluzzi L, 2012).

Es posible que uno solo de estos mecanismos conduzca a resistencia al cisplatino, sin embargo, es más probable la implicación de varios mecanismos.

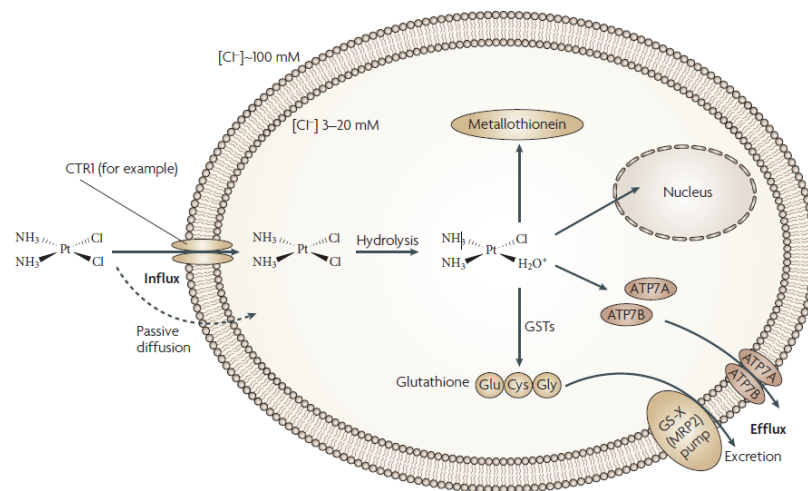


Figura 12. Esquema de los mecanismos de resistencia tumoral contra el cisplatino (Kelland L, 2007).

Debido a los graves efectos secundarios que causa el cisplatino, así como el desarrollo de resistencia celular que limita la dosificación y periodo de tratamiento, se han realizado diversos estudios en la búsqueda de fármacos capaces de potenciar su efecto

antiproliferativo, sin incrementar las consecuencias indeseables. En este sentido, agentes antihormonales han sido ampliamente estudiados para el tratamiento de distintos cánceres tanto hormonodependientes (mama, ovario y próstata) (Patel RR, 2007; Taplin ME, 2008; Rocereto TF, 2010; Tieszen CR, 2011) como independientes (cervicouterino y glioma) (Ramaswamy R, 2012; Li C, 2013; Llaguno-Munive M, 2013).

## **5.5. AGENTES ANTIHORMONALES**

Entre los fármacos antihormonales utilizados se encuentran antiestrogénicos como el tamoxifeno (Martin HL, 2014; Nazarali SA, 2014), raloxifeno (Gizzo S, 2013; Komm BS, 2014) y fulvestrant (McKeage K, 2004; Croxtall JD, 2011), y antiprogestágenos como la mifepristona (Koide SS, 1998; Klinj J, 2000; Terán-Dávila J, 2004). Estudios realizados en nuestro laboratorio, demuestran el efecto quimiosensibilizante de la mifepristona tanto en líneas celulares (HeLa y CasKi) como en xenotransplantes de cáncer cervicouterino (Jurado R, 2009). La mifepristona incrementa la acción citotóxica del cisplatino así como la acumulación intracelular e intratumoral del fármaco.

### **5.5.1. Mifepristona**

La mifepristona, también conocida como RU486, fue descubierta en 1980 por Georges Teutsch y Étienne-Émile Baulieu en la farmacéutica francesa Roussel Uclaf y aprobada en el año 2000 por la FDA como inductor del aborto terapéutico. A pesar de las repercusiones políticas y filosóficas que causó, actualmente se comercializa en más de treinta países (Beal MW, 2002; Schaff EA, 2010).

Es un esteroide sintético con potente actividad antiprogesteroa y antiglucocorticoide y débil actividad antiandrógeno. Su principal característica estructural es el grupo fenilaminodimetil en la posición 11- $\beta$ , el cual es el sitio específico de unión con el receptor (figura 13).

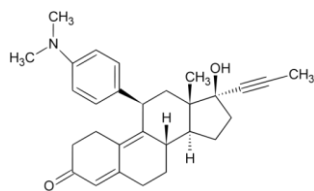


Figura 13. Estructura molecular de la mifepristona (Mahajan DK, 1997).

Aunque inicialmente la mifepristona se introdujo a la clínica como método médico para la terminación temprana del embarazo (Bartley J, 2000; Espinoza H, 2002; Kapp N, 2013), en años recientes se usó como anticonceptivo de emergencia (Baird DT, 2009; Gemzell-Danielsson K, 2013; Koyama A, 2013), regulador del ciclo menstrual (WHO, 1995; Bygdeman M, 2003), expulsión del útero por muerte fetal (Kulier R, 2011; Borgatta L, 2011), inducción del parto (Tenore JL, 2003) y quimiopreventivo en tumorigénesis (Yuan H, 2012) asimismo, ha demostrado gran potencial como agente terapéutico en el tratamiento del síndrome de Cushing (Johanssen S, 2007; Fleseriu M, 2012, 2013), depresión psicótica y esquizofrenia (DeBattista C, 2006; Ghoumari A, 2006; Mackin P, 2007), endometriosis (Kettel LM, 1994; Olive DL, 2004), meningiomas (Kyritsis AP, 1996; McMullen KP, 2004) y cánceres de distintos tejidos como mama (Chabbert-Buffet N, 2005), endometrio (Murphy AA, 2000), ovario (Rocereto TF, 2000; Goyeneche AA, 2007), colon (Check JH, 2009), próstata (Ligr M, 2012) y glioma (Pinski J, 1993). Esto sugiere que la presencia del receptor a progesterona no es obligatoria para la acción de la mifepristona.

### 5.5.2. Mecanismo de acción

La afinidad relativa de la mifepristona por los receptores a progesterona, glucocorticoide y andrógeno es aproximadamente cinco veces superior a la progesterona, tres veces a la dexametasona y cuatro veces menor que la testosterona, respectivamente. Todos estos compuestos son considerados Reguladores Selectivos de los Receptores a Progesterona (SPRMs, por sus siglas en inglés) El antiprogéstágeno mifepristona no tiene afinidad alguna por los receptores a mineralocorticoides y estrógenos. (Cadepond F, 1997)

La progesterona entra en la célula blanco y se une a su receptor; esto produce una alteración en su conformación, lo que estabiliza el complejo receptor-proteína HSP-90. A

continuación, el receptor se dimeriza y se une a los elementos de respuesta (figura 14) (Spitz IM, 2010).

En presencia de mifepristona, los receptores adoptan una conformación inactiva y preferencialmente interactúan con correpresores, impidiendo la interacción con el ADN y por lo tanto, su transcripción. (Mahajan DK, 1997; Sitruk-Ware R, 2003)

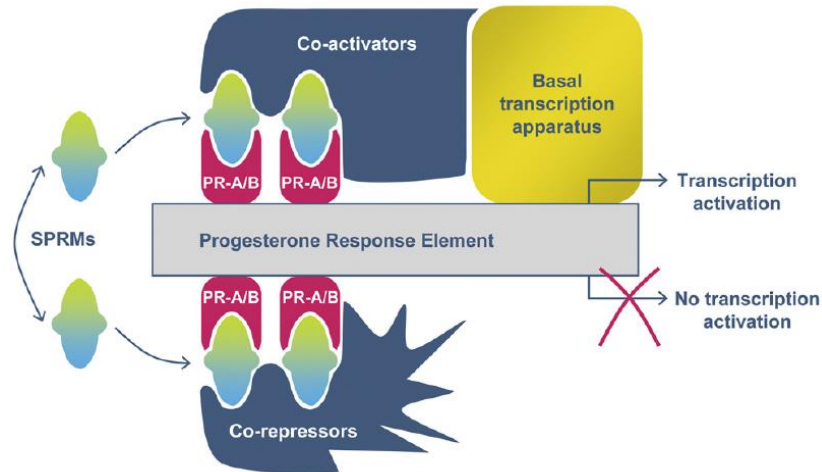


Figura 14. Mecanismo de acción propuesto para la mifepristona (Bouchard P, 2001).

La acción citotóxica por la cual la mifepristona inhibe el crecimiento tumoral no es aún dilucidada. Sin embargo, diferentes estudios proponen posibles mecanismos de acción:

- Inhibición de síntesis de ADN mediante arresto en fase G1 del ciclo celular.

Disminución de Cdk2, asociado al incremento de p21<sup>cip</sup>, p27<sup>kip</sup> y retinoblastoma; reducción del factor de transcripción E2F1 (necesario para la progresión a fase S) (Moe BG, 2009; Goyeneche AA, 2012).

- Inducción a apoptosis.

Incremento en la expresión de p53 precedido por la activación de caspasas; disminución de Bcl-2 (Gaddy VT, 2004; Navo MA, 2008; Fjellidal R, 2010).

- Regulación de VEGF y EGFR.

La progesterona incrementa significativamente la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La mifepristona reprime esta inducción compitiendo por los receptores (Hernández-Hernández OT, 2012; Mauro A, 2014).

- Inhibición de MRP y P-gp.

La mifepristona bloquea las proteínas de resistencia asociada a fármacos (MRP) y la glicoproteína P (P-gp). Estas proteínas funcionan como bombas de expulsión, lo que confiere resistencia celular; la inhibición de estas proteínas permite la acumulación de fármacos antineoplásicos (Lecureur V, 1994; Payen L, 1999; Li DQ, 2004).

- Cambios morfológicos celulares.

Alteraciones en la estructura y plasticidad del citoesqueleto, íntimamente relacionados con la adhesión, migración, invasión y metástasis. (Brandhagen B, 2013)

### **5.5.3. Efectos adversos producidos por la mifepristona**

#### **5.5.3.1. Efectos a corto plazo**

En la clínica, los efectos secundarios producidos por la mifepristona son diversos aunque comúnmente bien tolerados.

Debido a que históricamente su principal uso es la inducción del aborto, los efectos adversos más estudiados son a corto plazo. Estos incluyen: (Sitruk-Ware R, 2003; Spitz IM, 2009)

- Contracciones uterinas
- Sangrados
- Eflorescencia
- Sofocamiento
- Fatiga severa
- Calambres

### **5.5.3.2. Efectos a largo plazo**

En la administración crónica se han observado los siguientes efectos adversos (Grunberg SM, 2006): disminución del sangrado menstrual, inclusive amenorrea, retardo o inhibición de la ovulación, se ha asociado con desarrollo de hipotiroidismo y ginecomastia.

## **5.6. LIMITANTES EN LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS**

A pesar de estos hallazgos, los fármacos convencionales utilizados en la quimioterapia oncológica están lejos de ser ideales; la resistencia a los fármacos continúa como un obstáculo importante para el éxito del tratamiento antineoplásico. Esta surge de diversos cambios moleculares y farmacocinéticos que pueden superar los tratamientos mejor diseñados, lo que incluye malabsorción y suministro del fármaco, variabilidad genética en el transporte, metabolismo, amplificaciones o deleciones en los objetivos farmacológicos entre otros (Kelland L, 2007).

Por otro lado, la toxicidad inherente de los fármacos antineoplásicos es uno de los más grandes problemas al momento de su administración debido a su baja especificidad sobre las células cancerosas, por lo que se asocian a un riesgo muy elevado de lesionar el tejido normal. Las células más afectadas por el efecto citotóxico de la quimioterapia son aquellas que comparten características con las células tumorales, especialmente la multiplicación celular a alta velocidad, como son las de los folículos pilosos, médula ósea, tubo digestivo y el sistema reproductor (Blasco CA, 2013). Todo esto aunado al pobre comportamiento farmacocinético de estos agentes terapéuticos, donde se observan velocidades de eliminación elevadas, amplios volúmenes de distribución en tejidos, alta unión a proteínas plasmáticas y por lo tanto una baja biodisponibilidad del fármaco.

Por lo anterior, actualmente uno de los principales objetivos científicos es incrementar el índice terapéutico de los antineoplásicos mientras se minimizan los efectos dañinos. Para intentar resolver esta problemática, mediante el uso de nanotecnología, se han desarrollado nanovectores capaces de transportar principios activos (Hofheinz RD, 2005; Huwyler J, 2008; Malam Y, 2009; López-Dávila V, 2012; Fonseca NA, 2014). Estas partículas

resultan de la incorporación física del fármaco en un sistema coloidal y ejemplos de ellas son los niosomas, microesferas, nanoesferas, micelas poliméricas, micelas invertidas, lipoproteínas y liposomas, siendo estos últimos acarreadores los más estudiados y usados (Cheong I, 2007).

## 5.7. LIPOSOMAS

Producidos por primera vez en Inglaterra en 1961 por Alec D. Bangham (Tiwari G, 2012), los liposomas son vesículas artificiales esféricas de dimensiones nanométricas constituidas por una o más bicapas concéntricas de fosfolípidos y esteroides como el colesterol u otros surfactantes que se forman espontáneamente cuando se dispersan en un medio acuoso (figura 15), esto debido a las propiedades termodinámicas que confieren los lípidos anfipáticos (Wilczewska AZ, 2012). Fármacos con diferentes lipofilidad pueden ser encapsulados en estas micelas: aquellos altamente lipofílicos son atrapados casi totalmente en la bicapa de fosfolípidos; los principios activos hidrofílicos son almacenados en el núcleo acuoso.

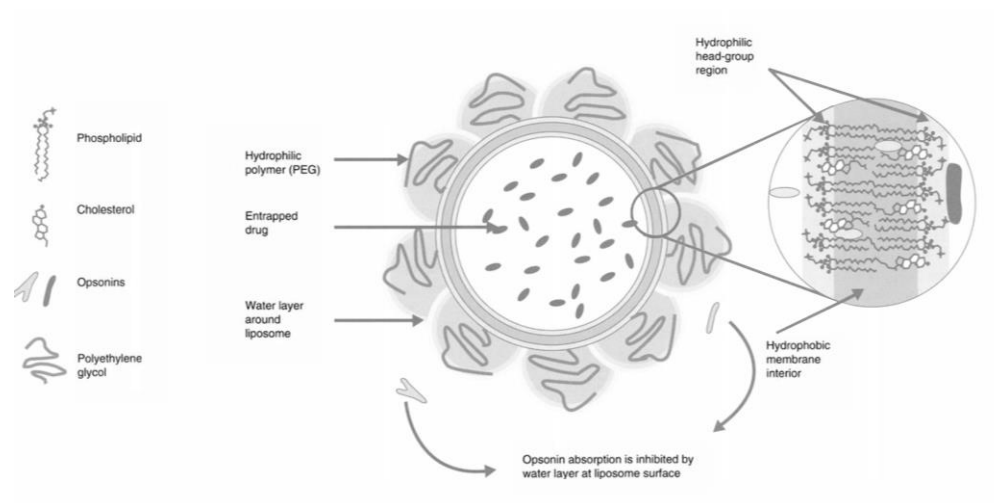


Figura 15. Estructura de los sistemas de liberación liposomal (Allen TM, 1997).

Gracias a su biocompatibilidad, capacidad para biodegradarse, baja toxicidad, aptitud para encapsular tanto fármacos hidrosolubles como liposolubles y facilitar la liberación del principio activo en el sitio de interés, los liposomas han captado el interés tanto científico como comercial.



En un inicio, los liposomas fueron sintetizados para estudiar el comportamiento de la membrana biológica; en los años 70's emergieron como transportadores de fármacos. Actualmente son utilizados en muchas disciplinas científicas incluyendo las matemáticas, física teórica, biofísica, química, estudio de los coloides, bioquímica, biología y en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Lasic DD, 1998).

### 5.7.1. Clasificación de los liposomas

El tamaño de los liposomas varía usualmente de 80 a 300nm, y pueden tener una o más membranas. El tamaño de partícula es un parámetro trascendental para determinar el tiempo de circulación y tanto el tamaño como el número de bicapas afecta la cantidad de fármaco que se logre encapsular. En base a su tamaño y número de capas, los liposomas pueden ser clasificados en dos categorías (figura 16) (Vemuri S, 1995):

- a) Vesículas multilaminares (MLV): Tamaño en un rango de 500 a 5,000nm y consisten en varias capas concéntricas en estructura de “cebolla”.
- b) Vesículas unilaminares: Esfera de una sola bicapa lipídica que envuelve un centro acuoso.

Se dividen a su vez en:

- a) Vesículas unilaminares grandes (LUV): rango de tamaño de 200 a 800nm.
- b) Vesículas unilaminares pequeñas (SUV): aproximadamente de 100nm.

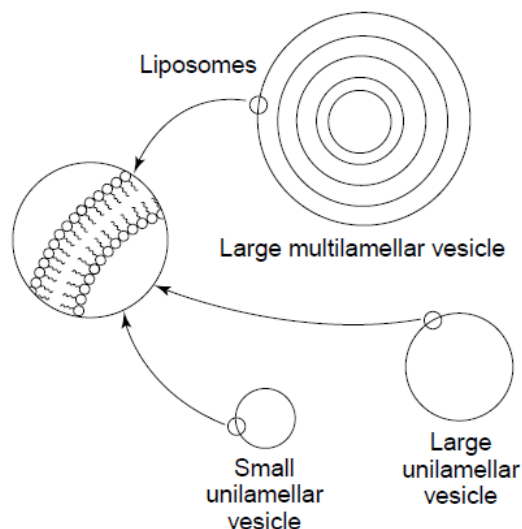


Figura 16. Clasificación de liposomas en por su número de membranas que los conforman (Lasic DD, 1998).

Otro criterio de clasificación se basa en las modificaciones realizadas sobre la superficie liposomal (figura 17):

- a) Liposomas convencionales
- b) Liposomas de circulación prolongada: también denominados liposomas stealth; son formulaciones que incorporan en la superficie polímeros biocompatibles hidrofílicos como gangliósidos o el polietilenglicol (PEG), que provocan una eliminación más lenta y por lo tanto, mayor tiempo en circulación.
- c) Inmunoliposomas: Se agregan anticuerpos a la membrana con la finalidad de incrementar la especificidad y acumulación en el sitio deseado.
- d) Liposomas catiónicos: están formulados a base de lípidos cargados positivamente. Se utilizan principalmente en terapia génica debido a las interacciones favorables con el ADN y ARN.

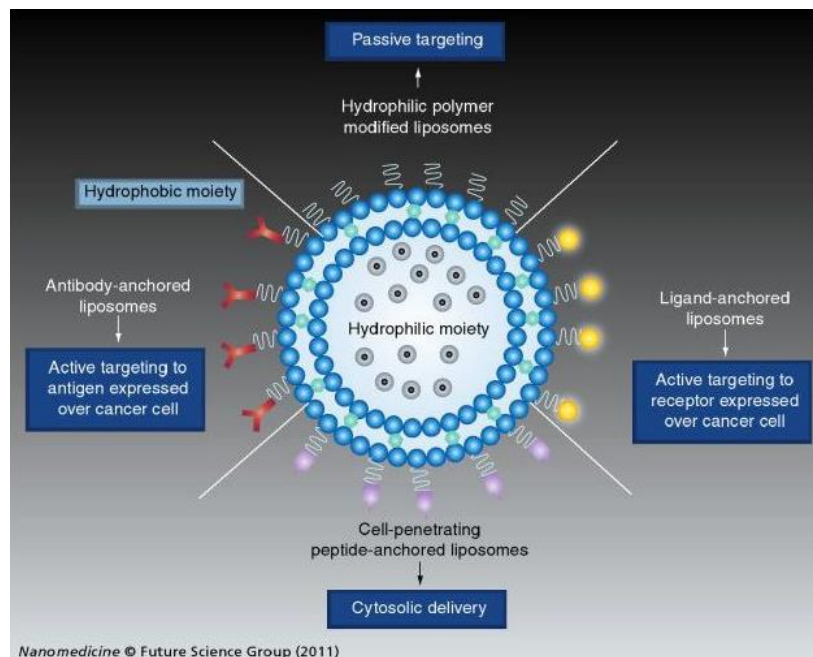


Figura 17. Clasificación de los liposomas en base a las modificaciones en la superficie lipídica (Paliwal SR, 2011).

### **5.7.2. Métodos de preparación**

Todos los métodos de preparación de liposomas incluyen cuatro etapas básicas:

1. Humidificación de lípidos en solvente
2. Dispersión de lípidos en medio acuoso
3. Purificación del liposoma resultante
4. Análisis de producto terminado

#### **5.7.2.1. Dispersión de solvente**

Los lípidos disueltos en un medio orgánico son inyectados gradualmente en una solución acuosa con el material a ser encapsulado a 55-65° C bajo presión reducida. La remoción del solvente producida por el vacío lleva a la formación de liposomas. La principal desventaja de esta técnica es la heterogeneidad del tamaño de partícula (70 a 200nm) y la exposición del principio activo al solvente orgánico y a altas temperaturas (Mozafari MR, 2005)

#### **5.7.2.2. Remoción de detergente**

Utiliza una solución acuosa de detergentes en su concentración crítica de micela para solubilizar los lípidos y el principio activo. Posteriormente el detergente se retira mediante diálisis; durante este proceso, los fosfolípidos se conglomeran hasta formar liposomas tipo LUV (Meure LA, 2008).

#### **5.7.2.3. Evaporación de fase inversa**

Este método implica un gran avance en la tecnología de fabricación de liposomas dado que permite, por primera vez, la preparación de liposomas con una alta proporción de espacio acuoso, por lo tanto, una alta capacidad para encapsular grandes cantidades de fármaco.

Esta técnica se basa en la creación de micelas invertidas, las cuales son formadas mediante sonicación de la mezcla del buffer acuoso con las moléculas que serán encapsuladas y la fase orgánica en la que también se pueden integrar fármacos hidrofóbicos. La eliminación lenta del solvente orgánico produce un estado viscoso en forma de gel. En algún punto

crítico del proceso, el exceso de fosfolípidos forma una bicapa completa alrededor de las micelas, lo que resulta en la formación de liposomas. Los liposomas hechos por este método pueden ser fabricados de una amplia gama de lípidos y tienen una relación de volumen acuoso-lipídico cuatro veces mayor que los liposomas multilaminares. (Szoca F, 1978; Zalba S, 2011; Akbarzadeh A, 2013)

### **5.7.3. Homogenización del tamaño de partícula**

#### **5.7.3.1. Sonicación**

La sonicación es posiblemente el método más utilizado para la preparación de SUV. Aquí, las MLV son sonicadas en un baño de agua o en un sonicador de probetas bajo atmósfera pasiva. Las principales desventajas de este método son: volumen interno reducido, eficiencia de encapsulado baja, eliminación de moléculas grandes y presencia de MLV entre SUV (Uhumwangho MU, 2005).

#### **5.7.3.2. Extrusión**

Esta técnica implica la filtración repetida de MLV por membranas de poro micrométrico a alta presión (500-800 psi). Aunque permite obtener un tamaño de partícula homogéneo, es difícil alcanzar temperaturas elevadas y el volumen de trabajo es limitado (50 mL máximo).

El uso de fosfolípidos y colesterol para la formulación de sistemas de liberación liposomales convencionales no evita la unión con proteínas séricas y por lo tanto, el reconocimiento de sistema retículoendotelial (SRE), que promueve su eliminación de circulación sistémica. Se han desarrollado estrategias para eliminar estas dificultades mediante el revestimiento de la superficie liposomal con moléculas inertes para formar una barrera espacial.

### **5.7.4. Liposomas de circulación prolongada (Stealth)**

Los primeros estudios enfocados en disminuir la captura de liposomas por el SRE los llevó a cabo Papahadjopoulos en 1988, quien intentó imitar la membrana de los eritrocitos mediante el uso de derivados de gangliósidos y ácido siálico como el monosialogangliósido

(GM1) (Immordino ML, 2006). El siguiente paso fue incrementar la hidrofiliidad de superficie liposomal con el uso de polímeros inertes (Ceh B, 1997).

El concepto se basa en que los polímeros hidrofílicos o los glicolípidos como el polietilenglicol (PEG), poseen una cadena flexible que ocupa el espacio inmediato adyacente a la superficie de la vesícula (capa periliposomal), que tiende a excluir macromoléculas (figura 18). Consecuentemente, la opsonización de componentes plasmáticos es impedida y la interacción con el SRE es inhibida. También se especula que la presencia de polímeros como el PEG unidos al nanosistema forman un revestimiento de agua en la superficie, de esta manera podría pasar inadvertido por el sistema fagocítico mononuclear (Nagayasu A, 1999; Moghimi SM, 2003).

Se ha comprobado que la inclusión de PEG a la membrana liposomal incrementa su vida media en circulación en cerca de 18 veces en comparación con aquellas formulaciones que carecen del glicolípidido (Blume G, 1990).

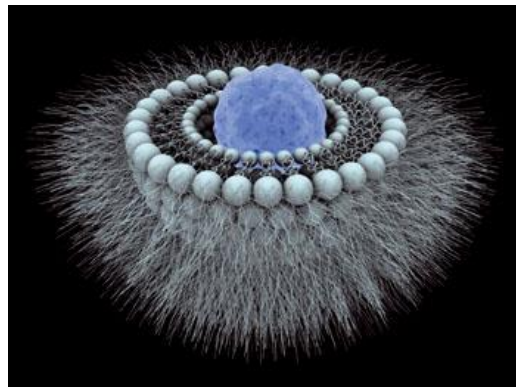


Figura 18. Liposomas pegilados de circulación prolongada (Stealth) (Stathopoulos GP, 2012).

#### **5.7.5. Acumulación en tumores**

Los liposomas stealth, en virtud de su alta estabilidad y biodisponibilidad en plasma provista por los grupos pegilados unidos a la membrana lipídica, favorece la acumulación pasiva en el tejido tumoral, beneficiándose del efecto de aumento de retención y permeabilidad, conocido como EPR (Enhanced Permeability and Retention), que consiste en el incremento de la permeabilidad de macromoléculas en el tumor debido a las

fenestraciones causadas por la angiogénesis, asociado a la pobre eliminación linfática y al lento retorno vascular (figura 19) (Cattel L, 2003; Maeda H, 2010, 2013; Fang J, 2011).

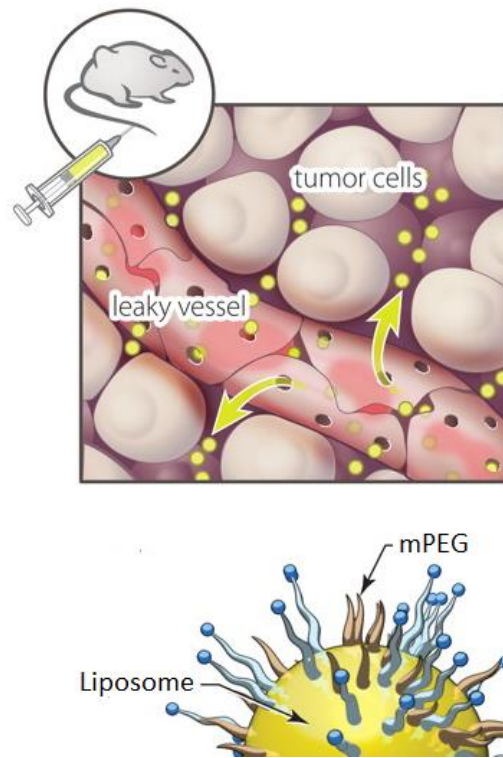


Figura 19. Acumulación de liposomas en tejido canceroso aprovechando el errático microambiente tumoral (Perrault SD, 2010).

### 5.7.6. Mecanismo de acción de los liposomas

Hasta el día de hoy no se ha dilucidado en su totalidad la forma en que operan los liposomas. En la figura 20, se muestra los diferentes mecanismos acción que siguen los liposomas. Los liposomas pueden adsorberse en la superficie celular de manera específica (a) o inespecífica (b). También se pueden fusionar con la membrana celular (c), y liberar su contenido en el citoplasma, o puede desestabilizarse por ciertos componentes celulares cuando se adsorben a la superficie de la célula (d), de esta manera el fármaco liberado puede ingresar a la célula mediante micropinocitosis. Puede existir un intercambio de los componentes lipídicos de los liposomas con la membrana celular mediado por proteínas de transferencia (e) o ser sujetos a endocitosis específica o no específica (f). En el caso de la endocitosis, el liposoma puede ser liberado por el endosoma en el lisosoma (g) o, en la ruta

hacia el lisosoma, el liposoma puede provocar la desestabilización del endosoma (h), lo que resulta en la liberación del fármaco en el citoplasma (Torchilin VP, 2005, 2012).

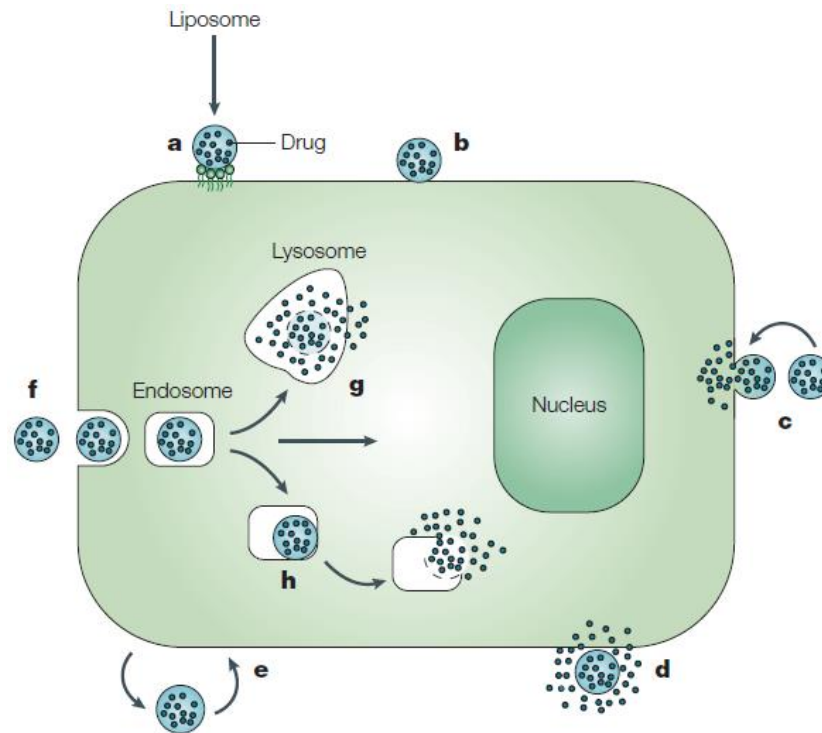


Figura 20. Mecanismos de acción propuestos para formulaciones liposomales (Torchilin VP, 2005).

### 5.7.7. Farmacocinética de los liposomas.

Una propiedad notable de los liposomas que los hace excelentes sistemas de liberación es su capacidad de alterar la farmacocinética del fármaco asociado, la cual es íntimamente relacionada a las propiedades fisicoquímicas de la nanoplataforma. En comparación con el fármaco libre o convencional, el sistema liposomal modifica la absorción, biodistribución y eliminación del agente, resultando, comúnmente en un aumento de la eficacia y seguridad, debido a la disminución de la toxicidad. (Mamot C, 2012; Gabizon A, 2012; Gusella M, 2014).

Después de su administración intravenosa, los liposomas circularán en la sangre con una vida media determinada por su tamaño, carga y composición de la membrana. Se sabe que tamaños de partícula pequeños tienen tasas de eliminación más lentas que aquellos con tamaños superiores (Allen TM, 1995). Tiempos de retención prolongados en sangre otorgan

mayor oportunidad de distribución hacia su sitio blanco, traduciéndose en el incremento de duración del efecto terapéutico (Düzgüneş N, 1999; Yamashita F, 2013).

Una vez en circulación, las opsoninas plasmáticas (inmunoglobulinas, C3b, fibronectina, proteína C reactiva, entre otras) son adsorbidas a la superficie liposomal, disparando el reconocimiento del SRE mediante receptores, principalmente del complemento (Papisov MI, 1998; Ait-Oudhia S, 2014). El principal sitio de eliminación de los liposomas y sus principios activos asociados es el SRE, particularmente en las células de Kupffer en el hígado y con la unión a macrófagos en el bazo; en menor medida también se puede presentar concentraciones bajas en médula ósea y nódulos linfáticos (Woodle MC, 1992; Liu D, 1997; Harasym TO, 1998).

Extensos estudios clínicos de doxorubicina liposomal pegilada –formulaciones actualmente en comercialización para el tratamiento de cáncer de mama-, con un tamaño de partícula promedio de 100nm, demuestran que mantienen una liberación prolongada, proveyendo niveles de exposición consistentes del fármaco al tumor (Drummond DC, 2008). Se observó una vida media ( $t_{1/2}$ ) de 48-72 horas comparadas con las 4 horas del fármaco convencional, demostrando la alta estabilidad de la formulación; la eliminación (Cl) disminuye de 73L/h/m<sup>2</sup> en el agente convencional a 24L/h/m<sup>2</sup> en el liposomal. La doxorubicina liposomal alcanza una concentración máxima en plasma cerca de 1000 veces superior al fármaco libre; comúnmente, menos del 1% menos del convencional llega al tumor mientras que el liposoma tiene una concentración intratumoral de 10 veces más (Woodle MC, 1995; Harrington KJ, 2002; Lao J, 2013). Todo esto permite modificar el esquema de dosificación; la doxorubicina convencional es administrada a 60-90mg/m<sup>2</sup> cada 3 semanas mientras que la liposomal se administra a 40-50mg/m<sup>2</sup> cada 4 semanas (Green AE, 2006). En este mismo contexto, se ha demostrado que la encapsulación de doxorubicina disminuye los efectos secundarios característicos del antineoplásico, manteniendo la eficacia antitumoral; el principal beneficio es la marcada disminución en la toxicidad cardíaca (Alberts DS, 1997; Theodoulou M, 2004).

Previamente, nuestro grupo de trabajo realizó estudios farmacocinéticos de una nueva formulación de cisplatino liposomal en ratas Wistar, administrando 6mg/kg de peso. Se



encontró que los parámetros del cisplatino convencional se ven modificados de manera significativa al encapsularse. Las concentraciones en plasma del fármaco convencional caen rápidamente durante las dos primeras horas, después de estas apenas es detectable; resultados que concuerdan con lo reportado en la literatura (Newman MS, 1999; Wang S, 2003.). De manera contraria, las concentraciones plasmáticas en el grupo de cisplatino liposomal decrecen lenta y sostenidamente encontrándose valores altos inclusive 48 horas después de la administración (figura 21).

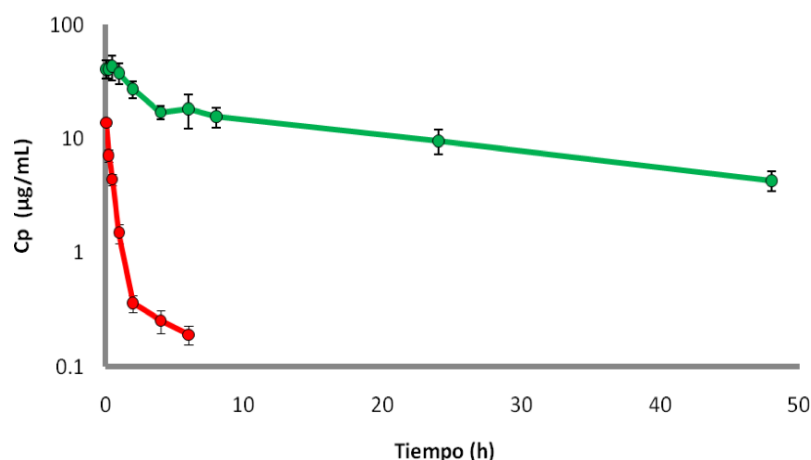


Figura 21. Concentración plasmática de cisplatino en razón del tiempo obtenidas tras la administración V.I. de 6mg/kg de cisplatino convencional (rojo) y cisplatino liposomal (verde). Cada punto representa el promedio de 6 animales  $\pm$ SEM (Toro A, 2010).

El volumen de distribución ( $V_d$ ) disminuyó prácticamente a la mitad, lo que indica menor fármaco en tejidos y mayor retención en plasma. Cl disminuyó casi 80 veces y  $t_{1/2}$  aumenta casi 4 veces. Los resultados anteriores se sintetizan en el aumento de casi 70 veces en el valor del área bajo la curva (ABC) para la formulación liposomal (figura 22) (Toro A, 2010).

Parámetro	Cisplatino convencional	Cisplatino liposomal
<b>Vd</b> (mL/kg)	311.26 $\pm$ 39.29	154.73 $\pm$ 21.7 *
<b>ABC</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}\cdot\text{kg}$ )	10.46 $\pm$ 2.57	749.42 $\pm$ 136.89 *
<b><math>t_{1/2\alpha}</math></b> (h)	0.16 $\pm$ 0.036	1.88 $\pm$ 0.16 *
<b><math>t_{1/2\beta}</math></b> (h)	9.41 $\pm$ 5.46	31.54 $\pm$ 5.97 *
<b>Cp<sup>0</sup></b> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	21.40 $\pm$ 3.59	44.26 $\pm$ 8.38 *
<b>Cl</b> (mL/h)	741.01 $\pm$ 151.25	9.29 $\pm$ 1.47 *

Figura 22. Parámetros farmacocinéticos de dos formulaciones analizadas. Los datos corresponden al promedio de 6 experimentos  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$  (Toro A, 2010).

### **5.7.8. Efectos adversos producidos por los liposomas**

Se han detallado pocos efectos secundarios producidos por la administración de liposomas y ninguno de ellos es grave, comúnmente estos malestares son asociados al fármaco encapsulado. Diferentes ensayos clínicos demuestran la disminución de efectos adversos en tratamientos liposomales en comparación con los convencionales (Perez AT, 2002; Hong RL, 2008; Kaminskas LM, 2012), por ejemplo, la encapsulación de antineoplásicos atenúa la toxicidad aguda como náusea, emesis y alopecia (Hong RL, 2001).

El principal efecto desfavorable es la eritrodisestesia palmo-plantar (PPE) o síndrome mano-pie, que consiste en un cuadro que inicia con hormigueo y parestesia en las plantas que evoluciona a descamación de la piel; los síntomas empeoran con dosis altas y repetidas. Aproximadamente el 23% de los pacientes la padecen en algún punto del tratamiento. La edad, raza, índice de masa corporal, estadio o histología no afectan estadísticamente entre los pacientes con PPE. (Green AE, 2006; Ko EM, 2013). Sin embargo, se ha visto claramente que la aplicación dérmica de cremas antioxidantes con alto factor de protección solar es una excelente estrategia para evitar su desarrollo (Lademann J, 2014).

Se han presentado reacciones de hipersensibilidad aguda, caracterizada por enrojecimiento general, edema facial, cefalea, dolor de cuerpo, hipotensión y disnea. Esta reacción se ha registrado en aproximadamente el 6.8% de los pacientes tratados con formulaciones liposomales y comúnmente ocurren en la primera administración (Uziely B, 1995). El 3.6% reportó náusea y vómito, el 4.5% experimentaron con desórdenes en mucosas, diarrea y en casos raros hepatomegalia y esplenomegalia (Drummond DC, 1999; Iwamoto T, 2013).

## **6. JUSTIFICACIÓN**

Estudios recientes demuestran el sinergismo entre el cisplatino -uno de los antineoplásicos más utilizados- y el agente antihormonal mifepristona en modelos tumorales tanto *in-vitro* como *in-vivo*; sin embargo, su baja especificidad por el sitio tumoral produce graves efectos secundarios que limitan su dosificación. Es por esto que la posibilidad de desarrollar un sistema liposomal que facilite el transporte de estos dos fármacos, promueva su acumulación pasiva en el blanco terapéutico y reduzca los efectos adversos en comparación con los agentes convencionales, plantea una prometedora alternativa terapéutica en el tratamiento del cáncer.

## **7. HIPÓTESIS**

Una formulación liposomal de cisplatino - mifepristona incrementará el efecto terapéutico en el tratamiento de CaCu al ser evaluado en estudios *in vitro* e *in vivo*.

## **8. METODOLOGÍA Y MATERIALES**

### **8.1. REACTIVOS**

El cisplatino, mifepristona, cloruro de níquel, promegestona, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro férrico, tiocianato de amonio y dietilditiocarbamato sódico, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. El fosfato de potasio monobásico y el fosfato de sodio dibásico, son de J. T. Baker<sup>®</sup>. Cristal violeta de Hycel de México<sup>®</sup>. Cell Proliferation Kit II (XTT) de Roche<sup>®</sup>. Cell Cycle Reagent y Nexin Reagent de Guava<sup>®</sup>.

Los lípidos empleados para la elaboración de los liposomas, fosfatidilcolina hidrogenada de soya (HSPC), colesterol y diesteroilglicerofosfoetanolamina (DSPE-mPEG<sub>2000</sub>), se obtuvieron de Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids Inc.

### **8.2. SOLVENTES**

El acetonitrilo y metanol grado cromatográfico, obtenidos de Honeywell<sup>®</sup>. El cloroformo grado reactivo es Merck<sup>®</sup>. Ácido acético glacial y formaldehído de J. T. Baker<sup>®</sup>. El agua empleada para cromatografía y preparación de soluciones se obtuvo del sistema Direct-Q UV de Millipore<sup>®</sup>.

### **8.3. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS DE CISPLATINO**

Inicialmente se probó la encapsulación por separado de cada uno de los principios activos (cisplatino y mifepristona), esto debido a las diferencias en su naturaleza fisicoquímica y por lo tanto, diferentes metodologías de elaboración.

La encapsulación de cisplatino se realizó mediante la técnica de evaporación de fase reversa basada en estudios previos (Stathopoulos GP, 2010; Kalra J, 2013). Los componentes de la bicapa lipídica son HSPC, colesterol y DSPE-mPEG<sub>2000</sub>. Para su elaboración, los lípidos se disuelven en una mezcla de cloroformo-metanol; a la par se prepara una solución sobresaturada de cisplatino en agua destilada estéril a 65° C con agitación magnética. Posteriormente, se gotea la solución clorofórmica a la acuosa lo que da lugar a la formación de los liposomas, se transfiere a un rotavapor acomplado a

sonicador para eliminar los solventes orgánicos y sonicación constante para reducir el tamaño de partícula durante 2 horas. Concluido el tiempo, el matraz que contiene los liposomas se depositan en un desecador de vacío durante 12 horas para eliminar cualquier residuo de solvente.

#### **8.4. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS DE MIFEPRISTONA**

La formulación de mifepristona liposomal también se realizó mediante la técnica de evaporación de fase reversa. A diferencia de la preparación de liposomas de cisplatino, en este caso los fosfolípidos y la mifepristona se disuelven juntos en una solución de cloroformo-metanol que se gotea en un volumen conocido de agua destilada estéril atemperada a 65° C. La mezcla se tranfiere al rotavapor durante 2 horas con sonicación constante. Terminado el tiempo, se elimina el solvente orgánico remanente en desecador de vacío durante 12 horas.

#### **8.5. COENCAPSULACIÓN DE CISPLATINO Y MIFEPRISTONA**

Este sistema liposomal se conforma de los lípidos HSPC, colesterol y DSPE-mPEG<sub>2000</sub> como componentes estructurales de membrana, el antihormonal mifepristona y el agente antineoplásico cisplatino.

La coencapsulación de los dos principios activos se realizó mediante el método de evaporación de fase reversa. En este caso, la mifepristona, debido a su liposolubilidad, se disolvió junto con los fosfolípidos en una mezcla de cloroformo-metanol; simultáneamente, el cisplatino se disolvió en agua destilada estéril. La solución orgánica se gotea lentamente en la solución acuosa para la formación de la emulsión liposomal y se lleva al rotavapor por 2 horas con sonicación constante para inducir un tamaño de partícula pequeño y homogéneo. Finalmente, se lleva al desecador de vacío por 12 horas para eliminar remanentes de solvente orgánico y se almacena en refrigeración a 4° C.

#### **8.6. ELIMINACIÓN DEL FÁRMACO NO ENCAPSULADO**

Para la purificación del sistema liposomal se eliminaron de los agentes activos no encapsulados utilizando los siguientes procedimientos:

### **8.6.1. Eliminación del cisplatino no encapsulado**

La separación del cisplatino libre se llevó a cabo por diálisis con una membrana semipermeable Spectra/Por<sup>®</sup> con tamaño de poro de 12 000 MWCO durante 4 horas con agitación a temperatura ambiente. El medio de diálisis se constituye de solución de cloruro de sodio 0.9% en proporción 20:1 (v/v) con respecto al volumen de liposomas y fue sustituido cada dos horas para evitar su saturación; se tomaron muestras a la 1, 2, 3 y 4 horas para cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

### **8.6.2. Eliminación de la mifepristona no encapsulada**

La mifepristona no atrapada se retiró mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna PD-10 GE Healthcare<sup>®</sup> preempacada con sephadex G-25M y agua destilada estéril como fase móvil. Los liposomas se agregaron a la columna y se recolectaron 40 fracciones de 1mL cada una. En cada una de las fracciones se cuantificó la cantidad de fosfolípidos con la finalidad de conocer el volumen en el que eluyen los liposomas; también cuantificó la concentración de mifepristona utilizando HPLC, para conocer el rango de las fracciones que contienen liposomas y aquellas con el fármaco libre.

Como método adicional de purificación, las fracciones relevantes obtenidas de la cromatografía se concentraron al volumen inicial por ultrafiltración a 5 000 rpm utilizando filtros para centrífuga Amicon<sup>®</sup> de 10 000 MWCO. De igual manera, se determinó la presencia de mifepristona en el filtrado.

## **8.7. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA**

### **8.7.1. Tamaño de partícula**

La prueba se basa en la técnica de dispersión dinámica de luz a 90° producida con un Zeta Sizer 90 Plus de Brookhaven Instruments Corporation<sup>®</sup>.

Antes de depositar la muestra en la celda de lectura, esta se lava con una solución de cloruro de potasio (KCl) 10mM para eliminar impurezas que pudieran interferir con la lectura; se agregan 2mL de la solución de KCl y 5µL del calibrador estándar de nanoesferas

de poliestireno provisto por Duke Scientific<sup>®</sup>, se homogeniza y se ejecuta la lectura. La medición de la muestra liposomal se realizó de la misma manera, agregando 5 $\mu$ L de muestra en lugar de estándar.

### **8.7.2. Potencial de membrana (Potencial Z)**

También conocido como potencial Z, es una prueba de estabilidad del sistema liposomal que calcula las cargas superficiales de atracción y repulsión entre las partículas y que permiten mantener la formulación en suspensión. Consiste en la disolución del estándar calibrador en 5mL de una solución de KCl 1mM. La celda se lava dos veces y se llena con 1.8mL con la solución anterior. Se introduce el electrodo que hará la medición a la celda y se conecta al Zeta Sizer 90 Plus<sup>®</sup>.

Las muestras liposomales se leen de la misma manera, con la diferencia de añadir 10 $\mu$ L de la formulación en 1.8mL de solución de cloruro de potasio. Los parámetros de lectura son: temperatura de 25° C, pH de 7.4 y el tamaño de partícula correspondiente a cada una de las muestras.

### **8.7.3. Cuantificación de fosfolípidos**

La determinación de la concentración de fosfolípidos en una muestra liposomal se basa en el método colorimétrico descrito por Stewart (Stewart JC, 1980), el cual se basa en la reacción entre el grupo fosfato de los fosfolípidos con el ferrotiocianato de amonio, formando un complejo detectable a 488nm; permite medir concentraciones en un rango de 0.01 a 0.1mg.

El cálculo de la concentración se realiza mediante una curva patrón con concentraciones que van de 0.02 a 0.08mg/mL de HSPC como estándar. Para la preparación de las muestras se realiza una dilución 1:10 de la muestra liposomal de la cual se tomaron 20 $\mu$ L que son llevados a sequedad total. Se rehidrató con 15 $\mu$ L de agua desionizada y se repitió el proceso de secado. Los lípidos se resuspendieron en 750 $\mu$ L de cloroformo y se agitó hasta homogenizar perfectamente. Seguido, se añadió 750 $\mu$ L de ferrotiocianato de amonio, se

agitó de nuevo para promover la reacción y se retiró la fase acuosa. La fase orgánica se deposita en una celda de cuarzo para obtener la lectura mediante espectrofotometría.

## **8.8. CUANTIFICACIÓN DEL FÁRMACO ENCAPSULADO**

### **8.8.1. Extracción y cuantificación de cisplatino liposomal**

La determinación de la concentración de cisplatino en la suspensión liposomal se realizó utilizando un método de HPLC desarrollado y validado en el laboratorio (Lopez-Flores A, 2005) el cual se describe a continuación: a muestras de 100µL de liposomas se agrega cloruro de níquel como estándar interno (E.I.) y acetonitrilo para disolver la bicapa lipídica y liberar el cisplatino, se centrifuga a 10 000 rpm por 10 minutos a 4° C para la precipitación de los lípidos. El sobrenadante se lleva a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno y el residuo se resuspende en solución salina 0.9%, se adiciona dietilditiocarbamato sódico (DDTC) como agente derivatizante; la mezcla se incuba a 37° C en un termomezclador Eppendorf® para promover la reacción. El platino-DDTC se extrae con cloroformo, se centrifuga para separar las fases y finalmente, la fase orgánica se inyecta al equipo de HPLC.

La concentración del principio activo encapsulado se calcula interpolando de la relación de altura del pico de la muestra con el E.I. obtenido del cromatograma en una curva patrón preparada a partir de liposomas blanco (sin carga de fármaco) en un rango de 0 a 10µg/mL.

### **8.8.2. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de cisplatino liposomal**

El equipo cromatográfico consta de un módulo de separación modelo 2695 acoplado a un detector de luz UV modelo 2489 (Waters®). Para la separación se utilizó una columna de fase reversa Symmetry® C18 (3.9 x 150mm) de 5µm de tamaño de partícula, mantenida a 23° C. La fase móvil se compuso de agua–metanol–acetonitrilo, en proporción 28:40:32 (v/v) respectivamente, a flujo de 1.8mL/min. EL volumen de inyección de muestra es 20µL y la detección se realiza a 254nm.



### **8.8.3. Extracción y cuantificación de mifepristona liposomal**

A partir de una dilución 1:100 de la muestra de liposomas, se añade promegestona como E.I. a una concentración de 4µg/mL y acetonitrilo para desintegrar la envoltura lipídica; se agita en vortex y se lleva a centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos y 4° C para precipitar y descartar los fosfolípidos. Se inyectan 20µL del sobrenadante directamente al equipo cromatográfico.

De igual forma que la cuantificación de cisplatino, la relación de picos de mifepristona y EI arrojados en el cromatograma se interpola en una curva patrón con rango de 0 a 16µg/mL para determinar la concentración exacta de fármaco presente en los liposomas.

### **8.8.4. Condiciones cromatográficas para cuantificación de mifepristona liposomal**

Se utilizó el equipo cromatográfico mencionado anteriormente. La columna de separación consistió en una Symmetry C18 mantenida a 20° C. La fase móvil consistió en agua-acetonitrilo, en proporción 10:90 (v/v) respectivamente, flujo de 0.8mL/min y 50µL de volumen de inyección. La detección se realiza a 302nm.

## **8.9. ESTUDIOS *IN-VITRO***

### **8.9.1. Línea celular**

La línea celular de cáncer cervical humano HeLa fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC) y mantenida de manera rutinaria en monocapa en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Gibco® suplementado con suero fetal bovino (SFB) e incubada a 37° C bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y alta humedad.

### **8.9.2. Inhibición del crecimiento celular**

Para este ensayo se sembraron células HeLa en medio DMEM enriquecido con 10% SFB a una densidad de 2x10<sup>4</sup>/pozo en placas de 12 pozos. Después de 6 horas las células fueron lavadas y expuestas a los fármacos convencionales y liposomales. Para la exposición de cisplatino las concentraciones estuvieron en un rango de 0-30µM; mientras que la

concentración de Mifepristona convencional fue de 0-9  $\mu\text{M}$ , esta concentración equivale a la concentración encapsulada en la formulación. El grupo control se expuso a la mayor concentración de fosfolípidos que contiene la formulación de cisapltino-mifepristona a la concentración más alta de la curva.

Las células se cultivaron en condiciones estándar por 5 días. Al final del experimento la viabilidad celular se determinó utilizando un ensayo de XTT y de cristal violeta. Todos los experimentos se realizaron 3 veces ( $n=3$ ) por triplicado cada uno, utilizando soluciones y liposomas recién elaborados.

#### **8.9.2.1. Ensayo de viabilidad celular por XTT**

Técnica que se basa en la ruptura de la sal tetrazolium [sodio 2,3-Bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida] para formar un complejo de color naranja de formazán; esta reacción puede ser llevada a cabo únicamente por aquellas células metabólicamente activas con mitocondrias intactas.

La metodología se siguió como se muestra a continuación: al término de las 120 horas de exposición a los tratamientos se retiró el medio de cultivo de los pozos, se lavaron dos veces con PBS, se agregó 500 $\mu\text{L}$  por pozo de medio DMEM 10% SFB sin rojo fenol adicionado con reactivo XTT. La absorbancia fue medida en un lector de placa (Multiskan MCC de Thermo Electron Corp<sup>®</sup>) a 492nm y 690nm.

#### **8.9.2.2. Ensayo de viabilidad celular por cristal violeta**

El ensayo de XTT se corroboró con la técnica de cristal violeta, la cual se basa en el ingreso del colorante al interior de las células con integridad de membrana comprometida, fenómeno que no sucede en aquellas con membrana intacta (Salgado M, 2002).

El medio se retiró y las células fueron lavadas dos veces con PBS y se fijaron con formol 10% (v/v) durante 24 horas. El día del ensayo se retira el formol y las células se tiñeron con el colorante de cristal violeta. La tinción fue removida con ácido acético glacial 33%; las placas fueron leídas a una longitud de onda de 570nm en un lector de placa.

### **8.9.3. Análisis del ciclo celular**

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células en cajas de  $25 \text{cm}^2$ , fueron sincronizadas y 24 horas después el medio se reemplazó con medio fresco conteniendo cada uno de los compuestos a la concentración de  $6.6 \mu\text{M}$ ; se decidió esta concentración dado que inhibe aproximadamente el 50% de las células sembradas. A los días 5 y 9 postratamiento las células fueron levantadas con PBS-EDTA, lavadas dos veces con PBS, fijadas con etanol al 70% (v/v) y almacenadas a  $4^\circ \text{C}$  hasta su análisis. El día del ensayo, se removió el solvente de la muestra y se lavó con PBS. La tinción del ADN se realizó con el kit Cell Cycle Reagent por 30 minutos en oscuridad. El análisis se efectuó por citometría de flujo utilizando un citómetro Guava EasyCyte de Millipore<sup>®</sup>, adquiriendo  $1 \times 10^4$  eventos. El estudio de resultados se llevó a cabo mediante el software Guavasoft. Se realizaron 3 experimentos independientes.

### **8.9.4. Análisis de apoptosis**

Las células fueron sembradas y tratadas como se mencionó anteriormente. El análisis de la apoptosis celular se realizó a los 5 y 9 días después de la exposición a los fármacos; las células fueron despegadas con PBS-EDTA y se tomaron 10,000 células para el ensayo. A estas células se les adicionó el reactivo Guava Nexin Reagent siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó por citometría de flujo en un total de  $1 \times 10^4$  eventos utilizando un Citómetro Guava EasyCyte de Millipore<sup>®</sup>. Los resultados fueron analizados con el software Guavasoft. El ensayo fue realizado por triplicado, realizando tres experimentos independientes.

## **8.10. ESTUDIO *IN-VIVO***

### **8.10.1. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones nu/nu hembras de 6-7 semanas de edad con peso promedio de 20g, mantenidos en condiciones libres de patógenos y alimentados *ad libitum*, obtenidos del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

El protocolo para el manejo y cuidado de los animales se diseñó de acuerdo a los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### 8.10.2. Evaluación terapéutica y toxicidad sistémica

Los ratones fueron inoculados vía subcutánea con  $5 \times 10^6$  células de la línea HeLa en la parte superior del lomo; una vez que se alcanzó un volumen tumoral aproximado de  $7 \times 7 \text{ mm}$  ( $150 \text{ mm}^3$ ) se dividieron aleatoriamente en grupos de 5 ratones cada uno y se procedió a administrar los tratamientos como se muestra en la figura 23.

Grupo	Tratamiento	Esquema de administración
1	Control	Sin tratamiento
2	Liposomas blanco	120mg/kg/semana x 3 semanas I.P.
3	Cisplatino convencional	3mg/kg/semana x 3 semanas I.P.
4	Mifepristona convencional	1.3mg/kg/semana x 3 semanas S.C.
5	Cisplatino/Mifepristona convencional	Misma dosis y esquema anteriores
6	Cisplatino liposomal	3mg/kg/semana por 3 semanas
7	Cisplatino/Mifepristona liposomal	Misma dosis y esquema anteriores

Figura 23. Descripción de tratamientos y esquema de administración de los grupos experimentales *in-vivo*. Vía intraperitoneal (IP), vía subcutánea (SC).

La eficacia terapéutica fue evaluada durante 6 semanas bajo el seguimiento del crecimiento tumoral, midiendo dos diámetros perpendiculares con un vernier digital. El volumen tumoral se determinó usando la siguiente fórmula:  $V = \pi/6$  (diámetro mayor [diámetro menor]<sup>2</sup>) (Medina LA, 2008)

La valoración de la toxicidad se realizó con el registro semanal del peso corporal de los animales durante todo el experimento.

### 8.10.3. Actividad metabólica tumoral

Se evaluó la actividad metabólica tumoral mediante imagen molecular en la primera y última semana del estudio, administrando como radiofármaco fluorodesoxiglucosa (<sup>18</sup>F-FDG) y utilizando un equipo microPET/CT Albira ARS<sup>®</sup>. Se inyectaron 100μCi del

radiofármaco vía IP; posteriormente, se adquirieron las imágenes 30 minutos después para permitir su biodistribución. Durante el estudio los ratones se mantuvieron bajo anestesia. La actividad metabólica se determinó cuantificando la captación de glucosa en la zona tumoral (Pérez-López B, 2011).

### **8.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para evaluar la diferencia entre los diferentes tratamientos administrados se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de Bonferroni utilizando el software de análisis estadístico SPSS<sup>®</sup> versión 20. Se estableció  $p < 0.05$  como diferencia estadísticamente significativa.

## **9. RESULTADOS**

### **9.1. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS**

#### **9.1.1. Liposomas cargados con cisplatino**

Se elaboraron 4 lotes de liposomas cargados con cisplatino mediante la técnica de evaporación de fase reversa, utilizando agua destilada como diluyente; se obtuvieron concentraciones promedio de 989.7  $\mu\text{g/mL} \pm 82.9$ , tamaño de partícula de 132nm  $\pm 6.1$ , potencial Z de -36.12mV  $\pm 1.1$  y concentración de fosfolípidos de 29.8mg/mL  $\pm 3.4$ .

#### **9.1.2. Liposomas cargados con mifepristona**

Debido a que la mifepristona es un fármaco liposoluble y estructuralmente similar al colesterol, se propone que este fármaco pueda intercale en la membrana.

Inicialmente, se desarrollaron 3 lotes de liposomas de mifepristona a concentraciones de 1, 5 y 10M, con la finalidad de obtener la mejor proporción de fármaco encapsulado. La concentración de mifepristona encapsulada fue 176, 475 y 496 $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. La concentración inicial que se decidió utilizar fue 5M, debido a que el rendimiento de encapsulación es mejor que 10M; este último no mostró concentraciones significativamente superiores, utilizaba el doble de principio activo que al final no se atrapaba y tendría que ser removido.

#### **9.1.3. Coencapsulación de cisplatino y mifepristona**

Una vez que se estableció la metodología para la elaboración de liposomas cargados con cada compuesto encapsulado de manera individual, se procedió a la coencapsulación de los dos fármacos en un mismo sistema liposomal, logrando concentraciones suficientes para realizar los ensayos *in-vitro* e *in-vivo*. Los resultados se muestran en la figura 26.

## 9.2. ELIMINACIÓN DE LOS FÁRMACOS NO ENCAPSULADOS

La purificación de la coencapsulación se llevó a cabo, primeramente, por diálisis con membranas semipermeables para eliminar el cisplatino por ósmosis; el descarte de la mifepristona libre se realizó mediante cromatografía por exclusión molecular con columnas PD-10; se recolectaron 40 fracciones de 1mL cada una y se procedió a cuantificar su contenido de fosfolípidos para determinar la presencia de liposomas (figura 24).

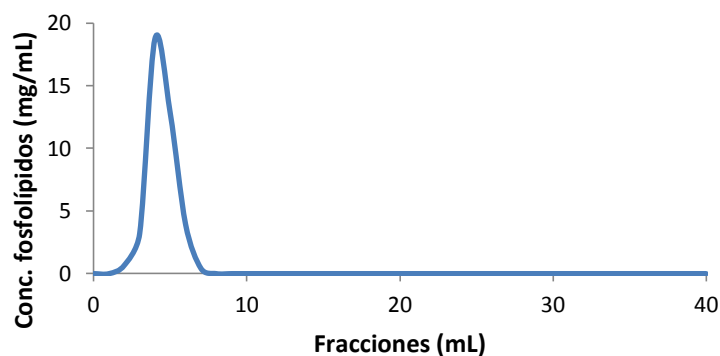


Figura 24. Concentración de fosfolípidos en las fracciones recolectadas de la cromatografía por exclusión de tamaño en PD-10.

Se concluyó que los liposomas eluyen en las fracciones 2 a 8, siendo estas las recolectadas y concentradas a su volumen inicial. Adicionalmente, se cuantificó la concentración de mifepristona liposomal en estas mismas 40 fracciones para comprobar si el método de purificación era eficiente (figura 25).

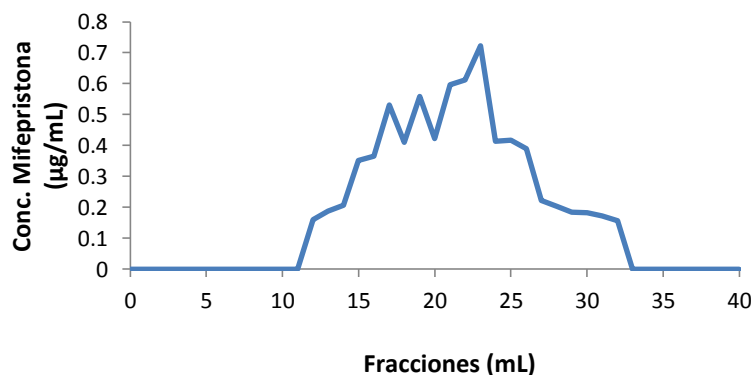


Figura 25. Perfil cromatográfico de la mifepristona liposomal libre en columna PD-10.

La mifepristona libre eluye a partir de la fracción 11, lo que demuestra ser un método de separación efectivo dado que el fármaco no encapsulado y los liposomas no se traslapan.

### **9.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS LIPOSOMAS**

#### **9.3.1. Tamaño de partícula**

Durante la elaboración de las diferentes formulaciones liposomales, el tamaño de partícula fue homogenizado por sonicación permanente, dando como resultado vesículas con tamaños promedio de  $116.8\text{nm} \pm 13.1$  (figura 26).

#### **9.3.2. Potencial de membrana (Potencial Z)**

El potencial Z o potencial de membrana en formulaciones liposomales es una medida de estabilidad de la suspensión. Un rango de  $-30\text{mV}$  a  $-50\text{mV}$  indica baja propensión a flocular y adhesión entre las partículas. Los lotes elaborados mostraron un potencial en un rango entre  $-35$  y  $-45\text{mV}$  (figura 26).

#### **9.3.3. Cuantificación de fosfolípidos**

Aun cuando los fosfolípidos estructurales de los liposomas les confieren biocompatibilidad con el organismo, la concentración es importante. La concentración promedio de fosfolípidos obtenidas en los lotes de liposomas preparados fue de  $36.4\text{mg/mL} \pm 1.3$  (figura 26).

Por otro lado, en el primer lote elaborado, la concentración de ambos fármacos encapsulados fue baja en comparación con los liposomas cargados con una sola molécula. La mifepristona, al ser una molécula liposoluble, se intercala en la membrana lipídica, engrosándola, y el cisplatino, por su naturaleza hidrofílica, se inserta en el núcleo del liposoma, creando una lucha de ambos fármacos por un lugar en el sistema y limitando la concentración de ambos principios activos. Para los lotes subsecuentes, se modificaron las condiciones de elaboración, reduciendo el tiempo de sonicación, con los que se lograron concentraciones superiores y muy aceptables en comparación con ese primer lote; de esta manera, la cantidad encapsulada de cisplatino y mifepristona son comparables con las utilizadas en estudios *in-vitro* e *in-vivo* con fármacos convencionales.



Figura 26. Resultados de análisis fisicoquímico de lotes desarrollados. \*Valores promedio de lotes  $\pm$ SEM.

Lote	Conc. P.A. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial Z (mV)	Conc. Fosfolípidos (mg/mL)
Blanco 1-4	-	96.5 $\pm$ 2 *	0.044 $\pm$ 0.01 *	-39.9 $\pm$ 1 *	34.9 $\pm$ 0.6 *
MF (1M)	176.3	97.7	0.064	-40.8 $\pm$ 0.6	39.9
MF (5M)	475.4	94.4	0.089	-44.9 $\pm$ 0.7	40.4
MF (10M)	496.6	96.1	0.107	-35.1 $\pm$ 0.6	35.5
CisPt 1-4	989.7 $\pm$ 82.9 *	132 $\pm$ 6.1 *	0.133 $\pm$ 0.03 *	-36.1 $\pm$ 1.1 *	29.8 $\pm$ 3.4 *
CisPt/MF 1-5	CisPt-615.4 $\pm$ 45.4 MF-175.5 $\pm$ 86.3 *	184 $\pm$ 56.6 *	0.216 $\pm$ 0.03 *	-34.9 $\pm$ 0.1 *	37 $\pm$ 2.3 *
CisPt/MF 6-9	CisPt-813.1 $\pm$ 103.1 MF-381.2 $\pm$ 19.5 *	109.3 $\pm$ 5.4 *	0.110 $\pm$ 0.02 *	-38.7 $\pm$ 1.2 *	37.6 $\pm$ 0.4 *

## 9.4. CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACO ENCAPSULADO

### 9.4.1. Cuantificación de cisplatino encapsulado

La determinación de la concentración de cisplatino encapsulado se realizó por HPLC. El tiempo de retención del cisplatino fue de 3.2 minutos y 4.1 minutos para el cloruro de níquel (E.I.) (figura 28). El método cromatográfico presenta una buena selectividad para la determinación del cisplatino; la concentración mínima cuantificable es 0.1 $\mu\text{g/mL}$ , se observaron picos bien definidos sin ningún tipo de interferencia en los tiempos de retención de los picos de interés. Asimismo, el método mostró linealidad, precisión y exactitud en el rango de 0 a 10 $\mu\text{g/mL}$  (figura 27).

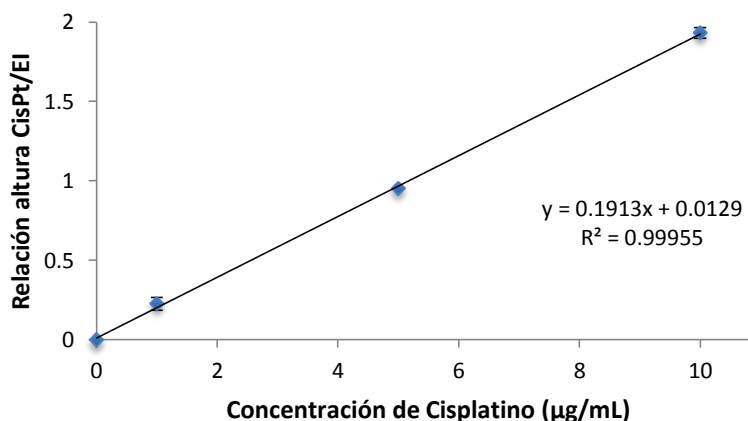


Figura 27. Curva de calibración de cisplatino. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones  $\pm$  D.E.

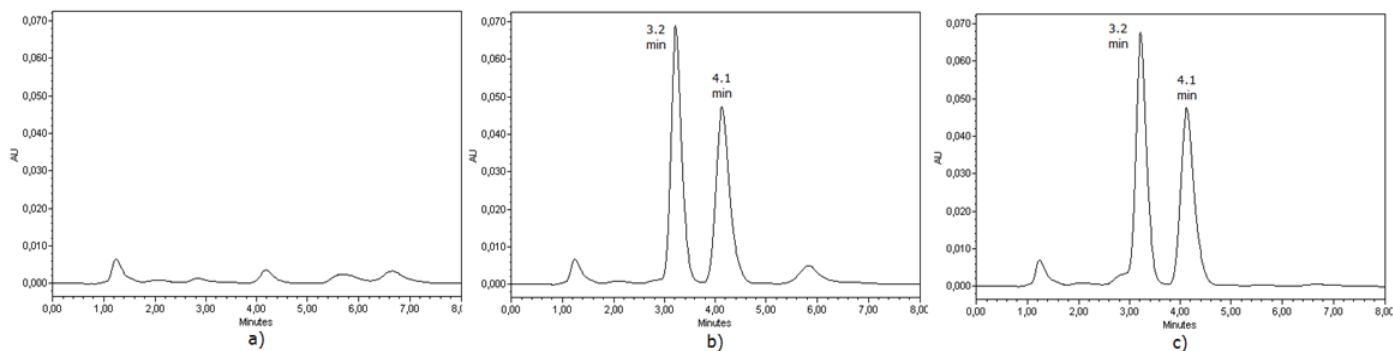


Figura 28. Cromatogramas obtenidos de cisplatino por HPLC. a) blanco (matriz de la muestra), b) 10µg/mL de cisplatino y 25µg/mL de E.I y c) cisplatino liposomal.

#### 9.4.2. Cuantificación de mifepristona encapsulada

La determinación de la concentración de mifepristona se realizó utilizando la técnica de HPLC, interpolando el valor de la muestra liposomal en una curva patrón. El método demostró ser sensible, con picos bien definidos, sin interferencias en los tiempos de retención de las muestras y linealidad en el rango de 0 a 16µg/mL (figura 29).

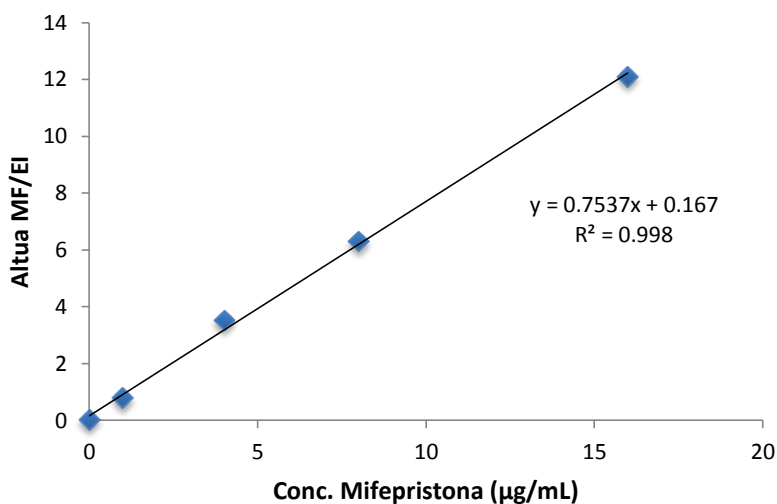


Figura 29. Curva de calibración de mifepristona. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones ± D.E.

El tiempo de retención de la mifepristona observado en los cromatogramas fue de 2.6 minutos, mientras que el E.I. aparece aproximadamente a los 3.8 minutos (figura 30).

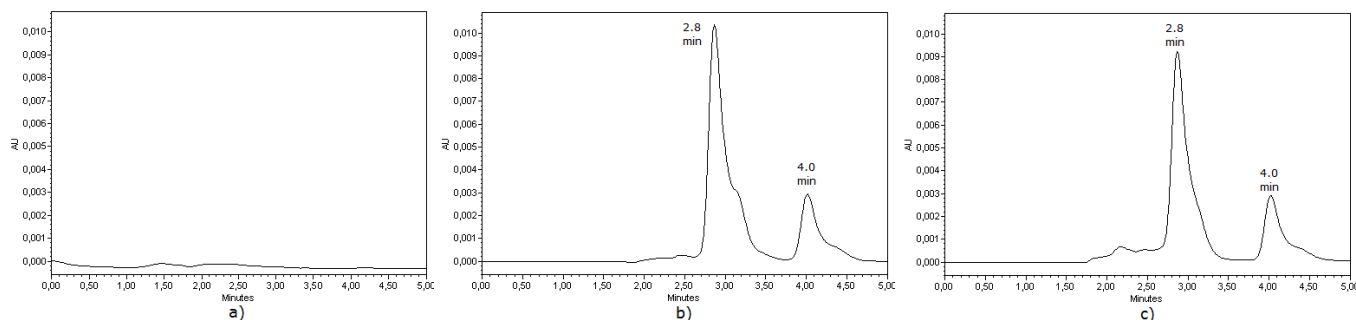


Figura 30. Cromatogramas obtenidos de muestras de mifepristona liposomal. a) blanco, b) 4µg/mL de mifepristona y 4µg/mL E.I. y c) mifepristona liposomal.

### 9.5. ESTABILIDAD DEL SISTEMA CISPLATINO-MIFEPRISTONA

Como medida de estabilidad para el almacenamiento de formulaciones liposomales, se cuantificó la concentración de los principios activos 15 meses después de su elaboración (figura 31).

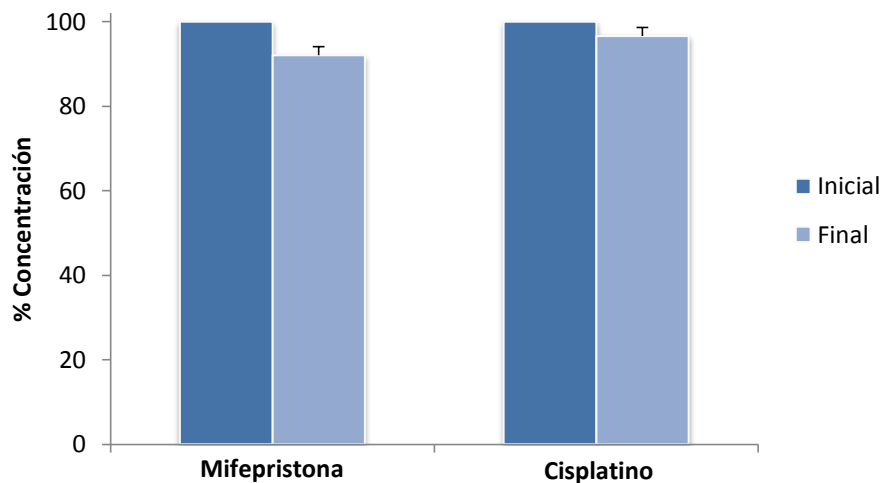


Figura 31. Estabilidad de las formulaciones liposomales 15 meses después de su elaboración. Cada barra representa el promedio del porcentaje de concentración  $\pm$ SEM.

Se examinaron los lotes 1, 2 y 3 de mifepristona con concentraciones de 1M, 5M y 10M respectivamente, el lote 1 de cisplatino y el lote 1 de coencapsulación de cisplatino-

mifepristona, almacenados a 4° C. Con 15 meses después de su elaboración, las concentraciones de los fármacos mostraron una disminución mínima, lo que demuestra la buena estabilidad de las formulaciones elaboradas.

## 9.6. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

En las figuras 32 y 33 se muestra la viabilidad celular después de los distintos tratamientos evaluados por el método XTT y corroborados por cristal violeta.

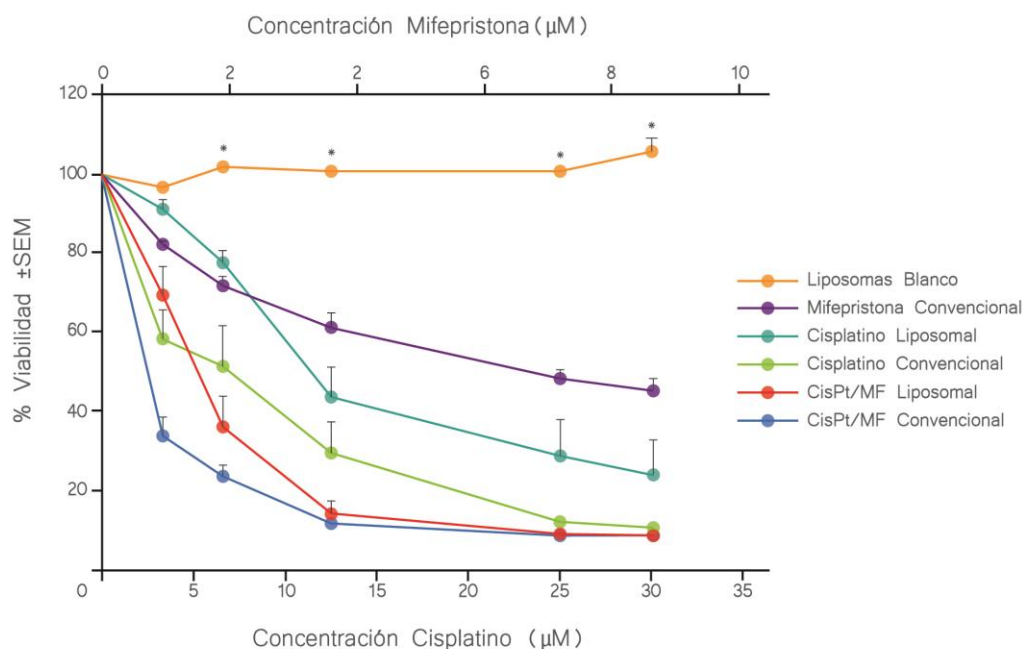


Figura 32. Inhibición del crecimiento celular de los agentes terapéuticos a 5 días por XTT. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos individuales realizados cada uno por triplicado  $\pm$ SEM. \*Diferencia significativa entre liposomas blanco vs liposomas de cisplatino-mifepristona a partir de 6.6 $\mu$ M y mifepristona convencional vs liposomas de cisplatino-mifepristona a partir de 6.6 $\mu$ M ( $p < 0.001$ ).

Los resultados señalan que concentraciones equivalentes de fosfolípidos entre los grupos de fármacos liposomales y liposomas blanco no tiene efecto alguno sobre las células, lo que demuestra que la inhibición producida por las formulaciones liposomales es efecto de los fármacos encapsulados. El cisplatino convencional administrado individualmente a concentraciones elevadas muestra un efecto cercano a las combinaciones, sin embargo estas últimas tienen efectos más sostenidos y mejores a concentraciones menores. La combinación cisplatino-mifepristona tanto convencional como liposomal muestran la mayor muerte celular a partir de 6.6 $\mu$ M, con un porcentaje de sobrevivencia menor a 9%, efecto

superior a las terapias individuales. Se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de cada tratamiento: mifepristona no encapsulada 23.5µM, cisplatino liposomal 11.5µM, cisplatino no encapsulado 7µM, el sistema liposomal de cisplatino-mifepristona 5µM y el tratamiento simultáneo de cisplatino y mifepristona no encapsulados 2.8µM.

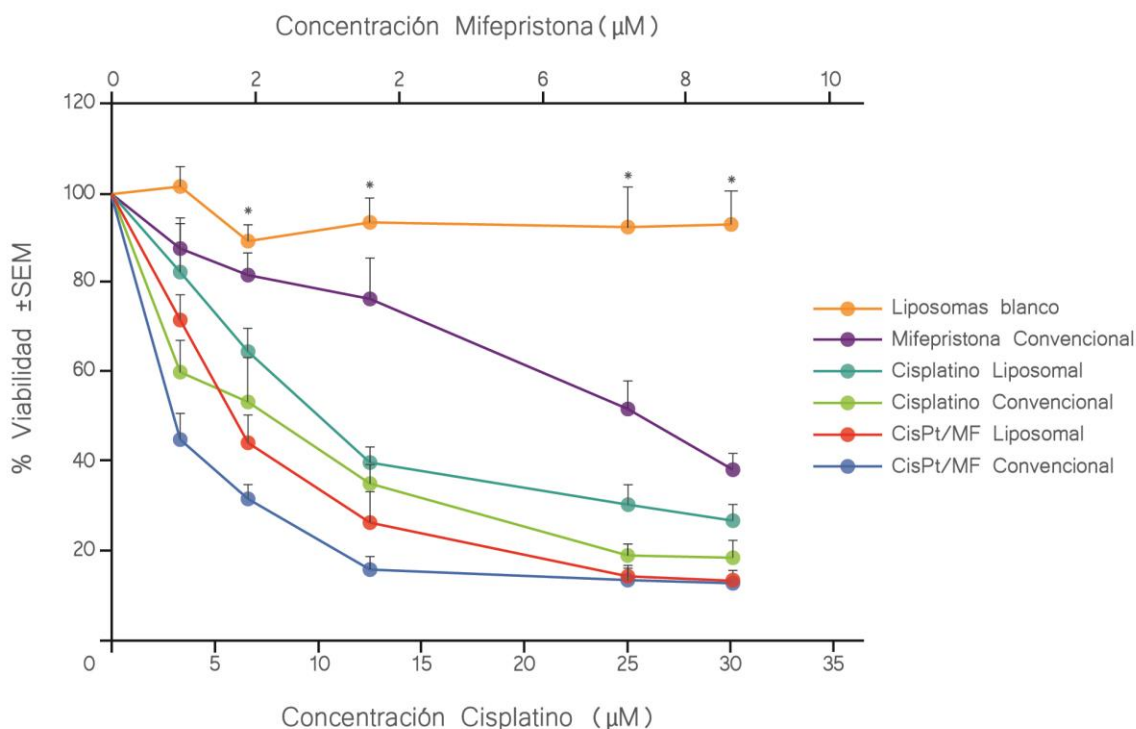


Figura 33. Inhibición del crecimiento celular de los agentes terapéuticos a 5 días por cristal violeta. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos individuales realizados cada uno por triplicado ±SEM. \*Diferencia significativa entre liposomas blanco vs liposomas de cisplatino-mifepristona a partir de 6.6µM y mifepristona convencional vs liposomas de cisplatino-mifepristona a partir de 6.6µM (p<0.001).

A pesar de que el análisis estadístico marca diferencia significativa únicamente entre la formulación liposomal de cisplatino-mifepristona con respecto a mifepristona convencional y liposomas blanco, sí se observa una marcada tendencia de la coencapsulación liposomal a la disminución del porcentaje de sobrevida en comparación con los demás tratamientos, solamente la combinación cisplatino-mifepristona convencional parece mostrar un efecto similar. De la misma manera, se calcularon las IC<sub>50</sub> de cada uno de los tratamientos aplicados: los liposomas blanco no muestran inhibición alguna, mifepristona no encapsulada 25.5µM, cisplatino liposomal 10µM, cisplatino no encapsulado 7.4µM,

coencapsulación de cisplatino-mifepristona liposomal 5.7 $\mu$ M y cisplatino-mifepristona no encapsulados 3 $\mu$ M.

## 9.7. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

Se estudió la distribución de las fases del ciclo celular en células HeLa del grupo sin tratamiento (control), contra el cisplatino liposomal y la coencapsulación cisplatino-mifepristona a 5 y 9 días.

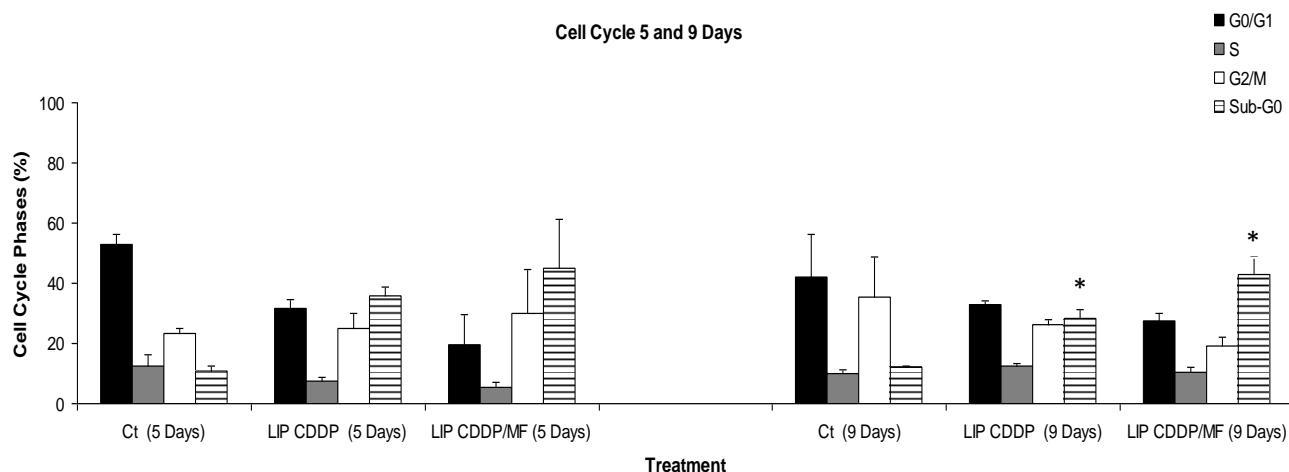


Figura 34. Análisis de ciclo celular a 5 y 9 días de control versus formulaciones liposomales. \*Diferencia estadísticamente significativa en la fase Sub-G0 de las formulaciones liposomales a 9 días postratamiento con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de 3 experimentos individuales realizados cada uno por triplicado  $\pm$ SEM.

## 9.8. ANÁLISIS DE APOPTOSIS

Se analizó la muerte celular producida por los tratamientos mediante citometría de flujo a 5 y 9 días postratamiento. Las siguientes figuras representan el porcentaje de inducción a apoptosis producida por cada uno de los agentes individuales, combinados y liposomales.

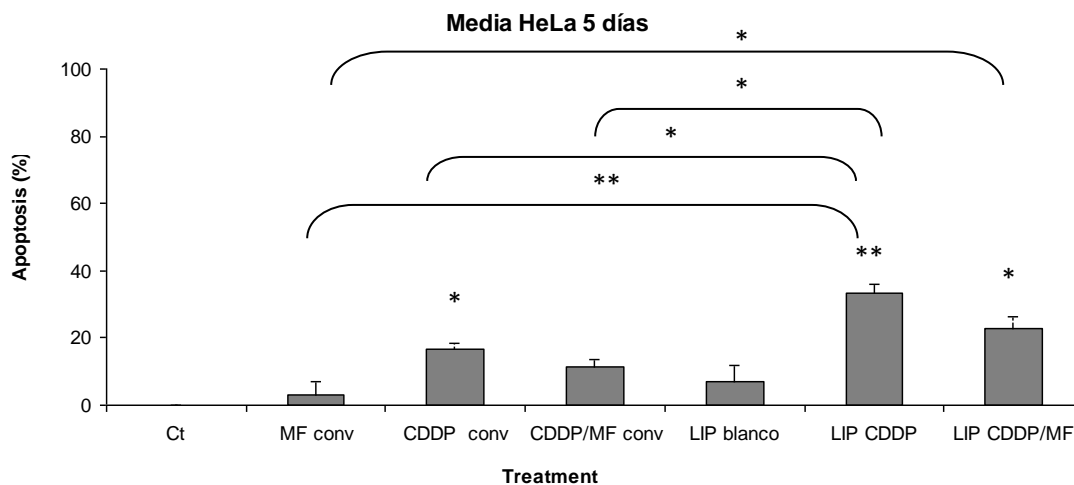


Figura 35. Apoptosis generada por los agentes terapéuticos tras 5 días de exposición con los fármacos. Comparación entre el tratamiento contra el control. Las comparaciones entre tratamientos se marcan con corchete. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ). \*\*Diferencia estadísticamente significativa entre el control y el cisplatino liposomal y la mifepristona convencional y cisplatino liposomal ( $p < 0.001$ ). Cada barra representa el promedio mínimo de 3 experimentos individuales realizados cada uno por triplicado  $\pm$ SEM.

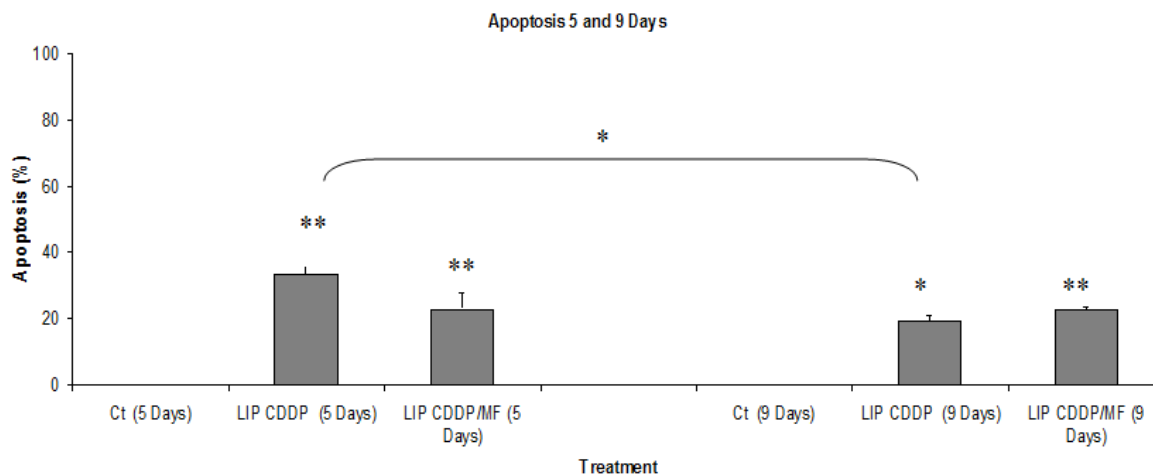


Figura 36. Comparación entre días de la apoptosis inducida los tratamientos liposomales contra el control del mismo día. Las comparaciones entre tratamientos se marcan con corchete. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ). Diferencia estadísticamente significativa entre control y liposomas de cisplatino-mifepristona ( $p < 0.001$ ). Cada barra representa el promedio mínimo de 3 experimentos individuales realizados cada uno por triplicado  $\pm$ SEM.

## 9.9. EVALUACIÓN TERAPÉUTICA DEL SISTEMA LIPOSOMAL EN XENÓGRAFOS DE CaCu EN RATONES ATÓMICOS

La eficacia terapéutica de la formulación liposomal de cisplatino-mifepristona fue estudiada en ratones hembra nu/nu xenotransplantados con células HeLa. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño tumoral aproximado de 5x5mm el estudio fue iniciado administrando los compuestos bajo el esquema mencionado en materiales y métodos.

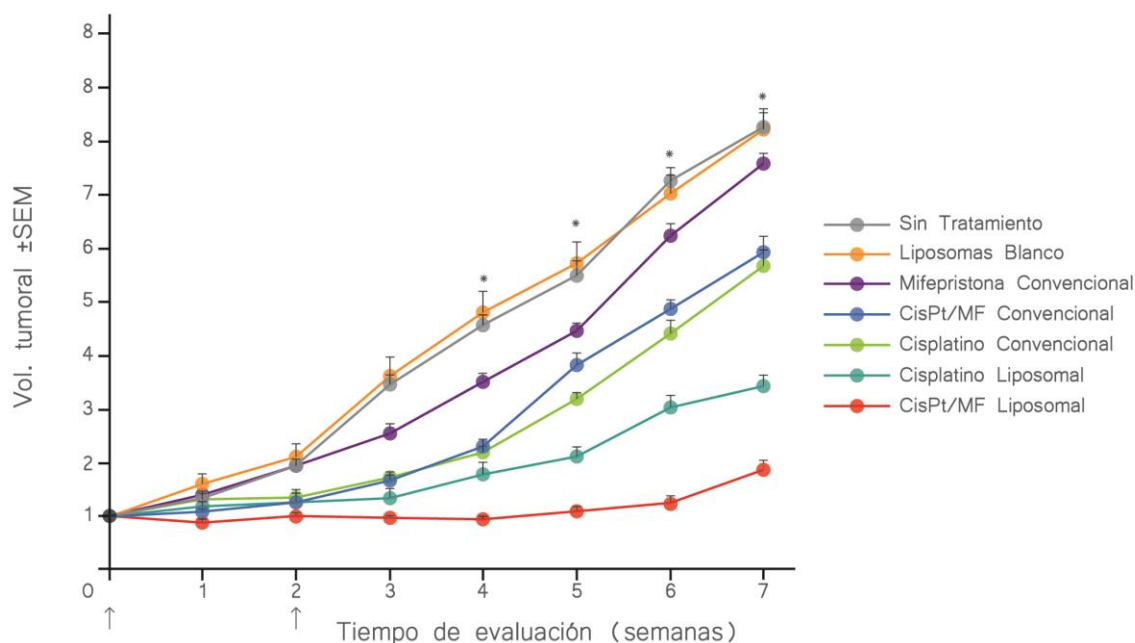


Figura 37. Seguimiento del crecimiento tumoral durante 7 semanas de iniciado el tratamiento. Cada punto representa el promedio de 6-8 ratones  $\pm$ SEM. Las flechas marcan el inicio y final de los tratamientos. \*Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con liposomas de cisplatino-mifepristona y todos los demás grupos a partir de la cuarta semana ( $p < 0.001$ ).

La figura 37, el grupo control (sin tratamiento), liposomas blanco y mifepristona convencional, el tumor aumentó alrededor de 7 veces respecto al volumen inicial. El cisplatino convencional (no encapsulado) y la combinación cisplatino-mifepristona sin encapsular, tuvieron un crecimiento de 4.5 veces, mientras que el cisplatino liposomal inhibió el crecimiento 2.4 veces, sin embargo, los ratones que recibieron la terapia con liposomas de cisplatino-mifepristona mostraron un mejor efecto con 0.8 veces de incremento del volumen tumoral con respecto al inicial. Estos resultados se relacionan con las imágenes de la figura 38, donde evidentemente se muestra un tamaño tumoral final



menor (basado en un vernier en el inferior de las imágenes) en el grupo tratado con la coencapsulación liposomal, en comparación con el grupo control (liposomas sin carga de fármaco) y la combinación de cisplatino-mifepristona no encapsulados.



Figura 38. Volumen tumoral final (semana 7) del estudio in-vivo.

En la figura 39 se muestra la comparación del tamaño tumoral de los diferentes grupos al final del estudio. Observándose que los tumores de los animales que recibieron el sistema liposomal de cisplatino-mifepristona son menores en comparación a los tumores de los animales que recibieron los fármacos no encapsulados, e incluso que el grupo que tratado con liposomas de cisplatino.

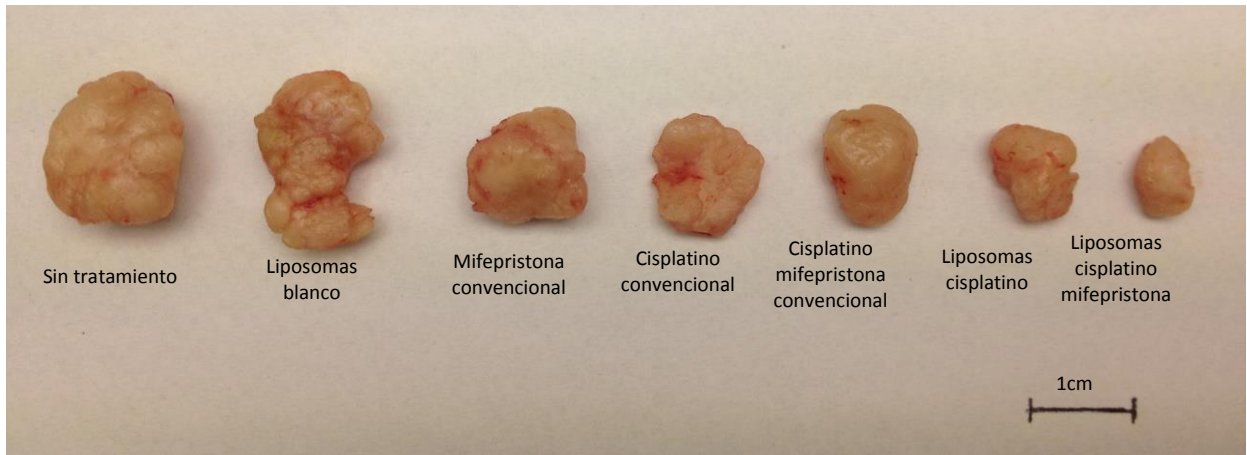
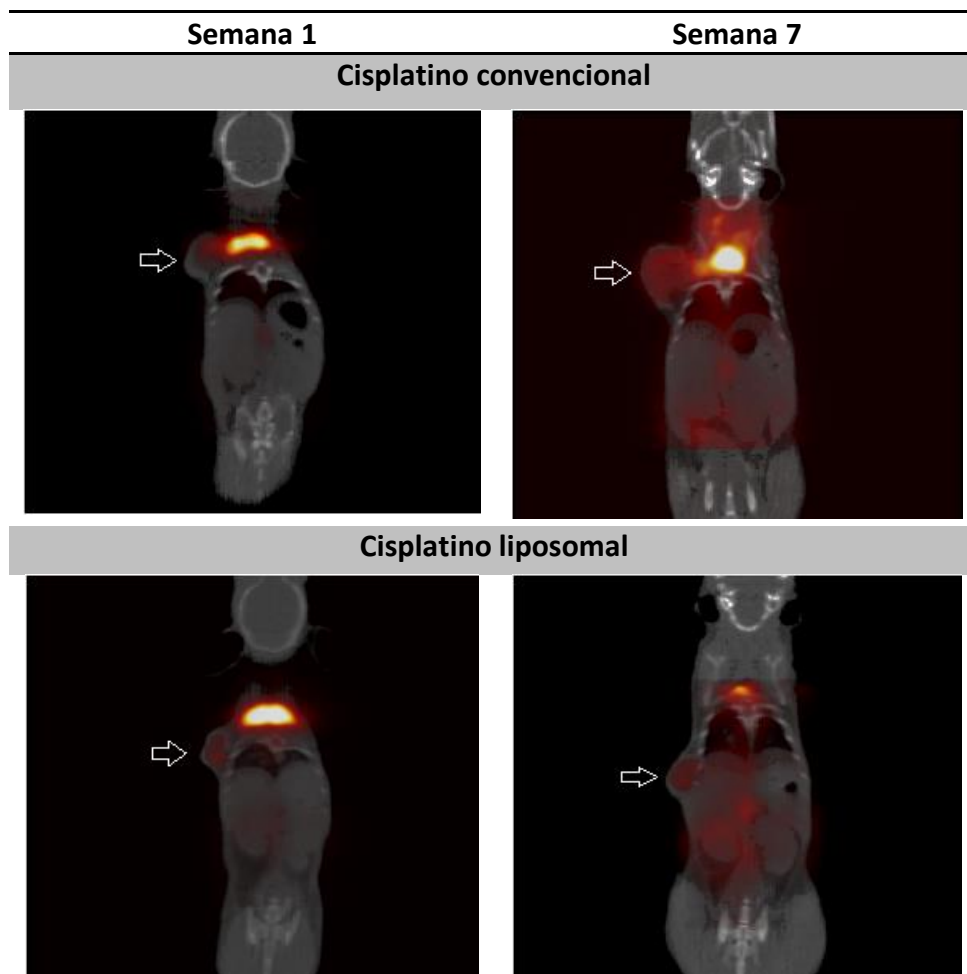


Figura 39. Comparación de tamaño de tumores disecados al finalizar el estudio.

### 9.10. ACTIVIDAD METABÓLICA TUMORAL

La figura 40 muestra la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG. La diferencia de intensidad en el color de la zona tumoral indica el grado de actividad metabólica.



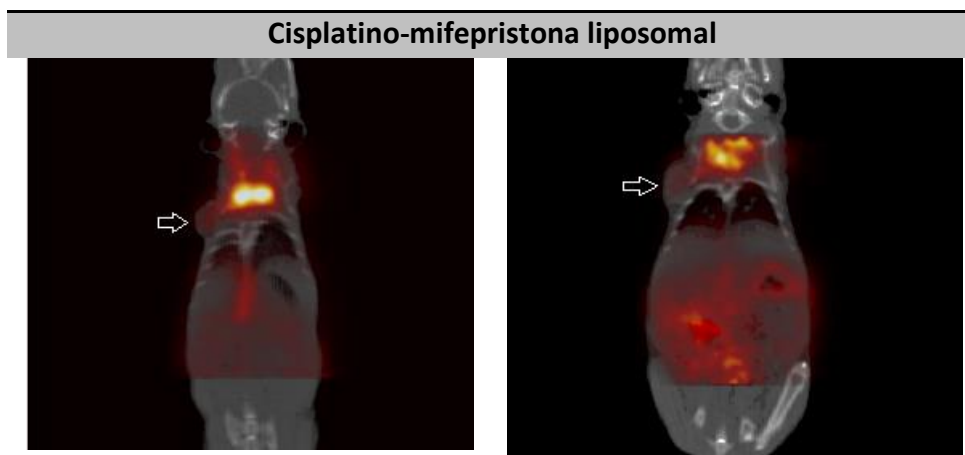


Figura 40. Captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG mediante micro PET/CT al inicio (semana 1) y final (semana 7) del seguimiento del volumen tumoral.

Las imágenes finales muestran un aumento en la captación tumoral en los grupos tratados con cisplatino no encapsulado y cisplatino liposomal respecto a la captación inicial; sin embargo, el grupo administrado con el sistema liposomal de cisplatino-mifepristona mostró una disminución de la actividad tumoral al final del tratamiento comparada con la actividad inicial. Mediante el ensayo de imagen molecular se determinó el volumen de interés metabólico (VOI). En la figura 41 se compara el VOI normalizado final (semana 7) respecto al inicial (semana 1), mostrando un aumento de 3.9 veces en el grupo tratado con cisplatino no encapsulado, mientras que en el tratamiento de cisplatino liposomal se observó un aumento de 0.3 veces. Contrario a estos incrementos, los ratones tratados con la formulación liposomal de cisplatino-mifepristona disminuyeron, pasando de un VOI normalizado de 1 a 0.6.

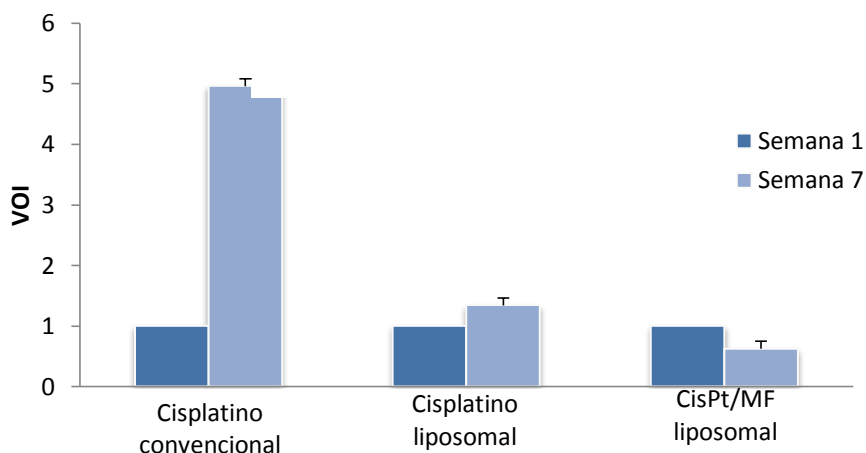


Figura 41. Volumen de interés normalizado; representa la actividad metabólica tumoral al inicio (semana 1) y final (semana 7) del seguimiento del volumen tumoral. Las barras de los tratamientos de cisplatino liposomal

y cisplatino-mifepristona liposomal representan el promedio de 2 ratones; las barras del tratamiento con cisplatino convencional (no encapsulado) representa 1 ratón.

### 9.11. TOXICIDAD SISTÉMICA

La evaluación de la toxicidad sistémica producida por los diferentes tratamientos -analizada por la pérdida en el porcentaje de peso corporal- a lo largo del periodo de estudio se muestra en la figura 40, observando que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

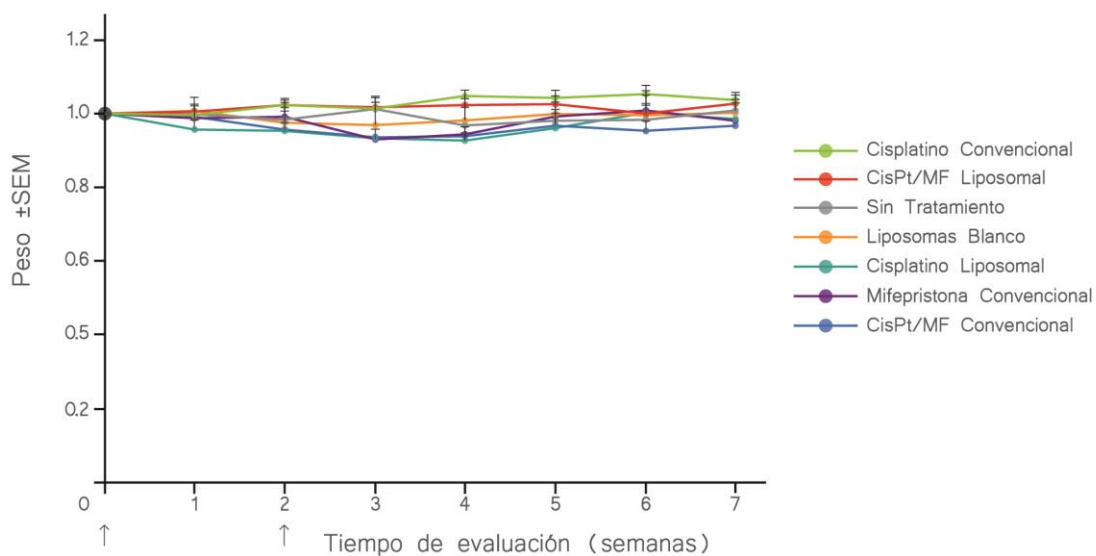


Figura 42. Peso corporal normalizado de ratones sometidos a los diferentes esquemas de tratamiento. Promedio de individuos de cada grupo  $\pm$ SEM.

## 10. DISCUSIÓN

Actualmente, el cáncer cervicouterino es una de las neoplasias malignas con mayor prevalencia a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo (Lawson HW, 1998. Almonte M, 2010). Es un cáncer de lento desarrollo y a pesar de la gran disponibilidad de pruebas y campañas para su detección temprana, un alto porcentaje de pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas, en las cuales, los tratamientos de elección son radioterapia y quimioterapia. El fármaco de primera línea para el cáncer cervical avanzado es el cisplatino; sin embargo, presenta graves efectos indeseables así como desarrollo de resistencia (Starha P, 2014), lo que limita su administración. En este sentido, se han propuesto nuevos métodos para potenciar la respuesta de los antineoplásicos sin incrementar sus efectos secundarios, como el desarrollo de moléculas análogas al platino, ejemplo de esto son el carboplatino y oxaliplatino. Ambos tratamientos han demostrado una ligera disminución en los efectos secundarios, no obstante, no se ha obtenido una mejor eficacia (Todd RC, 2009). Otro método es la administración concomitante de agentes antineoplásicos y antihormonales como tamoxifeno/doxorubicina/ciclofosfamida, cisplatino/mifepristona o temozolamida/mifepristona (Ponzzone R, 2006. Eroles P, 2010, Llaguno-Munive, 2013).

A pesar de estos avances, la terapia convencional dista mucho de ser ideal, particularmente por su dificultad para acumularse en tejido tumoral; en este sentido, la nanotecnología ha tenido un avance importante en el desarrollo de nanosistemas como los liposomas, para mejorar la eficacia, seguridad, propiedades fisicoquímicas y perfiles farmacocinético/farmacodinámicos de diversos agentes. Estos nanosistemas ofrecen una mejor biodisponibilidad y mayor deliberación del principio activo a tejido tumoral, llevando a una mejor eficacia terapéutica (Lammers T, 2012; Stapleton S, 2013).

A la fecha se han desarrollado varios sistemas liposomales que encapsulan antineoplásicos con la finalidad de mejorar la respuesta biológica y reducir la toxicidad, así como controlar la liberación del fármaco (Hofheinz RD, 2005). Sin embargo, el desarrollo de sistemas liposomales que encapsulan simultáneamente dos fármacos es escaso.

En el presente trabajo se planteó el diseño y desarrollo de un nuevo sistema liposomal que encapsula simultáneamente el cisplatino y el agente antihormonal mifepristona, dos fármacos que han demostrado tener un efecto sinérgico cuando se administran simultáneamente tanto en líneas celulares como en xenotransplantes de cánceres como cervicouterino (Jurado R, 2009) y ovario (Gamarra-Luques CD, 2012).

La primera etapa del proyecto consistió en la elaboración de liposomas cargados con cada uno de los fármacos por separado. La preparación se realizó mediante el método de fase reversa, dado que estudios previos demostraron que este método es eficiente para la encapsulación de cisplatino (Zawada ZH, 2004; Toro Córdova A, 2010). Al elaborar la coencapsulación de cisplatino-mifepristona, el diluyente utilizado fue solución salina, dado que se ha reportado buena estabilidad en dicho compuesto (Cheung YW, 1987; Bristol-Myers Squibb Company, 2010); sin embargo, los primeros lotes que se elaboraron presentaron una eficacia de encapsulación baja, con concentraciones promedio de cisplatino de 615 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de mifepristona de 175 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y un tamaño de partícula de 184nm; por lo que el método de preparación del sistema liposomal se modificó disminuyendo el tiempo de sonicación y se evaluó el agua destilada como diluyente. Estas modificaciones disminuyeron el tamaño de partícula a 109nm e incrementaron un 25% la encapsulación de cisplatino y el doble de mifepristona.

Para eliminar el fármaco no encapsulado, los liposomas se pasaron por una columna de cromatografía por exclusión molecular PD-10. Se recolectaron fracciones de 1mL y se cuantificó el contenido lipídico y de cada fármaco; se comprobó la eliminación del fármaco no encapsulado de la formulación liposomal (resultados mostrados en las figuras 24 y 25).

Una vez que se desarrolló y purificó el sistema liposomal de cisplatino-mifepristona, se prosiguió a su análisis fisicoquímico. Se obtuvieron tamaños de partícula promedios de 110nm. Se ha documentado que un tamaño entre 100 y 200nm favorece la acumulación de liposomas en el tejido tumoral; de igual manera prolonga el tiempo en circulación debido a la disminución del reconocimiento por el SRE (Ramachandran S, 2006).

El potencial Z, indicador de la estabilidad de suspensiones, es determinado por las fuerzas de repulsión electrostáticas entre las partículas que componen el coloide; si la carga es

elevada, las partículas permanecen dispersas y en suspensión. Los lotes elaborados mostraron un potencial de membrana promedio de  $-37\text{mV}$ , lo que indica una estabilidad aceptable para este tipo de formulaciones (Malvern Instruments, 2013).

El contenido de fosfolípidos en las formulaciones elaboradas se encontró en el rango de 30 a  $40\text{mg/mL}$ . Previos estudios en el laboratorio han demostrado que la administración de estas concentraciones de fosfolípidos en ratas Wistar sanas, no presentan toxicidad sistémica; probablemente el organismo sea capaz de manejar este incremento (Toro A, 2010).

El sistema liposomal presentó una buena estabilidad, dado que no se observó floculación en lotes analizados 15 meses después de su preparación. Se observó que pasado este tiempo, la formulación seguía en suspensión, no presentaba cambios físicos y la disminución de cisplatino y mifepristona fue menor a 10% (figura 31).

Se prepararon 9 lotes de la formulación liposomal, comprobando que este método de elaboración es reproducible; así que el siguiente objetivo fue la evaluación del sistema liposomal en una línea celular de CaCu.

### **10.1. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR**

En este trabajo, se evaluó la citotoxicidad de los liposomas cargados simultáneamente con cisplatino y mifepristona en la línea celular de CaCu HeLa. Los resultados muestran una disminución de la viabilidad celular al aplicarse el sistema liposomal desarrollado, efecto similar tras la aplicación de los fármacos no encapsulados.

La  $IC_{50}$  de mifepristona y cisplatino no encapsulados fue de  $23.5\mu\text{M}$  y  $7\mu\text{M}$  respectivamente, mientras que la aplicación simultánea de los dos principios activos convencionales mostró una  $IC_{50}$  de  $2.8\mu\text{M}$ . Se observó una  $IC_{50}$  de  $11.5\mu\text{M}$  por parte de los liposomas cargados con cisplatino y de  $5\mu\text{M}$  de la coencapsulación liposomal. La diferencia podría ser debido al mecanismo de acción propio de los liposomas y al arresto celular al exponerse a la formulación liposomal como se observa en los resultados del análisis del ciclo celular (Fig. 34).

Al analizar el perfil del ciclo celular por citometría de flujo, no se observó diferencia significativa en la fase G2/M entre los tratamientos y el control; sin embargo, existe un incremento del 12% en el tratamiento del sistema de cisplatino-mifepristona liposomal respecto al control a los 5 días de exposición, lo que podría indicar un arresto en esta fase. Se vio un aumento en el grupo control, sin ser estadísticamente significativo; este efecto fue causado por muerte producida por la confluencia celular a 9 días de su siembra. El pico subdiploide indica células apoptóticas; se observó que el tratamiento con la coencapsulación de cisplatino-mifepristona incrementa este pico subdiploide con respecto al control a 5 y 9 días, mostrando un efecto prolongado sobre la apoptosis celular.

Se estudió la inducción de apoptosis en las células HeLa después de 5 días de exposición al sistema liposomal (figura 34). Los resultados muestran que los liposomas sin carga de fármaco no mostraron diferencia significativa respecto al control, lo que corrobora que no presentan citotoxicidad. Se observó un aumento de la apoptosis respecto al control en los grupos tratados con los fármacos convencionales. Los tratamientos liposomales mostraron diferencia estadísticamente significativa, con un mayor efecto apoptótico en comparación con los tratamientos no encapsulados.

Con la finalidad de conocer la duración de la actividad apoptótica, las suspensiones liposomales se analizaron a 9 días. Con el cisplatino liposomal se observó un valor de apoptosis inferior en comparación con lo observado a los 5 días, lo que sugiere que el antineoplásico pudiera perder actividad en el transcurso de los días. Caso contrario sucede con el sistema liposomal de cisplatino-mifepristona, que siguió causando apoptosis a los 9 días, valor semejante a lo mostrado a 5 días. Estos resultados sugieren que al exponerse con la coencapsulación liposomal, las células no tendrían manera de recuperarse y se mantendría la apoptosis, mostrando un efecto más prolongado que los demás tratamientos.

En este trabajo se demostró que al exponerse un cultivo de células HeLa a liposomas sin carga de fármaco no se produjo muerte estadísticamente significativa respecto al grupo control (sin tratamiento), lo que indica que la muerte celular producida por la formulación liposomal de cisplatino-mifepristona es producto de los fármacos encapsulados y no de los componentes de la membrana lipídica. Nuestros resultados muestran también que uno de



los mecanismos por el cual la formulación liposomal de cisplatino-mifepristona disminuye la proliferación celular es a través de la inducción de la apoptosis. Se comprueba también que el efecto apoptótico es estadísticamente superior a los tratamientos convencionales y de efecto más prolongado.

Las investigaciones actuales sobre la interacción de los liposomas con las células están basadas principalmente en estudio in-vivo sobre cultivos celulares y conclusiones de las observaciones in-vivo. Se han descrito diferentes teorías sobre el mecanismo de acción de los liposomas: los liposomas intercambian materiales como lípidos y proteínas con las células, lo que permitiría la liberación de los fármacos. Los liposomas podrían adherirse o fusionarse a la membrana celular. Otra posibilidad es el ingreso al interior de la célula mediante micropinocitosis o endocitosis transferida a los lisosomas (Torchilin VP, 2005, 2012). Una vez liberado de la vesícula, el cisplatino y la mifepristona ejercen su efecto mediante sus particulares mecanismos de acción, los cuales han sido ampliamente descritos con anterioridad.

Después de comprobar el efecto citotóxico del sistema liposomal, se evaluó el efecto terapéutico de los liposomas cargados con cisplatino-mifepristona en ratones xenotransplantados con células HeLa.

## **10.2. EVALUACIÓN TERAPÉUTICA DEL SISTEMA LIPOSOMAL EN XENÓGRAFOS DE CaCu EN RATONES ATÍMICOS**

Los datos presentados en la figura 37 muestran el seguimiento del volumen tumoral. Los resultados demostraron que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo sin tratamiento y el tratado con liposomas sin carga de fármacos, lo que descarta un posible efecto antitumoral por parte de los componentes del liposoma. El tratamiento doble con cisplatino y mifepristona no encapsulados disminuyó significativamente la velocidad del crecimiento tumoral con respecto al control; sin embargo, la coencapsulación liposomal simultánea de estos dos fármacos mostró el mejor efecto terapéutico; se observó diferencia estadísticamente significativa con los demás tratamientos administrados a partir de la cuarta semana del estudio.

Los resultados revelan que la formulación liposomal de cisplatino-mifepristona mantiene prácticamente sin cambios el tamaño tumoral durante las 7 semanas de evaluación, lo que demuestra ser un efectivo antitumoral, el cual actúa de manera más prolongada y constante que los tratamientos individuales y simultáneos no encapsulados. Estos datos se corroboran con las imágenes moléculas producidas por el microPET/CT (figura 40 y 41), donde se observa que tras la administración del sistema liposomal no solo se disminuye la velocidad del crecimiento tumoral, sino que también la captación del radiofármaco, lo que indica el decremento de células tumorales.

Aunado a la eficacia antitumoral de la formulación liposomal, el resultado sobre el análisis de la toxicidad sistémica (Figura 42) demostró la ausencia toxicidad demostrable dado que no existe pérdida en el peso superior al 20%, ni muerte de ninguno de los animales tratados con esta formulación, lo que sugiere que los liposomas no tienen toxicidad elevada (OPS, 2007).

La formulación de doxorubicina liposomal se encuentra actualmente en el mercado como terapia alternativa a la doxorubicina convencional. Ha sido por años el sistema liposomal más estudiado, demostrando la disminución de la toxicidad característica de la antraciclina e incluso, posibles ventajas en eficacia antitumoral (Woodle MC, 1995). Se ha demostrado que cuando un fármaco es encapsulado en una vesícula, la farmacocinética se modifica, siguiendo ahora el perfil que le confiere el liposoma. Al comparar la doxorubicina no encapsulada contra la liposomal, se observa un incremento en el ABC, el  $t_{1/2}$  y una disminución en la velocidad de eliminación (Huwyler J, 2008).

Por otro lado, diferentes formulaciones liposomales de cisplatino se encuentran en ensayos clínicos; un ejemplo es la formulación SPI-077, la cual ha demostrado tener eficacia antitumoral dependiente de dosis en tumores generados con células C-26 en ratones Balb/c, donde se observó un incremento del doble de efectividad antitumoral. A diferencia del cisplatino no encapsulado, donde se observa un  $t_{1/2}$  de 20-30 minutos, un ABC de  $24\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$  y una rápida eliminación, la formulación liposomal muestra un perfil farmacocinético diferente, con un  $t_{1/2}$  de 37h, un ABC de  $1461\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$  y una eliminación mucho más sostenida (Newman MS, 1999).

El mecanismo por el cual los liposomas incrementan su biodisponibilidad ha sido extensamente discutido. Los polímeros hidrofílicos unidos a la membrana liposomal como el PEG, poseen cadenas flexibles que ocupan el espacio inmediato a la superficie del liposoma, las cuales tienden a excluir macromoléculas, consecuentemente, la unión de opsoninas es impedida y por lo tanto, su captura por macrófagos. La disminución en el reconocimiento del SRE, permite a los liposomas acumularse pasivamente dentro de tejidos y órganos. Este fenómeno es evidente en tumores sólidos en proceso de angiogénesis: las irregularidades en el tejido epitelial de la vasculatura tumoral facilita la extravasación de partículas de hasta 300nm al espacio intersticial (Immordino ML, 2006).

Basado en estudios previos y conforme a lo observado en este trabajo, se demuestra la relevancia de desarrollar nuevos sistemas de transporte de principios activos que sean capaces de aprovechar las irregularidades que presentan los tumores para incrementar el efecto terapéutico y disminuir los efectos secundarios. La formulación desarrollada y evaluada tanto *in-vitro* como *in-vivo*, propone una nueva alternativa para el tratamiento del CaCu. Sin embargo, es necesario comprobar estos resultados en otros modelos experimentales, así como estudiar otros mecanismos moleculares implicados en la acción del sistema, con la finalidad de que en un futuro sirva como una opción en la terapia clínica.

## **11. CONCLUSIÓN**

Se desarrolló y estandarizó la metodología para la elaboración de un sistema liposomal que encapsula simultáneamente cisplatino y mifepristona mediante la técnica de evaporación de fase reversa.

Los ensayos de viabilidad en la línea celular de CaCu, demostraron que la coencapsulación de cisplatino y mifepristona presenta una actividad citotóxica igual a la combinación de cisplatino y mifepristona no encapsulados y mayor a los tratamientos individuales. El mecanismo de muerte celular causado por la formulación se debió a un arresto en fase G2 y apoptosis.

Los liposomas de cisplatino-mifepristona mostraron efectividad antitumoral sobre xenotransplantes de CaCu, al disminuir la velocidad de crecimiento del volumen tumoral en comparación con los fármacos no encapsulados y la formulación de cisplatino liposomal, sin presentar toxicidad sistémica evaluada por la pérdida de peso corporal.

## **12. PERSPECTIVAS**

- Evaluar la farmacocinética y otros posibles mecanismos moleculares además del análisis del ciclo celular y apoptosis implicados en la acción del sistema liposomal de cisplatino-mifepristona.
- Evaluar la eficacia y toxicidad de la formulación liposomal en modelos tumorales resistentes a cisplatino.
- Evaluar diferentes dosis y esquemas de tratamiento.
- Ensayos clínicos.

### **13. BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- GAVI-UNFPA-WHO meeting. Strengthening cervical cancer prevention and control. 2009.
- 2.- Secretaría de Salud. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino. Diario Oficial de la Federación. 2007.
- 3.- Organización Mundial de la Salud. Control integral del cáncer cervicouterino. Guía de prácticas esenciales. 2007.
- 4.- Burger KN, Staffhorst RW, de Vijlder HC, Velinova MJ, Bomans PH, Frederik PM, de Kruijff B. Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high toxicity. *Nature Medicine* 8:81-4. 2002.
- 5.- Ramachandran S, Quist AP, Kumar S, Lal R. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir* 22:8156-8162. 2006.
- 6.- Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM. Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs. *Current Medicinal Chemistry. Anti-cancer Agents* 2:539-51. 2002
- 7.- Freeburg EM, Goyeneche AA, Seidel EE, Telleria CM. Resistance to cisplatin does not affect sensitivity of ovarian cancer cell lines to mifepristone cytotoxicity. *Cancer Cell International* 9:4 doi 10.1186/1475-2867-9-4. 2009.
- 8.- Grott M, Karakaya S, Mayer F, Baertling F, Beyer C, Kipp M, Kopp HG. Progesterone and estrogen prevent cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. *Anticancer Research* 33:791-800.2013.

- 9.- Jurado R, Lopez-Flores A, Alvarez A, García-López P. Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: an *in vitro* and *in vivo* study. *Oncology Reports* 22: 1237-1245. 2009.
- 10.- Conti M, Tazzari V, Baccini C, Pertici G, Serino LP, Giorgi U. Anticancer drug delivery with nanoparticles. *In vivo* 20:697-702. 2006.
- 11.- Kushwaha S, Rastogl A, Rai AK, Singh S. Novel drug delivery system for anticancer drug: A review. *International Journal of PharmTech Research* 4: 542-553. 2012.
- 12.- Zhang J, Lan CQ, Post M, Simard B, Deslandes Y, Hsieh TH. Design of nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. *Cancer Genomics and Proteomics* 3:147-158. 2006.
- 13.- Mallick S, Choi JS. Liposomes: versatile and biocompatible nanovesicles for efficient biomolecules delivery. *Journal of Nanoscience and Technology* 14:755-765. 2014.
- 14.- <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>. National Cancer Institute of USA at the National Institutes of Health. Consultado el día 25 de Abril de 2014.
- 15.- [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). GLOBOCAN 2014. Consultado el día 25 de Abril de 2014.
- 16.- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64:9-29. 2014.
- 17.- Denny L. The prevention of cervical cancer in developing countries. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 112:1204-1212. 2005.
- 18.- Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biology and Therapy* 11:295-306. 2011.
- 19.- Concenso para la prevención del cáncer cervicouterino en México. La carga del cáncer cervicouterino y de la infección por virus del papiloma humano en México y en el mundo. *Ginecología y Obstetricia de México* 79:188-93. 2011.

- 20.- Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 22:2675-86. 2011.
- 21.- Pereira-Scalabrino A, Alamonte M, dos-Santos-Silva I. Country-level correlates of cervical cancer mortality in Latin America and the Caribbean. *Salud Pública de México* 55:5-15. 2013.
- 22.- Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine* 30 suppl. 5:F12-23. 2012.
- 23.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales. 2014.
- 24.- Fajardo-Ortiz D, Ochoa H, García L, Castaño V. Translation knowledge on cervical cancer: is there a gap between research on causes and research on patient care?. *Cadernos de Saúde Pública* 30:415-26.2014.
- 25.- Sánchez-Román FR, Carlos-Rivera FJ, Guzmán-Caniupan JA, Escudero-de los Ríos, Juárez-Pérez CA, Aguilar-Madrid G. Costos de atención médica por cáncer cervicouterino. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 50:99-106. 2012.
- 26.- <http://www.cancer.org/cancer/cervicalcancer/detailedguide/index>. American Cancer Society. Consultado el día 25 de Abril de 2014.
- 27.- McLaughlin-Drubin ME, Meyers J, Munger K. Cancer associated human papillomaviruses. *Current Opinion in Virology* 2:459-466. 2012.
- 28.- Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander R, Lacey CJ, Kitchener HC, Einstein MH. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine* 30S:F71-F82. 2012.

- 29.- Gree M, Mravak-Stipetic M. Human papillomavirus-associated diseases. *Clinics in dermatology* 32:253-8. 2014.
- 30.- Gravitt PE. The known unknown of HPV natural history. *The Journal of Clinical Investigation* 121:4593-4599. 2011.
- 31.- O'Connor M, Costello L, Murphy J, Prendiville W, Martin C, O'Leary J, Sharp L. I don't care whether it's HPV or ABC, I just want to know if I have cancer. Factors influencing women's emotional responses to undergoing human papillomavirus testing in routine management in cervical screening: a qualitative study. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology* doi 10.1111/1471-0528. 2014.
- 32.- Pierangeli A, Scagnolari C, Selvaggi C, Cannella F, Riva E, Impagnatiello A, Bernardi G, Ciardi A, Moschella CM, Antonelli G, Indinnimeo M. High detection rate of human papillomavirus in anal brushings from women attending a proctology clinic. *Journal of Infection* 65:255-261. 2012.
- 33.- Juckett G, Hartman-Adams H. Human papillomavirus: clinical manifestations and prevention. *American Family Physician* 82:1209-13. 2010.
- 34.- Chan PK, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 49:117-136. 2012.
- 35.- Bosch FX, Castellsagué X, de Sanjosé S. HPV and cervical cancer: screening or vaccination? *British Journal of Cancer* 98:15-21. 2008.
- 36.- Alamonte M, Murillo R, Sánchez GI, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, Lazcano-Ponce E, Herrero R. Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Salud Pública de México* 52:544-559. 2010.
- 37.- Brown AJ, Trimble CL. New technologies for cervical cancer screening. *Best Practice and Research. Clinical Obstetrics and Gynaecology* 26:233-42.2012.



- 38.- Jin XW, Lipold L, McKenzie M, Sikon A. Cervical cancer screening: what's new and what's coming? *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 80:153-60. 2013.
- 39.- <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/cuellouterino/Patient/page2>. National Cancer Institute of USA at the National Institutes of Health. Consultado el día 25 de Abril de 2014.
- 40.- FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 105:103-104. 2009.
- 41.- López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología* 1:31-55. 2006
- 42.- Mejía-Gómez J, Feigenber T, Arbel-Alon S, Kogan L, Benshushan A. Radical trachelectomy: a fertility-sparing option for early invasive cervical cancer. *The Israel Medical Association Journal* 14:324-8. 2012.
- 43.- Reade CJ, Eiriksson LR, Covens A. Surgery for early stage cervical cancer: how radical should it be? *Gynecologic Oncology* 131:222-230. 2013.
- 44.- Salicrú SR, de la Torre J, Gil-Moreno A. The surgical management of early-stage cervical cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 25:312-9.2013.
- 45.- Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, Suzuki Y, Takahashi T. Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer. *Journal of Radiation Research* 5:1-8. 2010.
- 46.- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences* 9:193-9. 2012.
- 47.- Markman M. Chemoradiation in the management of cervix cancer: current status and future directions. *Oncology* 84:246-50. 2013.

- 48.- Pectasides D, Kamposioras K, Papaxoinis G, Pectasides E. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treatment Reviews* 34:603-613. 2008.
- 49.- Tao X, Hu W, Ramirez PT, Kavanagh JJ. Chemotherapy for recurrent and metastatic cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 110:S67-S71. 2008.
- 50.- Montalvo G, Coronel J, Alvarado A, Cantú D, Flores D, Ortega A, Gonzáles A, Isla D, Muñoz D, Robles J, Solorza G, Mota A, Gallardo D, Morales F, Cetina M, Herrera A. Cáncer cervicouterino, oncoguía. *Cancerología* 6:61-69. 2011.
- 51.- Kamura T, Ushijima K. Chemotherapy for advanced or recurrent cervical cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 52:161-164. 2013.
- 52.- González VM, Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology* 59:657-663. 2001.
- 53.- Fuentes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews* 103:645-662. 2003.
- 54.- Lokich J. What is the “best” platinum: cisplatin, carboplatin, or oxaliplatin? *Cancer Investigation* 19:756-760. 2001.
- 55.- Monneret C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Annales Pharmaceutiques Francaises* 69:286-95. 2011.
- 56.- Ali I, Wani WA, Saleem K, Hague A. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* 13:296-306. 2013.
- 57.- Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 1:280-291. 2009.

- 58.- Gómez-Ruiz S, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Kaluderovic GN. On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications* doi:10.1155/2012/140284. 2012.
- 59.- Oberoi HS, Nukolova NV, Kabanov AV, Bronich TK. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:1667-1685. 2013.
- 60.- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265-7279. 2003.
- 61.- Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* 33:9-23. 2007.
- 62.- Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer research* 34:547-50.2014.
- 63.- Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrology Dialysis Transplantation* 12:2478-2480. 1997.
- 64.- dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Archives of Toxicology* 86:1233-50. 2012.
- 65.- Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins* 2:2490-2518. 2010.
- 66.- Gonçalves MS, Silveira AF, Teixeira AR, Hyppolito MA. Mechanisms of cisplatin ototoxicity: theoretical review. *The Journal of Laryngology and Otology* 127:536-41.2013.
- 67.- Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 219:177-86. 2009.

- 68.- Mukherjea D, Rybak LP. Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenomics* 12:1039-50. 2011.
- 69.- Brock PR, Knight KR, Freyer DR, Campbell KC, Steyger PS, Blakley BW, Rassekh SR, Chang KW, Fligor BJ, Rajput K, Sullivan M, Neuwelt EA. Platinum-induced ototoxicity in children: a consensus review on mechanisms, predisposition, and protection, including a new International Society of Pediatric Oncology Boston ototoxicity scale. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of The American Society of Clinical Oncology* 30:2408-17. 2012.
- 70.- McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Molecular Cancer Therapeutics* 8:10-16. 2009.
- 71.- Albers JW, Chaudhry V, Cavaletti G, Donehower RC. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* CD005228. 2011.
- 72.- Lo-Presti AC, Aular Y, Morales L, Payares E. Reacciones adversas renales y hematológicas producidas por cisplatino y carboplatino con concurrente radioterapia en pacientes con cáncer de cuello uterino. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo* 12:17-22. 2007.
- 73.- Oike T, Ohno T, Noda SE, Sato H, Tamaki T, Kiyohara H, Ando K, Nakano T. Comparison of hematological toxicities between innovator and generic cisplatin formulations in cervical cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy. *Journal of Radiation Research* 54:474-8. 2013.
- 74.- Percie du Sert N, Rudd JA, Apfel CC, Andrews PL. Cisplatin-induced emesis: systematic review and meta-analysis of the ferret model and the effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 67:667-86. 2011.
- 75.- Kartalou M, Essingmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research* 478:23-43. 2001.

- 76.- Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery* 4:320-7. 2005.
- 77.- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31:1869-83. 2012.
- 78.- Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer* 7:573-84. 2007.
- 79.- Patel RR, Sharma CG, Jordan VC. Optimizing the antihormonal treatment and prevention of breast cancer. *Breast Cancer* 14:113-22. 2007.
- 80.- Taplin ME, Manola J, Oh WK, Kantoff PW, Bublely GJ, Smith M, Barb D, Mantzoros C, Gelmann EP, Balk SP. A phase II study of mifepristone (RU-486) in castration-resistant prostate cancer, with a correlative assessment of androgen-related hormones. *BJU International* 101:1084-9. 2008.
- 81.- Rocereto TF, Brady WE, Shahin MS, Hoffman JS, Small L, Rotmensch J, Mannel RS. A phase II evaluation of mifepristone in the treatment of recurrent or persistent epithelial ovarian, fallopian or primary peritoneal cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology* 116:332-4. 2010.
- 82.- Tieszen CR, Goyeneche AA, Brandhagen BN, Ortbahn CT, Telleria CM. Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC Cancer* 11:207. 2011.
- 83.- Ramaswamy R, Ashton K, Lea R, Roberts P, Davis CH, Golash A, Dawson T. Study of effectiveness of mifepristone for glioma cell line growth suppression. *British Journal of Neurosurgery* 26:336-9. 2012.
- 84.- Li C, YeH. Mifepristone sensitizing cisplatin for cervical adenocarcinoma HeLa cell sensitivity to chemotherapy and its mechanism. *European Journal of Gynaecological Oncology* 34:142-7. 2013.

- 85.- Llaguno-Munive M, Medina LA, Jurado R, Romero-Piña M, Garcia-Lopez P. Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts. *Cancer Cell International* 13:29. 2013.
- 86.- Martin HL, Smith L, Tomlinson DC. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. *Brest Cancer* 6:1-13. 2014.
- 87.- Nazarali SA, Narod SA. Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast Cancer* 6:29-36-2014.
- 88.- Gizzo S, Saccardi C, Patrelli TS, Berretta R, Capobianco G, Di Gangi S, Vacilotto A, Bertocco A, Noventa M, Ancona E, D'Antona D, Nardelli GB. Update on raloxifene: mechanism of action, clinical efficacy, adverse effects, and contraindications. *Obstetrical and Gynecological Survey* 68:467-81. 2013.
- 89.- Komm BS, Mirkin S. An overview of current and emerging SERMs. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 143C:207-222. 2014.
- 90.- McKeage K, Curran MP, Plosker GL. Fulvestrant: a review of its use in hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women with disease progression following antiestrogen therapy. *Drugs* 64:633-48. 2004.
- 91.- Croxtall JD, McKeage K. Fulvestrant: a review of its use in the management of hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women. *Drugs* 71:363-80. 2011.
- 92.- Koide SS. Mifepristone. Auxiliary therapeutic use in cancer and related disorders. *The Journal of Reproductive Medicine* 43:551-60. 1998.
- 93.- Klijn JG, Setyono-Han B, Foekens JA. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65:825-30. 2000.

- 94.- Terán-Dávila J, Teppa-Garrán A. Progesterone antagonists: biochemical and pharmacological aspects and clinical usefulness. *Ginecología y Obstetricia de México* 72:76-84. 2004.
- 95.- Beal MW, Simmonds K. Clinical uses of mifepristone: an update for women's health practitioners. *Journal of Midwifery and Women's Health* 47:451-60. 2002.
- 96.- Schaff EA. Mifepristone: ten years later. *Contraception* 81:1-7. 2010.
- 97.- Mahajan DK, London SN. Mifepristone (RU486): a review. *Fertility and Sterility* 68:967-76. 1997.
- 98.- Bartley J, Tong S, Everington D, Baird DT. Parity is a major determinant of success rate in medical abortion: a retrospective analysis of 3161 consecutive cases of early medical abortion treated with reduced doses of mifepristone and vaginal gemeprost. *Contraception* 62:297-303. 2000.
- 99.- Espinoza H, Ellertson C, García S, Schiavon R, Langer A. Medicamentos para la interrupción de la gestación: una revisión de la literatura y sus posibles implicaciones para México y América Latina. *Gaceta Médica de México* 138:347-356. 2002.
- 100.- Kapp N, Whyte P, Tang J, Jackson E, Brahmí D. A review of evidence for safe abortion care. *Contraception* 88:350-63. 2013.
- 101.- Baird DT. Emergency contraception: how does it work? *Reproductive Biomedicine Online* 18 Suppl. 1:32-36. 2009.
- 102.- Gemzell-Danielsson K, Rabe T, Cheng L. Emergency contraception. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of The International Society of Gynecological Endocrinology* 29 Suppl. 1:1-14. 2013.
- 103.- Koyama A, Hagopian L, Linden J. Emerging options for emergency contraception. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health* 7:23-35. 2013.

- 104.- World Health Organization Task Force on Post-ovulatory Methods of Fertility Regulations. Menstrual regulation by mifepristone plus prostaglandin: results from a multicenter trial. *Human Reproduction* 10:308-314. 1995.
- 105.- Bygdeman M. The possibility of using mifepristone for menstrual induction. *Contraception* 68:495-98. 2003.
- 106.- Kulier R, Kapp N, Gülmezoglu AM, Hofmeyr GJ, Cheng L, Campana A. Medical methods for first trimester abortion. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* CD002855. 2011.
- 107.- Borgatta L, Kapp N; Society of Family Planning. Clinical guidelines. Labor induction abortion in the second trimester. *Contraception* 84:4-18. 2011.
- 108.- Tenore JL. Methods for cervical ripening and induction of labor. *American Family Physician* 67:2123-8.2003.
- 109.- Yuan H, Upadhyay G, Lu J, Kopelovich L, Glazer RI. The chemopreventive effect of mifepristone on mammary tumorigenesis is associated with an anti-invasive and anti-inflammatory gene signature. *Cancer Prevention Research* 5:754-64. 2012.
- 110.- Johanssen S, Allolio B. Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome. *European Journal of Endocrinology* 157:561-9. 2007.
- 111.- Fleseriu M, Biller BM, Findling JW, Molitch ME, Schteingart DE, Gross C; SEISMIC Study Investigators. Mifepristone, a glucocorticoid receptor antagonist, produces clinical and metabolic benefits in patients with Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97:2039-49. 2012.
- 112.- Fleseriu M, Petersenn S. New avenues in the medical treatment of Cushing's disease: corticotroph tumor targeted therapy. *Journal of Neuro-Oncology* 114:1-11. 2013.



- 113.- DeBattista C, Belanoff J, Glass S, Khan A, Horne RL, Blasey C, Carpenter LL, Alva G. Mifepristone versus placebo in the treatment of psychosis in patients with psychotic major depression. *Biological Psychiatry* 60:1343-9. 2006.
- 114.- Ghoumari AM, Piochon C, Tomkiewicz C, Eychenne B, Levenes C, Dusart I, Schumacher M, Baulieu EE. Neuroprotective effect of mifepristone involves neuron depolarization. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:1377-86. 2006.
- 115.- Mackin P, Gallagher P, Watson S, Young AH, Ferrier IN. Changes in brain-derived neurotrophic factor following treatment with mifepristone in bipolar disorder and schizophrenia. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 41:321-6. 2007.
- 116.- Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ, Yen SS. Clinical efficacy of the antiprogestosterone RU486 in the treatment of endometriosis and uterine fibroids. *Human Reproduction* 9 Suppl. 1:116-20. 1994.
- 117.- Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best Practice and Research. Clinical Obstetrics and Gynaecology* 18:319-28. 2004.
- 118.- Kyritsis AP. Chemotherapy for meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology* 29:269-72. 1996.
- 119.- McMullen KP, Stieber VW. Meningioma: current treatment options and future directions. *Current Treatment Options in Oncology* 5:499-509. 2004.
- 120.- Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz IM. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Human Reproduction Update* 11:293-307. 2005.
- 121.- Murphy AA, Zhou MH, Malkapuram S, Santanam N, Parthasarathy S, Sidell N. RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells. *Fertility and Sterility* 74:1014-9. 2000.

- 122.- Rocereto TF, Saul HM, Aikins JA, Paulson J. Phase II study of mifepristone (RU486) in refractory ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 77:429-32. 2000.
- 123.- Goyeneche AA, Carón RW, Telleria CM. Mifepristone inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of The American Association for Cancer Research* 13:3370-9. 2007.
- 124.- Check JH, Dix E, Sansoucie L, Check D. Mifepristone may halt progression of extensively metastatic human adenocarcinoma of the colon - case report. *Anticancer Research* 29:1611-3. 2009.
- 125.- Ligr M, Li Y, Logan SK, Taneja S, Melamed J, Lepor H, Garabedian MJ, Lee P. Mifepristone inhibits GR $\beta$  coupled prostate cancer cell proliferation. *The Journal of Urology* 188:981-8. 2012.
- 126.- Pinsky J, Halmos G, Shirahige Y, Wittliff JL, Schally AV. Inhibition of growth of the human glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77:1388-92. 1993.
- 127.- Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annual Review of Medicine* 48:129-56. 1997.
- 128.- Spitz IM. Mifepristone: where do we come from and where are we going? *Clinical development over a quarter of a century. Contraception* 82:442-52. 2010.
- 129.- Sitruk-Ware R, Spitz IM. Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception* 68:409-20. 2003.
- 130.- Bouchard P, Chabbert-Buffet N, Fauser BC. Selective progesterone receptor modulators in reproductive medicine: pharmacology, clinical efficacy and safety. *Fertility and Sterility* 96:1175-89. 2011.

- 131.- Moe BG, Vereide AB, Orbo A, Sager G. High concentrations of progesterone and mifepristone mutually reinforce cell cycle retardation and induction of apoptosis. *Anticancer Research* 29:1053-8. 2009.
- 132.- Goyeneche AA, Seidel EE, Telleria CM. Growth inhibition induced by antiprogestins RU-38486, ORG-31710, and CDB-2914 in ovarian cancer cells involves inhibition of cyclin dependent kinase 2. *Investigational New Drugs* 30:967-80. 2012.
- 133.- Gaddy VT, Barrett JT, Delk JN, Kallab AM, Porter AG, Schoenlein PV. Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of The American Association for Cancer Research* 10:5215-25. 2004.
- 134.- Navo MA, Smith JA, Gaikwad A, Burke T, Brown J, Ramondetta LM. In vitro evaluation of the growth inhibition and apoptosis effect of mifepristone (RU486) in human Ishikawa and HEC1A endometrial cancer cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 62:483-9. 2008.
- 135.- Fjellidal R, Moe BT, Ørbo A, Sager G. MCF-7 cell apoptosis and cell cycle arrest: non-genomic effects of progesterone and mifepristone (RU-486). *Anticancer Research* 30:4835-40. 2010.
- 136.- Hernández-Hernández OT, González-García TK, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 132:127-134. 2012.
- 137.- Mauro A, Martelli A, Berardinelli P, Russo V, Bernabò N, Di Giacinto O, Mattioli M, Barboni B. Effect of antiprogestone RU486 on VEGF expression and blood vessel remodeling on ovarian follicles before ovulation. *PLoS One* 9:e95910. 2014.
- 138.- Lecreur V, Fardel O, Guillouzo A. The antiprogestatin drug RU 486 potentiates doxorubicin cytotoxicity in multidrug resistant cells through inhibition of P-glycoprotein function. *FEBS Letters* 355:187-91. 1994.

- 139.- Payen L, Delugin L, Courtois A, Trinquart Y, Guillouzo A, Fardel O. Reversal of MRP-mediated multidrug resistance in human lung cancer cells by the antiprogestatin drug RU486. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258:513-8. 1999.
- 140.- Li DQ, Wang ZB, Bai J, Zhao J, Wang Y, Hu K, Du YH. Reversal of multidrug resistance in drug-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR by antiprogestin drug mifepristone. *World Journal of Gastroenterology* 10:1722-5. 2004.
- 141.- Brandhagen BN, Tieszen CR, Ulmer TM, Tracy MS, Goyeneche AA, Telleria CM. Cytostasis and morphological changes induced by mifepristone in human metastatic cancer cells involve cytoskeletal filamentous actin reorganization and impairment of cell adhesion dynamics. *BMC Cancer* 13:35. 2013.
- 142.- Spitz IM. Clinical utility of progesterone receptor modulators and their effect on the endometrium. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 21:318–324. 2009.
- 143.- Grunberg SM, Weiss MH, Russell CA, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Sitruk-Ware R. Long-term administration of mifepristone (RU486): clinical tolerance during extended treatment of meningioma. *Cancer Investigation* 24:727-33. 2006.
- 144.- Blasco-Cordellat A. Efectos secundarios de la quimioterapia. *Sociedad Española de Oncología Médica*. 2013.
- 145.- Hofheinz RD, Gnad-Vogt SU, Beyer U, Hochhaus A. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 16:691-707. 2005.
- 146.- Huwyler J, Drewe J, Krähenbuhl S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *International Journal of Nanomedicine* 3:21-9. 2008.
- 147.- Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 30:592-9. 2009.
- 148.- López-Dávila V, Seifalian AM, Loizidou M. Organic nanocarriers for cancer drug delivery. *Current Opinion in Pharmacology* 12:414-9. 2012.

- 149.- Fonseca NA, Gregório AC, Valério-Fernandes A, Simões S, Moreira JN. Bridging cancer biology and the patients' needs with nanotechnology-based approaches. *Cancer Treatment Reviews* 40:626-635. 2014.
- 150.- Cheong I, Huang X, Thornton K, Diaz LA Jr, Zhou S. Targeting cancer with bugs and liposomes: ready, aim, fire. *Cancer Research* 67:9605-8. 2007.
- 151.- Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2:2-11. 2012.
- 152.- Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports* 64:1020-37. 2012.
- 153.- Allen TM. Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs* 54 Suppl. 4:8-14. 1997.
- 154.- Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* 16:307-21. 1998.
- 155.- Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70:95-111. 1995.
- 156.- Paliwal SR, Paliwal R, Agrawal GP, Vyas SP. Liposomal nanomedicine for breast cancer therapy. *Nanomedicine* 6:1085-1100. 2011.
- 157.- Mozafari MR. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10:711-9. 2005.
- 158.- Meure LA, Foster NR, Dehghani F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *AAPS PharmSciTech* 9:798-809. 2008.
- 159.- Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 75:4194-8. 1978.

- 160.- Zalba S, Navarro I, Trocóniz IF, Tros de Ilarduya C, Garrido MJ. Application of different methods to formulate PEG-liposomes of oxaliplatin: evaluation in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 81:273-80. 2012.
- 161.- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* 8:102. 2013.
- 162.- Uhumwangho MU, Okor RS. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *JMBR: A Peer-Review Journal of Biomedical Sciences* 4:9-21. 2005.
- 163.- Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine* 1:297-315. 2006.
- 164.- Ceh B, Winterhalter M, Frederik PM, Vallner JJ, Lasic DD. Stealth liposomes: from theory to product. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24:165-177. 1997.
- 165.- Nagayasu A, Uchiyama K, Kiwada H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40:75-87. 1999.
- 166.- Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research* 42:463-78. 2003.
- 167.- Blume G, Cevc G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 1029:91-7. 1990.
- 168.- Stathopoulos GP, Boulikas T. Lipoplatin formulation review article. *Journal of Drug Delivery* doi: 10.1155/2012/581363. 2012.

- 169.- Cattel L, Ceruti M, Dosio F. From conventional to stealth liposomes: a new Frontier in cancer chemotherapy. *Journal of Chemotherapy* 16 Suppl. 4:94-7. 2004.
- 170.- Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjugate Chemistry* 21:797-802. 2010.
- 171.- Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:71-9. 2013.
- 172.- Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63:136-51. 2011.
- 173.- Perrault SD, Chan WC. In vivo assembly of nanoparticle components to improve targeted cancer imaging. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 107:11194-9. 2010.
- 174.- Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews: Drug Discovery* 4:145-60. 2005.
- 175.- Torchilin VP. Liposomes in drug delivery. *Fundamentals and Applications of Controlled Release* doi 10.1007/978-1-4614-0881-9\_11. 2012.
- 174.- Mamot C, Ritschard R, Wicki A, Stehle G, Dieterle T, Bubendorf L, Hilker C, Deuster S, Herrmann R, Rochlitz C. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study. *The Lancet Oncology* 13:1234-41. 2012.
- 175.- Gabizon A, Shmeeda H, Grenader T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 45:388-98. 2012.

- 176.- Gusella M, Bononi A, Modena Y, Bertolaso L, Franceschetti P, Menon D, Pezzolo E, Barile C, Crepaldi G, Bolzonella C, Inno A, Padrini R, Pasini F. Age affects pegylated liposomal doxorubicin elimination and tolerability in patients over 70 years old. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 73:517-24. 2014.
- 177.- Allen TM, Hansen CB, Lopes de Menezes DE. Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16:267-284. 1995.
- 178.- Düzgüneş N, Nir S. Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40:3-18. 1999.
- 179.- Yamashita F, Hashida M. Pharmacokinetic considerations for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:139-47. 2013.
- 180.- Papisov MI. Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes: Molecular mechanics and chemistry of liposome interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:119-138. 1998.
- 181.- Ait-Oudhia S, Mager DE, Straubinger RM. Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. *Pharmaceutics* 6:137-74. 2014.
- 182.- Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1113:171-99. 1992.
- 183.- Liu D. Biological factors involved in blood clearance of liposomes by liver. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24:201-213. 1997.
- 184.- Harasym TO, Bally MB, Tardi P. Clearance properties of liposomes involving conjugated proteins for targeting. *Advanced Drug Delivery* 32:99-118. 1998.
- 185.- Drummond DC, Noble CO, Hayes ME, Park JW, Kirpotin DB. Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:4696-740. 2008.



- 186.- Woodle MC. Sterically stabilized liposome therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16:249-265.1995.
- 187.- Harrington KJ, Syrigos KN, Vile RG. Liposomally targeted cytotoxic drugs for the treatment of cancer. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54:1573-600. 2002.
- 188.- Lao J, Madani J, Puértolas T, Alvarez M, Hernández A, Pazo-Cid R, Artal A, Antón Torres A. Liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *Journal of Drug Delivery* doi: 10.1155/2013/456409. 2013.
- 189.- Green AE, Rose PG. Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *International Journal of Nanomedicine* 1:229-239. 2006.
- 190.- Alberts DS, Garcia DJ. Safety aspects of pegylated liposomal doxorubicin in patients with cancer. *Drugs* 54 Suppl. 4:30-35. 1997.
- 191.- Theodoulou M, Hudis C. Cardiac profiles of liposomal anthracyclines: greater cardiac safety versus conventional doxorubicin? *Cancer* 100:2052-63. 2004.
- 192.- Newman MS, Colbern GT, Working PK, Engbers C, Amantea MA. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 43:1-7. 1999.
- 193.- Wang S, Mi JB, Li YZ, Chang WB, Ci YX, Zhao MZ, Zhao YK, Zhu LY, Xu G. Pharmacokinetics and tissue distribution of iv injection of polyphase liposome-encapsulated cisplatin (KM-1) in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 24:589-92. 2003.
- 194.- Toro Córdova A. Elaboración y caracterización farmacocinética de una formulación liposomal de cisplatino. Tesis Maestría en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Autónoma Metropolitana. 2010.

- 195.- Perez AT, Domenech GH, Frankel C, Vogel CL. Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for metastatic breast cancer: the Cancer Research Network, Inc., experience. *Cancer Investigation* 20 Suppl. 2:22-9. 2002.
- 196.- Hong RL, Lin CH, Chao TY, Kao WY, Wang CH, Hsieh RK, Hwang WS. A phase-I study evaluating the combination of pegylated liposomal doxorubicin and paclitaxel as salvage chemotherapy in metastatic breast cancer previously treated with anthracycline. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61:847-53. 2008.
- 197.- Kaminskas LM, McLeod VM, Kelly BD, Cullinane C, Sberna G, Williamson M, Boyd BJ, Owen DJ, Porter CJ. Doxorubicin-conjugated PEGylated dendrimers show similar tumoricidal activity but lower systemic toxicity when compared to PEGylated liposome and solution formulations in mouse and rat tumor models. *Molecular Pharmaceutics* 9:422-32. 2012.
- 198.- Hong RL, Tseng YL. Phase I and pharmacokinetic study of a stable, polyethylene-glycolated liposomal doxorubicin in patients with solid tumors: the relation between pharmacokinetic property and toxicity. *Cancer* 91:1826-33. 2001.
- 199.- Ko EM, Lippmann Q, Caron WP, Zamboni W, Gehrig PA. Clinical risk factors of PEGylated liposomal doxorubicin induced palmar plantar erythrodysesthesia in recurrent ovarian cancer patients. *Gynecologic Oncology* 131:683-8. 2013.
- 200.- Lademann J, Martschick A, Kluschke F, Richter H, Fluhr JW, Patzelt A, Jung S, Chekerov R, Darvin ME, Haas N, Sterry W, Zastrow L, Sehouli J. Efficient prevention strategy against the development of a palmar-plantar erythrodysesthesia during chemotherapy. *Skin Pharmacology and Physiology* 27:66-70. 2014.
- 201.- Uziely B, Jeffers S, Isacson R, Kutsch K, Wei-Tsao D, Yehoshua Z, Libson E, Muggia FM, Gabizon A. Liposomal doxorubicin: antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 13:1777-85. 1995.

- 202.- Drummond DC1, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews* 51:691-743. 1999.
- 203.- Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 36:715-8. 2013.
- 204.- Stathopoulos GP. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. *Anti-Cancer Drugs* 21:732-736. 2010.
- 205.- Kalra J, Bally MB. Liposomes. *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience* doi 10.1007/978-1-4614-9164-4\_3. 2013.
- 206.- Stewart JC. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry* 104:10-14. 1980.
- 207.- Lopez-Flores A, Jurado R, García-López P. A high-performance liquid chromatographic assay for determination of cisplatin in plasma, cancer cell, and tumor samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 52:366-372. 2005.
- 208.- Salgado M. Citometría de flujo: fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Curso de Métodos en Biotecnología*. 2002.
- 209.- Medina LA, Herrera-Penilla BI, Castro-Morales MA, García-López P, Jurado R, Pérez-Cárdenas E, Chanona-Vilchis J, Brandan ME. Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 27:57. 2008.
- 210.- Cheung YW, Cradock JC, Vishnuvajjala BR, Flora KP. Stability of cisplatin, iproplatin, carboplatin, and tetraplatin in commonly used intravenous solutions. *American Journal of Health-System Pharmacy* 44:124-130. 1987.

- 211.- Bristol-Myers Squibb Company. Platinol (cisplatin for injection, USP). Datasheet Reference ID: 3006561. 2010.
- 212.- Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:36–48. 2013.
- 213.- Lawson HW, Lee NC, Thames SF, Henson R, Miller DS. Cervical cancer screening among low-income women: results of a national screening program, 1991-1995. *Obstetrics and Gynecology* 92:745-52. 1998.
- 214.- Starha P, Hošek J, Vančo J, Dvořák Z, Suchý P Jr, Popa I, Pražanová G, Trávníček Z. Pharmacological and molecular effects of platinum(II) complexes involving 7-azaindole derivatives. *PLoS One* 9:e90341. 2014.
- 215.- Ponzzone R, Biglia N, Jacomuzzi ME, Mariani L, Dominguez A, Sismondi P. Antihormones in prevention and treatment of breast cancer. *Annals of The New York Academy of Sciences* 1089:143-58. 2006.
- 216.- Eroles P, Bosch A, Bermejo B, Lluch A. Mechanisms of resistance to hormonal treatment in breast cancer. *Clinical and Translational Oncology* 12:246-52. 2010.
- 217.- Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release* 161:175-87. 2012.
- 218.- Gamarra-Luques CD, Goyeneche AA, Hapon MB, Telleria CM. Mifepristone prevents repopulation of ovarian cancer cells escaping cisplatin-paclitaxel therapy. *BMC Cancer* 12:200. 2012.
- 219.- Zawada ZH. A single-step method of liposome preparation. *Cellular and Molecular Biology Letters* 9:603-615. 2004.
- 220.- Malvern Instruments. Liposomes and the use of Z potential Measurements to study sterically stabilized liposomes using Malvern Instruments. 2013.

221.- Pérez-López B, Vega-González IF, Estrada-Lobato E, Pérez-Molina JJ, Torres-Mendoza BM, Medina LA. Volume-of-interest assessment of oncology response using <sup>18</sup>-F-FDG PET/CT: a phantom study. *Journal of Nuclear Medicine Technology* 39:14-18. 2011.