



FACULTAD DE QUÍMICA

RADIOMARCADO DE UN SISTEMA DE CISPLATINO-LIPOSOMAL CON Tc-99M,
UTILIZANDO UN POTENCIAL TRANSMEMBRANAL
A TRAVÉS DEL IONÓFORO IONOMICINA.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
ERICK YAIR CASTILLO OCHOA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

VOCAL: Ma. Guadalupe Lemus Barajas

SECRETARIO: Luis Alberto Medina Velázquez

1er. SUPLENTE: Maria Josefa Bernad Bernad

2° SUPLENTE: Maria Elena Bravo Gómez

EL TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE FÍSICA MÉDICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN CÁNCER INCAN-UNAM DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA.

ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): ERICK YAIR CASTILLO OCHOA

(nombre (s) y firma (s))

ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaturas	2
1. Antecedentes	3
1.1. Formulación de Cisplatino Liposomal.....	3
1.2. Radiomarcaje de liposomas.....	4
2. Introducción	5
2.1. Liposomas	5
2.1.1. Composición de los liposomas	5
2.1.1.1. Fosfolípidos	5
2.1.1.2. Colesterol	6
2.1.1.3. Estabilización estérica	7
2.2. Tipos de liposomas	7
2.3. Técnicas de producción de liposomas	8
2.3.1. Hidratación de la capa lipídica	9
2.3.2. Evaporación en fase reversa	9
2.3.3. Sonicación	9
2.3.4. Extrusión	9
2.4. Caracterización fisicoquímica de liposomas	10
2.4.1. Tamaño de Partícula	10
2.4.2. Potencial Zeta	11
2.4.3. Cuantificación de fosfolípidos	12
2.4.4. Cuantificación de Colesterol	12
2.4.5. Cuantificación de Fármaco	13
2.5. Radiomarcado de liposomas	13
2.5.1. Propiedades fisicoquímicas del Tc-99m	13
2.5.2. Técnicas de radiomarcaje de liposomas	14
2.5.3. Ionóforos	15
2.5.3.1. Mecanismo de acción	15
2.5.4. Radiomarcado con 99mTc-MIBI	17

2.5.5. Pruebas de radiomarcaje de liposomas	17
3. Justificación	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos particulares	19
6. Materiales y métodos	19
6.1. Preparación de liposomas por hidratación de bicapa lipídica	19
6.2. Preparación de liposomas cargados con cisplatino por evaporación en fase reversa	20
6.3. Caracterización fisicoquímica de los liposomas	20
6.3.1. Tamaño de partícula	20
6.3.2. Potencial Zeta	20
6.3.3. Cuantificación de colesterol	21
6.3.4. Cuantificación de fosfolípidos	21
6.3.5. Cuantificación de cisplatino	21
6.3.6. Cuantificación de cloruro de calcio	22
6.4. Radiomarcaje de liposomas	23
6.5. Encapsulación de cisplatino mediante potencial transmembranal ...	23
6.6. Estabilidad in vitro	23
6.7. Análisis estadístico	24
7. Resultados y Discusión	24
7.1. Formulación Liposomal	24
7.2. Caracterización fisicoquímica	25
7.3. Radiomarcado de liposomas con CaCl ₂	25
7.3.1. Proporción Iónica: Lípido	25
7.3.2. Tiempo de Incubación	27
7.4. Resultados y discusión de la encapsulación de cisplatino	28
7.4.1. Evaluación de la concentración de cisplatino encapsulada en función de la proporción iónica: lípido	28
7.4.2. Tamaño de partícula después de la encapsulación de	

cisplatino	29
7.4.3. Potencial Zeta después de la encapsulación de cisplatino	30
7.5. Resultados y discusión del radiomarcado de liposomas con cisplatino	31
7.5.1. Tamaño de partícula después del radiomarcaje	32
7.5.2. Potencial Zeta después del radiomarcaje	33
7.5.3. Influencia en la concentración de cisplatino después del radiomarcaje	34
7.6. Estabilidad de radiomarcado	35
7.7. Proporción Fármaco: Lípido	36
7.8. Evaluación de la temperatura en la encapsulación	37
8. Conclusión	38
Referencias	39

Resumen

El compuesto cisdiaminocloroplatino(II), ha sido utilizado como fármaco de primera línea en el tratamiento del cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y en el cáncer de pulmón. Sin embargo, el tratamiento con cisplatino presenta varias desventajas como lo son: rápida eliminación del organismo, alta toxicidad en riñón y sistema nervioso periférico, ototoxicidad, náuseas, vómito entre otros.

Los sistemas de liberación controlada, como los liposomas, son prometedores acarreadores de fármacos antineoplásicos, debido a que mejoran las propiedades de biodisponibilidad y biodistribución del fármaco, así como la reducción o minimización de los efectos adversos que implica una quimioterapia.

El radiomarcaje de una formulación liposomal de cisplatino con radionúclidos de uso diagnóstico, como el ^{99m}Tc , permite la visualización *in vivo* del sistema permitiendo conocer la biodistribución de los liposomas y los sitios de acumulación.

Este trabajo de tesis consistió en el radiomarcaje de una formulación de cisplatino liposomal mediante la técnica de potencial transmembranal facilitada por un ionóforo, la caracterización fisicoquímica, la eficiencia de radiomarcaje y la estabilidad *in vitro*. La formulación de liposomas con cisplatino que se utilizó fue elaborada en el laboratorio de Física Médica en el Instituto Nacional de Cancerología.

Abreviaturas

CDDP	Cisdiaminodicloroplatino(II)
BMEDA	[<i>N,N</i> -bis(2-mercaptoetil)- <i>N',N'</i> -di-etil-etilendiamina]
GSH	Glutati3n
PC	Fosfatidilcolina
HSPC	Fosfatidilcolina hidrogenada de soya
PEG	Polietilenglicol
PE	Fosfoetanolamina
SER	Sistema Ret3culo Endotelial
SUV	Ves3culas Unilamelares Peque3as
LUV	Ves3culas Unilamelares Grandes
MLV	Ves3culas Multilamelares
EPR	Permeabilidad y Retenci3n Aumentada
MIBI	2-metoxi-2-metilpropilisonitrilo
SPECT	Tomograf3a Computada por Emisi3n de Fot3n 3nico
MeOH	Metanol
HPLC	Cromatograf3a de l3quidos de alta eficiencia
DDTC	Dietilditiocarbamato de sodio

1. ANTECEDENTES.

1.1. FORMULACIÓN DE CISPLATINO LIPOSOMAL.

Hoy en día, muchos fármacos usados en quimioterapia tienen propiedades farmacéuticas y farmacológicas que no son idóneas para su uso terapéutico: baja solubilidad acuosa, propiedades irritantes, falta de estabilidad, metabolismo rápido, propiedades farmacocinéticas desfavorables y biodistribución del fármaco no selectiva, lo que puede ocasionar reacciones adversas, baja eficacia terapéutica y una pobre calidad de vida del paciente⁽¹⁾.

El método por el cual un fármaco es transportado y liberado en su sitio de acción puede tener un efecto significativo en su eficacia terapéutica. Por esto, se han generado nuevas formas de transporte y liberación en donde se puedan controlar los parámetros farmacocinéticos, farmacodinámicos, la toxicidad inespecífica, la inmunogenicidad, el bio-reconocimiento, y la eficacia del fármaco. Las tecnologías que ofrecen hoy en día las nuevas formas de liberación de fármacos tiene como objetivo mejorar la estabilidad de estos, prevenir efectos tóxicos, y aumentar su biodisponibilidad y que estos se acumulen en el órgano deseado⁽²⁾.

Los sistemas de liberación de fármacos a nanoescala (~100 nm), como los liposomas, son sistemas coloidales que han llamado la atención por su potencial para encapsular y transportar fármacos quimioterapéuticos⁽¹⁾. El cisplatino es uno de los fármacos más efectivos y ampliamente usado en el tratamiento de malignidades epiteliales, como el cáncer de cabeza y cuello, ovario, vejiga y testicular. Sin embargo, presenta una serie de efectos adversos como lo son la toxicidad renal, gástrica, neuropatía periférica, astenia y ototoxicidad⁽³⁾.

De las formulaciones liposomales que han logrado alcanzar las fases clínicas del desarrollo de nuevas formulaciones, se encuentra el SPI-77, que es una formulación de tipo "Stealth", la cuál ha sido utilizada en pruebas para tratar el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón y el cáncer de ovario^(3, 4). Otra formulación de cisplatino liposomal es el Lipoplatino, y con ella se observaron efectos tóxicos reducidos en cuanto a la mielotoxicidad, y no se observaron ototoxicidad ni nefrotoxicidad⁽³⁾ y se ha probado en el tratamiento de cáncer en pulmón y en cáncer de mama en estudios de fase III⁽⁵⁾ y estudios preclínicos para tratar el cáncer cervical resistente a cisplatino⁽⁶⁾.

1.2. RADIOMARCAJE DE LIPOSOMAS.

Los liposomas radiomarcados tienen una utilidad fundamental en el seguimiento *in vivo* de estos acarreadores de fármacos, pudiendo obtener datos fundamentales como los parámetros farmacocinéticos, biodistribución y eliminación.

La literatura reporta varios métodos de radiomarcaje de liposomas con Tecnecio-99m, y uno de ellos es el reportado por Bao y colaboradores, cuyo método involucra la formación de un complejo de ^{99m}Tc con un quelante llamado BMEDA [*N,N*-bis(2-mercaptoetil)-*N',N'*-dietiletilendiamna], y la elaboración de liposomas con glutatión (GSH)⁽⁷⁾. El autor reporta cerca de un 70% de eficiencia de encapsulación, sin embargo, el método no es adecuado para los propósitos de este estudio, debido a que el glutatión usado para convertir de una forma lipofílica a una hidrofílica el complejo del ^{99m}Tc , reacciona también con el cisplatino inactivándolo; dentro de las células ésta es la forma en la que organismo destoxifica a este fármaco⁽³⁾. También se ha realizado esta misma técnica para encapsular ^{186}Re , utilizando cisteína y gradiente de sulfato de amonio para lograr la incorporación al núcleo del liposoma⁽⁸⁾. Aunque con esta técnica ya se ha logrado realizar el radiomarcaje de una formulación liposomal de doxorubicina comercial (DoxilTM) con ^{186}Re ⁽⁹⁾, la técnica sigue sin satisfacer la opción de realizar el radiomarcaje de liposomas cargados con cisplatino.

Por esta situación, este trabajo está enfocado al diseño de una técnica de radiomarcaje de una formulación de cisplatino liposomal con ^{99m}Tc , que sea adecuada y que los componentes no afecten a la estabilidad física y química de cisplatino, y que además tenga una alta eficiencia de radiomarcado y sea estable en estudios *in vitro*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Liposomas.

Los liposomas son vesículas en donde un volumen acuoso es rodeado por una membrana de fosfolípidos, cuyo tamaño puede llegar a ser desde algunos nanómetros hasta varios micrómetros. Pueden consistir en una o varias bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos^(10, 11). El tamaño más estable y útil de los liposomas como vectores de transporte de fármacos se encuentra en el orden nanométrico (90-250 nm), aunque muchas formulaciones liposomales en el intervalo de 90-100 nm están clínicamente aprobadas para la liberación de agentes antifúngicos, antiparasitarios y anticancerígenos⁽¹²⁾.

Los liposomas fueron desarrollados por Alec Bangham⁽¹³⁻¹⁵⁾ para modelar membranas celulares en estudios de biofísica. Años más tarde se estudiaron como acarreadores de fármacos⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, ofreciendo algunas ventajas como: a) Una estructura muy versátil que puede ser fácilmente adaptada para alguna aplicación específica, b) Se puede acomodar cualquier tipo de fármaco ya sea en su compartimento acuoso (Fármacos hidrofílicos) o en la bicapa (fármacos lipofílicos) y c) No son tóxicos, no son inmunogénicos y son completamente biodegradables^(10, 17, 19).

2.1.1. Composición de los liposomas.

Las nuevas formas de liberación de fármacos, como los liposomas, han sido usados para reducir los efectos adversos derivados de la quimioterapia, principalmente en órganos sensibles como el corazón y los riñones⁽²⁰⁾. Por ello, se requiere de una adecuada elección de los componentes de la formulación, así como la proporción de cada uno de estos, ya que de esto depende la farmacocinética y biodistribución del fármaco encapsulado en liposomas^(21, 22).

2.1.1.1. Fosfolípidos.

Los fosfolípidos son biomacromoléculas que sirven como componentes estructurales de las membranas biológicas y suministran energía a algunos organismos. Son moléculas anfifílicas con poca solubilidad acuosa y constan de dos partes: una parte hidrofílica y otra parte hidrofóbica correspondientes al grupo fosfato y a dos cadenas de ácido graso^(10, 21, 23).

Los fosfolípidos más utilizados son las fosfatidilcolinas o lecitinas (PC), las cuales son moléculas anfipáticas, en donde un puente de glicerol une un par de cadenas hidrocarbonadas con un grupo hidrofílico de fosfocolina; no son solubles en agua, pero al interactuar con ella, forman bicapas planares para minimizar las interacciones desfavorables entre el volumen acuoso y las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Dichas interacciones se ven eliminadas cuando la bicapa planar se dobla para formar vesículas con un núcleo acuoso⁽⁴⁾.

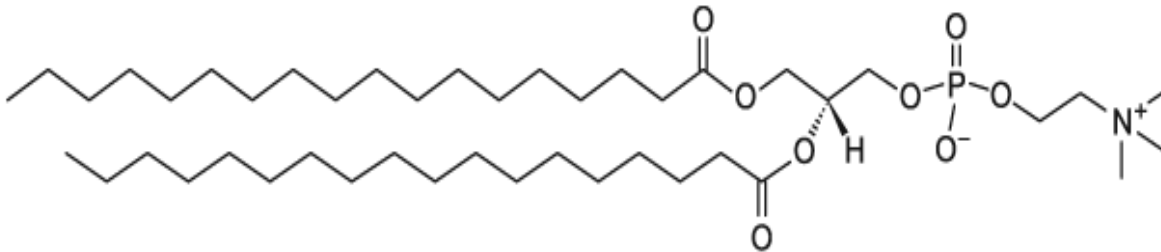


Figura 1. Estructura de la especie predominante de la fosfatidilcolina hidrogenada de soya.

2.1.1.2. Colesterol.

El colesterol es una molécula completamente hidrofóbica, con un esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno, que la constituyen cuatro anillos condensados con varias sustituciones:

1. Dos radicales metilo (-CH₃) en las posiciones C-10 y C-13
2. Una cadena alifática de 8 carbonos en la posición C-17
3. Un grupo hidroxilo (-OH) e la posición C-3
4. Una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6.

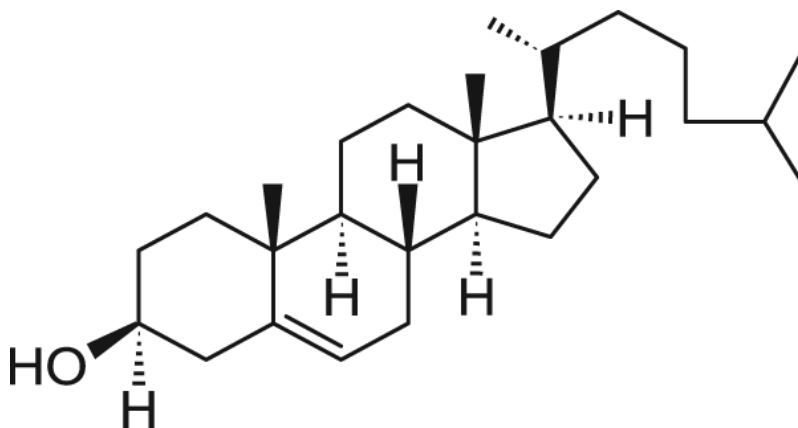


Figura 2. Estructura del colesterol.

Debido a su estructura, el colesterol es una molécula sumamente insoluble en agua, que solo se puede disolver en solventes apolares, tales como el cloroformo, hexano o tolueno.⁽²⁴⁾

La función del colesterol es dar rigidez y estabilidad a las membranas biológicas, intercalándose en la bicapa lipídica. La incorporación de colesterol dentro de las membranas liposomales tiende a incrementar la retención de fármacos hidrofílicos, contrarresta la transición de fase de los lípidos e incrementa la rigidez de la bicapa y por ello la resistencia a la degradación *in vivo*.⁽²⁵⁾ El colesterol tiene un efecto lioprotector, afectando a la cinética de hidrólisis, aumenta la hidrofobicidad de la bicapa e inhibe la transferencia de los componentes lipídicos hacia las lipoproteínas plasmáticas^(17, 22, 24, 26).




2.1.1.3. Estabilización estérica.

Aunque los liposomas han demostrado disminuir drásticamente los efectos adversos de algunos fármacos citotóxicos utilizados en quimioterapia, inicialmente el tiempo en circulación seguía siendo muy corto, debido a que aún podían ser reconocidos por el sistema retículo endotelial (SRE), produciendo una rápida e inespecífica eliminación en circulación sanguínea⁽¹⁰⁾. Una de las técnicas más utilizadas para aumentar el tiempo de circulación de los liposomas en sangre ha sido el recubrir la membrana lipídica con un polímero funcionalizado de polietilenglicol (PEG)^(11, 25), el cuál previene la agregación de los liposomas durante el almacenamiento y particularmente en suero después de la administración; esto se debe a que la cadena flexible del PEG ocupa el espacio inmediatamente adyacente a la superficie liposomal, la cual tiende a excluir a otros macrófagos de este espacio; el resultado es el retraso del reconocimiento y eliminación por el SRE^(19, 22). La estabilización óptima de la formulación se logra con 5-10% del PEG-PE, con una masa molecular entre 1000-2000 Da⁽²⁶⁾.

2.2. Tipos de liposomas.

Se ha encontrado diferentes tipos de liposomas, que se clasifican por el número de bicapas concéntricas y por su tamaño^(19, 24, 27, 28), dichas características se encuentran resumidas en la siguiente tabla:

Tabla 1. Tipos de liposomas según el tamaño y número de bicapas.

Tipo de vesícula	Tamaño de partícula	Características
 Vesículas Unilamelares Pequeñas (SUV)	$\leq 0.1 \mu\text{m}$	Las SUV están compuestas de una bicapa concéntrica, cuyo volumen acuoso es pequeño, lo que limita la encapsulación de altas concentraciones de fármaco.
 Vesículas Unilamelares Grandes (LUV)	$> 0.1 \mu\text{m}$	Estas vesículas están compuestas de una bicapa lipídica, cuyo volumen acuoso es mayor que las SUV, pudiendo encerrar una mayor cantidad de fármaco.
 Vesículas Multilamelares Grandes (MLV)	$> 0.1 \mu\text{m}$	Las vesículas multilamelares están compuestas de varias bicapas concéntricas, teniendo varios espacios acuosos, cuyo resultado es una baja encapsulación de fármaco.

2.3. Técnicas de producción de liposomas.

La formación de liposomas ocurre espontáneamente cuando los fosfolípidos son dispersados en agua. Sin embargo la preparación de liposomas encapsulados con fármaco no siempre lleva muy buenas eficiencias de carga. Las cualidades que debe tener el método de encapsulación para un fármaco determinado deben ser⁽²⁹⁾:

- La habilidad de atrapar un gran porcentaje de material acuoso.
- Un alto porcentaje de proporción espacio acuoso/lípido.
- Química ampliamente variable de los componentes lipídicos.

2.3.1. Hidratación de la capa lipídica.

El primer método descrito para preparar liposomas.⁽¹³⁾ Consiste en disolver los lípidos en un solvente orgánico (Cloroformo) que después es evaporado, formando una delgada capa. Se rehidrata la capa lipídica con una solución acuosa que contenga el fármaco y previamente calentada a la temperatura de transición. Después de la adición de la fase acuosa, se resuspenden los lípidos por agitación, produciendo una población heterogénea de MLVs^(27, 28, 30).

2.3.2. Evaporación en fase reversa.

Los lípidos son disueltos en un solvente orgánico el cuál se adiciona a una solución acuosa. Se forma una emulsión agua en aceite, la cual es evaporada hasta formar un gel seco, que finalmente se rompe por agitación mediante sonicación, produciendo la formación de una emulsión agua en aceite. El excedente del solvente orgánico es removido, quedando los liposomas suspendidos en agua⁽²⁷⁻²⁹⁾.

2.3.3. Sonicación.

Este método utiliza energía por ultrasonido y se puede aplicar a una dispersión de MLVs producidas por hidratación de una capa lipídica para producir SUV. El matraz con la dispersión liposomal es colocada en una bañó sonicador el cuál agitará la suspensión, rompiendo las bicapas de los liposomas, reduciendo su tamaño y dejando liposomas unilamelares.^(27, 28, 31)

2.3.4. Extrusión.

Es un método muy utilizado para homogeneizar el tamaño de las vesículas formadas. MLVs son extruídas a través de filtros con tamaños definidos de poro, bajo una presión constante. El policarbonato es el material más común de los filtros. Generalmente, repetidos ciclos de extrusión reducen el número de bicapas, produciendo únicamente liposomas unilamerares. El mecanismo sugerido es que las MLVs al ser forzadas a pasar por poros de tamaño definido, se van perdiendo bicapas, hasta quedar solo una. Aunque se obtiene una distribución de tamaño uniforme, el tiempo de elaboración es muy tardado.^(27, 28, 31)

2.4. Caracterización fisicoquímica de liposomas.

Desde que los liposomas fueron propuestos como una nueva alternativa para acarrear agentes terapéuticos, se requiere el uso de técnicas analíticas para caracterizar la formulación, ya que existen parámetros importantes que influyen en el comportamiento de las vesículas dentro del organismo. Los distintos componentes de la formulación se mantienen unidos por interacciones débiles para formar vesículas lipídicas de tamaño y lamellaridad deseadas. Estas técnicas analíticas deben de ser fáciles, seguras, no laboriosas y con alto rendimiento.⁽³²⁾

A continuación se describen los parámetros que se deben cuidar para obtener una formulación estable.

2.4.1. Tamaño de Partícula.

El tamaño de partícula es un parámetro importante a cuidar cuando los liposomas son utilizados como sistemas de liberación de fármacos, ya que el tiempo de circulación sanguínea es dependiente de éste parámetro. Un aumento en el tamaño de partícula ocasiona una rápida eliminación del organismo. El tamaño de partícula del liposoma en el orden nanométrico (~100nm) también permite la acumulación en tumor a través del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR por sus siglas en inglés), que es originado por las fenestraciones de la vasculatura tumoral.⁽³³⁾

Uno de los métodos más utilizados para determinar el tamaño de las vesículas liposomales de forma rápida, confiable y versátil, es mediante la técnica de dispersión dinámica de luz. Ésta técnica se basa en el análisis de la intensidad de las fluctuaciones de la luz dispersada por las partículas en suspensión, debido al movimiento caótico que presentan (Movimiento Browniano)⁽³⁴⁾. El principio físico de este método se basa en la dispersión de luz por las partículas coloidales en función de su tamaño. Las partículas dispersan la radiación de un haz incidente de luz hacia un detector que estará posicionado a una distancia y a un ángulo determinados.⁽³⁵⁾

Ésta técnica tiene la ventaja de realizarse de forma rápida y no invasiva, ya que no se destruyen las vesículas liposomales. Los resultados obtenidos de esta técnica pueden ser

representados por histogramas que muestran la intensidad de eventos de dispersión de luz que genera cada tipo de partícula de diferente tamaño, obteniendo el promedio del diámetro efectivo de las partículas en la suspensión liposomal.⁽³⁵⁾

La dispersión dinámica de luz requiere que la concentración de la muestra esté lo suficientemente diluida para que solo se pueda dar una simple dispersión. Esto quiere decir que las muestras deben de ser ópticamente claras.⁽³⁵⁾

2.4.2. Potencial Zeta.

El potencial Zeta es el punto donde se unen la capa Stern que son iones que se localizan en la superficie del coloide y la capa difusa que son los contra-iones de la capa difusa, creando una diferencia de potencial. La carga superficial y el potencial electrostático presentes en la superficie del liposoma son parámetros muy importantes que afectan la interacción entre partículas y superficies. Depende en gran medida por la estructura química de la cabeza polar del fosfolípido y la composición del buffer acuoso, que incluye pH y fuerza iónica del medio. El potencial Zeta es un parámetro que determina la estabilidad de la suspensión liposomal.^(33, 36)

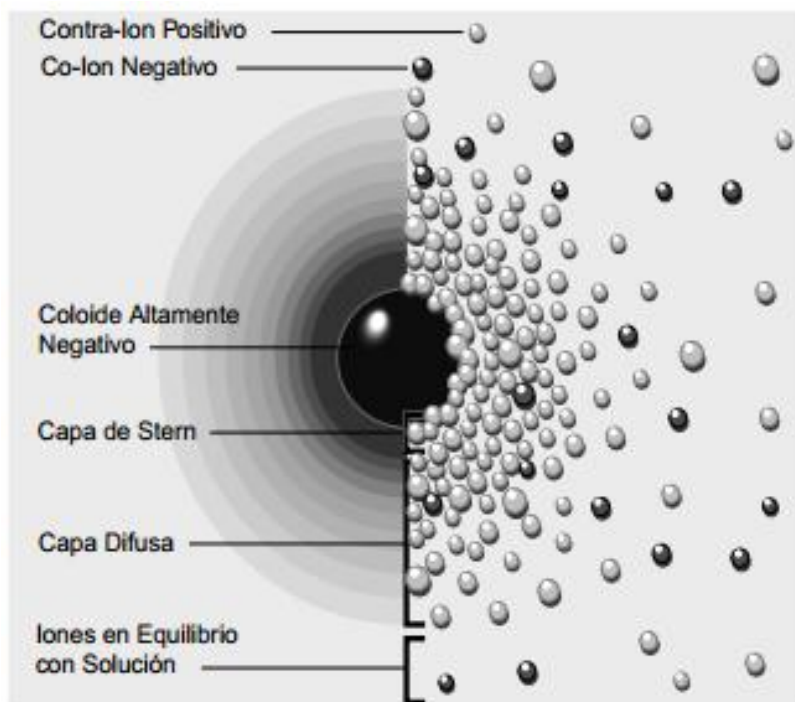


Figura 3. Representación de la doble capa.

Una técnica para determinar el potencial Zeta es midiendo la movilidad electroforética del liposoma mediante la electroforesis con láser⁽³³⁾. La técnica comúnmente utilizada para realizar mediciones de potencial Zeta en suspensiones liposomales se basa en el uso de un electrodo conductor y transparente hacia la luz incidente como a la dispersada. Las partículas tienen un movimiento electroforético en el campo generado por el electrodo, y la luz dispersada por estas partículas cercanas a la ventana de la superficie del electrodo son refractadas dos veces después de que la luz salga por la ventana del otro lado, la cuál es detectada y medida por el sistema⁽³⁶⁾.

La forma en que se puede calcular el potencial Zeta es con la siguiente ecuación⁽³³⁾:

$$\zeta = \frac{\mu_{lip} \eta}{\epsilon_0 \epsilon_r}$$

Donde μ_{lip} es la movilidad electroforética del liposoma, η es la viscosidad del medio, ϵ_0 es la permitividad al vacío y ϵ_r es la permitividad relativa del agua.

2.4.3. Cuantificación de fosfolípidos.

Un parámetro de control de calidad de la formulación liposomal, es la cuantificación de fosfolípidos, cuya caracterización fisicoquímica es importante para conocer la eficiencia del proceso de fabricación de liposomas. Un método para determinar la concentración de fosfolípidos, es el método reportado por Stewart⁽³⁷⁾ cuyo fundamento es el análisis del grupo fosfato presente en la cabeza polar del fosfolípido. Es un método colorimétrico basado en la formación de un complejo entre el ferrotiocianato de amonio, el cuál es soluble en agua, y los fosfolípidos disueltos en cloroformo, que agitándose vigorosamente a temperatura ambiente se da la formación de un complejo colorido (λ_{max} 488nm) en la fase clorofórmica⁽³⁷⁾.

2.4.4. Cuantificación de Colesterol.

El siguiente parámetro de control de calidad es la concentración de colesterol, que al igual que la cuantificación de fosfolípidos, da a conocer la eficiencia del proceso de fabricación de liposomas. Un método propuesto para la determinación cuantitativa de colesterol es mediante un ensayo enzimático. Existen kits comerciales que están basados en la hidrólisis de los ésteres de colesterol a colesterol mediante la acción de una enzima de tipo hidrolasa. El colesterol producido es oxidado por una enzima de tipo oxidasa, produciendo el colesterol

oxidado y peróxido de hidrógeno, el cual se une a la 4-aminiantipirina y fenol en presencia de la peroxidasa, generando un cromógeno con un máximo de absorción a 500 nm^(32, 38).

2.4.5. Cuantificación de Fármaco.

Una prueba de control de calidad que se realiza rutinariamente a una formulación liposomal que contenga algún agente terapéutico, es la cuantificación del fármaco encapsulado. Para esto se requiere de algún método analítico validado y estandarizado dependiendo de las características fisicoquímicas del fármaco.

2.5. Radiomarcado de liposomas.

Desde el descubrimiento de los liposomas, se han propuesto varias técnicas de radiomarcado con distintos núcleos radioactivos para poder seguir dichas partículas *in vivo*. Algunos de los radionúclidos más utilizados para este propósito son los emisores- γ como el Tecnecio-99m (^{99m}Tc), Indio-111 (^{111}In) y el Galio-67 (^{67}Ga)^(7, 39).

En el presente trabajo solamente se enfocara en el Tecnecio-99m y a continuación se detallarán sus propiedades fisicoquímicas.

2.5.1. Propiedades fisicoquímicas del Tc-99m.

El ^{99m}Tc es el radionúclido de elección para realizar estudios de imagen molecular en el área de medicina nuclear. Su facilidad de producción y la química bien caracterizada del radionúclido, han logrado comercializar una gran variedad de radiofármacos de uso diagnóstico. En la siguiente tabla se presentan las características físicas y químicas del ^{99m}Tc que lo hacen un radionúclido de primera línea en el diagnóstico del cáncer⁽⁴⁰⁾.

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del ^{99m}Tc .

Propiedad	
Modo de decaimiento	Transición Isomérica
Tiempo de vida media	6.02 h
Emisión	Fotones- γ
Energía de emisión	140 keV
Modo de producción	Generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$
Estados de oxidación	-1, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7

2.5.2. Técnicas de radiomarcaje de liposomas.

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas para marcar liposomas con radionúclidos, aunque para ello se requieren de ciertas características importantes del método para realizar un radiomarcado aceptable: 1) Preparación sencilla y rápida, preferiblemente a temperatura ambiente, 2) Alta eficiencia de incorporación, 3) Disponibilidad del radionúclido, 4) Alta estabilidad del radiomarcado tanto *in vivo* como *in vitro*, 5) Que sea aplicable a todos los tipos de liposomas⁽⁴¹⁾.

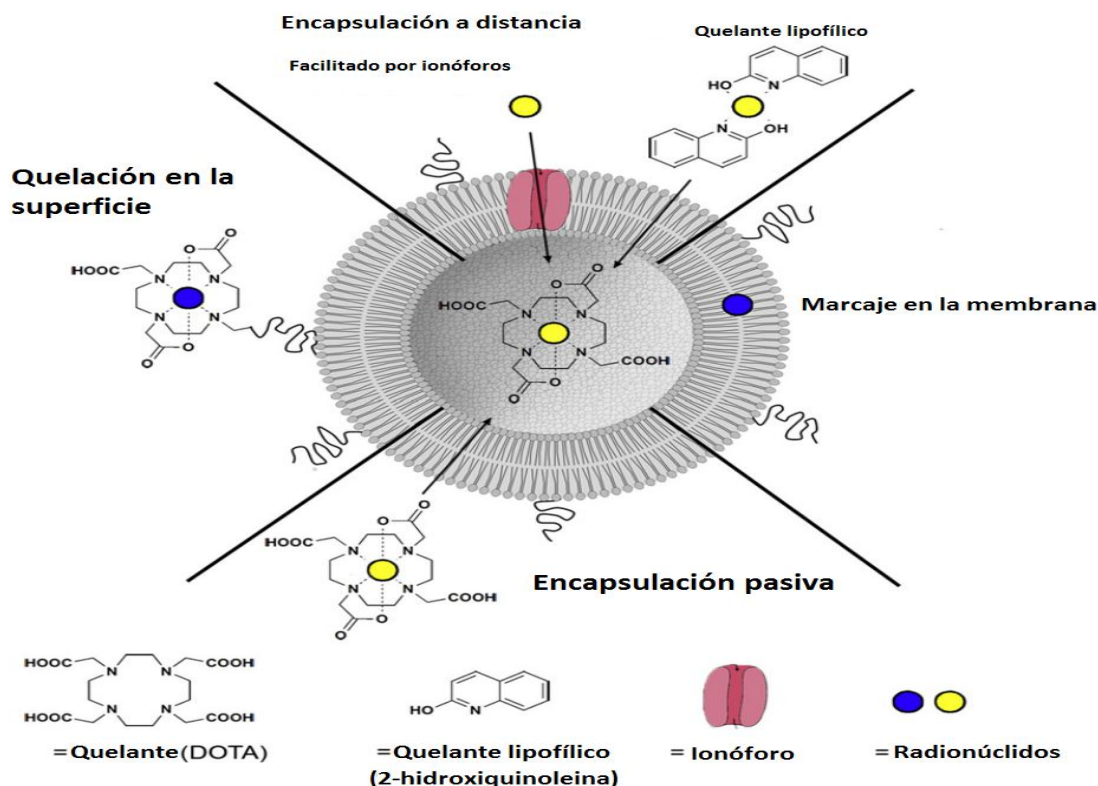


Figura 4. Esquema de las técnicas de radiomarcaje de liposomas⁽⁴¹⁾.

Idealmente, los liposomas deben ser marcados después de su preparación y justo antes de la experimentación. Estos métodos son llamados “after-loading” o “remote-labeling”, los cuáles son las formas más adecuadas para dicho propósito. Estos métodos son indispensables cuando se utilizan radionúclidos de vida media corta, como lo es el Tecnecio-99m^(39, 41).

2.5.3. Ionóforos.

El término ionóforo ó portador de iones, describe a aquellas moléculas capaces de formar complejos organosolubles con cationes alcalinos; facilitando su transporte a través de barreras lipídicas⁽⁴²⁾. Los ionóforos son ampliamente utilizados en modelos de transporte de iones utilizando liposomas⁽⁴²⁻⁴⁶⁾ y recientemente se han utilizado para el transporte de fármacos al interior de estas vesículas lipídicas, tal es el caso del irinotecan^(47, 48), del ciprofloxacino y de la vincristina⁽⁴⁹⁾, y también se han propuesto como moléculas bioactivas para la terapia contra el cáncer⁽⁵⁰⁾.

2.5.3.1. Mecanismo de acción.

Para poder realizar el transporte, los ionóforos deben asumir conformaciones críticas en donde los átomos de oxígeno se orientan hacia el catión, provocando que el exterior de la molécula presente una superficie rica en estructuras hidrocarbonadas⁽⁴²⁾. Uno de los ionóforos que se han estudiado en modelos de transporte de iones es la ionomicina, la cual presenta mejores propiedades de transporte iónico al compararlo con otros ionóforos⁽⁴³⁾.

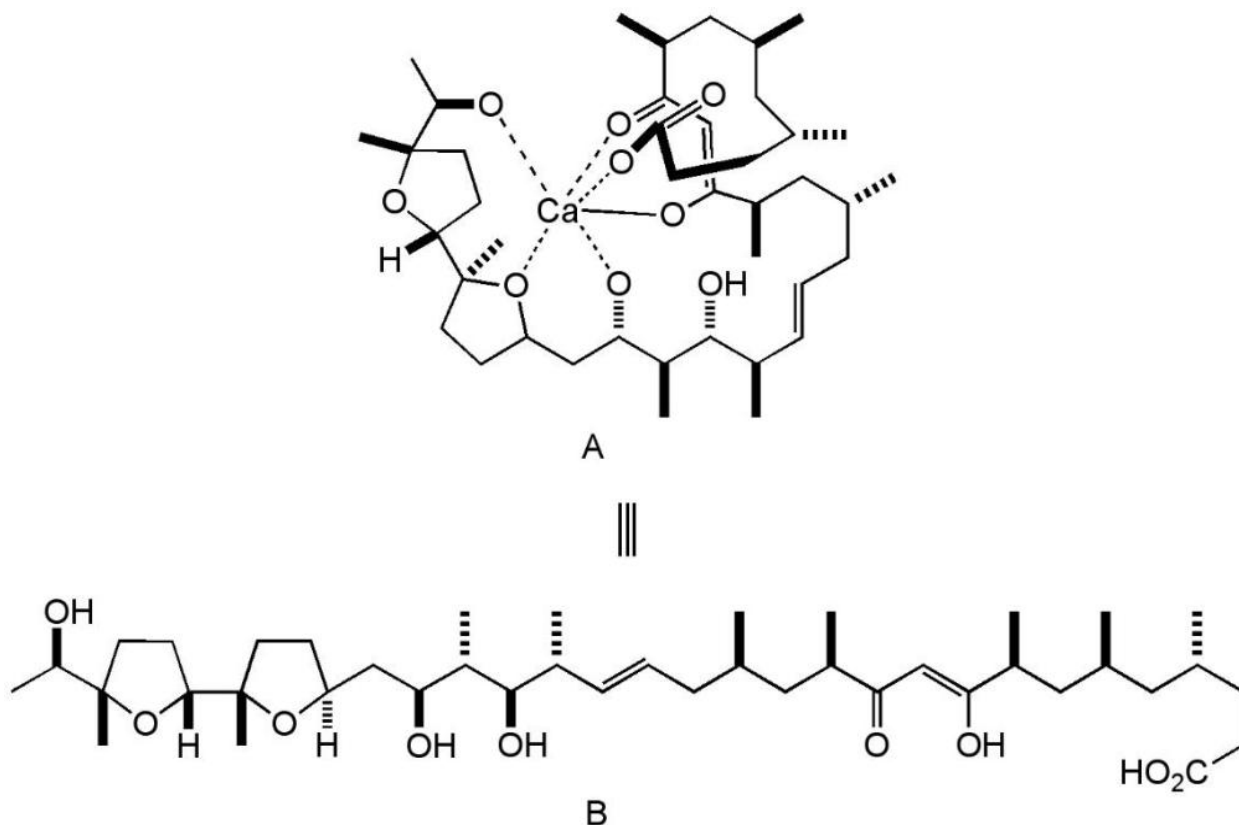


Figura 5. Estructura de la ionomicina y su complejo con calcio⁽⁵¹⁾.

Este ionóforo es de tipo transportador, lo que quiere decir que se encontrara embebido en la membrana del liposoma y actuara como un portador de iones con preferencia a los divalentes y menor preferencia hacia los monovalentes, generando un potencial transmembranal. El mecanismo por el cual se propone este ionóforo actúa en las membranas es electroneutro, es decir que el balance neto de la reacción no produce una diferencia de concentraciones de iones tanto dentro como fuera de la membrana⁽⁴³⁾.

En la siguiente figura se esquematiza el mecanismo de acción de este ionóforo.

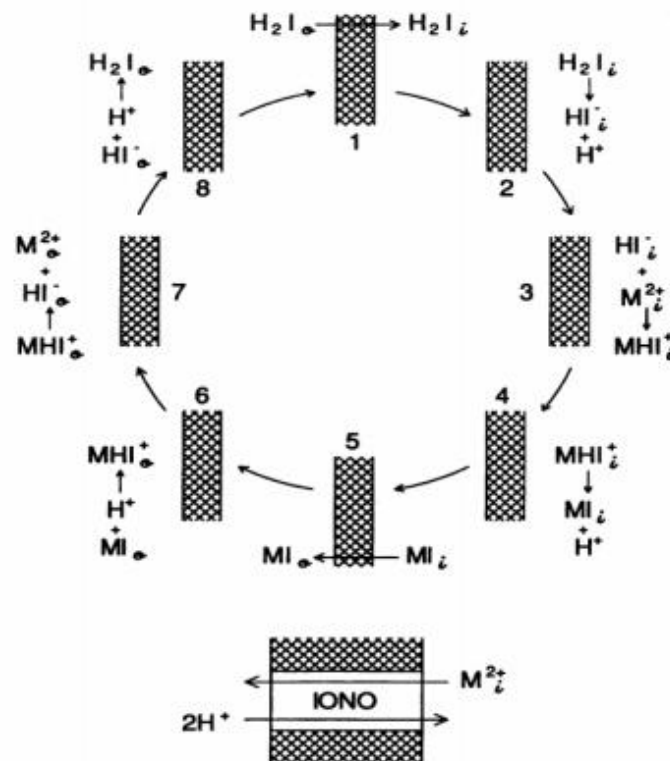


Figura 6. Mecanismo de incorporación de cationes por la ionomicina. En un primer paso (1) la ionomicina interacciona con la membrana liposomal, y al estar dentro del liposoma ésta se desprotona (2) pudiendo realizar la reacción de complejación con el catión (3) y consecutivamente volviéndose a desprotonar (4) dejando dos protones en el medio y quedando el complejo neutro. El complejo neutro sale del liposoma debido a sus propiedades lipofílicas (5) y una vez fuera el complejo se protona (6) y el catión se libera de la Ionomicina (7) y ésta se vuelve a protonar, quedando de nuevo en su forma neutra(8)⁽⁴³⁾.

2.5.4. Radiomarcado con ^{99m}Tc -MIBI.

El Tecnecio-99m (2-metoxi-2-metilpropilisonitrilo) sestamibi fue desarrollado originalmente para imágenes de perfusión miocárdica, y en los últimos años también se ha utilizado en imagen de tumores en cáncer de pulmón y cáncer de mama. El mecanismo de incorporación del radiofármaco en tumores está relacionado con el potencial de membrana de la célula, y también por difusión pasiva a través de la membrana. El ^{99m}Tc -MIBI es un catión lipofílico cuya carga es +1⁽⁵²⁾.

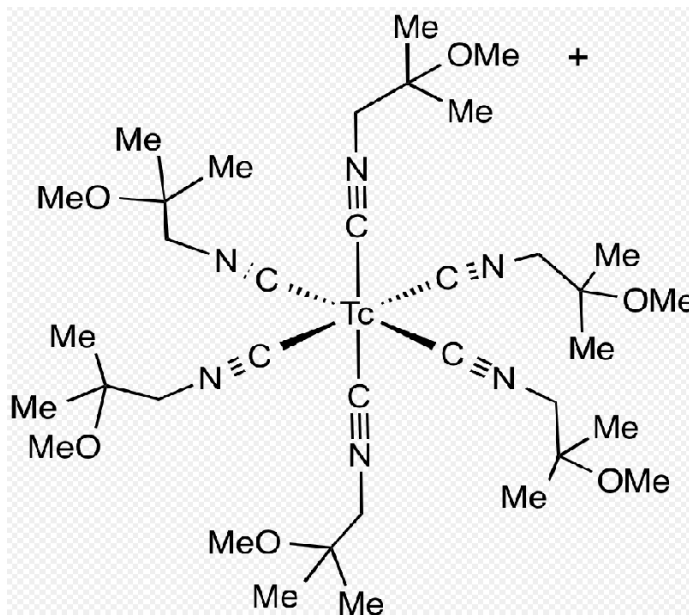


Figura 7. Estructura química del ^{99m}Tc -sestamibi.

Debido a esta característica, este radiofármaco puede ser incorporado al espacio acuoso del liposoma, utilizando un gradiente transmembranal facilitado por un ionóforo, tal como ya ha sido publicado por Belhaj-Tayeb et. al⁽⁵²⁾.

2.5.5. Pruebas de radiomarcaje de liposomas.

Dentro de los controles de calidad para el radiomarcaje de liposomas, se encuentran: 1) La evaluación de la eficiencia de radiomarcaje, la cual nos indicara cuanto de la actividad inicial del radiofármaco queda asociado con el liposoma, 2) La estabilidad *in vitro* para predecir cuánto del radiofármaco quedará asociado con el liposoma con respecto al tiempo que dura el experimento y, 3) la estabilidad *in vivo* mediante modelos animales y técnicas de imagen molecular, se puede obtener la biodistribución del sistema liposomal así como su farmacocinética^(12, 52, 53).

3. Justificación.

Dada la alta incidencia de cáncer cervicouterino en la población mexicana, el uso del fármaco cis-diaminodicloroplatino (II) (cisplatino) como tratamiento de primera línea contra este tipo de padecimiento ha sido muy eficaz. Sin embargo, existen diversos efectos adversos ocasionados por este fármaco, como lo son la nefrotoxicidad, la ototoxicidad y la neurotoxicidad, además de que el tiempo de residencia del fármaco en el organismo es muy corto, lo cual limita su eficacia en la terapia convencional. Por tal motivo se han investigado otros recursos para disminuir dichos efectos adversos y aumentar sus propiedades quimioterapéuticas; el uso de liposomas como acarreadores de fármacos han resultado muy eficiente para disminuir los efectos adversos y mejorar los parámetros farmacocinéticos, obteniendo un mayor tiempo de residencia en el organismo.

El radiomarcaje de la formulación liposomal de cisplatino con núcleos radioactivos de Tecnecio 99 metaestable (Tc-99m), es una herramienta útil para poder realizar estudios de farmacocinética y biodistribución de la formulación liposomal en animales de experimentación mediante la obtención de imágenes por microSPECT (por sus siglas en inglés Tomografía Computada por Emisión de Fotón Único), o la cuantificación de la radiación en órganos utilizando un contador de radiación por centelleo. La utilización de núcleos radioactivos en este estudio permitirá hacer el seguimiento de la distribución, en tiempo real, de la formulación de cisplatino-liposomal y en un futuro, se podrá realizar el radiomarcaje con algún radionúclido de uso terapéutico, como lo es el Re-188, Re-186.

4. Hipótesis.

La encapsulación de Tc-99m mediante un potencial transmembranal, generado por el ionóforo Ionomicina, mejorará la eficiencia del radiomarcado.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo general.

Desarrollar y caracterizar una técnica de radiomarcado de un sistema de cisplatino liposomal con Tc-99m utilizando un potencial transmembranal.

5.2. Objetivos particulares.

- 1) El diseño de una técnica de encapsulación de cisplatino a través de un potencial transmembranal.
- 2) La implementación de la técnica de radiomarcado con Tc-99m-MIBI de liposomas a través del ionóforo Ionomicina.
- 3) La caracterización fisicoquímica y pruebas de estabilidad *in vitro* de liposomas.

6. Materiales y métodos.

6.1. Preparación de liposomas por hidratación de bicapa lipídica.

En una solución de cloroformo/metanol (2:1) se disolvieron una mezcla de HSPC (Avanti Polar Lipids Inc, USA) , Colesterol (Avanti Polar Lipids, USA) mPE-PEG₂₀₀₀ (Avanti Polar Lipids Inc, USA) y vitamina E (Sigma-Aldrich, Alemania) como antioxidante. Después se evaporó el solvente mediante el uso de un rotavapor a una temperatura de 65°C, agitando a 210 rpm (Laborota 4000, Heidolph, Alemania) aplicando vacío al final de la evaporación. La capa obtenida fué colocada en un desecador a vacío por 24 horas. Posteriormente la bicapa lipídica fue hidratada con una solución de CaCl₂ anhidro (Sigma-Aldrich, Alemania) a una concentración de 600mM. Una vez hidratada se homogenizó el tamaño de partícula por extrusión a través de filtros de policarbonato de 0.4, 0.2 y 0.1 µm. Los liposomas obtenidos fueron dializados (Spectrapor 12-14000 MWCO, Spectrum Medical Industries, USA) por 4 horas usando solución salina como medio. Se realizó la caracterización fisicoquímica.

6.2. Preparación de liposomas cargados con cisplatino por evaporación en fase reversa.

Se preparó una solución acuosa con Cisplatino (Merck, Alemania), la cual fue calentada a 65°C con agitación magnética. En otro vaso se disolvieron HSPC, Colesterol, mPE-PEG₂₀₀₀ en una solución de cloroformo (Reproquifin, México) metanol (Fermont, México) (2:1), y adicionando vitamina E como antioxidante. Se adicionó lentamente por goteo la solución de lípidos a la solución acuosa (aún en agitación y a 65°C) lentamente para no formar espuma. La emulsión que se formó fue trasvasada a un matraz de bola y llevada a un rotavapor a una velocidad de 150 rpm bajo sonicación y a una temperatura de 65°C. La suspensión de liposomas fue enfriada a temperatura ambiente y colocada en un desecador por 24 horas a vacío. Los liposomas fueron dializados durante 4 horas utilizando solución salina como medio. Se realizó la caracterización fisicoquímica.

6.3. Caracterización fisicoquímica de los liposomas.

6.3.1. Tamaño de partícula.

Se lavaron celdas de plástico 2 veces con KCl (Sigma-Aldrich, Alemania) 10 mM previamente filtrado a través de filtros de 0.2 µm, con el fin de remover partículas de polvo que pudieran interferir en la lectura. Se llenaron las celdas con KCl 10 mM y se agregaron 5µL del estándar o de la muestra. Se resuspendió la muestra y se realizó la lectura en un equipo 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA). La lectura del estándar debe ser: 92 ± 3.7 nm.

6.3.2. Potencial zeta.

Se lavaron las celdas 2 veces con KCL 1 mM previamente filtrado. Se llenó con aproximadamente 1.8 mL de KCl y fueron agregados 10 µL de la muestra, se resuspendieron y se les colocó un electrodo cuidando que no se formen burbujas, se conectó el electrodo al equipo y se leyó la muestra en un equipo 90 PLUS/BI-MAS.

Para el estándar se lavó la celda y se llenó con 1.8 mL aproximadamente de una solución de 5mg/20 mL (0.25 mg/mL) del estándar BIZR3 (Brookhaven Instruments, USA), se colocó el electrodo y se leyó la muestra. La lectura del estándar debe ser de -53 ± 4 mV.

6.3.3. Cuantificación de colesterol.

Para la determinación del colesterol en la muestra, se utilizó un kit comercial (Advia Chemistry, Bayer USA). Se agregaron 10 µL de la muestra y después 1 mL del reactivo, se agitó en vortex por un minuto. La muestra fue incubada a 4 °C por 10 minutos. La muestra se leyó en un espectrofotómetro (DU 530 Beckman Coulter, USA) a 500nm.

6.3.4. Cuantificación de fosfolípidos.

Se realizó la cuantificación de fosfolípidos con una modificación del método reportado por Stewart ⁽³⁷⁾. Se tomaron 10 µL de muestra y se llevaron a 100 µL con agua desionizada y se agita en vortex por un minuto. Se tomaron 20 µL de la dilución anterior y se secaron. Se añadieron 15 µL de agua desionizada, se agitó 1 minuto en vórtex y se repite el proceso de secado. Una vez secas las muestras fueron resuspendidas en 750 µL de cloroformo y se agitó en vórtex por 2 minutos. Se agregaron 750 µL de ferrotiocianato de amonio, se agitaron en vórtex 1 minuto y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos a una temperatura de 4°C (Centrifuge 5702 R, Eppendorf USA). La fase acuosa fue retirada y de la fase orgánica se tomaron aproximadamente 700 µL que se depositaron en la celda de cuarzo y se leyó a 488 nm en un espectrofotómetro (DU 530 Beckman Coulter, USA).

- Preparación del ferrotiocianato de amonio (NH₄FeSCN).

Se disolvieron 27.03 g de cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃*6H₂O) (Sigma-Aldrich, Alemania) y 30.4 g de tiocianato de amonio (NH₄SCN) (Sigma-Aldrich, Alemania) en 1 L de agua desionizada. La solución se guardó en un frasco ámbar.

6.3.5. Cuantificación de cisplatino.

Tratamiento de la muestra:

Se preparó una dilución 1:100 de la muestra de liposomas. Se tomaron 100 µL y fueron agregados 400 µL de acetonitrilo, se agitó en vórtex y se centrifugó durante 10 minutos a una temperatura de 4°C y 10000 rpm (Zentrifugen Mikro 22R Hettich, USA). Se tomaron 400 µL del sobrenadante y se pasaron a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Las muestras fueron secadas a una temperatura de 40°C y bajo corriente de Nitrógeno. Una vez secas las muestras fueron resuspendidas en 100 µL de solución salina, se agitaron en vórtex y se agregaron 10 µL de NiCl₂ 50 µg/mL y 10 µL de DDTC (Sigma-Aldrich, Alemania) al 10% en

NaOH 0.1 M. Las muestras fueron agitadas e incubadas durante 30 minutos a 37°C y 500 rpm en una placa de calentamiento con agitación. Se agregaron 100 µL de cloroformo y se agitaron 3 minutos en vórtex y se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm a 4°C.

La cuantificación de cisplatino se realizó por HPLC en un equipo WATERS-ALLIANCE 2695 acoplado a un detector UV-VIS WATERS 2489, las condiciones cromatográficas fueron:

Columna: Symmetry C-18 (3.9 X150 mm) 5 µm

Flujo: 1.8 mL/min

Temperatura: 23 °C

Fase móvil: Agua-MeOH-Acetonitrilo (28:40:32)

Volumen de inyección: 20 µL

T_R cisplatino: 3.2 min

T_R NiCl₂: 4.5 min

Tiempo de corrida: 7 min

Detector UV

Longitud de onda: 254 nm

6.3.6. Cuantificación de cloruro de calcio.

Se realizó una dilución 1:20 de la muestra de liposomas con agua desionizada, se agitaron en vórtex durante 3 minutos y se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 15 minutos para asentar los lípidos. Se cuantificó la muestra utilizando un kit para determinar calcio (Spinreact, S.A. España), se adicionó 2 mL de hidroxilamina, 1 gota de *o*-cresoltaleina y 20 µL del calibrador de calcio (10 mg/dL) o de la muestra, directamente en las celdas. Se leyó en un espectrómetro UV-VIS (DU 530 Beckman Coulter) a 570 nm.

6.4. Radiomarcaje de liposomas.

Se tomaron 200 μL de la suspensión liposomal (cargados con CaCl_2 ó cisplatino) y se adicionaron 0.5 mCi (18.5 MBq) de $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ (MIYMSA, S.A. de C.V. México), inmediatamente se adicionó ionomicina (Sigma-Aldrich, Alemania) en una proporción 8:1 (μg ionomicina por μmol de lípido). Las muestras de liposomas se dejaron incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se purificaron y concentraron los liposomas radiomarcados con ultrafiltración en filtros Amicon de 3 K (Merk Millipore, USA) de 0.5 mL, se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos (Mini Spin, Eppendorf USA), adicionando 100 μL de solución salina para filtrar el $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ no encapsulado. Se determinó la eficiencia de radiomarcado utilizando un activímetro (Deluxe Isotope Calibrator II, Nuclear Associates, USA) midiendo la actividad inicial y la actividad asociada a los liposomas.

6.5. Encapsulación de cisplatino mediante potencial transmembranal.

A una muestra de 0.5 mL de liposomas cargados con cloruro de calcio fué adicionada una solución de cisplatino (Sigma-Aldrich, Alemania) a una temperatura de 65°C cuya proporción fué 1:6 (fármaco: lípido), se adicionó ionomicina a una proporción de 8:1 (μg ionomicina por μmol de lípido) y se dejó incubar por 1 hora a 65°C . Después se purificaron y concentraron las muestras en tubos de ultrafiltración Amicon de 30 k de 4 mL (Merk Millipore, USA), y se centrifugaron a 4000 rpm durante 40 minutos a una temperatura de 4°C (Centrifuge 5702 R, Eppendorf USA). Se adicionó 1 mL de agua destilada para filtrar el cisplatino no encapsulado. Y por último se cuantificó la concentración de cisplatino encapsulada con HPLC.

6.6. Estabilidad *in vitro*.

Se preparó 1 mL de solución salina al 0.9% y suero humano al 50% que se mantuvieron en incubación a una temperatura de 37°C . A continuación se adicionó 0.2 mCi de liposomas con CaCl_2 y liposomas con cisplatino, ambos previamente radiomarcados con la técnica descrita anteriormente. Se tomaron muestras de 20 μL a las 0, 0.5, 1, 3, 6, 18 y 24 horas y se depositaron en tubos Amicon de 3 K. Se adicionaron 150 μL de solución salina para filtrar el tecnecio liberado. Se centrifugaron las muestras por 20 minutos a 13000 rpm. Se midió la actividad en el filtro y en el filtrado utilizando un contador de centelleo sólido (Model 2200 Scale Ratemeter, Ludlum, USA).

6.7. Análisis estadístico.

Los valores se han reportado como el promedio \pm la desviación estándar. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar la diferencia entre las medias de los resultados y una prueba de Tukey en caso de encontrar diferencia significativa utilizando el programa SPSS V.22. Existe diferencia estadísticamente significativa si $p < 0.05$.

7. Resultados y Discusión.

7.1. Formulación liposomal.

La formulación liposomal consta de los siguientes componentes: HSPC: Colesterol: PEG2000: α -tocoferol (60:33.5:5:1.5). El fosfolípido principal es el HSPC (Fosfatidilcolina hidrogenada de soya), que es el componente principal de la suspensión liposomal, el colesterol es el que sigue en proporción y es el encargado de dar soporte y rigidez a la membrana⁽²⁵⁾. El liposoma tiene un recubrimiento de Polietilenglicol, que da una estabilización estérica permitiendo que haya un mayor tiempo de distribución en el organismo, al no poder ser detectado por el sistema retículo endotelial⁽⁵⁴⁾. Se adiciona también α -tocoferol (Vitamina E), como agente antioxidante que prevendrá la oxidación de los componentes liposomales, ya que el objetivo de esta formulación es la encapsulación de un radionúclido emisor de rayos gamma. Se ha reportado que la radiación gamma puede producir la degradación química de los fosfolípidos, produciendo peroxidación, formación de lisolípidos, ácidos grasos libres, ácido fosfatídico y otros derivados, es por ello que la incorporación de un agente antioxidante, como la vitamina E es fundamental en este tipo de formulaciones que serán radiomarcadas⁽⁵⁵⁾.

El método propuesto para realizar la encapsulación, tanto para el cisplatino como para el Tc-99m, involucran un potencial transmembranal a través del ionóforo Ionomicina, el cual intercambiará el catión calcio encapsulado en el interior acuoso del liposoma por la forma ionizada del cisplatino en medio acuoso (Carga +2) y/o por el ^{99m}Tc-MIBI (Carga +1).

7.2. Caracterización fisicoquímica.

En la Tabla 3 se presentan los parámetros fisicoquímicos de caracterización de los liposomas; se reporta el promedio con la desviación estándar de tres lotes:

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de liposomas cargados con CaCl₂.

Parámetro	Valor ± Desviación estándar
Tamaño de partícula	159.2 nm ± 3.91
Potencial Zeta	-25.29 mV ± 3.30
Concentración de fosfolípidos	38.20 mg/mL ± 1.42
Concentración de colesterol	3.66 mg/mL ± 0.74
Concentración de calcio	1.75 mg/mL ± 0.31

7.3. Radiomarcado de liposomas con CaCl₂.

7.3.1. Proporción Ionomicina: Lípido.

La técnica ideal para realizar el radiomarcaje de liposomas involucra la utilización de liposomas preformados⁽⁴¹⁾, los cuales fueron elaborados mediante hidratación de bicapa lipídica y cargados con cloruro de calcio. El estudio consistió en evaluar la proporción óptima de ionomicina con respecto a la cantidad de lípido en la formulación que resulta en la mejor eficiencia de encapsulación.

En la Figura 8 se muestran las diferentes proporciones de Ionomicina: lípido y las eficiencias en porcentaje que se obtienen en cada una de ellas.

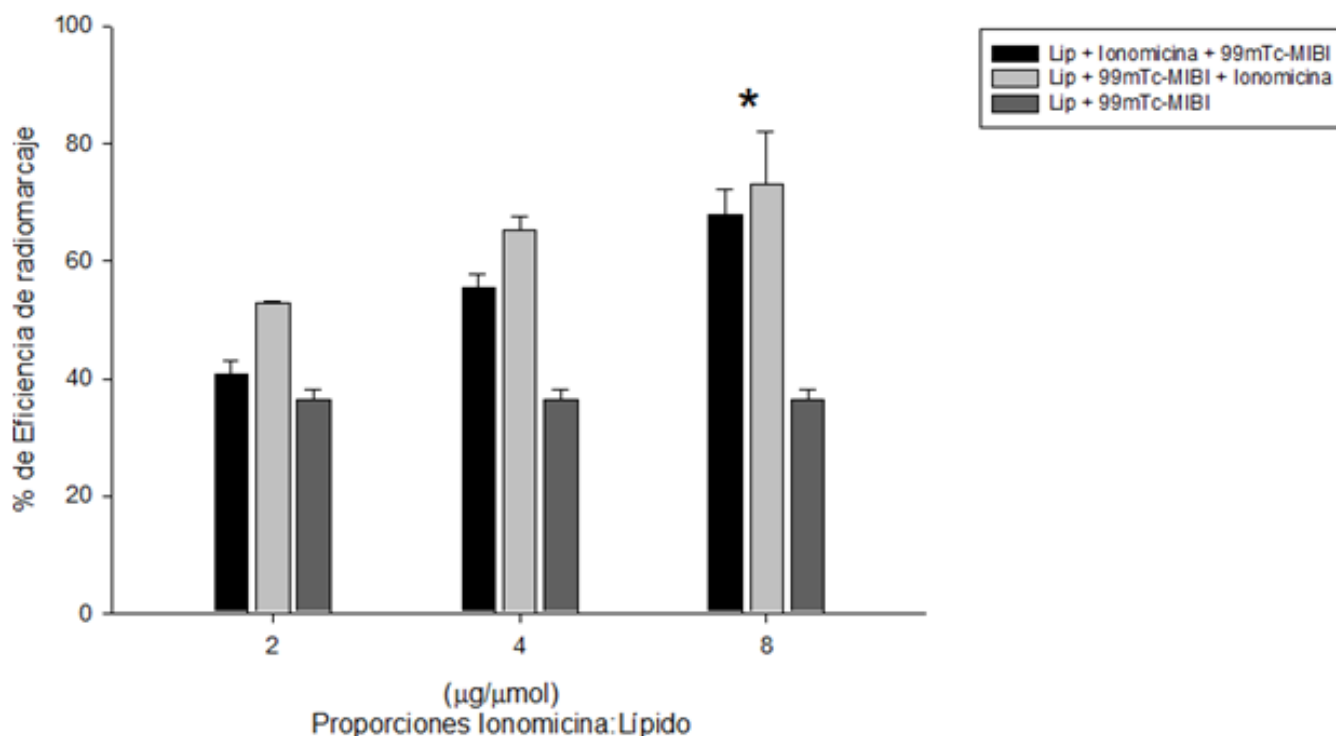


Figura 8. Evaluación de la eficiencia de radiomarcado en función de la proporción de ionomicina adicionada. Conjuntamente se evaluaron dos diferentes formas de adición de los reactivos (Ionomicina y $^{99m}\text{Tc-MIBI}$); como control de referencia se incluyó una muestra sin el ionóforo. Se adicionaron 0.5 mCi de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$. Se reporta el promedio $n=3 \pm$ Desviación estándar. (*) Indica diferencia significativa con respecto al control ($p<0.05$).

Fue utilizado el radiofármaco $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ debido a que es un catión lipofílico con carga (+1), y el ionóforo Ionomicina, que creará un gradiente transmembranal, intercambiando el calcio del interior liposomal por el Radiofármaco.

Se evaluaron dos maneras de adicionar los reactivos, en una se adiciona primero la ionomicina a los liposomas y en seguida el radiofármaco, y en la otra se invierte el orden adicionando el radiofármaco primero a los liposomas seguida de la adición de la ionomicina. Se observó una leve mejoría en la eficiencia de radiomarcado con la adición de la ionomicina al final.

Los resultados también mostraron que la eficiencia de encapsulación es directamente proporcional a la cantidad de ionomicina que se adiciona, con la proporción de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ se observa una eficiencia de radiomarcado en el orden del 75%, mientras que en los otros casos esta es del orden de 55 y 65 %. Debido a que el $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ es un catión monovalente, y la ionomicina tiene una mayor afinidad por cationes divalentes, como el calcio⁽⁴³⁾, se cree

que la reacción requiere de mayor cantidad del ionóforo para poder ingresarlo al espacio acuoso del liposoma, caso contrario a lo que se observa con el cisplatino cuyos resultados serán discutidos más adelante.

De acuerdo al análisis de varianza hay diferencia significativa de las muestras con respecto al control, el cual no contiene ionomicina; sin embargo, la eficiencia del radiomarcado es cercana al 30%, debido a que el $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ es un catión lipofílico, por lo tanto tendrá cierta afinidad por las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido, intercalándose una pequeña porción en la membrana del liposoma⁽⁵²⁾. Por lo tanto, la ionomicina ayuda a la incorporación del $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ aumentando la eficiencia de encapsulación.

7.3.2. Tiempo de Incubación.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos de la eficiencia de radiomarcado con respecto al tiempo de incubación a temperatura ambiente. Únicamente se consideró el método en el que la Ionomicina se adiciona al final.

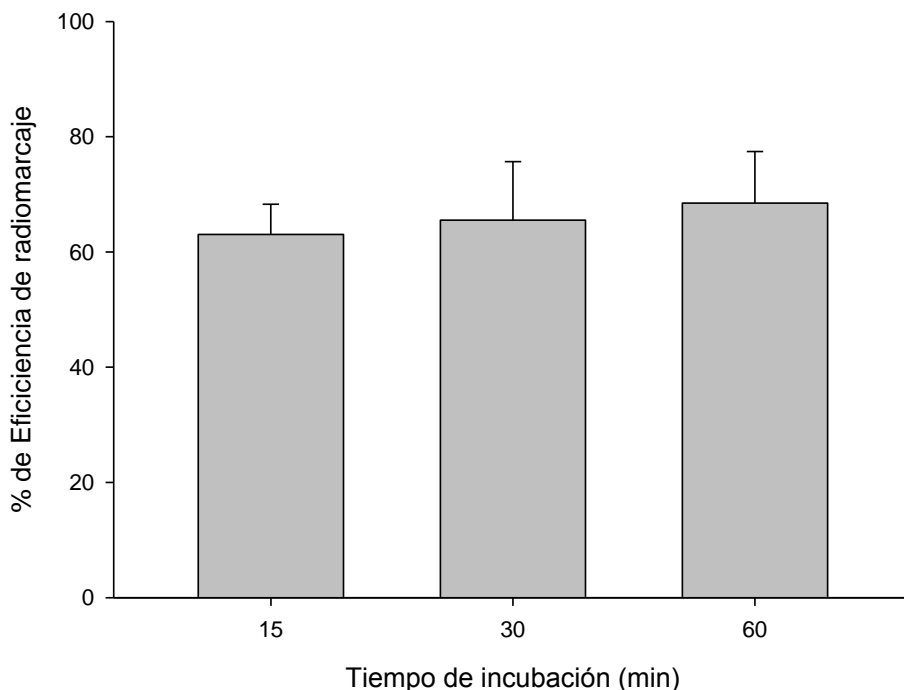


Figura 9. Se muestra la eficiencia de radiomarcado evaluados a tres diferentes tiempos (15, 30 y 60 min) a temperatura ambiente. Se presenta el promedio de $n=5$ con su respectiva desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

No hay diferencia significativa entre los tiempos de incubación, ya que se obtienen eficiencias de encapsulación similares (~ 60%). El tiempo de incubación no juega un papel fundamental en la eficiencia de encapsulación, lo que lleva a hacer el tiempo de marcaje mucho más rápido y eficiente, hasta con 15 minutos de incubación.

7.4. Resultados y discusión de la encapsulación de cisplatino.

7.4.1. Evaluación de la concentración de cisplatino encapsulada en función de la proporción ionomicina: lípido.

Se propone un nuevo método de encapsulación de cisplatino, considerando que este fármaco en medio acuoso pasa de su forma neutra a su forma cargada (+2) mediante una reacción de hidrólisis, donde los dos grupos salientes que son los iones cloruro son sustituidos por dos moléculas de agua⁽⁵⁶⁾. Esta característica permite su encapsulación por el método de potencial transmembranal con el ionóforo ionomicina.

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos de la concentración de cisplatino en liposomas en función con la proporción de ionomicina: lípido.

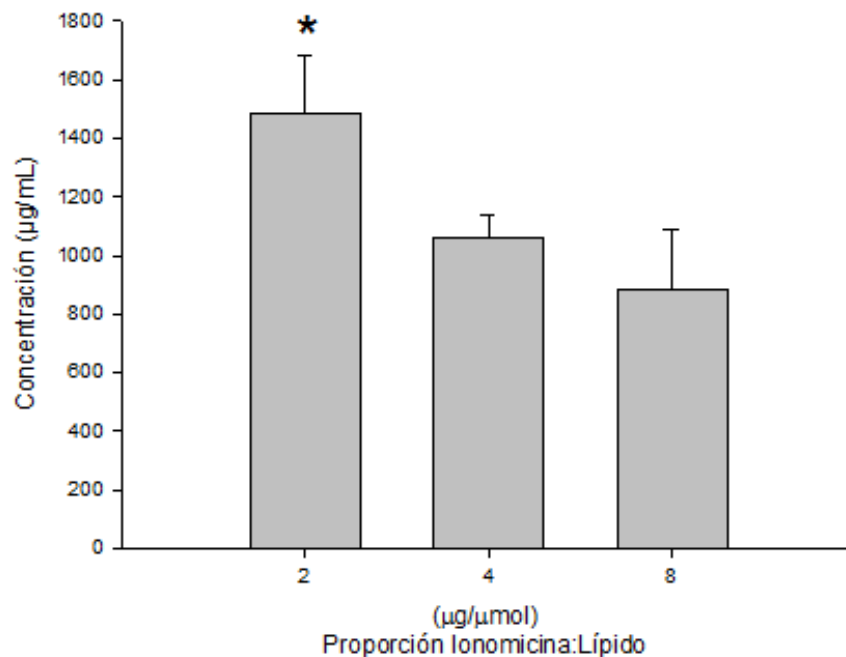


Figura 10. Se muestra la concentración de cisplatino en liposomas en función de la proporción de ionomicina: lípido (2, 4 y 8 µg/µmol). La proporción fármaco: lípido en este experimento fue 1:6. Se reporta el promedio n=3

con su respectiva desviación estándar. (*) Indica diferencia significativa en comparación con los otros dos grupos ($p < 0.05$).

La tendencia que se logra observar es inversamente proporcional a la cantidad de ionomicina que se adiciona, ya que en la mínima proporción ionomicina:lípido se alcanza la mayor concentración de cisplatino ($1482.34 \mu\text{g/mL}$). Contrario con los resultados obtenidos con $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ (mayor eficiencia con $8 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$, 73.13%), la proporción requerida para incorporar cisplatino al interior del liposoma es menor ($2 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$), el cual es significativamente diferente de las demás proporciones de ionomicina. Esto puede ser debido a la carga que presenta el cisplatino en solución acuosa (+2) y que la ionomicina es más afín a los cationes divalentes que a los monovalentes⁽⁴³⁾. La alta concentración también se asocia con la pureza del cisplatino utilizado (99.9%), ya que al no contener impurezas de otros metales, el proceso de potencial transmembranal se da de forma más eficiente.

7.4.2. Tamaño de partícula después de la encapsulación de cisplatino.

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos de las mediciones de tamaño de partícula.

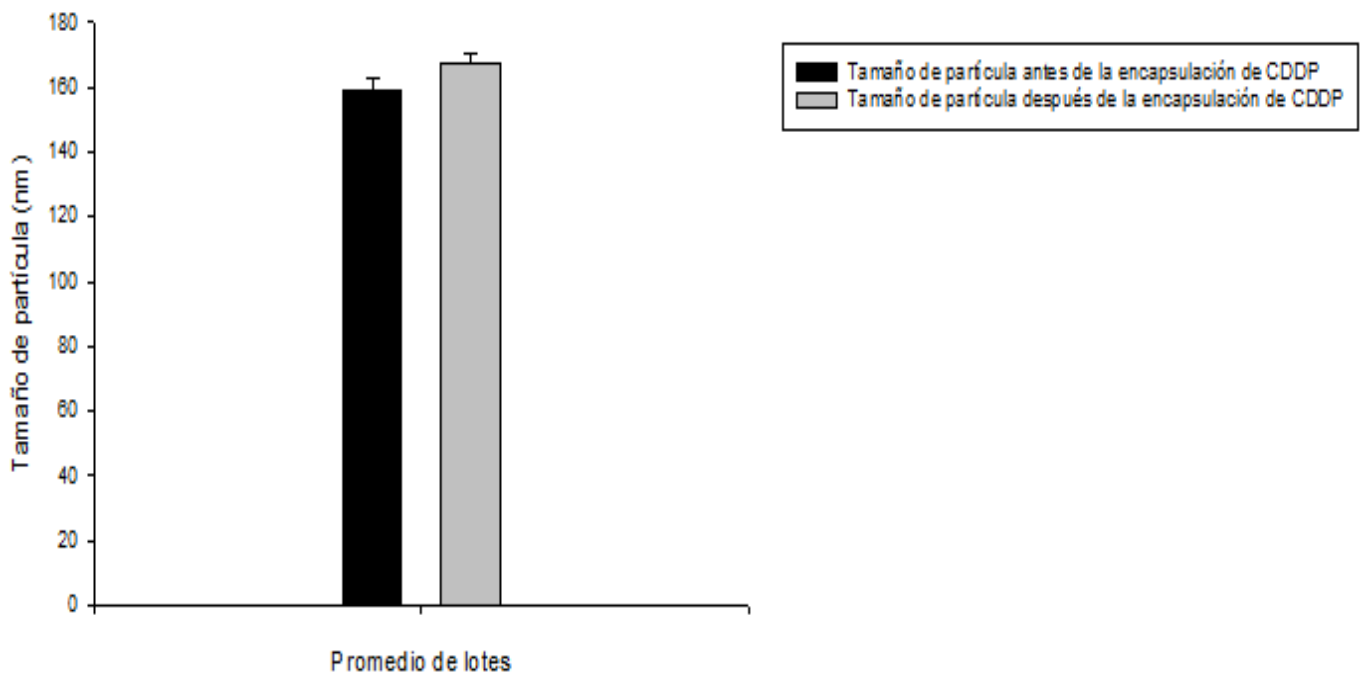


Figura 11. Se presentan los datos de 3 lotes utilizados para la encapsulación de CDDP con la técnica de potencial transmembranal con ionomicina. Se presenta el promedio $n=3$ con su respectiva desviación estándar.

No se observa diferencia significativa entre estos dos grupos.

No se observan cambios importantes en el tamaño de partícula después de encapsular el cisplatino; el tamaño antes de encapsular es de $159.2 \text{ nm} \pm 3.91$ y después de encapsular es de $167.4 \text{ nm} \pm 2.71$. Se creía que el método de encapsulación, donde se utiliza el calentamiento por encima de la temperatura de transición del lípido (70°C) o por la utilización de la Ionomicina en etanol absoluto, pudiera afectar el tamaño de los liposomas.

7.4.3. Potencial Zeta después de la encapsulación de cisplatino.

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos de las mediciones de potencial zeta antes y después de realizar la encapsulación de cisplatino mediante el método de potencial transmembranal generado por la ionomicina.

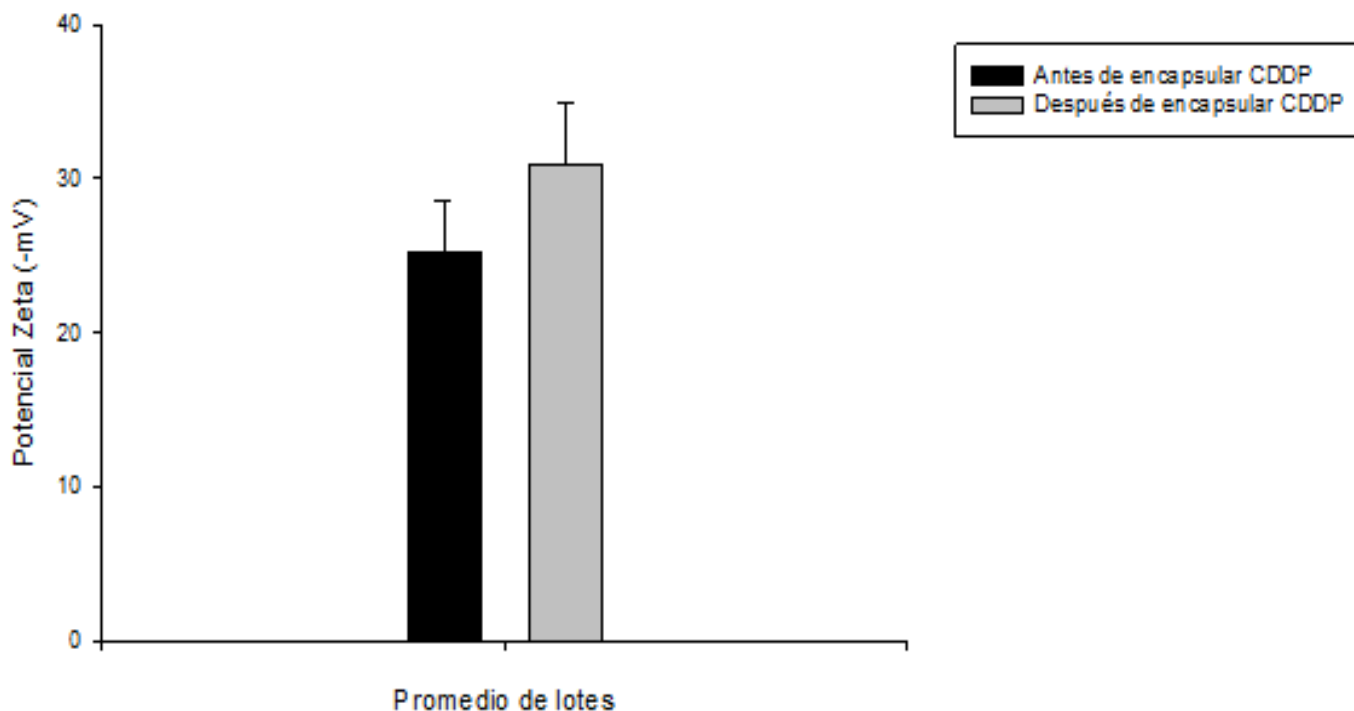


Figura 12. Se presentan los datos de 3 lotes utilizados para la encapsulación de CDDP con la técnica de potencial transmembranal con ionomicina. Se presenta el promedio $n=3$ con su respectiva desviación estándar.

No se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

Se observa que hay un ligero incremento del valor negativo del potencial zeta, antes de encapsular es de $-25.29 \text{ mV} \pm 3.30$ y después de encapsular es de $-30.98 \text{ mV} \pm 3.89$; esto

posiblemente como consecuencia del intercambio iónico calcio-cisplatino. Aunque hay un incremento en el potencial zeta, no es estadísticamente significativo.

7.5. Resultados y discusión del radiomarcado de liposomas con cisplatino.

En la Figura 13 se presentan los resultados del radiomarcado de liposomas cargados con cisplatino. El primer grupo son liposomas cargados únicamente con cisplatino, el segundo son liposomas cargados con cisplatino mediante técnica de potencial transmembranal con ionomicina, el tercero son liposomas cargados con cloruro de calcio y cisplatino, el cuarto y quinto grupos son liposomas cargados con cloruro de calcio.

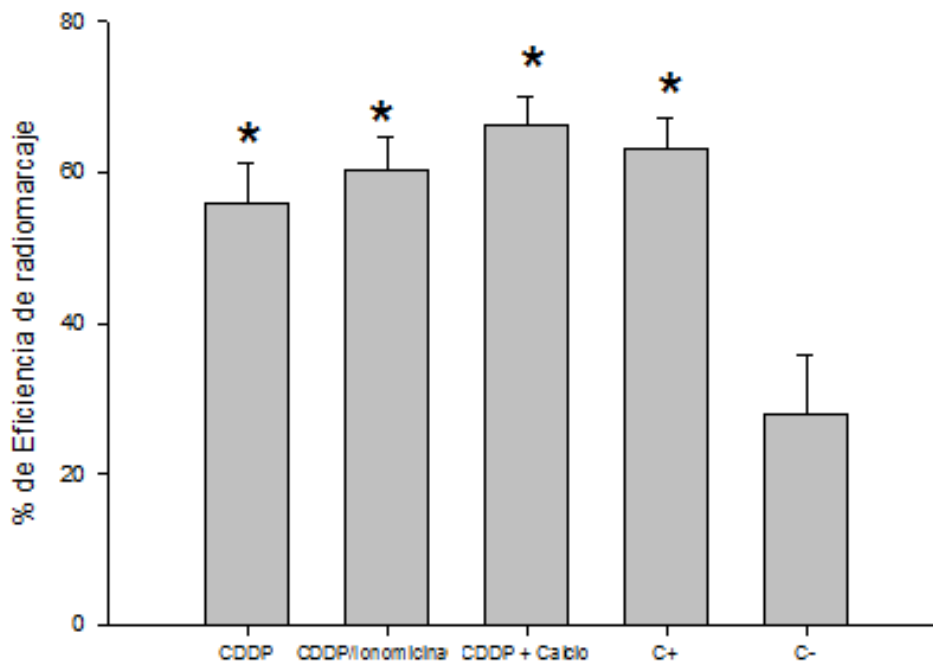


Figura 13. Radiomarcado de 3 diferentes formulaciones de cisplatino liposomal. Se adicionó un control positivo de liposomas cargados con CaCl_2 y un control negativo que no contiene ionomicina. La proporción de ionomicina es de $8 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$. Se adicionaron 0.5 mCi de $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$. Se presenta el promedio $n=6$ y su respectiva desviación estándar. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres formulaciones evaluadas y el control positivo, y se encontró diferencia significativa entre los grupos con ionomicina y el control negativo sin ionomicina, lo que indica que el ionóforo ayuda a la incorporación del $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ al interior del liposoma.

Se observa que el control negativo tiene una eficiencia de encapsulación del 27.85%, debido a que el radiofármaco es un catión lipofílico que puede intercalarse en la bicapa del liposoma.

La eficiencia del proceso de radiomarcado de liposomas cargados con cisplatino es de un 60%, que es un poco mejor que la eficiencia del 50% reportada en la literatura con este método⁽⁵²⁾.

7.5.1. Tamaño de partícula después del radiomarcaje.

Se realizó la medición de tamaño de partícula de los liposomas radiomarcados, después de que decayera la actividad del ^{99m}Tc (pasadas 10 vidas medias, 2.5 días).

Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 14. El primer grupo son liposomas cargados unicamente con cisplatino, el segundo son liposomas cargados con cisplatino mediante técnica de potencial transmembranal con ionomicina, el tercero son liposomas cargados con cloruro de calcio y cisplatino, el cuarto y quinto grupos son liposomas cargados con cloruro de calcio.

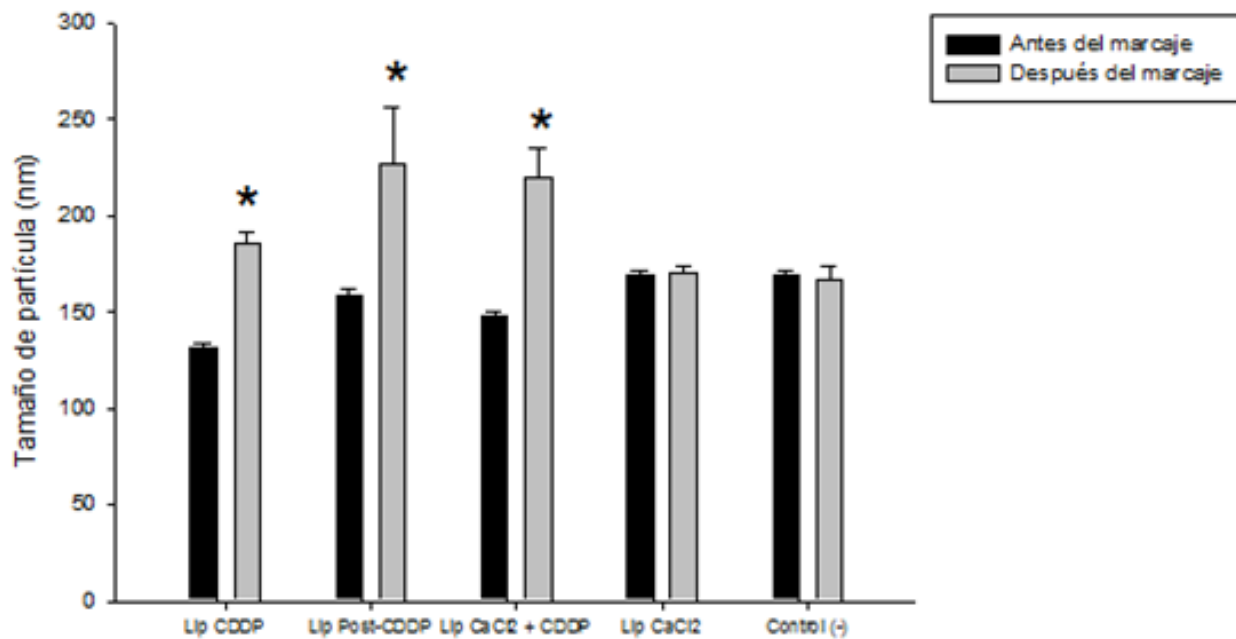


Figura 14. Se presentan las variaciones en cuanto al tamaño de partícula antes y después de realizar el radiomarcaje. Se presenta el promedio n=10 y su respectiva desviación estándar. (*) Indica diferencia significativa entre ambos grupos de estudio (p<0.05).

Se observa que hay un incremento significativo en el tamaño de partícula de los tres lotes que contienen cisplatino, mientras que en los controles (positivo y negativo) que solo contienen cloruro de calcio no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Este aumento de tamaño de partícula es debido a que la membrana liposomal posee una cierta flexibilidad, que le permite incorporar más material al interior del liposoma, permitiendo que haya tanto cisplatino como $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ en el núcleo acuoso.

En los otros casos no se encontraron diferencias en el tamaño de partícula de los liposomas únicamente con cloruro de calcio debido al intercambio iónico calcio- $^{99m}\text{Tc-MIBI}$.

7.5.2. Potencial Zeta después del radiomarcaje.

Los resultados obtenidos para este experimento se muestran en la Figura 15.

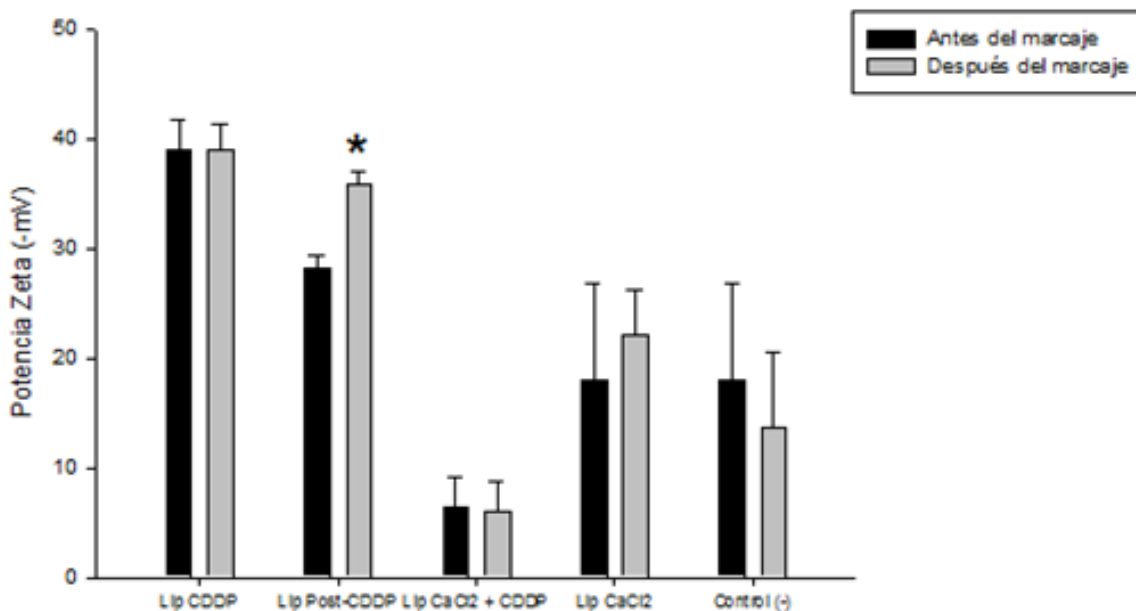


Figura 15. Se presentan los resultados en cuanto a la variación del potencial zeta antes y después de realizar el radiomarcado. Se presenta el promedio $n=20$ y su respectiva desviación estándar. (*) Indica diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

El lote que contiene únicamente Cisplatino (Lip CDDP) no mostró diferencias significativas en cuanto al potencial zeta, ya que no contiene iones que afecten la fuerza iónica del medio, y que pudieran alterar el valor del potencial zeta.

El siguiente lote (Lip Post-CDDP) mostró un aumento significativo en el valor negativo de potencial zeta, debido a que los iones calcio que quedan en el interior del liposoma se ven

desplazados hacia la parte externa del liposoma y al momento de ser removidos, la fuerza iónica disminuye aumentando el potencial zeta.

La co-encapsulación de cloruro de calcio y cisplatino (Lip CaCl₂+CDDP) no mostró diferencias significativas en cuanto a los valores de potencial zeta antes y después del radiomarcaje y cabe resaltar que el valor de potencial zeta de esta formulación liposomal al inicio es muy baja, por lo tanto tiene buena estabilidad.

Se observó un ligero aumento en el valor del potencial zeta con los liposomas cargados con cloruro de calcio (Lip CaCl₂), ya que hay movimiento de iones en la membrana debido a la adición de la ionomicina, que transporta iones al exterior del liposoma e introduce el Tc-99m-MIBI.

En el control negativo (Sin ionomicina) no se aprecia alguna diferencia en su valor de potencial zeta, y no era de esperarse que hubiera un movimiento de cationes al no estar presente la ionomicina, por lo tanto no hay modificaciones en la densidad de carga superficial del liposoma.

7.5.3. Influencia en la concentración de cisplatino después del radiomarcaje.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 16.

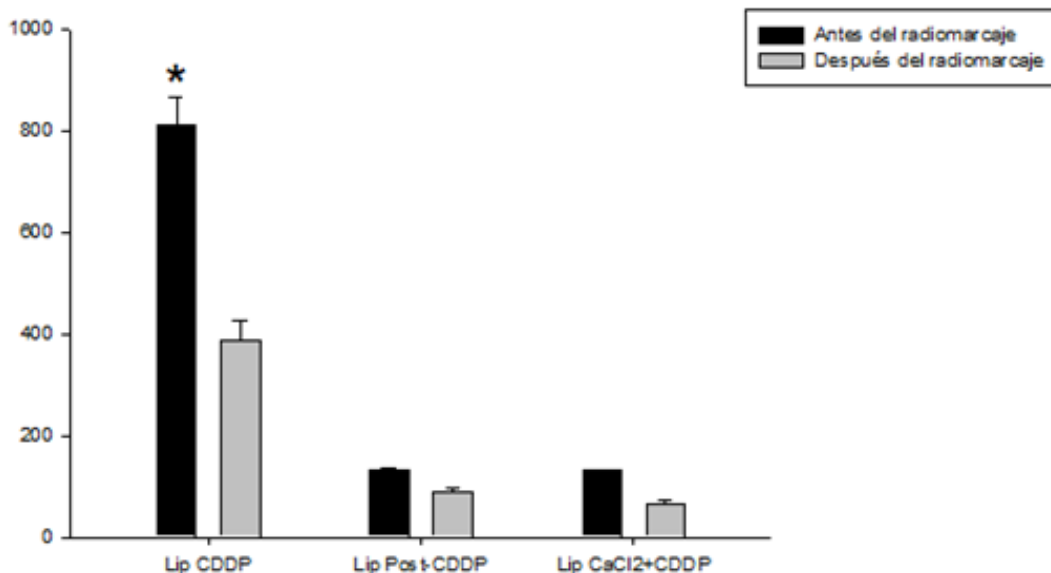


Figura 16. Se muestran los datos de la cuantificación de cisplatino antes y después del radiomarcaje. Se presenta el promedio n=5 y su respectiva desviación estándar. (*) Indica diferencia significativa entre ambos grupos (p<0.05).

Se observa una disminución estadísticamente significativa en la concentración de cisplatino en liposomas cargados únicamente con el fármaco aproximadamente a la mitad de la concentración inicial, debido al intercambio de Cisplatino-^{99m}Tc-MIBI durante el radiomarcado. Sin embargo los otros lotes que contienen calcio, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la disminución de la concentración de cisplatino, esto podría deberse a que el calcio previene que el cisplatino salga del liposoma, debido a que la ionomicina tiene mayor afinidad por los iones Ca²⁺.

7.6. Estabilidad de radiomarcado.

Se realizó un estudio de estabilidad *in vitro* del radiomarcaje de la formulación liposomal tanto en suero como en solución salina al 0.9%.

Los resultados de esta evaluación se presentan en la gráfica 17.

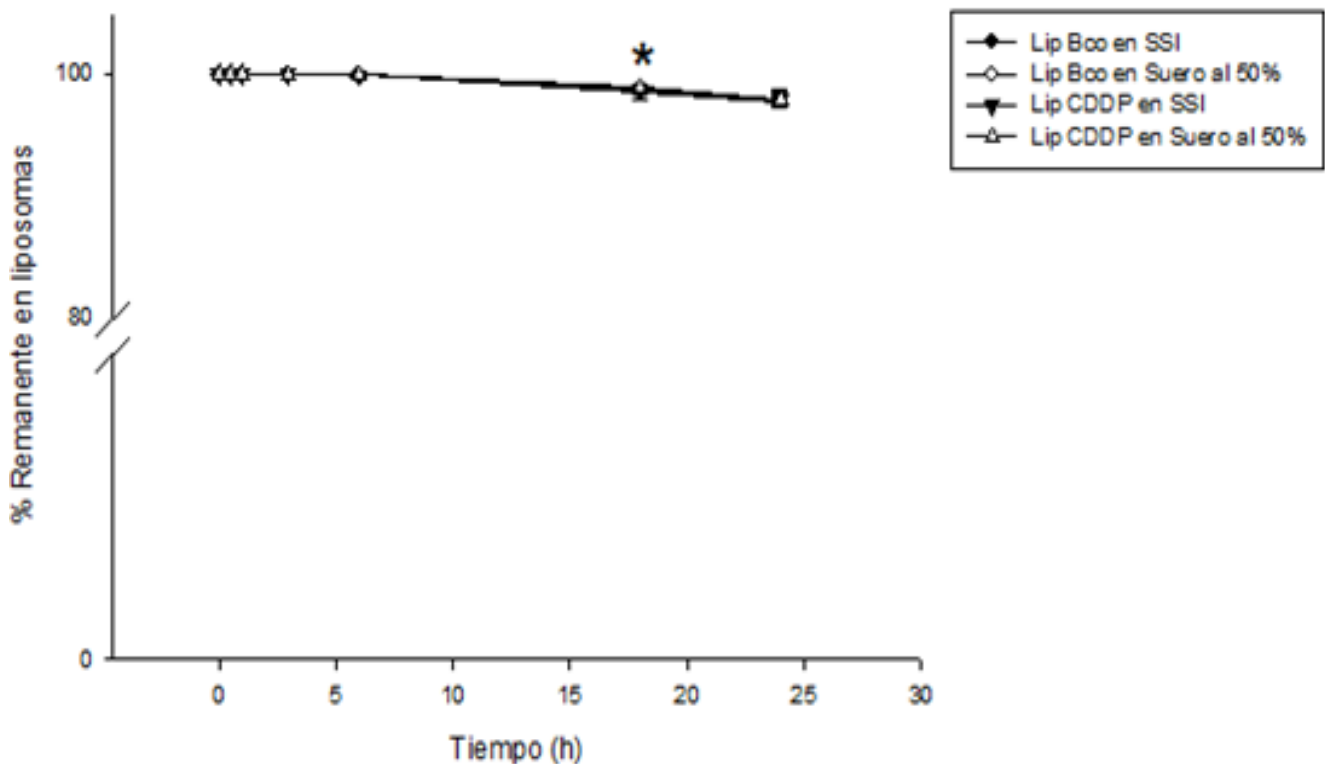


Figura 17. Se presenta la estabilidad *in vitro* hasta las 24 h tanto en suero y solución salina y fueron evaluados el radiomarcaje de liposomas blanco (CaCl₂) y de liposomas con CDDP. Se presenta el promedio n=3 y su respectiva desviación estándar.

No se observan diferencias significativas entre todos los grupos hasta las 6 h, ya que tienen el mismo comportamiento. De acuerdo con el análisis estadístico, hay diferencias significativas a partir de las 18 h que aunque sea significativo, el radiomarcaje resultó ser estable para los fines requeridos (97 %) tanto en suero humano y en solución salina isotónica y tanto en liposomas blanco como en liposomas con cisplatino, a las 24 h, tiempo suficiente para poder realizar la prueba de estabilidad *in vivo* mediante técnicas de imagen molecular.

7.7. Proporción Fármaco: Lípido.

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos para la encapsulación de cisplatino en función de la proporción fármaco:lípido. El siguientes experimento se realizó adicionando una proporción ionomicina: lípido de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$, debido a que se utilizó la proporción que dió una mejor eficiencia de radiomarcado.

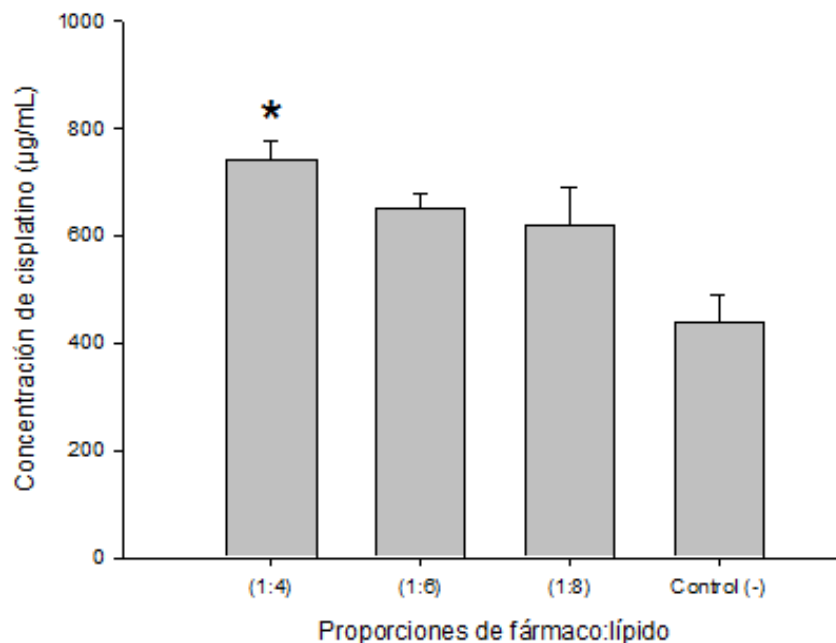


Figura 18. Se presenta la concentración de cisplatino en función de la proporción fármaco: lípido (1:4, 1:6 y 1:8), se adicionó un control negativo que no contiene ionomicina. Se reporta el promedio $n=3$ con su respectiva desviación estándar. (*) Indica diferencia significativa con respecto al control y los demás grupos de estudio ($p<0.05$).

Se observa que hay una diferencia significativa entre el control y las diferentes proporciones del fármaco, y la proporción óptima para esta técnica quedó en 1:4, que es la menor

proporción que se utilizó. No se observa diferencia significativa entre las proporciones 1:6 y 1:8. Por lo tanto, la ionomicina ayuda al cisplatino a incorporarse al interior del liposoma.

Aunque la encapsulación de cisplatino en el control sin ionomicina es mínima, en comparación con los demás grupos, es relativamente alta y por lo tanto se evaluara la influencia de la temperatura en la concentración de cisplatino en liposomas, ya que la temperatura de transición del lípido es muy cercana a la temperatura de solubilización máxima del cisplatino (65°C vs 70°C respectivamente)⁽⁵⁷⁾, en la que podía darse una encapsulación pasiva.

7.8. Evaluación de la temperatura en la encapsulación.

Se realizó un experimento en donde se incubó una muestra y un control a una temperatura más baja que la de transición del fosfolípido principal (40°C). Se utilizó la proporción de ionomicina: lípido) que dió una mejor eficiencia de radiomarcado (8 µg/µmol), y se utilizó la proporción fármaco:lípido que se tiene estandarizada en el laboratorio (1:6).

En la Figura 19 se muestran los resultados de la dependencia de la temperatura en la encapsulación de cisplatino.

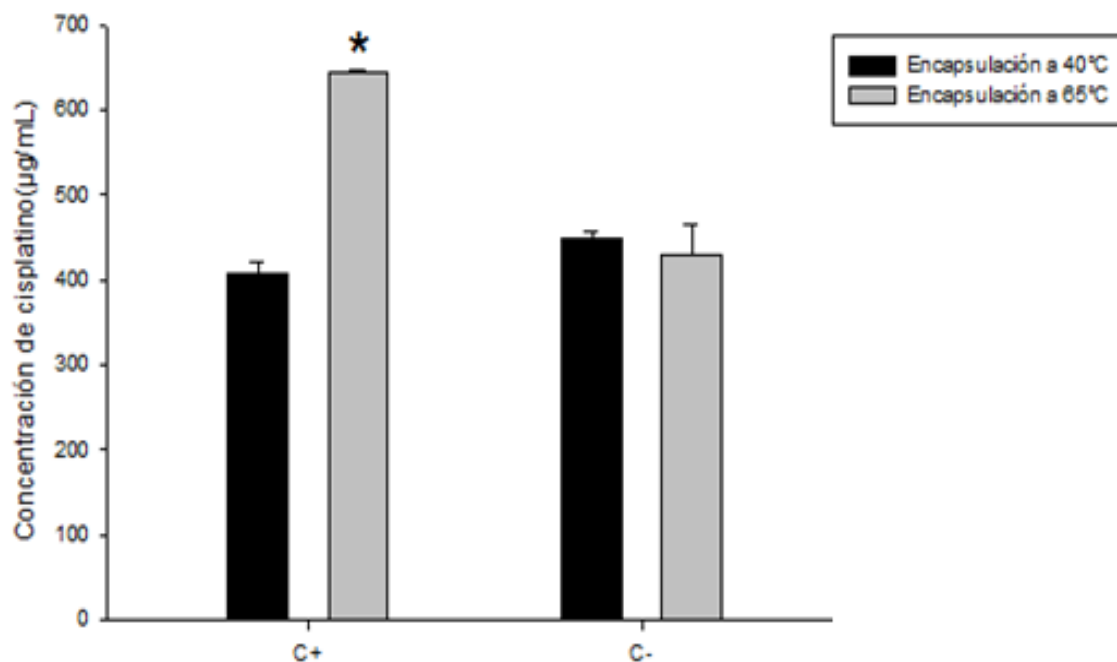


Figura 19. Encapsulación de cisplatino a 40°C y 65°C. Se adicionó un control negativo sin ionomicina para ambas temperaturas. Se presenta el promedio n=2 y su respectiva desviación estándar. (*) Indica diferencia significativa entre el control y los demás grupos de estudio (p<0.05).

Uno de los problemas para encapsular cisplatino es su baja solubilidad en agua a temperatura ambiente; la máxima solubilidad del cisplatino reportada en la literatura es de 12 mg/mL a 70°C⁽⁵⁷⁾.

Los resultados demuestran que para el control positivo hay una mayor encapsulación del fármaco a una temperatura de 65°C (643.38 µg/mL) que es estadísticamente diferente comparado con la encapsulación a 40°C (406.89 µg/mL) y con el control negativo a 65°C (429.15 µg/mL). Para la encapsulación a 40°C se observa que tanto para el control positivo como el negativo se tienen una concentración de cisplatino muy cercana (406.89 µg/mL ± 15.31 y 447.83 µg/mL ± 8.24 respectivamente), y la concentración de ambos controles negativos es casi la misma con las dos temperaturas (429.15 µg/mL ± 36.70 A 65°C y 447.83 µg/mL ± 8.24 a 40°C) y no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos control a ambas temperaturas y el control positivo a 40°C. Por lo tanto el método requiere que todo el cisplatino se encuentre en disuelto.

En conclusión, la temperatura juega un papel importante en la encapsulación del cisplatino, ya que ayuda a la solubilización del fármaco y que esté más disponible para ser encapsulado.

8. Conclusión.

La técnica diseñada en este trabajo para el radiomarcage de liposomas permitió obtener una eficiencia y estabilidad *in vitro* aceptables para realizar estudios de farmacocinética y biodistribución in vivo en modelos con animales mediante técnicas de imagen molecular.

La técnica también mostró ser factible para la encapsulación de cisplatino mediante el mismo sistema, en donde la ionomicina ayuda a la encapsulación del fármaco y del radiofármaco mediante un gradiente transmembranal.

Esta técnica puede ser aplicable en estudios posteriores para realizar el radiomarcage con ¹⁸⁸Re, un emisor de radiación beta con potencial terapéutico, y con ello poder establecer una quimio-radioterapia conjunta en un mismo sistema, y mejorar la eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer.

Referencias.

1. **Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H.** 2012. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today* **17**:160-166.
2. **Kumar N, Kumar R.** 2014. Chapter 2 - Nano-based Drug Delivery and Diagnostic Systems, p. 53-107, *Nanotechnology and Nanomaterials in the Treatment of Life-Threatening Diseases*. William Andrew Publishing, Oxford.
3. **Boulikas T, Vougiouka M.** 2003. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep* **10**:1663-1682.
4. **Seetharamu N, Kim E, Hochster H, Martin F, Muggia F.** 2010. Phase II study of liposomal cisplatin (SPI-77) in platinum-sensitive recurrences of ovarian cancer. *Anticancer Res* **30**:541-545.
5. **Fantini M, Gianni L, Santelmo C, Drudi F, Castellani C, Affatato A, Nicolini M, Ravaioli A.** 2011. Lipoplatin treatment in lung and breast cancer. *Chemother Res Pract* **2011**:125192.
6. **Casagrande N, De Paoli M, Celegato M, Borghese C, Mongiat M, Colombatti A, Aldinucci D.** 2013. Preclinical evaluation of a new liposomal formulation of cisplatin, lipoplatin, to treat cisplatin-resistant cervical cancer. *Gynecologic Oncology* **131**:744-752.
7. **Bao A, Goins B, Klipper R, Negrete G, Mahindaratne M, Phillips WT.** 2003. A novel liposome radiolabeling method using 99mTc-"SNS/S" complexes: in vitro and in vivo evaluation. *J Pharm Sci* **92**:1893-1904.
8. **Bao A, Goins B, Klipper R, Negrete G, Phillips WT.** 2003. 186Re-liposome labeling using 186Re-SNS/S complexes: in vitro stability, imaging, and biodistribution in rats. *J Nucl Med* **44**:1992-1999.
9. **Soundararajan A, Bao A, Phillips WT, Perez R, 3rd, Goins BA.** 2009. [(186)Re]Liposomal doxorubicin (Doxil): in vitro stability, pharmacokinetics, imaging and biodistribution in a head and neck squamous cell carcinoma xenograft model. *Nucl Med Biol* **36**:515-524.
10. **SG A, P K, DG F.** 2008. Liposomes and Drug Delivery, p. 443-533. *In Cox S (ed.), Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. John Wiley & Sons.
11. **Vladimir T.** 2005. Recent Advances With Liposomes As Pharmaceutical Carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**:145-160.
12. **Phillips WT, Goins BA, Bao A.** 2009. Radioactive liposomes. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **1**:69-83.
13. **Bangham AD, Standish MM, Watkins JC.** 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **13**:238-IN227.
14. **Bangham AD.** 1968. Membrane models with phospholipids. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **18**:29-95.
15. **Bangham AD.** 1993. Liposomes: the Babraham connection. *Chemistry and Physics of Lipids* **64**:275-285.
16. **Gregoriadis G.** 1973. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Letters* **36**:292-296.
17. **Gregoriadis G.** 1995. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in Biotechnology* **13**:527-537.
18. **Gregoriadis G, Ryman BE.** 1971. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J* **124**:58p.
19. **Sharma A, Sharma US.** 1997. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* **154**:123-140.
20. **Zisman N, Dos Santos N, Johnstone S, Tsang A, Bermudes D, Mayer L, Tardi P.** 2011. Optimizing Liposomal Cisplatin Efficacy through Membrane Composition Manipulations. *Chemother Res Pract* **2011**:213848.
21. **Ulrich AS.** 2002. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep* **22**:129-150.
22. **Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D.** 1999. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* **51**:691-743.

23. **Michel R, Gradzielski M.** 2012. Experimental aspects of colloidal interactions in mixed systems of liposome and inorganic nanoparticle and their applications. *Int J Mol Sci* **13**:11610-11642.
24. **GV B, SA J, DL P.** 1993. Preparation of liposomes, p. 1-24, *Liposome Drug Delivery Systems*. Technomic Publishing Company.
25. **Allen TM, Cullis PR.** 2013. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**:36-48.
26. **Grit M, Crommelin DJ.** 1993. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids* **64**:3-18.
27. **MU U, RS O.** 2005. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review *Journal of Biomedical Sciences* **4**:9-21.
28. **Lichtenberg D, Barenholz Y.** 1988. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. *Methods Biochem Anal* **33**:337-462.
29. **Szoka F, Jr., Papahadjopoulos D.** 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:4194-4198.
30. **Antimisiaris SG, Kallinteri, P. and Fatouros, D. G.** 2010. Liposomes and Drug Delivery, p. 1–91., *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia*.
31. **Mayer LD, Bally MB, Hope MJ, Cullis PR.** 1986. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chem Phys Lipids* **40**:333-345.
32. **Shmeeda H, Even-Chen S, Honen R, Cohen R, Weintraub C, Barenholz Y, Nejat D.** 2003. Enzymatic Assays for Quality Control and Pharmacokinetics of Liposome Formulations: Comparison with Nonenzymatic Conventional Methodologies, p. 272-292, *Methods in Enzymology*, vol. Volume 367. Academic Press.
33. **Franzen U, Østergaard J.** 2012. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance–liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **1267**:32-44.
34. **Kölchens S, Ramaswami V, Birgenheier J, Nett L, O'Brien DF.** 1993. Quasi-elastic light scattering determination of the size distribution of extruded vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids* **65**:1-10.
35. **Ross Hallett F.** 1994. Particle size analysis by dynamic light scattering. *Food Research International* **27**:195-198.
36. **Xu R.** 2008. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology* **6**:112-115.
37. **Stewart JC.** 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem* **104**:10-14.
38. **Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC.** 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* **20**:470-475.
39. **Laverman P, Boerman OC, Storm G.** 2003. Radiolabeling of liposomes for scintigraphic imaging. *Methods Enzymol* **373**:234-248.
40. **Nosco DL, Beaty-Nosco JA.** 1999. Chemistry of technetium radiopharmaceuticals 1: Chemistry behind the development of technetium-99m compounds to determine kidney function. *Coordination Chemistry Reviews* **184**:91-123.
41. **Petersen AL, Hansen AE, Gabizon A, Andresen TL.** 2012. Liposome imaging agents in personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev* **64**:1417-1435.
42. **Reed PW, Sidney Fleischer LP.** 1979. [56] Ionophores, p. 435-454, *Methods in Enzymology*, vol. Volume 55. Academic Press.
43. **Warren E, Clifford C, Richard T, Douglas P.** 1994. Ca²⁺ Transport Properties of Ionophores A23187, Ionomycin, and 4-BrA23187 in a Well Defined Model System. *Biophysical Journal* **66**:1678-1693.
44. **Wang E, Taylor RW, Pfeiffer DR.** 1998. Mechanism and specificity of lanthanide series cation transport by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin. *Biophys J* **75**:1244-1254.

45. **Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR.** 1995. Effects of pH conditions on Ca²⁺ transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems. *Biophys J* **69**:2350-2363.
46. **Hyono A, Hendriks T, Daemen FJ, Bonting SL.** 1975. Movement of calcium through artificial lipid membranes and the effects of ionophores, p. 34-46, *Biochim Biophys Acta*, vol. 389, Netherlands.
47. **Ramsay E, Alnajim J, Anantha M, Zastre J, Yan H, Webb M, Waterhouse D, Bally M.** 2008. A novel liposomal irinotecan formulation with significant anti-tumour activity: use of the divalent cation ionophore A23187 and copper-containing liposomes to improve drug retention. *Eur J Pharm Biopharm* **68**:607-617.
48. **Verreault M, Strutt D, Masin D, Anantha M, Waterhouse D, Yapp DT, Bally MB.** 2012. Irinophore C, a lipid-based nanoparticulate formulation of irinotecan, is more effective than free irinotecan when used to treat an orthotopic glioblastoma model. *J Control Release* **158**:34-43.
49. **Fenske DB, Wong KF, Maurer E, Maurer N, Leenhouts JM, Boman N, Amankwa L, Cullis PR.** 1998. Ionophore-mediated uptake of ciprofloxacin and vincristine into large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane ion gradients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1414**:188-204.
50. **Huczyński A.** 2012. Polyether ionophores—promising bioactive molecules for cancer therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**:7002-7010.
51. **Hanessian S, Cooke NG, DeHoff B, Sakito Y.** 1990. The total synthesis of (+)-ionomycin. *Journal of the American Chemical Society* **112**:5276-5290.
52. **Belhaj-Tayeb H, Briane D, Vergote J, Kothan S, Leger G, Bendada SE, Tofighi M, Tamgac F, Cao A, Moretti JL.** 2003. In vitro and in vivo study of 99mTc-MIBI encapsulated in PEG-liposomes: a promising radiotracer for tumour imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **30**:502-509.
53. **Chen LC, Chang CH, Yu CY, Chang YJ, Hsu WC, Ho CL, Yeh CH, Luo TY, Lee TW, Ting G.** 2007. Biodistribution, pharmacokinetics and imaging of (188)Re-BMEDA-labeled pegylated liposomes after intraperitoneal injection in a C26 colon carcinoma ascites mouse model. *Nucl Med Biol* **34**:415-423.
54. **Sugiyama I, Sadzuka Y.** 2013. Change in the character of liposomes as a drug carrier by modifying various polyethyleneglycol-lipids. *Biol Pharm Bull* **36**:900-906.
55. **Stensrud G, Redford K, Smistad G, Karlsen J.** 1999. Effects of gamma irradiation on solid and lyophilised phospholipids. *Radiation Physics and Chemistry* **56**:611-622.
56. **Chval Z, Sip M.** 2000. Pentacoordinated transition states of cisplatin hydrolysis—ab initio study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **532**:59-68.
57. **Woo J, Chiu GNC, Karlsson G, Wasan E, Ickenstein L, Edwards K, Bally MB.** 2008. Use of a passive equilibration methodology to encapsulate cisplatin into preformed thermosensitive liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **349**:38-46.