



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***“BIODISTRIBUCIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE CISPLATINO LIPOSOMAL
RADIOMARCADO CON Tc-99m EN UN XENOTRASPLANTE DE CÁNCER
CERVICO UTERINO MEDIANTE TECNICAS DE IMAGEN MOLECULAR
microSPECT/CT”***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
KEVIN LÓPEZ BARRIOS**



CDMX

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: **ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ**
VOCAL: Profesor: **ARTURO RODRÍGUEZ PEÑALOZA**
SECRETARIO: Profesor: **LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ**
1er. SUPLENTE: Profesora: **MA. GUADALUPE LEMUS BARAJAS**
2° SUPLENTE: Profesora: **MARÍA EUGENIA IVETTE GÓMEZ SÁNCHEZ**

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

Asesor del **DR. LUIS ALBERTO MEDINA** _____
tema: **VELÁZQUEZ**

Sustentante: **KEVIN LÓPEZ BARRIOS** _____

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) así como a la Facultad de Química y sus Profesores, por la formación académica y profesional proporcionada durante el estudio de la carrera Química Farmacéutico Biológica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico proporcionado mediante la beca de Ayudante de Investigador SNI Nivel 3 con número Exp. Inv. 6387; Exp. Ayte. 12635 otorgada, la cual me permitió concluir el trabajo de tesis.

Al Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México (IF-UNAM) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por las becas con claves IN-209916 e IN-225014, otorgadas para el desarrollo del trabajo de tesis.

Al Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Ciudad de México, perteneciente a la Secretaría de Salud, por las facilidades otorgadas para la realización del proyecto de investigación.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Liposomas	3
2.1.1. Componentes de liposomas	6
2.1.1.1. Fosfolípidos	6
2.1.1.2. Colesterol	7
2.1.1.3. Polietilenglicol	8
2.1.1.4. Alfa-tocoferol	8
2.2. Clasificación de liposomas	9
2.3. Elaboración de liposomas	10
2.4. Caracterización fisicoquímica	12
2.4.1. Tamaño de partícula	13
2.4.2. Carga superficial y potencial Z	13
2.4.3. Cuantificación de fosfolípidos	14
2.4.4. Cuantificación de colesterol	14
2.4.5. Cuantificación de calcio	15
2.4.6. Cuantificación de fármaco	16
2.5. Liposomas radiomarcados	16
2.5.1. Técnicas de radiomarcaje de liposomas	16
2.5.2. Ionóforo	18
2.5.2.1. Ionomicina	19
2.6. Tecnecio 99 metaestable SESTAMIBI (99Tc-MIBI)	22
2.6.1. Radiomarcado de liposomas con 99mTc-MIBI	23
2.6.2. Pruebas de radiomarcaje de liposomas	23
2.7. Xenotransplante de cáncer cervicouterino	23
2.8. Estudios de imagen molecular	24

3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos particulares	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.1. Reactivos	26
5.2. Preparación de liposomas cargados con CaCl₂ por rehidratación de capa lipídica	26
5.3. Caracterización fisicoquímica de los liposomas	27
5.3.1. Tamaño de partícula	27
5.3.2. Potencial Zeta	28
5.3.3. Cuantificación de fosfolípidos	28
5.3.4. Cuantificación de colesterol	30
5.3.5. Cuantificación de calcio	31
5.3.6. Encapsulación de cisplatino mediante potencial trasmembranal	31
5.3.7. Cuantificación de cisplatino	32
5.3.8. Perfil de liberación de suspensión liposomal cargada con cisplatino	34
5.3.9. Radiomarcaje de liposomas	35
5.3.10. Estabilidad de radiomarcado <i>in vitro</i>	35
5.3.11. Animales de experimentación	36
5.3.12. Estudio de farmacocinética sanguínea y biodistribución en ratas	36
5.3.13. Líneas celulares	36
5.3.14. Desarrollo de tumores de cáncer cervicouterino en ratones atómicos	37
5.3.15. Estudio de biodistribución tumoral en ratón atómico	37
5.3.16. Cuantificación de cisplatino en tumores de cáncer cervicouterino en ratones atómicos	38
5.3.17. Análisis estadístico	38

6. RESULTADOS	39
7. DISCUSIÓN	51
8. CONCLUSIONES	54
9. BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE ABREVIATURAS

^{18}F-FDG	2-Desoxi-2- ^{18}F fluoroglucosa
^{99}Mo	Molibdenu-99
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnecio-99 metaestable
$^{99\text{m}}\text{TC}$-MIBI	Tecnecio-99 metaestable Metoxi-isobutil isomitrilo
ABC	Área Bajo la Curva
ATCC	American Type Culture Collection
Ca^{2+}	Ion calcio
CaCl_2	Cloruro de calcio
CHCl_3	Cloroformo
CI	Depuración
CO_2	Dióxido de carbono
Cp^0	Concentración plasmática a tiempo cero
CT	Computed Tomography (tomografía computarizada de rayos X)
DDTC	Dietilditiocarbamato de sodio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio Eagle Modificado de Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HSPC	Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine (Fosfatidilcolina hidrogenada de soja)
KCI	Cloruro de potasio
MWCO	Molecular weight cut-off (Límite de peso molecular)
mPE-	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-
PEG2000	[metoxi(polietilenglicol)-2000] (sal de amonio)
NaOH	Hidróxido de sodio

NH₄FeSCN	Ferrotiocianato de amonio
NiCl₂	Cloruro de níquel
PC	Phosphatidylcholine (Fosfatidilcolina)
PEG-PE	Propilenglicol-Fosfatidiletanolamina
PET	Photon Emission Tomography (Tomografía por emisión de fotón)
SFB	Suero Fetal Bovino
SPECT	Single photon emission computerized tomography (Tomografía computarizada por emisión de fotón único)
t_{1/2}	Tiempo de vida media
t_{1/2} α	Tiempo de vida media de absorción
t_{1/2} β	Tiempo de vida media de eliminación
Vd	Volumen de distribución
Uv-Vis	Ultra violeta- Visible

1. Introducción

En la década de los 60 y principios de los 70, el científico Británico A.D. Bangham dirigió investigaciones que permitieron caracterizar las interacciones entre lípidos y agua⁽¹⁻⁷⁾. Bangham, junto con sus colegas, lograron demostrar que las estructuras de asociación acuosa formadas por la dispersión de lecitinas en agua pueden difundir iones del interior hacia el exterior similar a lo que ocurre en membranas biológicas. Debido a lo anterior, se asoció este comportamiento a la formación de vesículas con un interior acuoso. A partir de ese momento, las estructuras denominadas liposomas se emplearon como modelos de membrana celular y proliferaron los estudios de biofísica, estructura y funciones de membranas.

El investigador Británico G. Gregoriadis, formuló, en la década de los 70, el concepto del liposoma como transportador de sustancias con actividad farmacológica, es decir, como Sistemas de Liberación Prolongada⁽⁸⁾ debido a la permeabilidad selectiva de estas vesículas. En los años siguientes, los liposomas fueron estudiados por numerosos grupos de investigación como adyuvante* en vacunas^(9, 10), vehículos para transporte y direccionamiento de fármacos⁽¹¹⁾ e incluso para radiofármacos en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades^(12, 13). Así mismo, los liposomas radiomarcados pueden utilizarse para el seguimiento *in vivo* de estos transportadores cargados con fármacos, lo que permite obtener información sobre su biodistribución y eliminación.

Actualmente, existe una gran variedad de técnicas de radiomarcaje de liposomas. En el laboratorio de Física Medica del Instituto Nacional de Cáncer, se desarrolló una técnica de radiomarcado donde se utilizó el ionóforo Ionomicina para favorecer la encapsulación de ^{99m}Tc-MIBI dentro de los liposomas a través de un

* Los adyuvantes o coadyuvantes, son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos.

gradiente de concentración provocado por el ion Ca^{2+} previamente encapsulado en los liposomas⁽¹⁴⁾. Con la misma técnica, se encapsuló el fármaco anticancerígeno cisplatino. Se reporta que se encapsuló 0.725 ± 0.036 mg/mL de cisplatino y se obtuvo 75% de eficiencia de radiomarcado. Esta técnica que permite realizar un radiomarcado así como la encapsulación de fármaco, es prometedora para un uso clínico por lo cual este trabajo está enfocado en el estudio de biodistribución en un modelo tumoral.

2. Marco teórico

2.1. Liposomas

Los liposomas se describen como bicapas de lípidos formando una estructura esférica coloidal que posee un espacio acuoso en su núcleo, similar a las células. En otras palabras, los liposomas son análogos sintéticos de membranas naturales suspendidos en medio acuoso. El material base de los liposomas son los fosfolípidos contruidos por una cabeza polar y una doble cadena hidrófoba, con una configuración espacial cilíndrica que le permite arreglos en bicapas⁽¹⁵⁾.

La formación de los liposomas se debe al auto-ensamblaje de moléculas de fosfolípidos en un medio acuoso. Estas moléculas anfifílicas* forman una esfera de bicapa cerrada en un intento de disminuir el área de contacto de los grupos hidrófobos con la fase acuosa, mientras que todavía mantiene contacto con ella a través del grupo hidrófilo de la molécula (Figura 1). La esfera cerrada resultante puede encapsular principios activos hidrosolubles en el interior acuoso o bien, embeber* fármacos liposolubles en la membrana⁽¹⁶⁾.

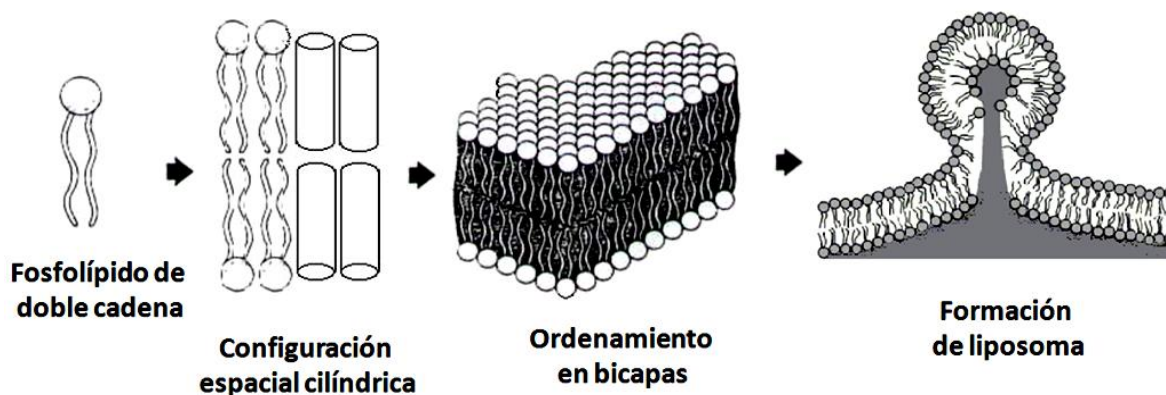


Figura 1. EL arreglo espacial cilíndrico de los fosfolípidos permite su ordenamiento en bicapas para la formación de liposomas⁽¹⁷⁾.

* Moléculas que poseen un extremo hidrófilo, es decir, que es soluble en agua y otro hidrófobo, es decir, que rechaza el agua.

* Un objeto o cuerpo contiene dentro de su misma estructura un material de diferente naturaleza.

Las virtudes de los liposomas son resumidas por el científico Gert Storm y sus colegas⁽¹⁸⁾: pueden ser direccionados hacia un sitio determinado en el organismo; pueden actuar como reservorios de liberación lenta; son capaces de proteger al principio activo de la degradación del organismo; pueden disminuir los efectos colaterales ocasionados por la distribución inespecífica del fármaco libre; en algunos casos pueden actuar mejorando la disolución de una sustancia insoluble facilitando su administración, modifican el tiempo de vida media en circulación de la molécula encapsulada así como su biodistribución.

La mayoría de las formulaciones liposomales son administradas vía intravenosa y una vez que se encuentran en el torrente circulatorio, se acumulan en las zonas periféricas a la masa tumoral por extravasación de éstas a través de lesiones porosas presentes en los vasos sanguíneos (endotelio fenestrado) que alimentan al tumor (Figura 2)^(19, 20), las cuales van desde 100 hasta 700 nm de diámetro vs los 6 nm en promedio que presenta el endotelio de los vasos de tejidos sanos. Una vez allí, comienza la interacción liposoma-célula blanco.

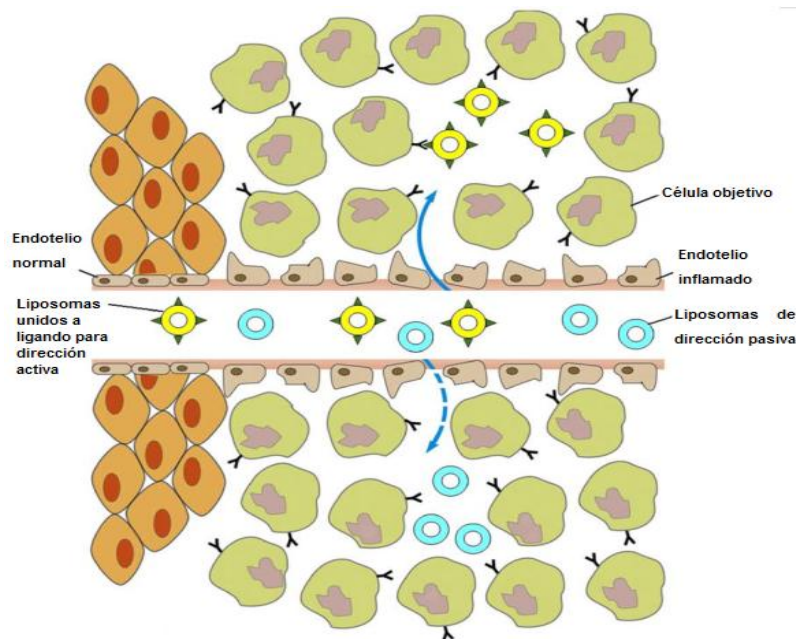


Figura 2. Esquema que muestra la acumulación de liposomas cargado con fármaco en los tumores.

Los liposomas de liberación lenta son capaces de llevar a algunos medicamentos a través de la circulación hasta llegar al tejido blanco⁽²⁰⁾.

Como se muestra en la Figura 3, los liposomas cargados con fármaco pueden ser absorbidos en la superficie celular de manera específica a través de interacciones receptor-ligando (a) o no específica (b). Así mismo, pueden fusionarse con la membrana celular (c) y liberar su contenido en el citoplasma de la célula, o puede ser desestabilizado por ciertos componentes de la membrana celular cuando es adsorbido sobre la superficie (d) de manera que el fármaco liberado puede entrar en la célula a través de macropinocitosis. De igual manera, los liposomas pueden someterse a intercambio mediada por transferencia directa de proteínas o de componentes lipídicos con la membrana celular (e) o ser sometida a una endocitosis específica o no específica (f). En el caso de la endocitosis, un liposoma puede ser entregado por el endosoma en el lisosoma (g) o, en ruta hacia el lisosoma, el liposoma puede provocar la desestabilización endosoma (h), lo que resulta en la liberación del fármaco en el citoplasma de la célula. ^(11, 21)

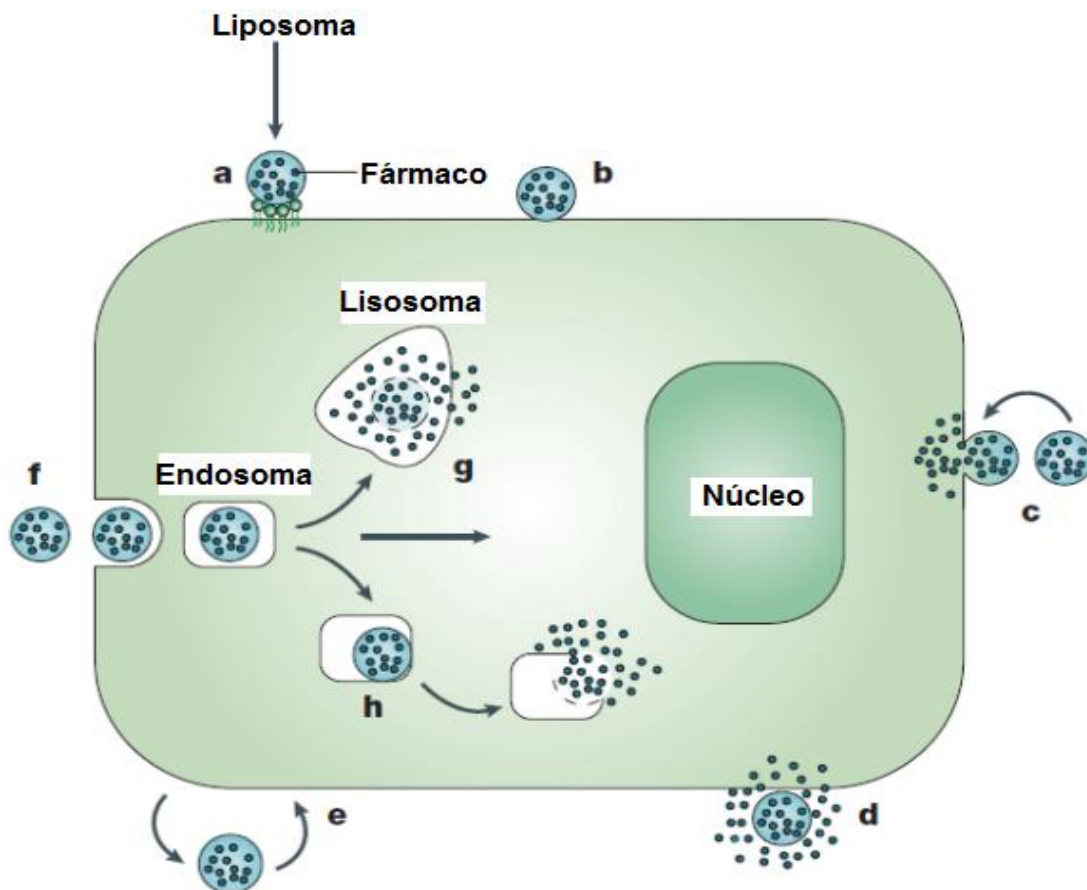


Figura 3. Interacciones liposoma-célula.⁽¹¹⁾

2.1.1. Componentes de liposomas

El material base que conforma a los liposomas son los fosfolípidos, sin embargo se puede incluir colesterol, tensioactivos no tóxicos, esfingolípidos, glicolípidos e incluso proteínas de membrana, lo que proporcionan diferentes características a los sistemas liposomales como menor o mayor permeabilidad en la membrana⁽²²⁾. Sin embargo, debido a que el uso de los liposomas está enfocado a su uso clínico en pacientes, se debe realizar una adecuada elección de los componentes de la formulación.

2.1.1.1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son los componentes principales de las membranas celulares de los seres vivos. Estructuralmente están compuestos por una molécula de glicerol que esta esterificada en los carbonos C1 y C2 con dos cadenas de ácidos grasos y un grupo fosfato en la posición C3, que puede o no estar unido a un grupo saliente, también denominado grupo polar. El grupo saliente más común en la naturaleza es la colina y el fosfolípido obtenido se denomina fosfatidilcolina (PC), uno de los más abundante en las membranas biológicas. En la Figura 2 puede verse la estructura química de la fosfatidilcolina (PC) con su cabeza polar y sus colas hidrocarbonadas. Las sustancias que poseen dominios hidrofílicos e hidrofóbicos en la misma molécula se conocen como anfifilos⁽²³⁾.

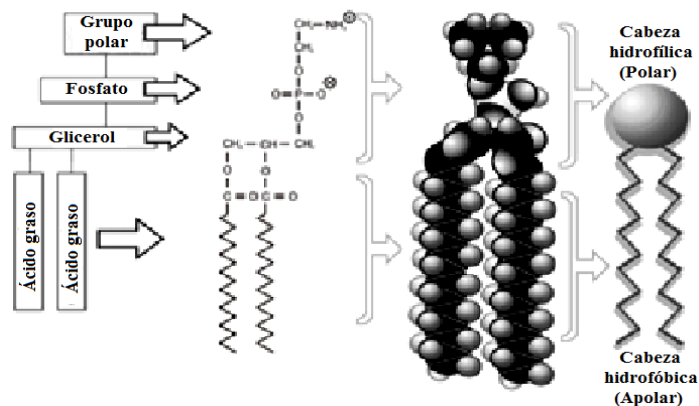


Figura 4. Estructura química de fosfatidilcolina PC⁽²⁴⁾.

2.1.1.2. Colesterol

El colesterol se encuentra en las membranas celulares y es utilizado en la preparación de liposomas. La molécula de colesterol se encuentra entre las moléculas de fosfolípidos con su grupo hidroxilo orientada hacia la fase acuosa, mientras que el anillo tricíclico se intercala entre los carbonos de las cadenas hidrofobias del fosfolípido. Se ha utilizado en la preparación de liposomas para mejorar las características de la bicapa lipídica debido a que mejora su fluidez, reduce la permeabilidad de las moléculas solubles en agua a través de la misma, previene la liberación del fármaco encapsulado y mejora la estabilidad de la membrana ante los fluidos biológicos como la sangre. Los liposomas sin colesterol tienden a reaccionar con las proteínas en torrente sanguíneo como albúmina, m-transferrina, y macroglobulina. Estos componentes tienden a desestabilizar los liposomas y reducir su utilidad como sistemas de administración de fármacos. Existen reportes donde se indica que el colesterol disminuye la interacción entre proteínas y liposomas. ^(23, 25, 26).

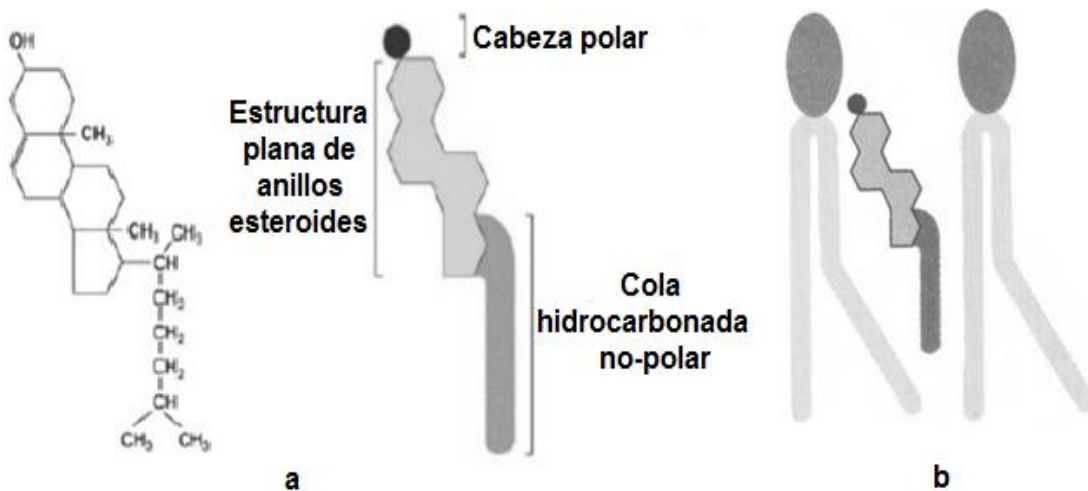


Figura 5. a) Molécula de colesterol con sus regiones identificadas. b) Colesterol entre moléculas de fosfolípido⁽²⁷⁾.

2.1.1.3. Polietilenglicol

Una de los limitantes para el uso de los liposomas como transportadores de fármacos es el sistema inmune, debido a que las células mononucleares pueden reconocerlos como no propios y pueden eliminarlos del organismo ⁽²⁸⁾. Con el fin de disminuir las interacciones del liposoma con los macrófagos, se han enfocado investigaciones para recubrir los liposomas con polímeros neutros y largos como es el propilenglicol (PEG-PE). El PEG-PE se une a los grupos fosfato de los fosfolípidos, de esta manera forma parte de la bicapa del liposoma^(11, 29). Este polímero crea una barrera estereoquímica que disminuye la fagocitosis mononuclear en comparación con liposomas que se presentaran “desnudos” ante el organismo^(30, 31). El recubrimiento permite que las partículas liposomales permanezcan por periodos más prolongados de tiempo en el organismo aumentando su biodisponibilidad, lo que es fundamental cuando se trata de la administración de formas farmacéuticas que requieren una liberación prolongada, tal es el caso de los fármacos dirigidos al tratamiento del cáncer. La estabilización optima de la formulación se logra con 5-10% del PEG-PE, con una masa molecular entre 1000-2000 Da⁽³²⁾.

2.1.1.4. Alfa-tocoferol

Los fosfolípidos de los liposomas pueden autooxidarse desestabilizando su estructura. A este proceso se le conoce como peroxidación lipídica y puede verse favorecida por la presencia de metales, luz y pH elevado, a la vez que se puede inhibir por agentes quelantes (EDTA) y antioxidantes como el alfa –tocoferol^(33, 34). La integración de estos agentes en la formulación liposomal favorece la conservación.

El alfa-tocoferol o vitamina E, es el antioxidante liposoluble más importante de las células. Posee la propiedad de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y otras estructuras de la peroxidación lipídica. Es poco soluble en

agua, alcanzando mayores grados de solubilidad en aceites. Se localiza en la parte hidrofóbica de las membrana y protege los fosfolípidos de las mismas del ataque de los radicales libres. Este antioxidante, secuestra los radicales libres reduciéndolos a metabolitos menos activos^(35, 36).

2.2. Clasificación de liposomas

Los liposomas pueden ser clasificados con base al tamaño, estructura, método de preparación, composición y liposomas especiales. A continuación, se presenta un resumen de la clasificación de los liposomas:^(22, 37)

Tabla 1. Tipos de liposomas en base a la estructura, métodos de preparación y composición.

Tipos de liposomas	Especificaciones
(A) En base a parámetros estructurales	
Vesículas multilaminares grandes	Más de 0.5 micrómetros
Vesículas oligolaminares	Entre 0.1-1 micrómetros
Vesículas unilaminares	Todos los rangos de tamaño
Vesículas unilaminares pequeñas, Vesículas unilaminares de tamaño medio	Entre 20-100 nanómetros
Vesículas unilaminares grandes	Mayores a 100 nanómetros
Vesículas unilaminares gigantes, Vesículas multivesiculares	Mayores a 1.0 micrómetros
(B) En base a métodos de preparación	
Vesículas multilaminares grandes	Hidratación de capa fina (agitación manual), Rehidratación
Vesículas unilaminares	Hidratación de capa fina (sin agitación)

Vesículas unilaminares pequeñas	Micro fluidificación, Inyección de etanol, Congelación/descongelación
Vesículas unilaminares grandes	Evaporación de fase inversa, Diálisis de detergente
(C) En base a la composición	
Liposomas convencionales	Compuesto de fosfolípidos neutros o con carga negativa y colesterol.
Liposomas sensibles a pH	Compuesto de fosfolípidos tales como Fosfatidil etanolamina, Dioleoil-Fosfatidil etanolamina.
Liposomas catiónicos	Compuesto de lípidos catiónicos.
Liposomas de circulación prolongada o stealth	Compuesto de lípidos neutros de alta temperatura de transición, colesterol y 5-10% de PEG-DSPE.
Inmunoliposomas	Anticuerpos o secuencias para reconocimiento asociadas con liposomas convencionales.
Magnetoliposomas	Compuesto por Fosfatidil colina, colesterol, aldehído de cadena lineal y partículas coloidales de óxido de hierro magnético.
Liposomas sensibles a temperatura	Compuesto por Dipalmitoil Fosfatidil colina y muestra liberación máxima a 41°C.

2.3. Elaboración de liposomas

Las características de los liposomas, como el tamaño de partícula, la cantidad de fármaco encapsulado o la laminaridad, están directamente relacionadas con el método de preparación. Con el fin de controlar las dimensiones y la estructura de los liposomas, aumentar la eficiencia de atrapamiento del fármaco deseado y prevenir una liberación no deseada, se han ido desarrollando diferentes métodos de preparación. La principal diferencia en estos métodos es su enfoque para superar la baja solubilidad de los lípidos en agua; por consiguiente, estos se pueden clasificar como agitación mecánica, evaporación del disolvente, inyección de disolvente, diálisis de detergente y rehidratación de bicapa lipídica^(38, 39).

Para el presente trabajo se utilizó el método de rehidratación de bicapa lipídica. En este método, una mezcla de fosfolípidos y colesterol se disuelven en una fase orgánica. Posteriormente, el disolvente orgánico se elimina por medio de evaporación utilizando un evaporador rotatorio con presión reducida. Por último, la película lipídica depositada sobre la pared del matraz se hidrata adicionando una solución acuosa del fármaco a encapsular a la concentración necesaria usando agitación y a la temperatura de transición de los lípidos. Los liposomas obtenidos son del tipo multilaminares grandes con poblaciones de tamaño de partícula heterogéneas^(39, 40), por lo que es necesario utilizar una técnica para homogenizar la suspensión coloidal, tanto en forma como en dimensiones. Con esta finalidad se utilizó un equipo de extrusión. El método de extrusión se basa en pasar repetidamente la suspensión liposomal a través de membranas de policarbonato con poros de dimensiones nanométricas, usando presión positiva de alta intensidad y manteniendo los liposomas a la temperatura de transición del fosfolípido que lo componen. El diámetro medio de los liposomas se vuelven progresivamente más pequeños hasta alcanzar un mínimo y, a medida que el tamaño promedio se reduce, los liposomas tienden a convertirse en unilaminares^(23, 39, 41).

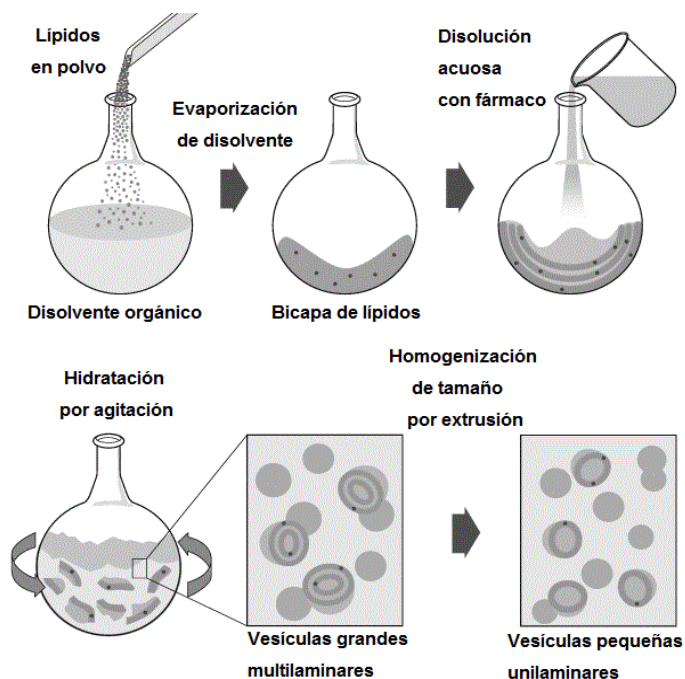


Figura 6. Proceso de elaboración de liposomas por la técnica rehidratación de bicapa lipídica⁽⁴²⁾.

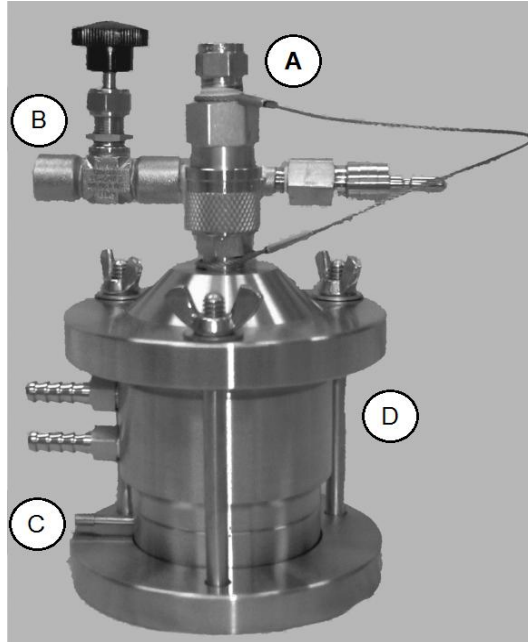


Figura 7. Extrusora Lipex™ para la preparación de liposomas con tamaño uniforme. La suspensión de vesículas multilaminares se introduce en la parte superior de la extrusora (A), esta se presuriza con nitrógeno (B), obligando a las vesículas multilaminares a travesar de un filtro de policarbonato de tamaño de poro definido. Las vesículas unilaminares resultantes se recogen a través de la abertura de salida en la parte inferior del dispositivo (C). La unidad permite la operación termostática en virtud del barril térmico, que puede ser acoplado a un baño de agua recirculante (D) ⁽⁴³⁾.

2.4. Caracterización fisicoquímica

Las características químicas y físicas de los liposomas determinan su comportamiento *in vivo* e *in vitro*. Por lo tanto, la disponibilidad de métodos analíticos para establecer estas características es esencial. Durante mucho tiempo, grupos de investigación centraron sus esfuerzos en el desarrollo de métodos para la caracterizar los liposomas, cumpliendo uno de los requisitos para la posterior aprobación de la entidad regulatoria Federal Drug Administration (FDA). El control de calidad de las dispersiones liposomales se complica debido a los diversos componentes que conforman las vesículas y a que todos los análisis químicos requieren disolución, solubilización o la extracción de los componentes liposomales para permitir el análisis y la cuantificación de cada uno de ellos ^(44, 45).

2.4.1. Tamaño de partícula

EL tamaño de los liposomas tiene que ser más pequeño que las fenestraciones de los vasos sanguíneos para extravasarse y alcanzar tumores sólidos. El tamaño de los liposomas es un factor que determina el aclaramiento de los mismos debidos al sistema inmune y al sistema retículo endotelial. En general, las vesículas que son más grandes que 100 nm requieren estrategias adicionales para prevenir la opsonización y prolongar su tiempo de vida media en circulación. Las técnicas de fracción de flujo de campo, microscopía, cromatografía de exclusión por tamaño, turbidez y dispersión dinámica de la luz se utilizan comúnmente para la caracterización físico-química de tamaño de partícula de las dispersiones de liposomas⁽³⁹⁾.

La dispersión dinámica de luz, una de las más utilizadas, se basa en que una fuente de luz monocromática, por lo general un láser, se dispara hacia una muestra. Todas las moléculas en la dispersión son golpeadas con la luz y todas las moléculas difractan esta luz en todas las direcciones. La luz difractada es recogida por un fotodetector posicionado a una distancia y ángulo específico. Este proceso se repite a intervalos de tiempo cortos y el conjunto resultante de patrones se analizan por un autocorrelacionador que compara la intensidad de la luz en cada punto por tiempo. Los resultados obtenidos de esta técnica son 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⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

2.4.2. Carga superficial y potencial Zeta (ζ)

La carga superficial de los liposomas es un parámetro importante que afecta a las interacciones electrostáticas entre liposomas y moléculas circundantes, partículas y superficies. Este parámetro nos permite predecir la estabilidad coloidal de la

dispersión liposomal y las interacciones entre liposomas y biomoléculas o células. Es dependiente del tipo de fosfolípido y la composición del medio acuoso, incluyendo pH y fuerza iónica. A menudo se utiliza la determinación del potencial zeta como medida de la carga superficial. El potencial zeta se define como la diferencia de potencial eléctrico que existe entre la capa de Stern y la capa difusa del coloide. Una de las técnicas utilizadas para medir el potencial ζ es a través de la movilidad electroforética por la técnicas de electroforesis Doppler láser⁽⁴⁶⁾. Esta técnica se basa en el uso de un electrodo conductor y la luz dispersada por la muestra liposomal. 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, es refractada dos veces; esta señal es detectada y medida por el sistema y posteriormente los resultados son interpretados por el software del equipo traduciéndolas en el potencial ζ de la muestra^(14, 49, 50).

2.4.3. Cuantificación de fosfolípidos

La concentración de fosfolípidos en una suspensión liposomal es un parámetro que nos permite estimar la eficiencia de formación de liposomas, así como prevenir intoxicación al momento de administrar una dosis. Una de los ensayos para realizar el análisis es por la reacción de Stewart que se basa en la formación de un complejo colorido, detectable a 488 nm, entre la molécula de fosfolípidos y en ferrotiocianato de amonio en solvente orgánico⁽⁵¹⁾.

2.4.4. Cuantificación de colesterol

La concentración de colesterol en liposomas puede indicar el nivel de rigidez en membrana y controlar la liberación del soluto encapsulado. Su determinación se puede realizar a través de una reacción enzimática. Esta reacción se basa en la hidrólisis del colesterol esterificado en colesterol libre a través de la enzima colesterol esterase. El colesterol libre es oxidado mediante la enzima colesterol

oxidasa dando como productos peróxido y colestona. El peróxido reacciona con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de la enzima peroxidasa, formando quinoneimina, compuesto detectable a 500 nm con un espectrofotómetro⁽⁵²⁾.

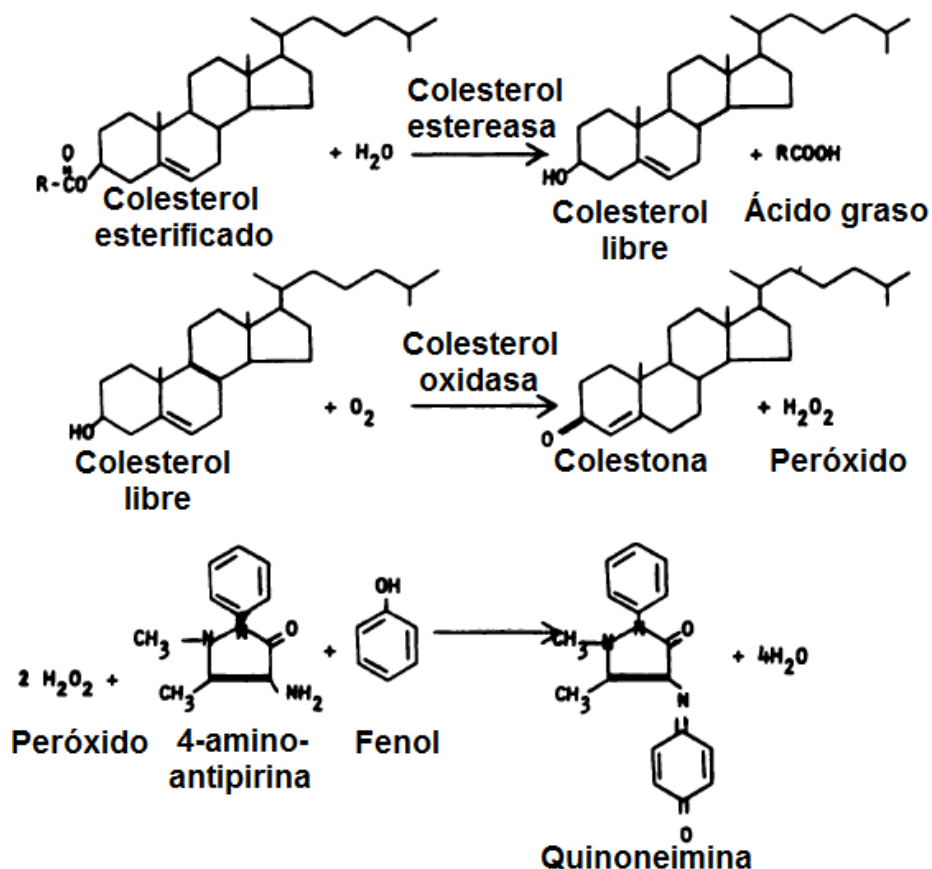


Figura 8. Esquema de la reacción para la medición enzimática de colesterol⁽⁵²⁾.

2.4.5. Cuantificación de calcio (Ca²⁺)

La medición de la concentración de Ca²⁺, siendo este el soluto encapsulado para promover el mecanismo de acción de la ionomicina, permite estimar la eficiencia de su encapsulación en la formulación liposomal. La determinación de Ca²⁺ se basa en la formación de un complejo colorido, detectable a 570 nm, entre el Ca²⁺ extraído de la muestra y la o-cresoltaleína, en medio alcalino. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de Ca²⁺ presente en la muestra⁽⁵³⁾.

2.4.6. Cuantificación de fármaco

La determinación de fármaco encapsulado es particular para cada formulación liposomal. El método utilizado debe estar estandarizado y validado de acuerdo a las características de la molécula de interés. Agentes anticancerígenos como cisplatino, mifepristona, paclitaxel, doxorubicina, 5-fluorouracilo, etc. su cuantificación puede realizarse por HPLC. Para el caso particular del cisplatino, primero se realiza una derivatización con dietilditiocarbamato de sodio (DDTC) para generar un complejo hidrófobo con una alta absorbancia a 254 nm^(54, 55).

2.5. Liposomas radiomarcados

Dadas las capacidades de los liposomas para encapsular moléculas, han sido usados como transporte para radiofármacos. Referente al aspecto terapéutico, se han realizado estudios con liposomas radiomarcados para tratar tumores sólidos debido a su capacidad de transportar radiofármacos emisores de partículas α o β que pueden dañar estructuras celulares provocando su muerte. Así mismo, se han utilizado para realizar imágenes de estudio molecular con la finalidad de diagnosticar inflamaciones debidas a infecciones o a Artritis, observar médula ósea o la región intracavitaria así como determinar la concentración farmacéutica en órganos de manera no invasiva⁽¹²⁾ entre otros objetivos.

2.5.1. Técnicas de radiomarcaje de liposomas

El radiomarcaje es el proceso por el cual un radionúclido (átomo radiactivo) es unido a una molécula o partícula de interés. Idealmente, los liposomas deben ser conjugados después de su preparación y justo antes de los ensayos. Por estas razones, los métodos denominados “after-loading^{*}” o “remote-labeling^{*}” son

^{*} Método de radiomarcaje donde se utiliza un quelante hidrofóbico para acarrear al radionúclido iónico a través de una membrana lipídica.

adecuados, además de proveer ventajas cuando se trabaja con radionúclidos de vida media corta, como el ^{99m}Tc ($t_{1/2}=6\text{ h}$)^(13, 56).

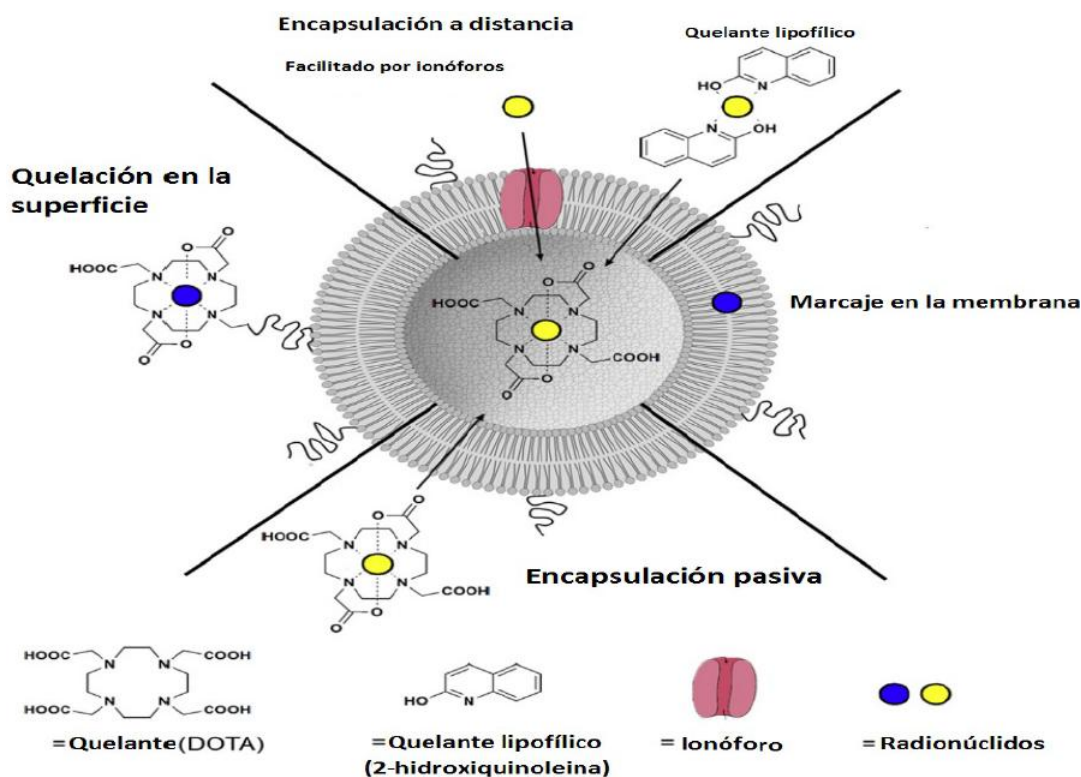


Figura 9. Diagrama esquemático del método "remote-labeling"^(14, 56).

El marcaje de la membrana, la encapsulación pasiva y el quelado en la superficie del liposoma son métodos para la preparación de liposomas radiactivos. Los radionúclidos se pueden asociar con la membrana lipídica por la interacción hidrófoba, a través de la conjugación en la membrana o el quelado en la superficie usando conjugados de quelantes lipídicos en liposomas preformados (radionúclidos en azul). Alternativamente, los radionúclidos se pueden encapsular dentro de liposomas durante el proceso de rehidratación de la bicapa lipídica o pueden ser transportados a través de la membrana por ionóforos o quelantes lipofílicos (radionúclidos en amarillo)^(13, 56). Para este proyecto se optó por utilizar el método de radiomarcado usando un ionóforo.

* Técnica utilizada en radiomarcado donde se utilizan gradientes de concentraciones para efectuar el encapsulado del radionúclido en el liposoma.

2.5.2. Ionóforo

Los ionóforos son agentes lipofílicos quelantes ⁽⁵⁷⁾, capaces de formar uniones reversibles y transportar iones específicos a través de membranas hidrófobas tales como las membranas poliméricas líquidas de las células o bien de vesículas sintéticas (liposomas).⁽⁵⁸⁾ Los ionóforos son importantes debido a que el interior de la bicapa lipídica de la membrana es hidrófoba, por lo que los iones no pueden pasar a través de ella debido a su carga⁽⁵⁹⁾.

Las dos clasificaciones generales de ionóforos son⁽⁶⁰⁾:

- Ionóforo transportador. Se une a un ion particular y protege su carga del ambiente circundante. Esto facilita el paso a través del interior hidrofóbico de la membrana lipídica. Ejemplos de ionóforos transportadores son A23187, ionomicina y 4-BrA23187⁽⁶¹⁾, que actúan como molécula de intercambio, es decir, por el pasaje de un catión, debe pasar al otro lado un número de protones (H^+) igual a la carga del catión, lo que produce un transporte electroneutro. Los ionóforos transportadores pueden ser proteínas u otras moléculas.

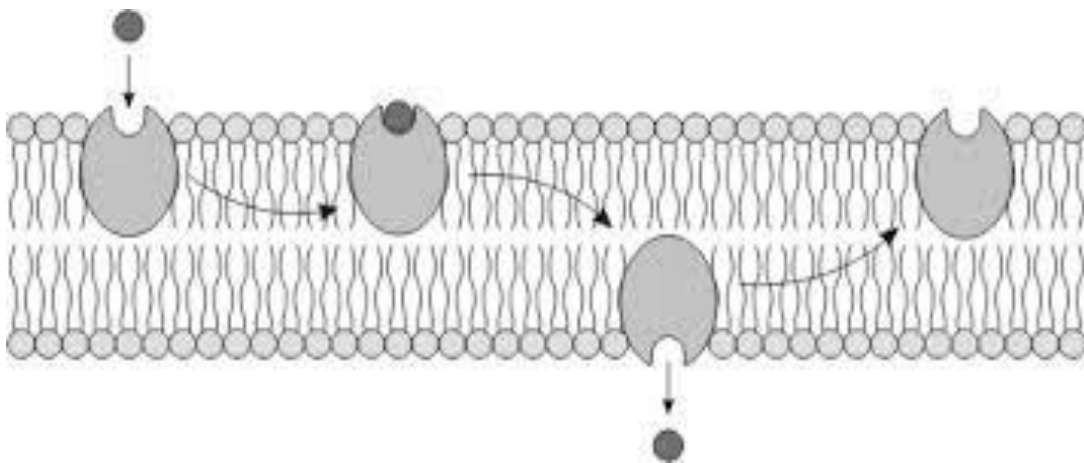


Figura 10. Mecanismo de acción general para los ionóforos transportadores⁽⁶²⁾.

-
- Ionóforo formador de canal. Crea un poro en la membrana hidrófila, permitiendo que los iones pasen a través sin entrar en contacto con el interior hidrofóbico de la membrana. Un ejemplo es la gramicidina A, un antibiótico polipeptídico⁽⁶³⁾. Estos ionóforos son generalmente proteínas grandes.

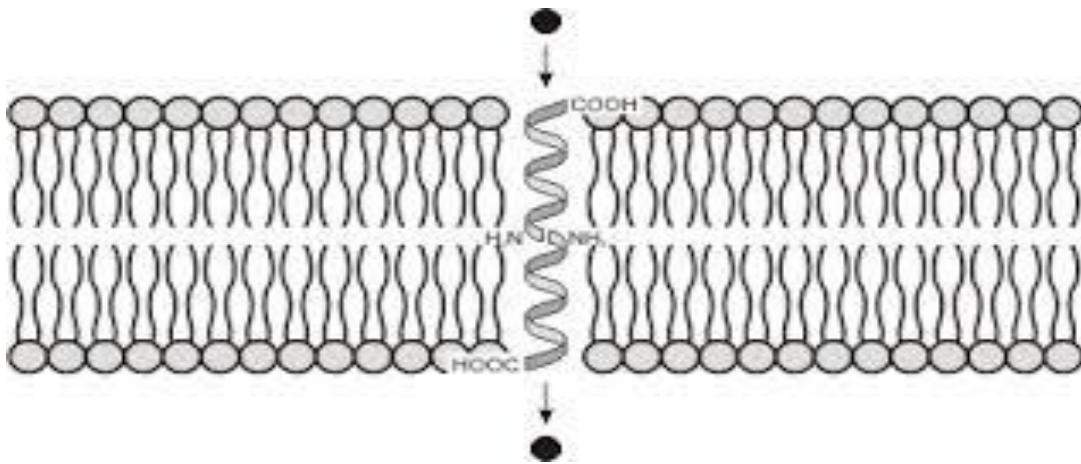


Figura 11. Mecanismo de acción general para los ionóforos formadores de canal⁽⁶²⁾.

2.5.2.1. Ionomicina

La ionomicina es un antibiótico de poliéter producido por la bacteria Gram positiva *Streptomyces globatus*. Este ionóforo, del tipo transportador, es capaz de extraer Ca^{2+} y otros cationes en una solución acuosa a partir de una fase orgánica. Posee una predilección a formar complejos con cationes de carga 2+, especialmente el Ca^{2+} , mientras que la unión a cationes monovalentes es menor. La reacción de formación de complejo se da en relación 1:1 y es dependiente del pH ya que cuando este es menor a 7.0 no ocurre la unión con Ca^{2+} , mientras que su mayor tasa de unión ocurre con pH mayor a 9.5⁽⁶⁴⁾.

La ionomicina es soluble en acetona, benceno, hexano, metanol y etanol sin embargo, es insoluble en agua, ácidos y bases débiles. Por lo general, el polvo de ionomicina es reconstituido en soluciones de etanol puro o DMSO (10 mg/mL), almacenándose a 2-8 °C con protección contra la luz⁽⁶⁵⁾.

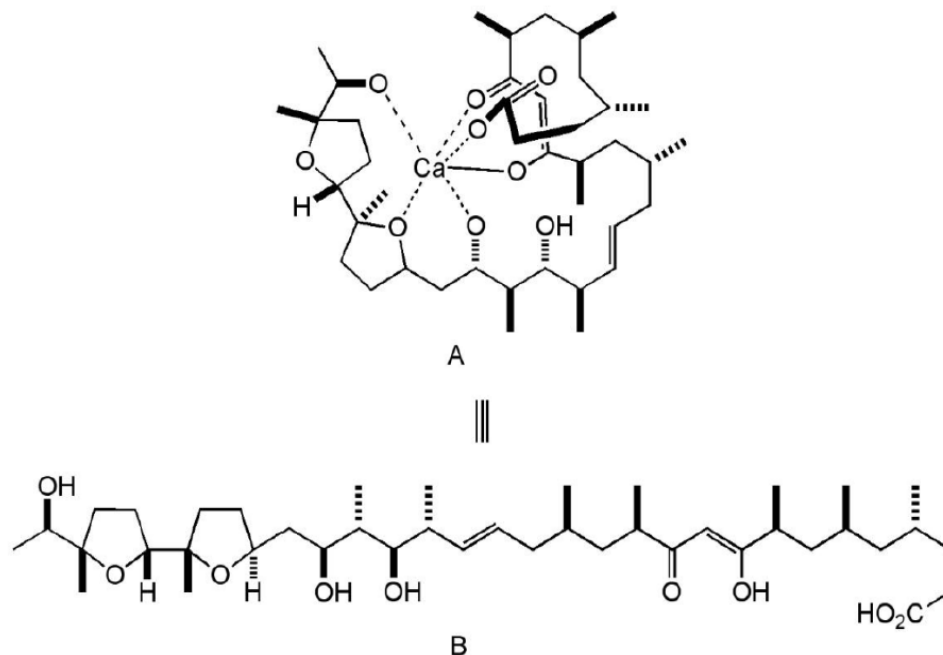


Figura 12. Molécula de ionomicina quelando el ion calcio (A), exponiendo sus grupos hidrofóbicos al medio, y en su secuencia lineal (B)⁽⁶⁶⁾.

Debido a que la ionomicina es un eficaz acarreador móvil de Ca²⁺, posee ventajas para el estudio de transporte de este catión a través de membranas biológicas⁽⁶⁷⁾. También, se ha utilizado para equilibrar los niveles intracelulares y extracelulares de ion Ca²⁺ para calibraciones *in situ* de indicadores fluorescentes⁽⁶⁸⁾. Además, se ha descrito que la ionomicina puede servir como inductor de la apoptosis⁽⁶⁹⁾ debido a que puede actuar activando una endonucleasa latente sensible a las concentraciones de Ca²⁺⁽⁷⁰⁾.

El funcionamiento de la ionomicina, como transportador, se basa en bloquear la carga del ion al quelarlo, asumiendo una conformación espacial que provoca que la molécula muestre grupos hidrocarbonados hacia el medio acuoso, lo que permite su paso a través de una zona hidrofóbica de la bicapa lipídica sin ningún gasto de energía⁽⁷¹⁾. De esta manera el ion pasa de un lado a otro por un gradiente de concentración facilitado, manteniendo un medio electroneutro, lo que no produce una diferencia de concentración de iones, tanto dentro como fuera de la membrana⁽⁶¹⁾.

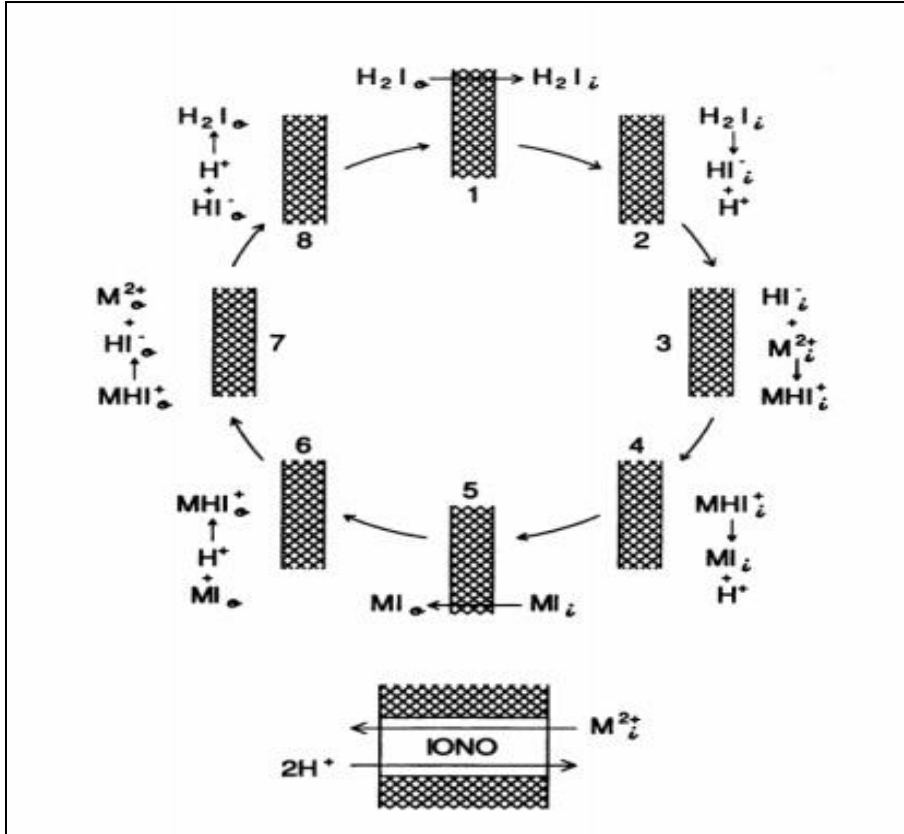


Figura 13. Se representa el mecanismo de acción del ionóforo ionomicina para el transporte de cationes en reacciones secuenciales⁽⁶¹⁾. Las zonas sombreadas simbolizan una sección de la bicapa lipídica, y los subíndices i y o se refieren a dentro y fuera del volumen delimitado, respectivamente.

Inicialmente, la ionomicina (H_2I_o), en su estado neutro, interacciona con la membrana lipídica internalizándose en ella (1). Posteriormente, el ionóforo se desprotona (2), lo cual le permite realizar una reacción de formación de complejo (MHI^+_i) con un catión (3). Consecutivamente, el complejo se desprotona de nuevo quedando neutro (4). El complejo ionomicina-catión neutro (MI_i), debido a sus propiedades lipofílicas se desplaza hasta la parte interna de la membrana (5). Una vez interaccionando con el núcleo del liposoma?, el complejo se protona (MHI^+_o) (6), lo que permite que el catión se libere de la ionomicina (7). Por último, el ionóforo se protona una vez más, permaneciendo en su forma neutra inicial (8).

2.6. Tecnecio-99 metaestable SESTAMIBI (^{99m}Tc -MIBI)

El tecnecio-99 metaestable (^{99m}Tc) es un radionúclido que se obtiene a partir del decaimiento radioactivo del molibdeno-99 (^{99}Mo). Su tiempo de vida media es de 6.02 horas. Su mecanismo de decaimiento es por transición isomérica emitiendo fotones γ . Generalmente el ^{99m}Tc es preferido por encima de otros isotopos, debido a características de formación de imagen optimas con una energía de fotón ideal de 140 keV y su fácil obtención a través de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.

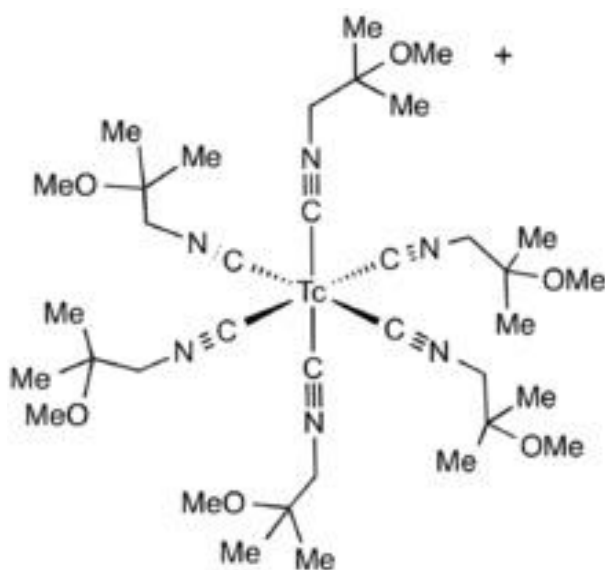


Figura 14. Estructura química de ^{99m}Tc SESTAMIBI⁽⁷²⁾.

El ^{99m}Tc -MIBI se obtiene a partir de la conjugación de ^{99m}Tc -pertechnetato de sodio con seis moléculas de metoxi isobutil isonitrilo. Este radiofármaco es usado para realizar imágenes de mama, imágenes de paratiroides así como estudios de perfusión cardiaca⁽⁷²⁾. Es considerado como un radiofármaco catiónico (1+) y lipofílico que se acumula en el miocardio por difusión pasiva. En pacientes, después de la administración intravenosa, el aclaramiento de la sangre es rápido con un tiempo de vida media de 1.6 a 4.3 minutos. Cinco minutos posteriores a la administración, 8 % de la dosis inyectada permanece en circulación. Menos del uno por ciento se une a proteínas plasmáticas. La vida media biológica en miocardio es de 6 horas aproximadamente. La vida media biológica en hígado es

de 30 minutos. La excreción urinaria es del 27% a las 24 horas y el 37% a las 48 h. El ^{99m}Tc -MIBI no se metaboliza in vivo⁽⁷³⁾.

2.6.1. Radiomarcado de liposomas con ^{99m}Tc -MIBI

Existe una amplia bibliografía donde se reportan distintos métodos de radiomarcado de liposomas con ^{99m}Tc -MIBI. Belhaj-Tayeb et. al.⁽⁷⁴⁾ radiomarcaron liposomas pegilados con ^{99m}Tc -MIBI a través de un ionóforo llamado valinomicina generando un potencial transmembranal con una solución de buffer de fosfatos y potasio. Al final de estudio, reportan que es posible usar diferentes radiofármacos catiónicos para ser encapsulados por este ionóforo o diferentes tipos de ionóforos para encapsular ^{99m}Tc -MIBI.

2.6.2. Pruebas de radiomarcaje de liposomas

Para asegurarse que el radiomarcado de liposomas es de alta calidad, deben realizarse pruebas de caracterización que incluyen la medición de la carga y tamaño de la molécula, solubilidad (características atribuibles a los liposomas); así como la eficiencia de radiomarcado y estabilidad de radiomarcado *in vitro*, que nos indica el tiempo que el radionúclido permanece conjugado al liposoma; estabilidad de radiomarcado *in vivo*, que nos indica el comportamiento del sistema en modelos animales, entre otros análisis^(74, 75).

2.7. Xenotransplante de cáncer cervicouterino

Un xenotransplante es la propagación de tejido tumoral o línea celular cancerósa, de una especie animal, en ratones inmunodeficientes con la finalidad de producir un modelo de tumor. Este tumor puede desarrollarse sobre un órgano o sitio distinto al de origen. Los xenotransplantes permiten realizar una evaluación terapéutica de un fármaco en un microambiente tumoral. Establecen un paso intermedio entre cultivos celulares y un tumor humano⁽⁷⁶⁾. Para el presente trabajo

se utilizó la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa de origen humano. Son células de tipo epitelial provenientes de adenocarcinoma del cuello uterino; posee un tiempo de replicación de 23 horas y es capaz de formar tumor (xenotransplante) en ratones una vez inoculado⁽⁷⁷⁾.

2.8. Estudios de imagen molecular

La tomografía por emisión de fotón único (SPECT) es una técnica no invasiva de medicina nuclear que, junto con otros métodos de diagnóstico como la PET, la gammagrafía, la imagenología óptica y ciertos procedimientos de la resonancia magnética funcional, pertenece al grupo de técnicas de imagenología molecular⁽⁷⁸⁾.

Las gammacámaras SPECT se diseñaron para permitir la tomografía computarizada por emisión de fotones únicos (como los del ^{99m}Tc), provenientes del paciente, y ofrecen información sobre la función de los órganos aunque sin información anatómica. Las gammacámaras se han fusionado a equipos de tomografía computarizada de rayos X (CT) para formar un equipo híbrido SPECT/CT. El sistema se acopla a algoritmos y programas de computación para adquirir, procesar y fusionar las dos imágenes para obtener una imagen en tercera dimensión que muestre la actividad metabólica del órgano y su ubicación anatómica. La imagen fusionada del SPECT/CT es una herramienta de gran utilidad en la detección y seguimiento de tumores malignos ya que se observa con mayor definición el órgano que capta el radiofármaco y la ubicación de la masa tumoral dentro del organismo⁽⁷⁹⁾.

3. Hipótesis

EL radiomarcado con ^{99m}Tc -MIBI de la formulación cisplatino-liposomal, usando ionomicina, permitirá determinar su biodistribución en un xenotransplante tumoral mediante técnicas de imagen molecular y su farmacocinética plasmática en ratas sanas con técnicas de radiofarmacología.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar la farmacocinética en ratas sanas y la biodistribución en un xenotransplante de cáncer cervicouterino HeLa en ratones nu/nu, de una formulación de cisplatino liposomal radiomarcado con ^{99m}Tc .

4.2. Objetivos particulares

- ▶ Optimizar la encapsulación de cisplatino y ^{99m}Tc -MIBI en liposomas usando el ionóforo ionomicina.
- ▶ Estudiar la farmacocinética plasmática y biodistribución del sistema ^{99m}Tc -MIBI-Liposomal en ratas Wistar sanas.
- ▶ Estudiar la distribución tumoral del sistema ^{99m}Tc -MIBI-Liposomal en un xenotransplante cáncer cervicouterino HeLa en ratones nu/nu.

5. Material y métodos

5.1. Reactivos

Los lípidos (colesterol, HSPC, mPE-PEG2000) se obtuvieron de Avanti® Polar Lipids Inc. El cisplatino, cloruro de calcio anhidro, cloruro férrico hexahidratado, cloruro de níquel, D-Alfa-tocoferol, dietilditiocarbamato sódico, ionomicina y tiocionato de amonio fueron obtenidos de Sigma-Aldrich®. Los solventes acetonitrilo y metanol de grado cromatográfico fueron obtenidos de Honeywell ®. El cloroformo utilizado fue de grado reactivo y se obtuvo de REPROQUIFIN®. El agua de alta calidad empleada para la cromatografía y la preparación de soluciones se obtuvo a partir de un sistema Avantege A10 Millipore®.

5.2. Preparación de liposomas cargados con CaCl₂ por rehidratación de capa lipídica

Se pesaron fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC), Colesterol, mPE-PEG2000 y D-Alfa-tocoferol en proporción molar 60:33.5:5:1.5 mol respectivamente, utilizando matraz bola y balanza analítica (RADWAG®, EUA) bajo condiciones de esterilidad. Se disolvió la mezcla de lípidos en cloroformo. Se evaporó el disolvente utilizando rotavapor (Heidolph, Alemania) con baño maría a 65°C y agitación de 210 rpm. Una vez formada la cama de lípidos, se colocó el matraz bola en desecador aplicando vacío y se mantuvo bajo estas condiciones durante 24 horas. Posteriormente, se rehidrató la bicapa al volumen deseado usando una disolución de cloruro de calcio anhidro 1M en agua desionizada estéril. Se homogenizó el tamaño de partícula usando equipo para extrusión pasando la suspensión liposomal a través de filtros de policarbonato con dimensión de poro de 0.4, 0.2 y 0.1 µm hasta obtener el tamaño de partícula preestablecido. El calcio no encapsulado se removió con diálisis usando membranas de 12-14000 MWCO (Spectrapor, EUA) durante 4 horas, usando solución salina isotónica estéril como medio de diálisis y cambiando por medio

fresco después de dos horas. Posteriormente, se procedió con la caracterización fisicoquímica de la suspensión liposomal.

5.3. Caracterización fisicoquímica de los liposomas

5.3.1. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula y el potencial ζ se determinó usando un equipo Zetasizer Analyzer 90 PLUS/BI-MAS (Brookheaven Instrumenst Corporation®, U.S.A). Las mediciones se realizaron con los siguientes parámetros:

Tabla 2. Parámetros físicos para cuantificación de tamaño de partícula ⁽⁸⁰⁾.

Temperatura	25 °C
Viscosidad	0.890 cP
Índice de refracción	1.330
Ángulo	90°
λ	657.0 nm

Se utilizaron 5 μ L de nanoesferas de poliestireno como estándar de referencia (Duke Scientific®, U.S.A) dispersadas en 1 mL de KCl 10 mM. Para garantizar su correcto funcionamiento, la lectura del equipo debe encontrarse dentro de 92 ± 3.7 nm, debido a que es el diámetro certificado de las nanoesferas de poliestireno.

Para realizar la medición de la muestra, se tomaron 10 μ L de la dispersión liposomal y se diluyó en 1 mL de KCl 10 mM, se agitó manualmente y se procedió a la lectura.

5.3.2. Potencial Zeta

Se determinó el potencial ζ empleando el electrodo de paladio con soporte de acrílico (incluido en el equipo). Las mediciones se realizaron bajo los siguientes parámetros:

Tabla 3. Parámetros físicos para cuantificación de potencial ζ ⁽⁸⁰⁾.

Temperatura	25 °C
pH	7.40
Concentración	1 mg/mL
Constante dieléctrica	78.54
Tamaño de partícula	300 nm

Para preparar el estándar de potencial ζ , se utilizaron 20 mg de BIZR3 (Brookhaven Instrument Corporation®, U.S.A) y se disolvieron en 50 mL de KCl 1 mM. Se agregó 1.8 mL del estándar de referencia y se insertó el electrodo, se conectó al equipo y se efectuó la medición. El estándar de potencial ζ tiene un valor de -53 ± 4 mV, la lectura del equipo debe encontrarse dentro de este intervalo para garantizar su correcto funcionamiento.

La medición de la muestra, se realizó con 10 μ L de la suspensión liposomal y se adicionó 1.8 mL de KCl 1mM, se agitó manualmente, se insertó el electrodo, se conectó al equipo y se realizó la medición.

5.3.3. Cuantificación de fosfolípidos

La concentración de fosfolípidos de la suspensión liposomal se determinó usando el método de Stewart⁽⁵¹⁾ que se basa en la formación de un complejo colorimétrico entre ferrocianato de amonio y fosfolípidos.

Para la preparación del ferrotiocianato de amonio, se disolvieron 27.03 g de cloruro férrico hexahidratado y 30.4 g de tiocionato de amonio en 1 L de agua desionizada. La solución se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Para calcular la concentración de fosfolípidos, se preparó una disolución de HSPC en cloroformo con concentración de 2mg/mL (Stock A). Posteriormente, se realizó una disolución 1:10 del Stock A (Stock B).

La Tabla 4 muestra las diluciones realizadas para la preparación de la curva patrón de HSPC:

Tabla 4. Curva patrón de HSPC para cuantificación de fosfolípidos en liposomas.

Concentración de HSPC (mg/mL)	Volumen de Stock B (μ L)	Volumen de CHCl_3 (μ L)	Volumen de NH_4FeSCN (μ L)
0.00	0	750	750
0.02	75	675	750
0.04	150	600	750
0.06	225	525	750
0.08	300	450	750
0.10	375	375	750

Cada volumen se agitó durante 1 minuto en vortex (Bench Mixer, EUA) y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos a 4 °C (Centrífuga Eppendorf, EUA). La fase orgánica se leyó a 488 nm en celda de cuarzo usando un espectrofotómetro UV-Vis (Beckman Coulter, EUA).

Para la cuantificación de fosfolípidos en las muestras, se diluyó 1:10 una alícuota de suspensión liposomal en agua desionizada. Posteriormente, se tomaron 20 μ L de la dilución y se llevaron a sequedad usando un equipo SpeedVac (Thermo Electron Corporation, U.S.A.) a 20 °C y con vacío durante 40 min. La muestra seca se disolvió en 750 μ L de cloroformo y se agitó durante 2 min en vortex. Se

agregaron 750 μL de NH_4FeSCN , se agitó durante 1 min en vortex y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos a 4 °C. La fase orgánica se leyó a 488 nm en celda de cuarzo usando el espectrofotómetro UV-Vis. El análisis se realizó por triplicado.

5.3.4. Cuantificación de colesterol

Para determinar la concentración de colesterol en suspensión liposomal se uso el kit comercial enzimático Advia Chemistry CHOL (Bayer, U.S.A.). El análisis se efectuó por triplicado.

La siguiente Tabla muestra las diluciones realizadas para la preparación de la curva patrón de colesterol:

Tabla 5. Curva patrón de colesterol.

Muestra	Concentración conocida (mg/dL)	Volumen de muestra (μL)	Volumen de reactivo enzimático (mL)
Control 1	84 – 114	10	1
Control 2	135 – 175	10	1
Control 3	192 – 223	10	1
Calibrador	200 – 400	10	1
Suspensión liposomal	-	10	1

Las reacciones se realizaron en celda de lectura, se agitó con vortex por 1 minuto y se incubó a 4°C durante 10 min. Posteriormente, se leyó a 500 nm usando el espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis). La concentración del calibrador debe encontrarse en el intervalo conocido para asegurar que la cuantificación es confiable. Se utilizó 1 mL de reactivo enzimático como blanco.

5.3.5. Cuantificación de Ca²⁺

La concentración de calcio encapsulado en la suspensión liposomal se determinó con el kit “Determinación cuantitativa de Ca²⁺ IVD” (SPINREACT S.A., España). Se adicionó la mezcla de reactivos Etanolamina, o-Cresolftaleína, 8-Hidroxiquinoleína como blanco. El análisis se realizó por triplicado.

Para la cuantificación del patrón primario acuoso de Ca²⁺, se realizó una dilución 1:20 de una muestra liposomal en agua desionizada. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min. Dependiendo de la determinación, se tomaron 20 µL del sobrenadante o del patrón primario de Ca²⁺ y se depositó en celda de lectura. Se adicionó 2 mL de Etanolamina y 1 gota de la mezcla o-Cresolftaleína, 8-Hidroxiquinoleína. Se agitó en vortex a 50 rpm durante 1 min. La muestra se leyó a 570 nm usando el espectrofotómetro UV-Vis.

La concentración de calcio en la muestra se calculó a partir de la relación matemática:

$$\frac{[c]Muestra}{[c]Patrón} \times 10 (Conc. Patrón) = mg/dL \text{ de calcio en la muestra}$$

5.3.6. Encapsulación de cisplatino mediante potencial transmembranal

Para la encapsulación de cisplatino en los liposomas se utilizó una proporción 1:6 (mg de fármaco: mg de lípido). Se disolvió el cisplatino en agua desionizada estéril a 65 °C. Por otra parte, los liposomas cargados con CaCl₂ se depositaron en un matraz bola estéril y se calentó a 65 °C usando rotavapor. Una vez alcanzada esta temperatura, se vertió la disolución de cisplatino en la suspensión liposomal y se agitó a 30 rpm durante 10 min. Posteriormente, se agregó ionomicina a una proporción 2:1 (µg ionomicina: µmol lípido) y se dejó incubar por 1 hora a 65 °C y 30 rpm. La solución se concentró y purificó en tubos de ultrafiltración Amicon de

30 K de 4 mL (Merk Millipore, EUA) adicionando 1 mL de solución salina isotónica para asegurar que todo el cisplatino no encapsulado pase a través de la membrana de filtración. Se cuantificó la concentración de cisplatino encapsulado mediante HPLC (WATERS-ALLIANCE, EUA) cuyo método fue previamente validado en el laboratorio.

5.3.7. Cuantificación de cisplatino

Para calcular la concentración de cisplatino encapsulado, se elaboró una curva patrón, por triplicado, empleando concentraciones conocidas de cisplatino en un intervalo de 0 a 20 ug/mL como se muestra a continuación:

Tabla 6. Curva patrón de cisplatino para cuantificación de fármaco encapsulado en liposomas.

Concentración de cisplatino ($\mu\text{g/mL}$)	Tipo de Stock	Volumen de Stock (μL)	Volumen de liposomas blanco (μL)	Volumen de agua desionizada (μL)
0	-	-	5	95
1	10 $\mu\text{g/mL}$	10	5	85
5	100 $\mu\text{g/mL}$	5	5	90
10	100 $\mu\text{g/mL}$	10	5	85
20	100 $\mu\text{g/mL}$	20	5	75

A cada volumen se agregó 400 μL de acetonitrilo, se agitó en vortex durante 5 minutos y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (Hettich, EUA). Se tomó 400 μL de sobrenadante y se secó a 40°C bajo flujo de nitrógeno. Posteriormente, se agregó 100 μL de solución salina isotónica, se agitó en vortex 1 minuto y se adicionó 10 μL de NiCl_2 50 $\mu\text{g/mL}$ y 10 μL de DDTc 10%; se incubó a

37 °C con agitación de 500 rpm durante 30 minutos usando placa de calentamiento con agitación (Eppendorf Thermomixer®, EUA). Después, se agregó 100 µL de cloroformo, se agitó en vortex durante 3 min y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, 20 µL de la fase clorofórmica fueron inyectados en el equipo de HPLC.

Para la cuantificación de cisplatino en muestras liposomales, se realizó una dilución 1:100 a una alícuota de la suspensión liposomal. Se tomaron 100 µL de la dilución y se realizó la extracción de cisplatino de la misma manera descrita para la curva patrón.

La concentración de cisplatino encapsulado se determinó usando del equipo HPLC 2695 acoplado al detector UV-Vis 2489 (WATERS, EUA) bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

Tabla 7. Condiciones cromatografías para cuantificación de cisplatino ⁽⁸⁰⁾.

Tipo de columna	Symmetry C-18, 100 Å, 5µm, 3.9 X 150 mm
Flujo	1.8 mL/min
Temperatura de columna	23 °C
Temperatura de muestra	4 °C
Fase móvil	Agua-Metanol-Acetonitrilo (28:40:32)
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida	6 min
T _R cisplatino	3.2 min.
T _R NiCl ₂	4.5 min.
Tipo de detector	UV
Longitud de onda	254 min.

5.3.8. Perfil de liberación de suspensión liposomal cargada con cisplatino

Para evaluar la estabilidad de los liposomas se utilizó el sistema de celdas de difusión vertical tipo Franz (PermeGear, EUA). El ensayo se realizó por triplicado. En función del análisis, se realizó una dilución 1:2 de la suspensión liposomal con solución salina isotónica o plasma humano y ésta se colocó en el compartimento para muestra de la celda de Franz.

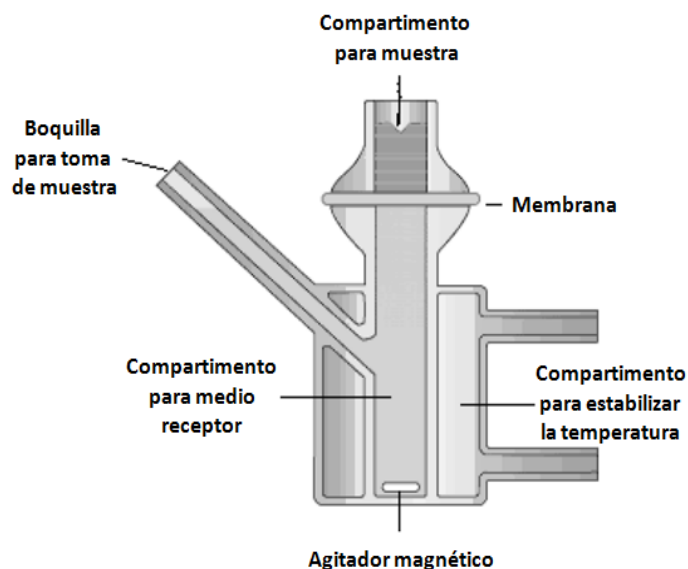


Figura 15. Esquema de sistema para difusión vertical tipo Franz⁽⁸¹⁾.

Para preparar del sistema de difusión vertical, se colocó una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0.050 μm (Whatman Nucleopore, Canadá) entre el compartimento de muestra y la parte superior del compartimento para medio receptor. Se usaron pinzas de metal para mantener fijas ambas partes del sistema. Después, se llenó con solución salina isotónica el compartimento para medio receptor evitando la formación de burbujas y se adicionó un mini agitador magnético. En el compartimento para muestra se colocó 1 mL de la mezcla liposomas/solución salina isotónica o liposomas/plasma. La boquilla del compartimento para muestra se selló con parafilm. Una vez preparado el sistema, éste se colocó en el soporte de agitación magnética (PermeGear, EUA) y se acopló un equipo recirculador (LAUDA, EUA) con baño María a 37 °C.

Se recolectó el medio receptor en los tiempos establecidos: 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 h. Una vez retirado el medio, se rellenó nuevamente la celda con solución salina isotónica hasta la marca de aforo y se repitió la operación hasta el siguiente tiempo. El cisplatino liberado al medio receptor se cuantificó utilizando el equipo HPLC siguiendo las condiciones previamente descritas.

5.3.9. Radiomarcado de liposomas

A 500 μL de la suspensión liposomal cargados con CaCl_2 y cisplatino, se adicionó 5 mCi de $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ (MIYMSA, S.A. de C.V. México). Consecutivamente, se adicionó ionomicina en proporción 8:1 (μg de ionomicina: μmol de lípido). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se purificó la suspensión liposomal radiomarcada adicionando 100 μL de solución salina isotónica y se filtró tubos Amicon de 3 K con capacidad de 0.5 mL (Merk Millipore, USA). Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min (Eppendorf, USA). La eficiencia de radiomarcado se determinó utilizando un activímetro (Nuclear Associates, USA), midiendo la diferencia entre la actividad adicionada a la suspensión liposomal al inicio del proceso y la actividad de los liposomas radiomarcados después de la purificación.

5.3.10. Estabilidad de radiomarcado *in vitro*

Se agregó 0.2 mCi de liposomas radiomarcados en 0.5 mL de solución salina isotónica y 0.5 mL suero humano al 50%. Posteriormente, se incubó en baño seco a 37°C . Se recolectó por triplicado 20 μL de muestra a las 0, 0.5, 1, 3, 6, 18, 24 h. Cada muestra recolectada se colocó en tubos Amicon de 3 K y se adicionó 150 μL de solución salina isotónica para filtrar el $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ liberado. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 min. Se midió la actividad en el filtro y en el filtrado utilizando un contador de centelleo sólido (Ludlum, USA).

5.3.11. Animales de experimentación

Se utilizaron 6 ratas Wistar macho entre 6-8 semanas de edad y 4 ratones hembra *nu/nu* entre 6-8 semanas de edad, adquiridas del bioterio de la Facultad de Medicina y del Cinvestav Zacatenco, respectivamente. Los animales se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos, con agua y alimento *ad libitum*, con fotoperiodo día/noche 12/12 h, la temperatura fue de 22 ± 2 °C y humedad fue 40%.

5.3.12. Estudio de farmacocinética sanguínea y biodistribución en ratas

Las ratas (180-200g) se separaron en dos grupos (n=3). Al grupo control se le administró por vía intravenosa 300 μ Ci de ^{99m}Tc -MIBI, mientras que el grupo experimental se le inyectó vía intravenosa 300 μ Ci ^{99m}Tc -MIBI-Liposomal. Se tomaron 20 μ L de sangre de la cola a los tiempos 0.06, 0.1, 0.13, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 horas. La actividad de las muestras se midió inmediatamente utilizando el contador de centelleo tipo pozo. Se elaboró una gráfica de radioactividad por mililitro de sangre contra tiempo y los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron con ayuda del programa WinNonlin® (Certara, E.U.A.) Posterior a las 24h, los animales se sacrificaron y se extrajeron órganos de interés para cuantificar la radioactividad en estos.

5.3.13. Líneas celulares

La línea celular de cáncer de ovario HeLa se obtuvo de la ATCC (Rockville, E.U.A.). Esta línea se cultivó en condiciones de esterilidad en Medio Eagle Modificado de Duplecco (DMEM) (Gilco, E.U.A.) suplementado con 10% de SFB (Gilco, E.U.A.) e incubada a 37°C con atmósfera de 5% de CO_2 .

5.3.14. Desarrollo de tumores de cáncer cervicouterino en ratones atímicos

Las células se proliferaron en cajas de cultivo de 75 cm², se mantuvieron en DMEM suplementado con el 10% de suero fetal bovino, las cajas de cultivo se revisaron para verificar el porcentaje de confluencia hasta obtener entre 80-90%. Las células se despegaron con tripsina, se centrifugaron y posteriormente se contaron con un hemocitómetro. Una vez contadas la células, se resuspendieron en un volumen de 100 µl de medio de cultivo y se inocularon a la concentración de 1x10⁶ por vía subdérmica en el lomo del ratón. Después de la inoculación, se midió el tamaño del tumor semanalmente y se determinó el volumen tumoral utilizando la siguiente fórmula⁽⁸²⁾:

$$VT = D \times d^2 \times \left(\frac{\pi}{6}\right)$$

Donde:

VT = Volumen del tumor (mm³)

D = Diámetro mayor (mm)

d = Diámetro menor (mm)

5.3.15. Estudio de biodistribución tumoral en ratón atímico

Una vez que el volumen tumoral llegó aproximadamente a 200 mm³ y para corroborar que el tumor se encuentra metabólicamente activo⁽⁸³⁾, se administraron 200 µCi del radiofármaco ¹⁸F-FDG (Ciclotrón UNAM, México) por vía intravenosa; los animales se mantuvieron 30 minutos de reposo para permitir la biodistribución del radiofármaco en el organismo y posteriormente se realizó el estudio PET/CT (Albira ARS, Oncovisión, España). Un día después se realizó el estudio SPECT/CT, inyectando 200 µCi de ^{99m}Tc-MIBI-Liposomal cargados con cisplatino, en los tiempos 1, 3, 6 horas posteriores a la administración de la formulación liposomal. Las imágenes se reconstruyeron y analizaron para observar la acumulación liposomal en el tumor.

5.3.16. Cuantificación de cisplatino en tumores

Al término del estudio de biodistribución tumoral, se sacrificaron los animales y se extrajo el tumor para cuantificar la cantidad de cisplatino transportado por los liposomas mediante HPLC. Se realizó una curva patrón con “tumores blanco” (que no tuvieron interacción con la formulación liposomal), a los que se les agregaron cantidades conocidas de cisplatino en un intervalo de 0 a 5 ug/mL y 20 uL de NiCl₂ a 300 ug/mL. Para los ratones inyectados con la formulación liposomal, cada tumor se disgregó en 600 µL de solución salina isotónica. Posteriormente, se agregó 600 µL de acetonitrilo, se agitó, se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos, se tomó 1000 µL del sobrenadante y se secó en baño María a 40 °C con flujo de nitrógeno. Se resuspendió en 300 µL de solución salina isotónica, se agitó y se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos a 4 °C usando tubos Amicon de 30 kDa. Se tomaron 200 µL del filtrado y se agregó 20 µL de DDTC al 10% en NaOH 0.1 M y se incubó durante 15 minutos en agitación a 37 °C. Se agregó 100 µL de cloroformo, se agitó y centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, las muestras fueron cuantificadas por HPLC bajo las condiciones previamente descritas.

5.3.17. Análisis estadístico

Los resultados se reportan como el promedio \pm desviación estándar de la media. Para determinar una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los resultados se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey realizando comparaciones múltiples entre los grupos. Se utilizó el paquete estadístico SPSS[®] (versión 22 win64) y un valor de $p < 0.05$ indicó diferencia significativa.

6. Resultados

6.1. Caracterización fisicoquímica

En la Tabla 8 se comparan los parámetros fisicoquímicos de liposomas elaborados en este trabajo (liposomas Ω) contra liposomas de un proyecto previo⁽¹⁴⁾ usados como referencia (liposomas α). Se puede observar que sólo existe diferencia estadísticamente significativa para la concentración de Ca^{2+} encapsulado en los liposomas Ω , la concentración de Ca^{2+} es mayor en comparación con los liposomas α .

Tabla 8. Resumen de caracterización fisicoquímica de liposomas. Se reporta el valor promedio (n=3) con su respectiva desviación estándar.

Parámetro	Liposomas Ω	Liposomas α
Tamaño de partícula (nm)	164.45 \pm 1.6	159.2 \pm 3.91
Potencial ζ (mV)	-22.29 \pm 4.85	-25.29 \pm 3.30
[C] Fosfolípidos (mg/mL)	35.40 \pm 1.30	38.20 \pm 1.42
[C] Colesterol (mg/mL)	3.91 \pm 0.05	3.66 \pm 0.74
[C] Calcio (mg/mL)	2.24 \pm 0.07*	1.75 \pm 0.31

6.2. Eficiencia de encapsulación

Se observó que durante el tiempo de preincubación los liposomas encapsulan cisplatino de manera pasiva. Desde el tiempo cero, cuando se adiciona ionomicina, y durante los siguientes 45 min., no se observó una encapsulación significativamente diferente a la que se alcanzó antes de agregar la ionomicina (Figura 11). A partir de 1 h. se observa una mayor encapsulación de cisplatino. El análisis estadístico mostró diferencia significativa de los tiempos 60, 90 y 120 min. con respecto a los tiempos anteriores, aunque sin mostrar diferencias significativas entre ellos. El resultado indica que se requiere al menos 60 min. de incubación de al menos para lograr una encapsulación de cisplatino del orden de 1 mg/ml.

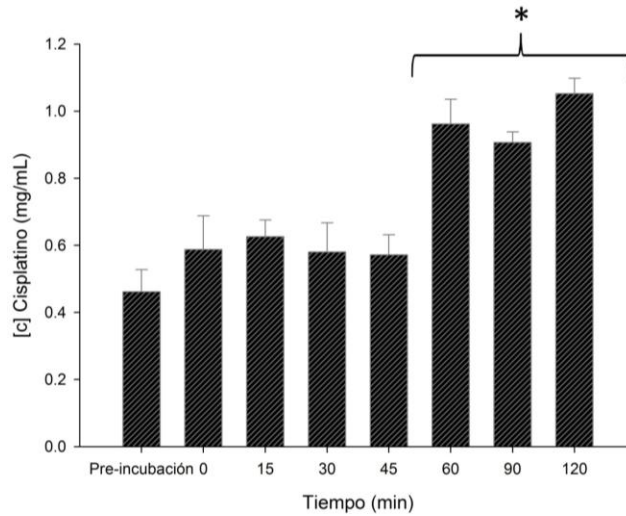


Figura 16. Cinética de encapsulación para cisplatino. Se grafica la concentración de cisplatino en miligramos por mililitro contra el tiempo de incubación. Se reporta el valor promedio para cada tiempo ($n=3$) \pm desviación estándar. El * indica diferencia significativa $p<0.05$, con respecto a los tiempos menores a 60 min.

La Figura 12 muestra el resultado de incrementar la concentración de Ca^{2+} en la encapsulación de cisplatino. En la figura se comparan los resultados con la formulación con los liposomas de referencia (liposomas α); la diferencia es estadísticamente diferente.

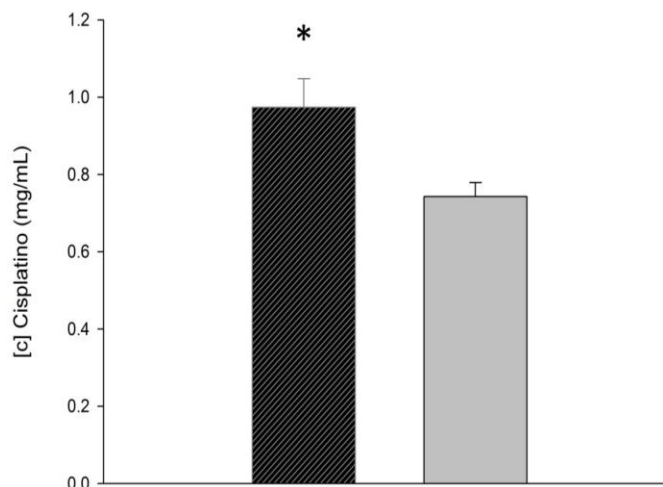


Figura 17. Comparación de la concentración de cisplatino encapsulado en liposomas Ω y liposomas α . Se reporta el promedio $n=3 \pm$ desviación estándar. La diferencia es estadísticamente significativa, $p<0.5$.

6.3. Perfil de liberación

La Figura 13 muestra el perfil de liberación de la suspensión liposomal Ω , a 37 °C en solución salina isotónica y en plasma al 50%. El análisis indica que los liposomas liberan alrededor del 20% del fármaco encapsulado a las doce horas. Este porcentaje se mantiene hasta llegar a las 96 horas. No se observó diferencia estadísticamente significativa.

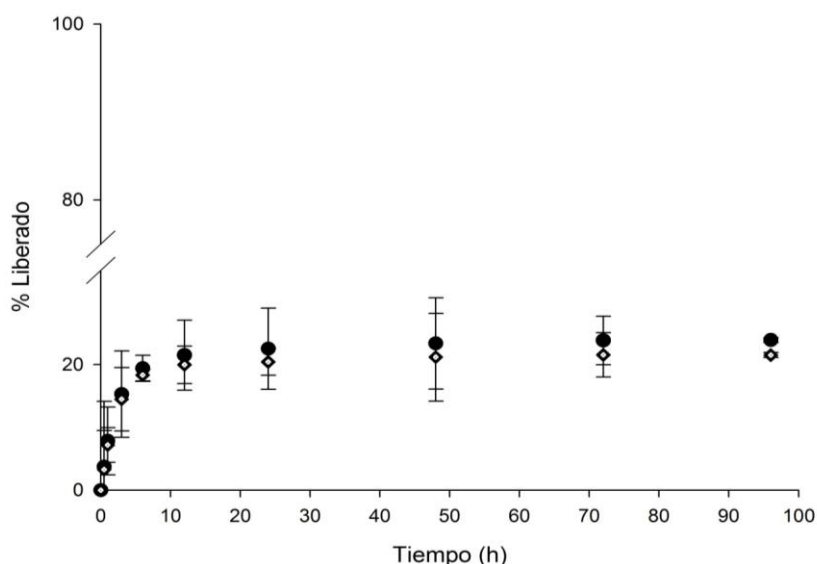


Figura 18. Liberación de cisplatino encapsulado en liposomas Ω . Se grafica el porcentaje de cisplatino liberado contra en tiempo en horas. La prueba se realizó en plasma al 50 % ● y solución salina isotónica ◊. Cada punto representa el valor promedio (n=3) con su respectiva desviación estándar.

6.4. Eficiencia y estabilidad de radiomarcado

Los resultados mostraron que la eficiencia de radiomarcado mejora hasta un 80% para los liposomas Ω , como consecuencia de incrementar la concentración de calcio. La diferencia en la encapsulación de radiofármaco es estadísticamente significativa.

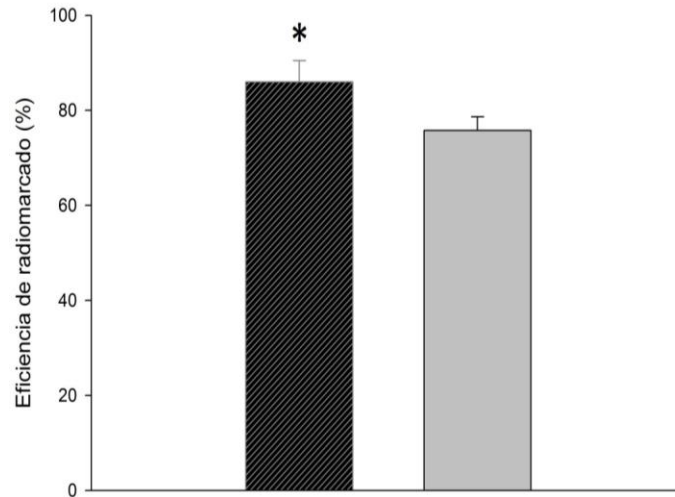


Figura 19. Eficiencia de radiomarcado entre liposomas Ω y liposomas α . Se reporta el promedio $n=3$ con su respectiva desviación estándar.

Al evaluar diferentes tiempos de incubación, se puede observar que la eficiencia de radiomarcado también es mayor en los liposomas Ω (Figura 15). Se observó que en ambos casos, el porcentaje de radiomarcado no se ve modificado de manera relevante desde el inicio de la cuantificación hasta el final del proceso y que se necesitan solo 15 minutos de incubación para alcanzar la máxima eficiencia de radiomarcado (80% y 70%, respectivamente).

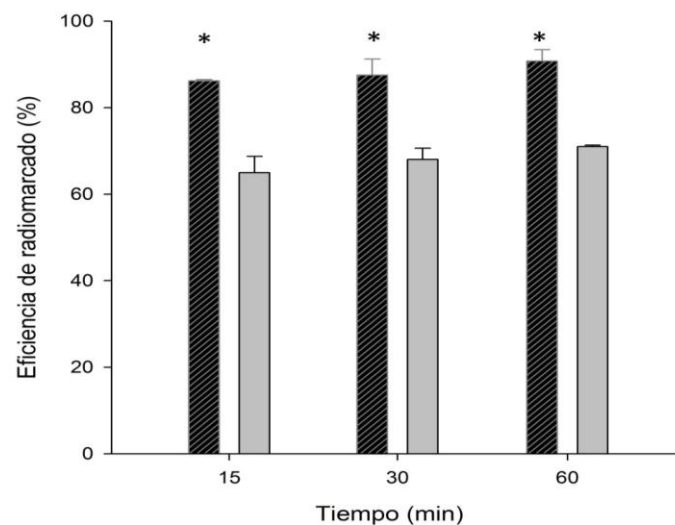


Figura 20. Comparación de eficiencia de radiomarcado entre liposomas Ω y liposomas α . Se reporta el promedio $n=3 \pm$ desviación estándar y diferencia estadística con $p < 0.5$.

La estabilidad de radiomarcado de liposomas α y Ω , en solución salina isotónica y plasma al 50%, fue del orden del 100% durante las primeras 8 horas (Figura 16). A las 18 horas el porcentaje de radiomarcado disminuyó al 95% para los liposomas α , mientras que para los liposomas Ω , éste se redujo al 90%. Después de 24 horas se observa una diferencia significativa entre los porcentajes de radiomarcado, siendo de 90% y 80% para los liposomas α y Ω , respectivamente. El resultado indica que la formulación Ω tiende a desestabilizarse después de 24 horas.

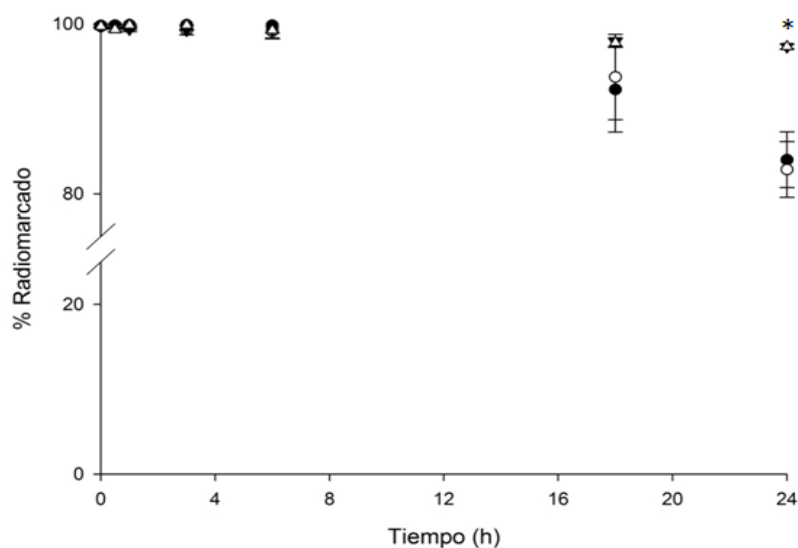


Figura 21. Estabilidad de radiomarcado para liposomas Ω en medio receptor plasma al 50% ● y solución salina isotónica ○ contra liposomas α puestos en plasma al 50% ▼ y solución salina isotónica ▲. Se reporta el promedio $n=3 \pm$ desviación estándar. La diferencia estadística se observa con $p<0.05$.

6.5. Farmacocinética sanguínea

En la Figura 17 se ilustra el comportamiento farmacocinético de ^{99m}Tc -MIBI libre y de liposomas radiomarcados con ^{99m}Tc -MIBI. Se grafica la radioactividad en μCi por mililitro de muestra contra tiempo en horas. Se observa que la curva de liposomas radiomarcados posee una concentración máxima a tiempo cero mayor que el de la curva de ^{99m}Tc -MIBI libre. Por otro lado, el descenso de la

concentración de radiactividad es gradual en la curva de liposomas radiomarcados en comparación con la curva de ^{99m}Tc -MIBI libre, que es más pronunciada. No hay diferencia estadísticamente significativa a los diferentes tiempos.

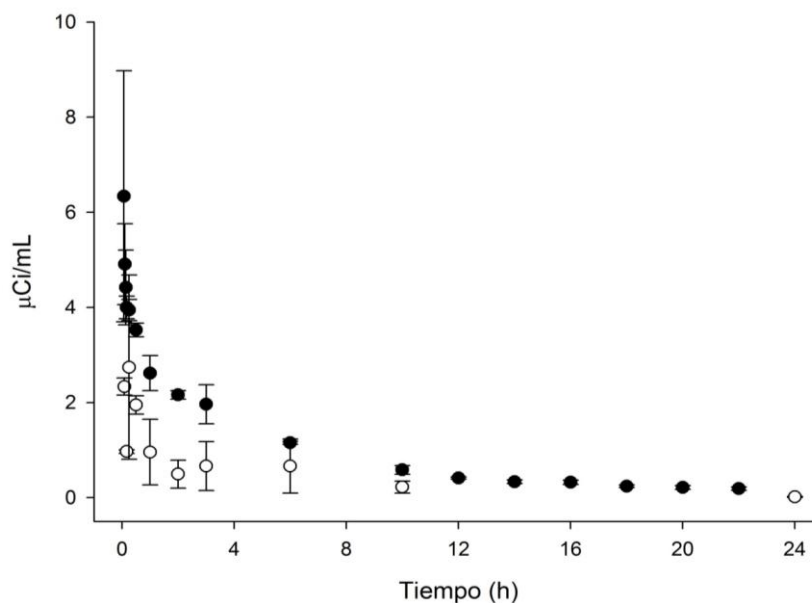


Figura 22. Farmacocinética sanguínea con ^{99m}Tc -MIBI \circ y liposomas radiomarcados \bullet . Se reporta el promedio $n=3 \pm$ error estándar.

Los parámetros farmacocinéticos del estudio se presentan en la Tabla 9. Los valores de ABC, $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$, así como C_p^0 son mayores para los liposomas mientras que el Vd y Cl es mayor con el radiofármaco libre. Se usó el programa WinNonlin® (Certara, E.U.A.) (versión 5.3 *User Resources*) para obtener estos parámetros.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de ^{99m}Tc -MIBI-Liposomal y ^{99m}Tc -MIBI libre. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos \pm error estándar y diferencia estadística con $p < 0.5$.

Parámetro	^{99m}Tc -MIBI	^{99m}Tc -MIBI-Liposomal
Vd (mL/kg)	243.71 \pm 16.42*	127.62 \pm 7.56
ABC ($\mu\text{Ci}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	18.44 \pm 2.07	23.76 \pm 1.71
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.64 \pm 0.02	1.91 \pm 0.02*
$t_{1/2\beta}$ (h)	8.75 \pm 2.85	10.76 \pm 0.43
C_p^0 ($\mu\text{Ci}/\text{mL}$)	3.47 \pm 2.63	14.27 \pm 1.38*
Cl (mL/h)	100.40 \pm 24.66	93.65 \pm 2.20

6.6. Estudio de biodistribución en ratas normales

La Figura 18 muestra estudios de imagen molecular a las una, tres y seis horas después de la inyección de ^{99m}Tc -MIBI y ^{99m}Tc -MIBI-liposomas. Se observa que la vía principal de eliminación de ambos radiofármacos es por vía hepática e intestinal. A partir de la primera hora se observa una marcada acumulación en intestino delgado que se mantiene hasta la tercera hora. Después de la hora seis se observa que ambos sistemas se concentran en la vejiga. El proceso de eliminación en ambos casos sigue el mismo comportamiento.

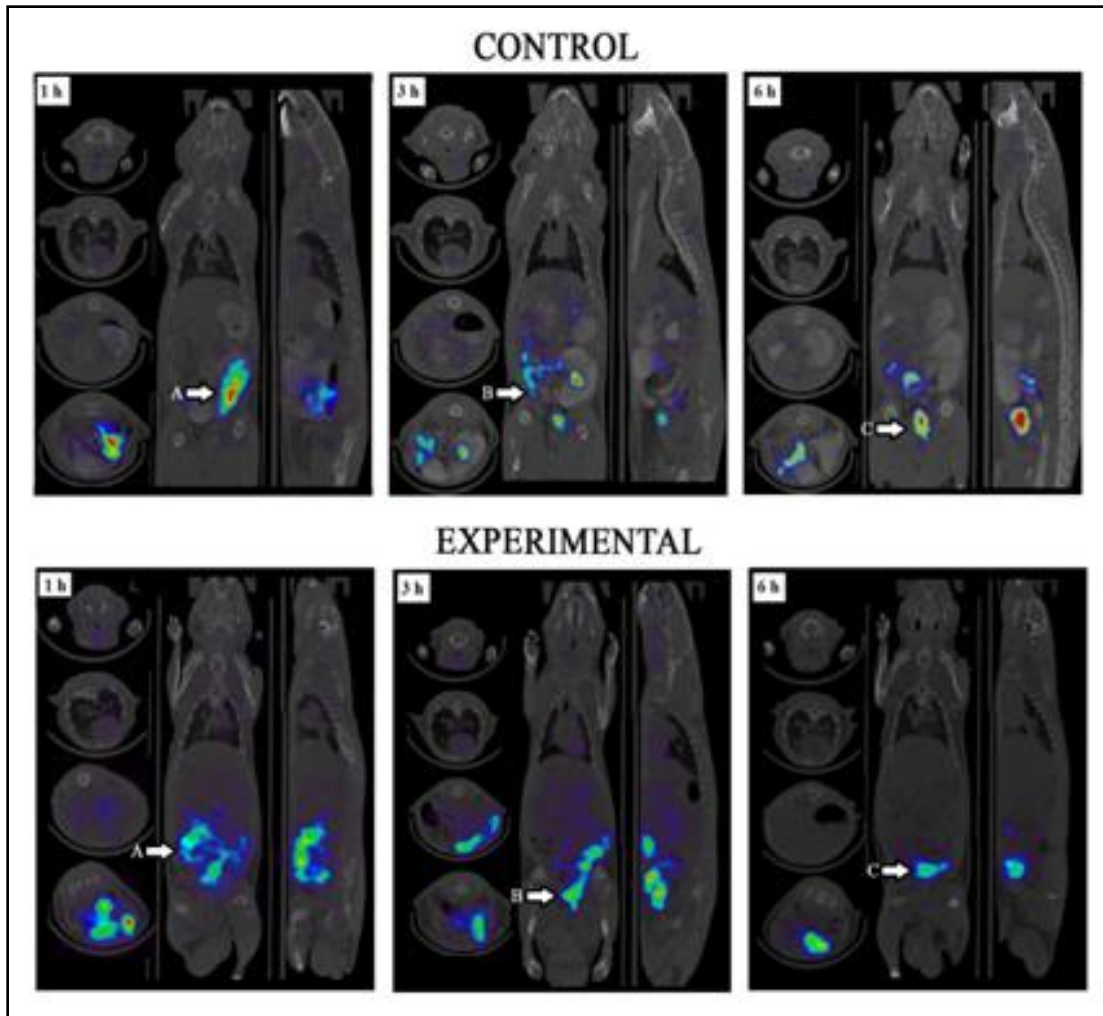


Figura 23. Imágenes Moleculares microSPECT/CT. Se muestran imágenes de dos ratas, inyectadas con ^{99m}Tc -MIBI y ^{99m}Tc -MIBI- liposomas, respectivamente a diferentes tiempos. Se observó que ambos fármacos aparentemente siguen el mismo proceso metabólico de eliminación.

En la Figura 19 se presenta la biodistribución de ambos sistemas evaluados, en términos del porcentaje de dosis inyectada por gramo (%DI/g), en órganos de interés a las 24 h post-inyección. Sólo se observa diferencia estadísticamente significativa en bazo.

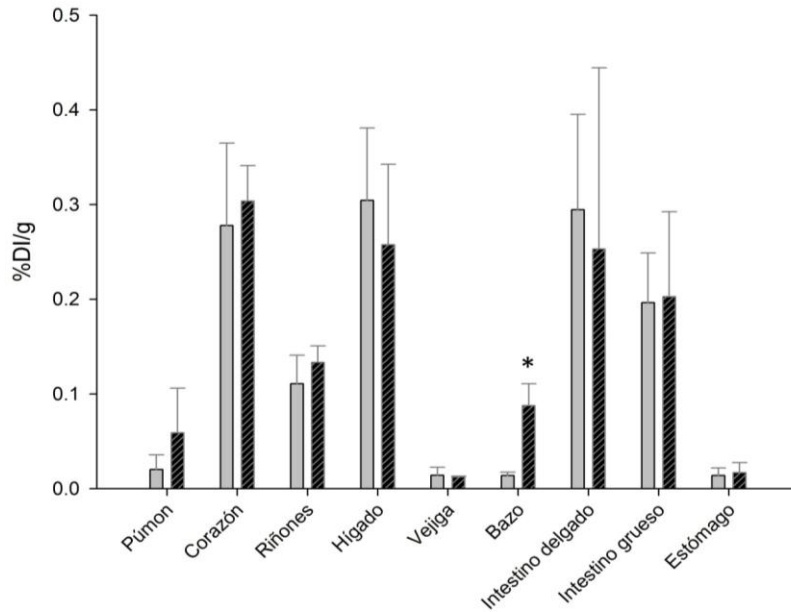


Figura 24. Biodistribución en órganos para $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ (■) y liposomas radiomarcados (▨). Se reporta el promedio $n=3 \pm$ error estándar.

6.7. Estudios de biodistribución en modelo tumoral

En la Figura 20 se muestra una fotografía y una imagen ^{18}F -FDG PET/CT de un ratón con xenotransplante de CaCu, representativo del grupo experimental, donde se comprueba la viabilidad metabólica del tumor.

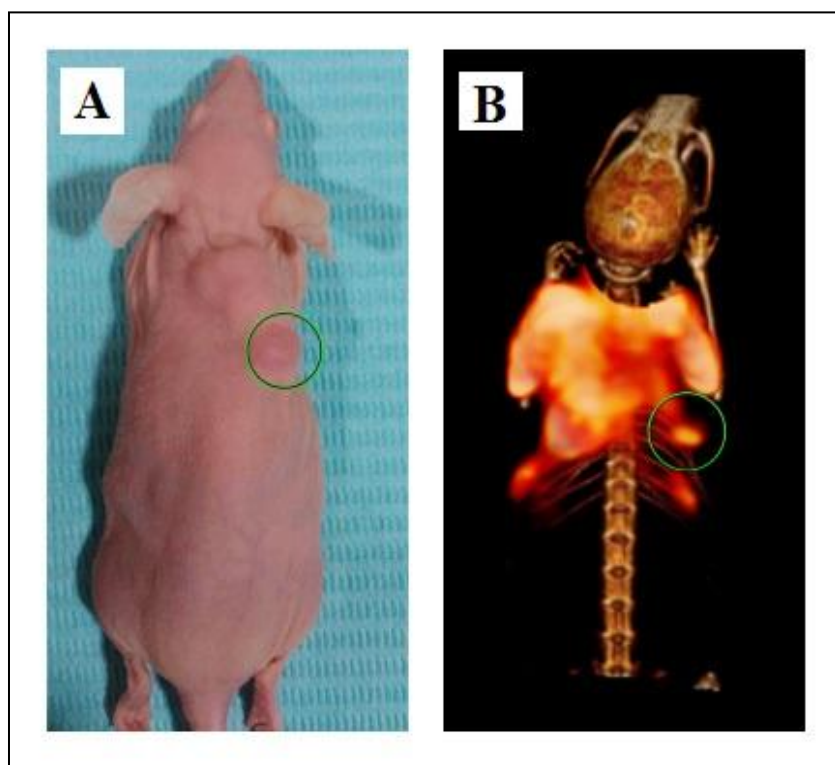


Figura 25. A) Imagen del xenotransplante de CaCu B) Imagen ^{18}F -FDG microPET/CT del mismo ratón. En el círculo verde se señala la zona del tumor.

La Figura 21 muestra imágenes SPECT/CT con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI-Liposomal a diferentes tiempos en las que se evalúa la biodistribución y la captación del radiofármaco en el tumor (indicado en el círculo verde). La biodistribución sigue el mismo comportamiento que en las ratas sanas, donde las principales vías de captación y eliminación son hígado, intestinos y vejiga.

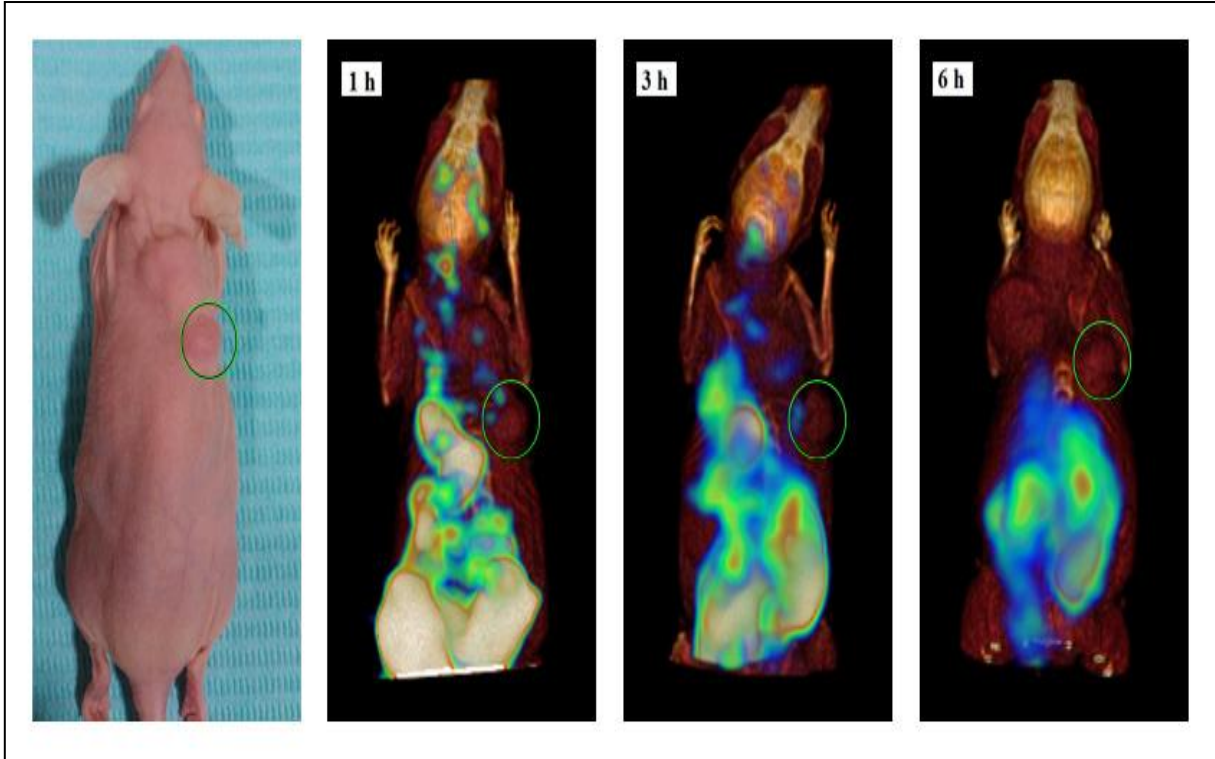


Figura 26. Imágenes microSPECT/CT donde se evalúa la biodistribución y captación del ^{99m}Tc -MIBI-Liposomal a diferentes tiempos. La captación del radiofármaco en el tumor (círculo verde) es mínima, del orde de la captación en tejido sano.

El análisis cuantitativo de las imágenes, usando el software del equipo Albira, para determinar la razón de captación en el tumor con respecto al hígado (órgano de referencia) a las diferentes horas de estudio se muestra en la Figura 22. Se encontró que la captación del radiofármaco en el tumor es mínima (Tumor/Hígado $\approx 0.2 \pm 0.08$). En el análisis se consideró una región de interés (ROI) en el hígado del mismo tamaño del tumor.

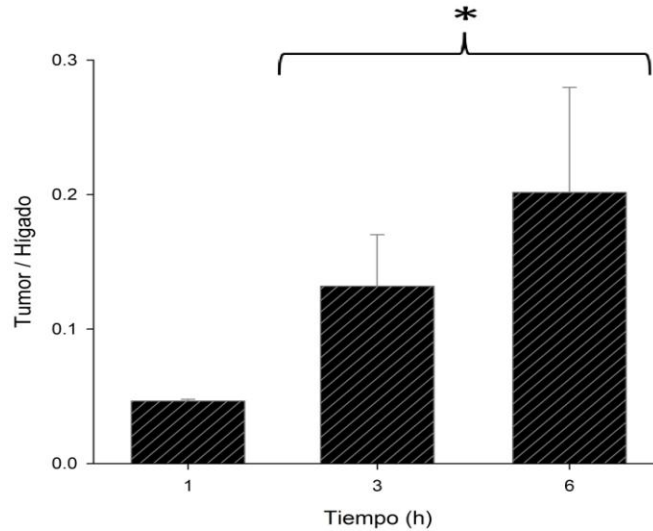


Figura 27. Relación de radioactividad acumulada en Tumor con respecto al Hígado. Se muestra el valor promedio \pm su respectivo error estándar. La captación a las 3 y 6 horas fue estadísticamente diferente a la de 1 hora; ($p < 0.5$) $n=4$.

Los resultados de biodistribución en órganos de interés, en términos del porcentaje de dosis (radioactividad) inyectada por gramo de tejido, se presentan en la Figura 22. Los tejidos se obtuvieron después de sacrificar a los ratones, 6 h después de la inyección del ^{99m}Tc -MIBI-Liposomal. Se observa mayor acumulación de radiactividad en corazón, hígado y estómago en comparación con el tumor.

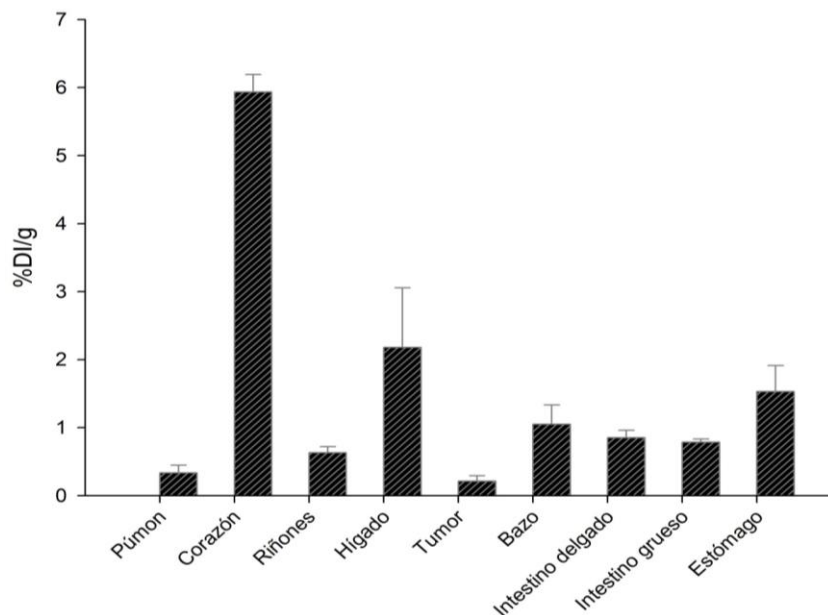


Figura 28. Biodistribución del ^{99m}Tc-MIBI-Liposomal en diferentes órganos de ratones atómicos con tumores de la línea celular HeLa. Se reporta el promedio n=4 ± error estándar.

En la Tabla 10 se presentan los resultados de la cuantificación de cisplatino (por HPLC) en los tumores reportados en la Figura 22. Se puede observar que aunque la señal radiactiva (del ^{99m}Tc) era mínima, la cantidad promedio de cisplatino en el tumor es de $5.15 \pm 0.6 \mu\text{g}$ por gramos de tumor. La cantidad de cisplatino presente en el tumor representa un $2.6 \pm 0.6 \%$ de la cantidad total inyectada y transportada por los liposomas radiomarcados.

Tabla 10. Cisplatino transportado al tumor por los liposomas. Los datos corresponden a un promedio de 4 con su respectivo error estándar.

Ratón	Peso (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso del tumor (g)	[c] Cisp. Liposomal inyectado (μg/mL)	[c] Cisp. acumulado (μg/mL)	Cantidad de Cisp. (μg)	Cisp/g de tumor (μg/g)	% Cisp. acumulado
2	26	195.24	0.197	199	2.37	1.42	4.45	2.9
4	30	412.28	0.275	199	2.71	1.63	7.23	3.3
5	29	404.32	0.320	199	1.47	0.88	4.48	1.8
6	29	229.57	0.225	199	2.04	1.22	4.45	2.5

7. Discusión

7.1. Caracterización fisicoquímica, eficiencia de encapsulación y estabilidad

Los resultados de caracterización fisicoquímica mostraron que el incremento en la concentración de calcio encapsulada en los liposomas no afecta los otros parámetros (Tabla 8). Mayer L.D. junto con sus colaboradores han establecido que, para el caso de los fármacos solubles en agua, se puede aumentar la encapsulación de la molécula de interés al saturar la disolución que se utiliza en la técnica de rehidratación de bicapa lipídica⁽⁸⁴⁾. El resultado de saturar la concentración de calcio es una mejora en la eficiencia de encapsulación de cisplatino (Figura 12) y en el radiomarcado con el ^{99m}Tc-MIBI (Figuras 14 y 15), debido a que se utiliza la ionomicina para encapsular el fármaco y que este ionóforo requiere calcio para realizar el intercambio de iones y por ende la encapsulación. Los resultados mostraron que la estabilidad de cisplatino encapsulado no se ve afectada (Figura 13), pero la estabilidad del radiomarcado si (Figura 16), observándose una caída del orden del 80 % del radiomarcado después de 24 h.

La encapsulación de cisplatino en el tiempo de pre-incubación es consecuencia de un proceso de acumulación pasiva⁽⁸⁵⁾, que es dependiente de la temperatura y concentración inicial de cisplatino a los que somete la suspensión liposomal. El incremento en la concentración de cisplatino después de la primera hora se atribuye a que la ionomicina inicia el intercambio de iones una vez que se incorpora a la membrana⁽⁶¹⁾; en consecuencia el máximo de encapsulación se alcanza rápidamente y no se ve modificado de manera importante a partir de ese tiempo. Los resultados del perfil de liberación, en plasma y en solución salina isotónica, confirmaron la estabilidad de la encapsulación de cisplatino en la formulación Ω (liberación del 20% durante las primeras 96 horas) similar a lo reportado en otros proyectos^(80, 86).

El aumento en la eficiencia de radiomarcado en los liposomas Ω , comparado con la formulación anterior (α), es debido a que la tasa de intercambio de la ionomicina es dependiente de la concentración de calcio, entre otras variables⁽⁸⁷⁾, y que los liposomas Ω tienen una mayor cantidad de este ion; además, se sabe que el ^{99m}Tc -MIBI es capaz de atravesar membranas lipídicas fácilmente sin importar su concentración o temperatura^(72, 73). En consecuencia, el proceso de radiomarcado sigue dos procesos, uno es atravesando pasivamente la membrana liposomal y el otro es mediante acarreo por la ionomicina. La inestabilidad del radiomarcado que se observa después de las primeras 8 horas se asocia con este carácter lipofílico del ^{99m}Tc -MIBI.

7.2. Farmacocinética sanguínea, parámetros farmacocinéticos y biodistribución de órganos

Los resultados de la cinética sanguínea de los liposomas radiomarcados indica que el ^{99m}Tc -MIBI se está liberando casi de inmediato del liposoma. Este hecho se confirma al comparar los parámetros farmacocinéticos (Tabla 9) donde no se observa diferencia estadísticamente significativa entre los liposomas radiomarcados y el ^{99m}Tc -MIBI. Considerando la composición de los liposomas⁽⁸⁶⁾, se esperaba que tanto el ABC como la $t_{1/2\beta}$ aumentaran considerablemente, mientras que Cl disminuyera. Los resultados del estudio de biodistribución en ratas por imagen molecular confirman lo observado en las farmacocinéticas. Estos resultados indican que la técnica de radiomarcado de liposomas con ^{99m}Tc -MIBI mediante ionomicina no es estable *in vivo*.

7.3. Biodistribución en modelo tumoral en ratones

Los estudios de imagen molecular en el modelo tumoral en ratones (Figura 21) muestran el mismo comportamiento de biodistribución que se observó en las ratas. Las imágenes mostraron mínima acumulación del sistema ^{99m}Tc -MIBI-Liposomal en el volumen tumoral. La inestabilidad del radiomarcado se confirma al observar

una gran acumulación de radiactividad en corazón y en estómago (Figura 22) que son órganos en los que se acumula de manera directa el $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ ⁽⁷³⁾.

El estudio de cuantificación de cisplatino en tumor (Tabla 10) confirmó que el $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ no se encuentra conjugado a los liposomas, y su biodistribución es diferente a la del liposoma con cisplatino. Es bien conocido que el cisplatino convencional es eliminado al poco tiempo de ser inyectado⁽⁸⁶⁾, por lo que la cantidad de cisplatino encontrada en el tumor es debido a la acumulación de los liposomas.

El desacoplamiento del $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ del liposoma puede ser resultado de la naturaleza lipofílica del $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, que le permite atravesar membranas lipídica de manera pasiva, y a la alta eficiencia de encapsulación que se logró con la ionomicina, que satura el interior acuoso del liposoma aumentando la posibilidad de que el $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ interaccione con la membrana y se libere del liposoma. Otra posibilidad es que la ionomicina se integra permanentemente en la membrana del liposoma y promueva un intercambio de iones que permita el acarreo de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ encapsulado hacia afuera del liposoma. Se propone realizar otras pruebas de estabilidad para confirmar esta hipótesis.

8. Conclusiones

De igual manera, se realizó la optimización de encapsulación de cisplatino y ^{99m}Tc -MIBI al aumentar su porcentaje encapsulado en el liposoma. Es a partir de esta formulación que se realizó la farmacocinética y biodistribución del sistema ^{99m}Tc -MIBI-Liposomal en ratas sanas Wistar y la distribución tumoral de dicho sistema liposomal en un xenotransplante de cáncer cervicouterino HeLa en ratones nu/nu. Con ello se observó que el radiomarcado no es estable *in vivo* puesto que las curvas de farmacocinética y la comparación de la biodistribución del sistema liposomal radiomarcado y el radiofármaco sumamente similares.

9. Bibliografía

1. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. J Mol Biol 1965;13:238-52.

-
2. Bangham AD, Papahadjopoulos D. Biophysical properties of phospholipids. I. Interaction of phosphatidylserine monolayers with metal ions. *Biochimica et biophysica acta*. 1966;126:181-4.
 3. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC, Weissmann G. The diffusion of ions from a phospholipid model membrane system. *Protoplasma*. 1967;63:183-7.
 4. Bangham AD. Membrane models with phospholipids. *Prog Biophys Mol Biol*. 1968;18:29-95.
 5. Bangham AD, Bangham DR. Very long-range structuring of liquids, including water, at solid surfaces. *Nature*. 1968;219:1151-2.
 6. Bangham AD. Model Membranes. *CHEM PHYS LIPIDS*. 1972;8:386-92.
 7. Bangham AD. Lipid bilayers and biomembranes. *Annu Rev Biochem*. 1972;41:753-76.
 8. Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *NEJM*. 1976;295:704-10.
 9. Gregoriadis G. Immunological adjuvants. A role for liposomes. *Immunol Today*. 1990;11(3):89-97.
 10. Alving CR. Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J Immunol Methods*. 1991;140:1-13.
 11. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(2):145-60.
 12. Phillips WT, Goins BA, Bao A. Radioactive liposomes. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009;1:63-83.
 13. Laverman P, Boerman OC, Storm G. Radiolabeling of Liposomes for Scintigraphic Imaging. *Methods Enzymol*. 2003;373:234-48.
 14. Ochoa EYC. Radiomarcado de un sistema de cisplatino-liposomal con Tc-99M, utilizando un potencial transmembranal a través del ionóforo ionomicina [Licenciatura]. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
 15. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *AJPS*. 2015;10(2):81-98.

-
16. Walde P, Namani T, Morigaki K, Hauser H. Formation and Properties of Fatty Acid Vesicles (Liposomes). In: Gregoriadis G, editor. Liposome Technology. Volume 1. U.S.A.: Informa Healthcare; 2007. p. 1-17.
 17. D. B. Liposome in gene delivery. U.S.A.: CRC Press; 1997.
 18. Storm G, Wilms HP, Crommelin DJA. Liposomes and biotherapeutics. *Biotherapy*. 1991;3:25-42.
 19. DRUMMOND DC, MEYER O, HONG K, KIRPOTIN DB, PAPAHA DJOPOULOS D. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1999;51(4):691 - 743.
 20. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in pharmacological sciences*. 2009;30(11):592-9.
 21. P. TV, Volkmar. W. Liposomes. 2 ed. ed. Boston M.A. U.S.A.: Oxford; 2003.
 22. Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Curr Drug Deliv*. 2007;4:297-305.
 23. Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems. A review. *Pharm Acta Helv*. 1995;70:95-111.
 24. Adam-Day S. A Level Notes U. S. A. : Inmotion Hosting; 2015 [updated 2015; cited 2015 02/01/2016]. Available from: <http://alevelnotes.com/>;
[http://alevelnotes.com/Biological-Membranes/128?tree=.](http://alevelnotes.com/Biological-Membranes/128?tree=)
 25. Lee SC, Lee KE, Kim JJ, Lim SH. The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated Retinol. *Journal of liposome research*. 2005;15(3-4):157-66.
 26. McIntosh TJ. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et biophysica acta*. 1978;513:43-58.
 27. Childs GV. Membrane Structure and Function U.S.A.: htm; 1995 [updated 07/19/01; cited 2016 02/01/2016]. Available from:
http://cellbio.utmb.edu/cellbio/membrane_intro.htm;
<http://163.178.103.176/tema1g/grupos1/germant1/gatp3/membrana3.htm>.
-

-
28. Allen TM, Chonn A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS J.* 1987;223(1):42-6.
 29. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews.* 2013;65(1):36-48.
 30. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery. Progress and limitations. *Int J Pharm.* 1997;154:123-40.
 31. DRUMMOND DC, MEYER O, HONG K, KIRPOTIN DB, PAPAHA DJOPOULOS D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 1999;51(4):691-743.
 32. Grit M, Crommelin DJA. Chemical stability of liposomes. Implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids.* 1993;64:3-18.
 33. HUNT CA, TSANG S. Alpha-Tocopherol Retards Autoxidation and Prolongs the Shelf Life of Liposomes. *Int J Pharm.* 1981;8:101-10.
 34. Fukuzawa K, Inokama Y, Tokumura A, Terao J, Suzuki A. Rate constants for quenching singlet and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and alpha-tocopherol in liposomes. *Lipids.* 1998;33:751-6.
 35. Kagan VE, Bakalova RA, Zhelev ZZ, Rangelova DS, Serbinova EA, Tyurin VA, et al. Intermembrane Transfer and Antioxidant Action of Alpha-Tocopherol in Liposomes. *Arch Biochem Biophys.* 1990;280(1):147-52.
 36. FUKUZAWA K, IKEBATA W, SOHMI K. Location, antioxidant and recycling dynamics of alpha-tocopherol in liposome membranes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1993;39(Supplement P):S9-S22.
 37. Garg T, Goyal AK. Liposomes: Targeted and Controlled Delivery System. *Drug Deliv Lett.* 2014;4:62-71.
 38. Çağdaş M, Sezer AD, Bucak S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. *INTECH.* 2014:1-50.
 39. Antimisiaris SG, Kallinteri P, Fatouros DG. Liposomes and drug delivery. In: Gad SC, editor. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook Production and Processes.* First Edition ed. USA: WILEY & SONS; 2008. p. 443- 533.

-
- 40.Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012;1(2):147-68.
- 41.Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(102):1-9.
- 42.Balazs DA, Godbey W. Liposomes for use in gene delivery. *Journal of drug delivery.* 2011;2011:326497.
- 43.MacLachlan I. Liposome Formulations for Nucleic Acid Delivery. In: Crooke St, editor. *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications.* 2 ed. ed. U.S.A: CRC Press; 2007. p. 237 - 70.
- 44.Zuidam NJ, Vrueth Rd, Crommelin DJA. Characterization of liposomes In: Torchilin VP, Weissig V, editors. *Liposomes.* Second Edition ed. Great Britain OXFORD UNIVERSITY PRESS; 2003. p. 31-78.
- 45.Acevedo LM. Evaluación fisicoquímica de formulaciones liposomales de Doxorubicina [Licenciatura]. México, D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
- 46.Franzen U, Ostergaard J. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography A.* 2012;1267:32-44.
- 47.Krlchens S, Ramaswami V, Birgenheier J, Nett L, O'Brien DF. Quasi-elastic light scattering determination of the size distribution of extruded vesicles. *Chem Phys Lipids.* 1993;65:1-10.
- 48.Pecora R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J Nanopart Res.* 2000;2:123-31.
- 49.Xu R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology.* 2008;6(2):112-5.
- 50.Goff JR, Luner P. Measurement of colloid mobility by laser doppler electrophoresis: the effect of salt concentration on particle mobility. *J Colloid Interface Sci.* 1983;99(2):468-83.
-

-
51. J.C. S. Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. *Anal Biochem.* 1980;104:10-4.
52. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974;20(4):470-5.
53. Kessler G, Wolfman M. An Automated Procedure for the Simultaneous Determination of Calcium and Phosphorus. *Clin Chem.* 1964;10(8):686-706.
54. Lopez-Flores A, Jurado R, Garcia-Lopez P. A high-performance liquid chromatographic assay for determination of cisplatin in plasma, cancer cell, and tumor samples. *Journal of pharmacological and toxicological methods.* 2005;52(3):366-72.
55. ANDREWS PA, WUNG WE, HOWELL SB. A High-Performance Liquid Chromatographic Assay with Improved Selectivity for Cisplatin and Active Platinum (II) Complexes in Plasma Ultrafiltrate. *Anal Biochem.* 1984;143:46-56.
56. Petersen AL, Hansen AE, Gabizon A, Andresen TL. Liposome imaging agents in personalized medicine. *Advanced drug delivery reviews.* 2012;64(13):1417-35.
57. McNaught AD, Wilkinson A. *Compendium of Chemical Terminology: IUPAC Recommendations.* 2, illustrated ed: Blackwell Science; 1997.
58. Bakker E, Bühlmann P, Pretsch E. Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics. *Chem Rev.* 1997;97:3083-132.
59. Reed PW. Ionophores. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology Biomembranes Part F: Bioenergetics-Oxidative Phosphorylation LV.* United Kingdom: ACADEMIC PRESS; 1979. p. 435-54.
60. Bühlmann P, Pretsch E, Bakker E. Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors. *Chemical Reviews.* 1998;98:1593-687.
61. Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR. Ca²⁺ Transport Properties of Ionophores A23187, Ionomycin, and 4-BrA23197 in a Well Defined Model System. *Biophys J.* 1994;66:1678-93.
62. BRIANZA M. MEMBRANA CELULAR México: Blogger.com; 2010 [updated 11/19/2010; cited 2016 02/01/2016]. Available from: <http://biocelmembrana.blogspot.mx/>.
-

-
63. Hladky SB, Haydon DA. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1972;274(2):294-312.
64. Liu C-m, Hermann TE. Characterization of Ionomycin as a Calcium Ionophore. *J Biol Chem*. 1978;253(17):5892-4.
65. WC L, DS S, G A, WH T, WE B, E. M. Ionomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot* 1978;31:815-9.
66. Hanessian S, Cooke NG, DeHoff B, Sakito Y. The total synthesis of (+)-ionomycin. *J Am Chem Soc*. 1990;112:5276-90.
67. Beeler TJ, Jona I, Martonosi A. The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J Biol Chem*. 1979;254(14):6229-31.
68. Kao JP. Practical aspects of measuring $[Ca^{2+}]$ with fluorescent indicators. In: Nuccitelli R, editor. *Methods Cell Biol*. 40. U.S.A: Elsevier; 1994. p. 155-81.
69. Miyake H, Hara I, Arakawa S, Kamidono S. Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem*. 2000;77:396-408.
70. K.M. A-T, D.F. J. Differential activation of a calcium-dependent endonuclease in human B lymphocytes. Role in ionomycin-induced apoptosis. *J Immunol Methods*. 1995;7:3297-307.
71. P.W. R, L.P. SF. Ionophores. In: Fleischer S, editor. *Methods in Enzymology*. 55. U.S.A.: ACADEMIC PRESS; 1979. p. 435-54.
72. Rakiás F, Zolle I. ^{99m}Tc -Labeled Myocardial Perfusion Agents. In: Zolle I, editor. *Technetium-99m Pharmaceuticals Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*. 1 ed ed. Germany: Springer; 2007. p. 7-20, 237-44.
73. F.J. W, D.S. B, J. M, D.D. W, G.A. B, H.W. S, et al. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med*. 1989;30(3):301-11.
-

-
74. Belhaj-Tayeb H, Briane D, Vergote J, Kothan S, Leger G, Bendada SE, et al. In vitro and in vivo study of ^{99m}Tc -MIBI encapsulated in PEG-liposomes: a promising radiotracer for tumour imaging. *EJNMMI*. 2003;30(4):502-9.
75. Saha GB. Radiopharmaceuticals and Methods of Radiolabeling In: Saha GB, editor. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. Sixth Edition ed. U.S.A.: Springer; 2010. p. 83-114.
76. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(9):645-58.
77. MSc MA, DVSc AMD, MSc MH, BSc NS-K, DVM SR, DVSc SAD, et al. HeLa Cell Line Xenograft Tumor as a Suitable Cervical Cancer Model: Growth Kinetic Characterization and Immunohistochemistry Array. *Arch Iran Med*. 2014;17(4):273-7.
78. Ávila-Rodríguez MA, Alva-Sánchez H. Radiofármacos para PET, una nueva perspectiva de la medicina nuclear molecular en México. *MIR*. 2010;V(3):103-10.
79. Ferro-Flores G, Murphy CA. Current developments in SPECT-CT systems using ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. *REV INVEST CLIN*. 2007;59(5):373-81.
80. Becerra HV. Elaboración y caracterización de una formulación liposomal para la co-encapsulación de doxorubicina y 5-fluorouracilo [Investigación]. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
81. Debandi MV, François NJ, Daraio ME. Evaluation of different membranes for in vitro release of anticellulitic actives. *Av Cienc Ing* 2011;2(2):97-105.
82. Llaguno-Munive M, Medina LA, Jurado R, Romero-Pina M, Garcia-Lopez P. Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts. *Cancer cell international*. 2013;13(1):29-36.
83. Roldán-Valadez E, Vega-González I, Valdivieso-Cárdenas G, Rumoroso-García A, Morales-Santillán O, Osorio-Cardiel L. Conceptos básicos del ^{18}F -FDG PET-CT. Definición y variantes normales. *Gac Med Mex*. 2008;144(2):137-46.
84. MAYER LD, BALLY MB, HOPE MJ, CULLIS PR. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chem Phys Lipids* 1986;40:333-45.
85. Woo J, Chiu GN, Karlsson G, Wasan E, Ickenstein L, Edwards K, et al. Use of a passive equilibration methodology to encapsulate cisplatin into preformed
-

thermosensitive liposomes. International journal of pharmaceutics. 2008;349(1-2):38-46.

86.Córdova AT. Elaboración y caracterización farmacocinética de una formulación liposomal de cisplatino [Investigación]. México, D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco; 2010.

87.Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR. Effects of pH conditions on Ca²⁺ transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin. Biophys J. 1995;69:2350-63.