



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**FUNDAMENTOS E INNOVACIÓN DE SISTEMAS LIPOSOMALES
APLICADOS A LA LIBERACIÓN MODIFICADA DE FÁRMACOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARÍA JOSÉ RIVERO TREVIÑO



MÉXICO, CD. MX.

AÑO 2017



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: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

VOCAL: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

SECRETARIO: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON

1ER. SUPLENTE: CARLOS JUAREZ OSORNIO

2° SUPLENTE: LUZ ANTONIA BORJA CALDERON

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

SISTEMA HEMEROGRÁFICO DE LA UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Viridiana Gisela Llera Rojas

SUSTENTANTE

María José Rivero Treviño

Índice general

Abreviaturas	6
Índice de figuras.....	6
Índice de tablas	8
Justificación	9
Objetivos.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos particulares.....	11
1. Antecedentes	12
1.1 Sistemas de autoensamble	12
1.2 Liposomas: origen y clasificación	16
1.3 Materiales utilizados para la fabricación de liposomas	19
1.3.1 Fosfolípidos	19
1.3.2 Colesterol	22
1.4 Formación y estabilidad del sistema liposomal.....	25
2. Métodos de Fabricación.....	26
2.1 Hidratación de película fina (Thin film hydration)	27
2.2 Evaporación de Fase Reversa	28
2.3 Inyección de disolvente	29
2.3.1 Éter- Inyección de disolvente	29
2.3.2 Etanol- Inyección de disolvente	29
2.4 Eliminación de Tensoactivo.....	30
2.5 Deshidratación-Rehidratación	30
2.6 Microfluídica para la producción de Liposomas	31
2.6.1 Microfluídica de enfoque hidrodinámico (MHF).....	31
2.7 Preparación de liposomas utilizando un contactor de membrana.....	32
2.8 Disminución de tamaño de partícula.	37
2.8.1 Sonicación	37
2.8.2 Extrusión.....	37
2.8.3 Homogenización	37
2.9 Purificación.....	38
2.9.1 Filtración en columna –Cromatografía de exclusión molecular	38
2.9.2 Centrifugación.....	38

2.9.2.1	Centrifugación diferencial	38
2.9.2.2	Centrifugación con gradiente de densidad	39
2.9.2.3	Centrifugación de tamiz molecular	40
2.9.3	Liofilización	40
3.	Métodos de Caracterización	42
3.1	Tamaño y distribución de partículas	42
3.1.1	Dispersión dinámica de luz	42
3.2	Propiedades de la superficie	45
3.2.1	Potencial Zeta (ζ).....	46
3.3	Morfología.....	49
3.3.1	Microscopía electrónica EM.....	49
3.3.1.1	Microscopía de transmisión de electrones TEM	49
3.3.1.2	Microscopía electrónica de barrido SEM	50
3.3.2	Preparación de muestra.....	50
3.3.2.1	Fractura por Congelación	50
3.3.2.2	Tinción negativa	51
3.3.2.3	Criofijación	51
3.4	Calorimetría.....	51
3.4.1	Calorimetría diferencial de barrido DSC.....	52
3.5	Material encapsulado	54
3.6	Densidad.....	56
4.	Funcionalización	57
4.1	Liposomas con respuesta a un estímulo	58
4.1.1	Estímulos químicos.....	59
4.1.1.1	Liposomas sensibles a cambios de pH.....	59
4.1.1.2	Liposomas sensibles a cambios redox	63
4.1.1.3	Liposomas con respuesta enzimática.....	67
4.1.2	Estímulos físicos.....	70
4.1.2.1	Liposomas termosensibles	70
4.1.2.1.1	Liposomas Termosensibles Tradicionales TTSL	72
4.1.2.1.2	Liposomas Termosensibles que contienen Lisofosfolípidos LTSL..	73
4.1.2.1.3	Liposomas Termosensibles modificados con Polímeros PTLS.....	74
4.1.2.2	Magnetoliposomas	78

4.1.2.3	Liposomas ecogénicos o sónicamente activos	81
4.2	Inmunoliposomas	86
4.2.1	Inmunoliposoma Anti-HER2: Tratamiento de Cáncer de Mama.	92
4.2.2	Inmunoliposoma Anti-CD4: Tratamiento de VIH.....	96
4.3	Liposomas asociados con polímeros.....	97
4.3.1	PEGilación.....	97
4.3.2	Bioadherencia.....	103
	Perspectivas	108
	Conclusiones.....	110
	Bibliografía	111

Abreviaturas

%EE	Eficiencia de encapsulación
ABC	Fenómeno de eliminación acelerada en sangre
Apr	N-acriloilpirrolidina
CHEMS	Hemisuccinato de colesterol
CMT	Temperatura Micelar Crítica
COL	Colesterol
COL-SS-mPEG	Colesterol-disulfuro-metoxipolietilenglicol
CS	Chitosan
DMAMA	N,N-dimetilacrilamida
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPE	Dipalmitoilfosfatidiletanolamina
DPPG	Dipalmitoilfosfatidilglicerol
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DSPC	Disteroilfosfatidilcolina
DSPE	Disteroilfosfatidiletanolamina
EDL	Doble capa eléctrica
EM	Micsroscopía electrónica
EOEOVE	(2-etoxi)etoxietil vinil éter
EPC	Fosfatidilcolina de huevo
EPR	Permeabilidad y retención aumentada
Fab	Fracción de unión a antígeno
Fc	Fracción cristalizable
FL	Fosfolípido
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
HSPC	Fosfatidilcolina hidrogenada de soya
IC ₅₀	Concentración de inhibición media
IL	Inmunoliposomas
LCST	Temperatura de solución crítica baja
LE	Liposomas ecogénicos
LF-AMF	Campos magnéticos alternos de baja frecuencia
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
LTSL	Liposomas termosensibles que contienen lisofosfolípidos
LUVs	Vesículas unilaminares grandes
MAL	Melamida

ML	Magnetoliposomas
MLV	Vesículas multilaminares
MMP	Metaloproteinasas de matriz
Mpeg-SS-DOPE	Metoxipolietilenglicol-disulfuro-dioleilfosfatidiletanolamina
MPPC	Miristoilpalmitoilfosfatidilcolina
MVV	Vesículas multivesiculares
NP	Nanopartículas
OA	N-palmitoil homocisteína
ODVE	octadecil vinil éter
p(HPMA)	N-(2-hidroxipropil) metacrilamida
p(NIPMAM)	N-isopropilmetacrilamida
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenglicol
PEO	polietileno
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PPO	Óxido de propileno
PS	Fosfatidilserina
PTLS	Liposomas termosensibles modificados con polimeros
R-COOH	Ácido graso
SAMSA	Anhídrido S-acetilmercaptosuccinico
SATP	Succinimidil acetiltiopropianato
scFv	Fragmento variable monocatenario
SFM	Sistema fagocitico mononuclear
SPDP	N-succinimidil 3-(2-piridilditiolpropianato)
SPION	Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro
sPLA2	Fosfalipasa secretora A2
SPM	Esfingomielina
SUVs	Vesículas unilaminares pequeñas
Tm	Temperatura de Transición
TTSL	Liposomas termosensibles tradicionales
US	Ultrasonido

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de los bloques de construcción y las fuerzas de atracción y repulsión involucradas durante el proceso de autoensamble. (Modificado de: Lee Y.S., 2012).....	13
Figura 2. Diagrama del parámetro crítico de empaquetamiento. (Modificado de: Khalil R.A., Zarari A.A., 2014).	14
Figura 3. Diagrama de un liposoma (Creación propia).....	17
Figura 4. Clasificación de liposoma por tamaño y laminaridad. (Modificado de: Elizondo E., et al., 2011)	18
Figura 5. Esquema de la asociación de moléculas con el liposoma. (Modificado de: Elizondo E., et al., 2011).	19
Figura 6. Estructura general de los glicerofosfolípidos. (Modificado de: Nogueira E., Gomes A., et al. 2015)	20
Figura 7. Estructura química del Colesterol. Creación propia.	23
Figura 8. Esquema de la interacción entre el colesterol y fosfolípidos. (Modificado de Briuglia M., Rotella C., et al. 2015).	24
Figura 9. Formación de MLV's utilizando el método de hidratación de película fina. (Modificado de Dua. J.S, 2012).	28
Figura 10. Formación de SUV's utilizando el método de inyección de disolvente. (Modificado de: Carugo D., Bottaro E., et al., 2016).	30
Figura 11. Esquema del proceso de formación de liposomas por el método de Microfluídica de enfoque hidrodinámico (MHF). (Modificado de: Carugo D., Bottaro E., et al., 2016).	32
Figura 12. Esquema de la preparación de liposomas utilizando un contactor de membrana. (Modificado de: Jaafar-Maalej C., et al., 2011).	33
Figura 13. Intensidad de señal y decaimiento de la función de autocorrelación de partículas dependiendo del diámetro. (Modificado de: Nano Search Facility; Dynamic Light Scattering.)	44
Figura 14. Representación esquemática del Potencial zeta. (Modificado de: Elizondo E., et al., 2011).	47
Figura 15. Curva DSC. Creación propia.	53
Figura 16. Representación esquemática de algunas modificaciones que pueden llevarse a cabo en el liposoma: (a) Polímero de protección o sensibles a la temperatura, (b) lípidos sensibles a la temperatura, (c) conjugación con péptido, (d) conjugación con componentes virales, (e) anticuerpo, (f) Polímero conjugado con anticuerpo, (g) asociación con ADN, (h) fosfolípidos con carga, (i) fármacos hidrofílicos, (j) partículas magnéticas, (k) agentes de contraste. (Modificado de Elizondo E., et al., 2011).	58
Figura 17. Estabilizadores lipídicos sensibles a pH. (Modificado de Ferreira D.S., et al., 2013).....	61
Figura 18. Esquema del mecanismo de acción de la liberación de material liposomas formulados con DOPE y CHEMS. (Modificado de: Fan Y., et al., 2016; Ferreira D.S., et al., 2013).	62

Figura 19. Esquema de liberación de material encapsulado por polímeros sensibles a cambios de pH. (Modificado de: Ferreira D.S., et al., 2013)	63
Figura 20. Mecanismo de liberación del material encapsulado con conjugados Quinona-DOPE. (Modificado de: Ong W., 2008).....	66
Figura 21. Mecanismo de acción de TTSL, LSTL, y PTLs. (Modificado de Ta T., Porter T.M., 2013).....	77
Figura 22. Esquema de la cavitación estable y la cavitación inercial. (Modificado de Boissenot T., et al., 2016).....	84
Figura 23. Esquematación de los tipos de liposomas ecogénicos. (Modificado de Huang S., 2008)	86
Figura 24. Esquema de la estructura de inmunoglobulina IgG. (Modificado de Manjappa A., et al., 2010).....	87
Figura 25. Representación de los tipos de inmunoliposomas. (Modificado de Kozłowska D., et al., 2009).....	89
Figura 26. Mecanismo de la generación del grupo sulfhidrilo en el anticuerpo utilizando el reactivo de Traut y la conjugación con el liposoma a través del enlace covalente con PEG-melamida. (Modificado de Modificado de Manjappa A., et al., 2010).	91
Figura 27. Estructura química del polietilenglicol (PEG), PEG metoxilado y la conjugación de este con Disteroil fosfatidiletanolamina (DSPE). (Modificado de; Immordino M.L., et al., 2006).....	99
Figura 28. Representación de un liposoma PEGilado, y la barrera física que genera evitando la interacción de opsoninas con la superficie del liposoma. (Modificado de Barenholz Y., 2012).....	100
Figura 29. Estructura química del quitosán.	105
Figura 30. Representación de un liposoma recubierto con quitosán. (Modificado de Alavi S., 2016).....	106

Índice de tablas

Tabla 1. Geometría y estructuras que adoptan y construyen los fosfolípidos dependiendo del valor del parámetro crítico de empaquetamiento.....	15
Tabla 2. Diferencias entre FL de fuente vegetal (Soja) y animal (yema de huevo).....	21
Tabla 3. Factores que afectan la T _m de los Fosfolípidos.	22
Tabla 4. Ventajas y desventajas de algunos métodos de producción de sistemas liposomales, así como el tipo de vesículas que producen.	35
Tabla 5. Técnicas de inducción de hipertermia leve.....	71

Justificación

Desde su descubrimiento, el estudio sobre los liposomas como sistema de liberación de fármacos ha ganado interés e importancia. Debido a su composición, los liposomas se consideran biocompatibles y biodegradables, lo que los hace óptimos para su uso en humanos y animales.

La principal atracción de los liposomas como sistemas nanoacarreadores para la administración de fármacos consiste en su capacidad para encapsular fármacos de naturaleza hidrofóbica e hidrofílica, ya que proporciona una solución para la administración de fármacos de baja solubilidad acuosa. Aunado a eso, el sistema tiene la capacidad de modificar algunos parámetros biofarmacéuticos de la molécula activa, entre estos, el índice terapéutico, biodisponibilidad y biodistribución. Además, es posible funcionalizar a los liposomas al modificar los componentes que lo conforman o modificando su superficie al conjugar ligandos de reconocimiento celular, moléculas que mejoran la penetración celular, o que prolongan el tiempo de circulación, así como otorgarle al sistema la capacidad de responder a estímulos endógenos y exógenos. Estas modificaciones ofrecen la oportunidad de liberar el componente activo de forma específica, selectiva y direccionada, reduciendo efectos secundarios asociados al fármaco y optimizando los efectos farmacológicos.

En 1995, se aprobó el primer sistema nanométrico con fines terapéuticos, Doxil[®], un sistema liposomal que encapsula doxorubicina para el tratamiento de cáncer ovárico. Dicho acontecimiento marcó la pauta para el desarrollo de nuevos y mejores sistemas liposomales. El desarrollo de liposomas se ha enfocado principalmente al tratamiento de cáncer, sin embargo, se han desarrollado sistemas para el tratamiento de infecciones fúngicas, vacunas, y terapia génica. Hoy en día, se comercializan 15 formulaciones basadas en sistemas liposomales y 28 se encuentran en estudios clínicos. [Bulbake U., 2017]

Los sistemas liposomales han demostrado gran potencial como sistemas de liberación modificada de fármacos, se han reportado diversas estrategias para optimizar la fabricación, caracterización y funcionalización del sistema. La revisión realizada a continuación pretende proporcionar al lector los fundamentos e innovación relacionados

con los aspectos mencionados, enfatizar el potencial del sistema como nanoacarreador de fármacos, así como proporcionar una fuente confiable de información.

Objetivos

Objetivo general

- Describir los fundamentos relacionados con los componentes, técnicas de fabricación y caracterización de sistemas liposomales aplicados a la liberación modificada de fármacos, así como exponer las ventajas otorgadas al sistema a partir de la funcionalización de los liposomas.

Objetivos particulares

- Identificar y describir los principales componentes de los liposomas.
- Identificar y describir los métodos de fabricación de liposomas utilizados con mayor frecuencia, así como las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.
- Describir los métodos de caracterización más utilizados y su importancia.
- Describir las ventajas de funcionalizar al sistema liposomal.
- Seleccionar y describir las técnicas de funcionalización más utilizadas, así como el mecanismo de liberación.

1. Antecedentes

1.1 Sistemas de autoensamble

La química supramolecular se dedica -entre otras cosas- a estudiar sistemas de autoensamble (*self-assembly systems*). El autoensamble se define como la formación espontánea de estructuras organizadas a través de un proceso estocástico, el cual involucra la asociación de unidades preexistentes (átomos, moléculas, fragmentos de moléculas). Es reversible y puede ser controlado a través del diseño de las unidades que lo constituyen, el ambiente en el cuál se lleva a cabo y la fuerza motriz que los genera [Pelesko J., 2007]. Las características de estas estructuras están determinadas por las características individuales de las moléculas que los conforman [Elizondo E., et al., 2011]. La formación de bicapas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos son ejemplos de dicho fenómeno.

Para que el ensamble pueda generarse, es necesario que ocurra un equilibrio de las fuerzas de atracción/repulsión entre los bloques de construcción (Figura 1) y posteriormente, mantengan un equilibrio termodinámico el cual les permita mantener integridad estructural y flexibilidad dinámica. El sistema debe permitir que los componentes se muevan libremente y puedan ajustarse a la estructura obtenida. [Lee Y.S., 2012]

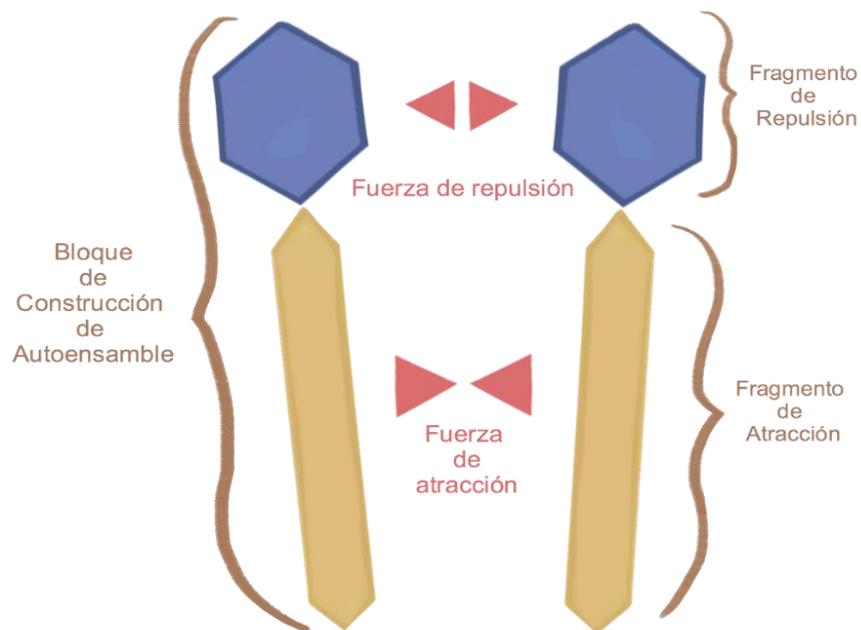


Figura 1. Esquema de los bloques de construcción y las fuerzas de atracción y repulsión involucradas durante el proceso de autoensamble. (Modificado de: Lee Y.S., 2012).

Las unidades de construcción de los sistemas de autoensamble deben tener la capacidad, por si mismos o bajo la influencia de cualquier tipo de fuerza externa, de ensamblarse. [Lee Y., 2012]. Al ensamblarse, las unidades presentan generalmente interacciones intermoleculares débiles tales como fuerzas de van der Waals, fuerzas de London, puentes de hidrógeno, efecto hidrofóbico, atracción y repulsión estérica e interacciones electrostáticas, sin embargo, pueden darse interacciones poco comunes como enlaces iónicos o covalentes. [Elizondo E., et al., 2011]

Las moléculas anfipáticas de diversa naturaleza (fosfolípidos (FL), tensoactivos y algunos polímeros) se caracterizan por estar formados por un fragmento polar o hidrofílico y un fragmento no-polar o hidrofóbico, debido a esta característica, las moléculas anfipáticas tienden a formar sistemas de autoensamble. El fragmento hidrofílico de los fosfolípidos está conformado por una molécula de glicerol, la cual está unida por uno de sus carbonos a un grupo fosfato mediante un enlace fosfodiéster, y este a su vez puede estar unido a otras moléculas. El fragmento hidrofóbico se conforma por dos cadenas de ácido graso unidas por un enlace éster a la molécula de glicerol previamente mencionada [Fox S., 2011]

Los fosfolípidos se singularizan por tener la capacidad de formar diversas estructuras organizadas tanto en su forma sólida como cuando se encuentran dispersos en agua o medios acuosos. [Borrel J. H., et al., 2016] La conformación que adoptan en medio acuoso los diversos tipos de fosfolípidos depende del tamaño relativo entre la cabeza polar y las cadenas no polares (Figura 2), por lo que la conformación que pueden adoptar estas moléculas depende de la naturaleza química y la geometría que tengan [Elizondo E., et al., 2011]. El parámetro crítico de empaquetamiento, desarrollado por Israelachvili en 1976, predice la estructura que pueden adoptar los fosfolípidos en medio acuoso a partir de la siguiente ecuación. [Pelesko J., 2007, Elizondo E., et al., 2011; Khalil R.A., Zarari A.A., 2014]

$$P = \frac{v}{a_0 l_c} \quad \text{ecuación (1)}$$

Donde:

v: Volumen hidrofóbico

a_0 : Área superficial ocupada por la cabeza polar

l_c : Longitud máxima de la cadena hidrocarbonada

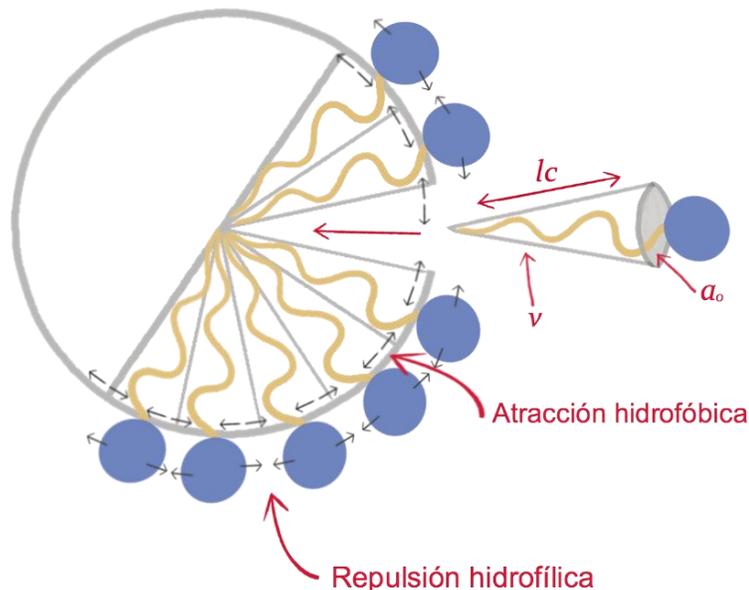
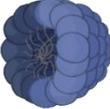
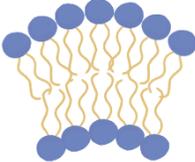
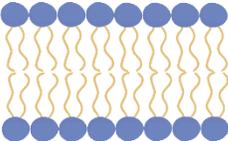
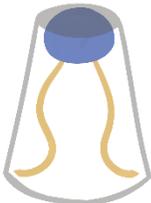
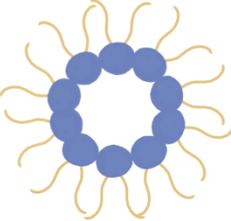


Figura 2. Diagrama del parámetro crítico de empaquetamiento. (Modificado de: Khalil R.A., Zarari A.A., 2014).

En la Tabla 1 se muestra la forma geométrica y la estructura que pueden adoptar y construir los fosfolípidos dependiendo del valor obtenido del parámetro crítico de empaquetamiento.

Tabla 1. Geometría y estructuras que adoptan y construyen los fosfolípidos dependiendo del valor del parámetro crítico de empaquetamiento.

Parámetro de empaquetamiento	Geometría	Estructura adoptada	Ejemplo Fosfolípidos
$1/3 < p$	Cono 	Micelas esféricas 	LCP, LPE R-COOH
$1/3 \leq p < 1/2$		Micelas cilíndricas 	
$1/2 \leq p < 1$	Cono truncado 	Vesículas, bicapas flexibles 	PC, PS, PG, PI, PA, SPM
$p = 1$	Cilindro 	Bicapas planas 	PE, PS- Ca ²⁺
$p > 1$	Cono truncado invertido 	Micela invertida 	PE-insaturado PA-Ca ²⁺

1.2 Liposomas: origen y clasificación

A mediados de la década de los sesenta, Alec Bragham y su grupo de investigación del Consejo de Investigación Agrícola del Instituto de Fisiología Animal (Brabaham, Cambridge) observaron, utilizando microscopía electrónica, la tinción con ácido fosfotúngstico de dispersiones de fosfatidilcolina (lecitina) y la mezcla de ésta con colesterol en agua. Se percataron que la dispersión de estas moléculas generaba pequeñas y grandes estructuras las cuales denominaron “esferulitas” y que éstas se producían por agitación manual o por sonicación, esta última técnica producía mayor cantidad de esferulitas pequeñas. Las esferulitas presentaban una estructura lamelar, con una capa lipídica de 44.2 Å y una capa de agua de 25.6 Å. Fue en 1967, a partir del estudio de la difusión de cationes y aniones monovalentes a través de las esferulitas, que Bragham et al. publicaron que se trataba de una bicapa lipídica que rodeaba un núcleo acuoso, estructura que más tarde llamaron “liposoma”. [Düzgünes N., Gregoriadis G., 2005]

Los liposomas se definen como nano/micropartículas vesiculares constituidas por una o varias bicapas lipídicas que envuelven una fase acuosa y que puede encontrarse entre capas también (Figura 3). La bicapa lipídica está conformada, principalmente, por fosfolípidos de doble cadena catiónicos, aniónicos o neutros, naturales o sintéticos. [Bilia A.R., et al., 2015; Dou Y. et al., 2017; Van der Meel R. et al., 2014; Akbarzadeh A., et al., 2013; Torchilin V., 2005; Sercombe L., et al., 2015] Debido a su naturaleza anfipática, estas moléculas se autoensamblan al dispersarse en medios acuosos, asociando los fragmentos hidrofóbicos de las moléculas con la finalidad de evitar el ambiente acuoso y exponiendo los fragmentos hidrofílicos, a dicho fenómeno se le conoce como efecto hidrofóbico. [Borrell J., et al. 2016]

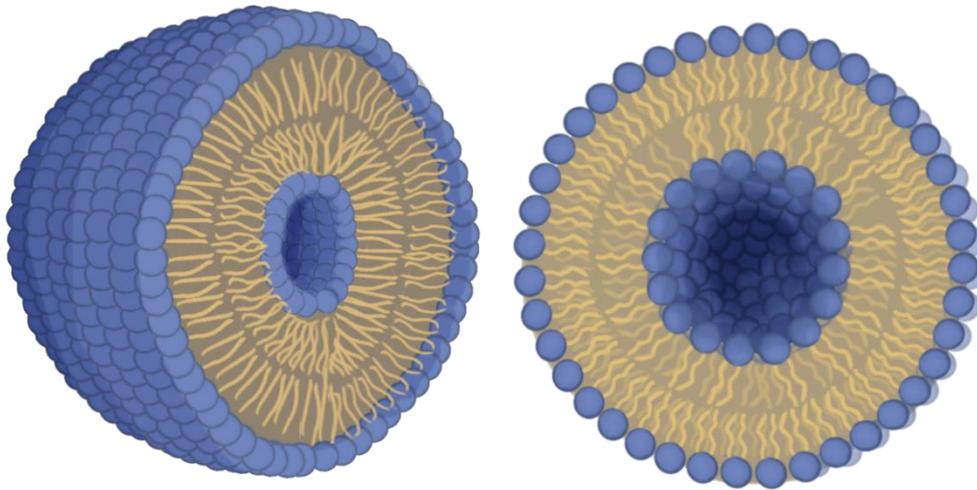


Figura 3. Diagrama de un liposoma (Creación propia).

Los liposomas se clasifican de acuerdo con su tamaño y laminaridad (Figura 4), este último se refiere al número de bicapas lipídicas concéntricas que contiene una vesícula. De acuerdo con la literatura, el tamaño mínimo de un liposoma es de aproximadamente 30 nm debido a que el empaquetamiento de los lípidos se ve limitado por la geometría curva de los liposomas, [van der Meel, R. et al. 2014], alcanzando un tamaño máximo de alrededor de 5 μm . [Torchilin V. 2005] En cuanto a su laminaridad, los liposomas se clasifican en tres categorías principales: Vesículas Unilaminares, Vesículas Multilaminares y Vesículas Multivesiculares. Las vesículas unilaminares se conforman por una bicapa lipídica y un núcleo acuoso. Dentro de esta categoría los liposomas se sub-clasifican en Vesículas Unilaminares Pequeñas (SUV's por sus siglas en inglés: *Small Unilamellar Vesicles*) las cuales presentan un intervalo de diámetro (D) entre $100 \text{ nm} \geq D \geq 30 \text{ nm}$, y Vesículas Unilaminares Grandes (LUV's por sus siglas en inglés: *Large Unilamellar Vesicles*) las cuales se encuentran en un intervalo de $100 \text{ nm} < D \leq 2.5 \mu\text{m}$. Las Vesículas Multilaminares (MLV por sus siglas en inglés: *Multilamellar Vesicle*) se conforman por dos o más bicapas lipídicas formando esferas concéntricas las cuales usualmente están separadas por regiones acuosas y presentan un diámetro entre $500 \text{ nm} \leq D \leq 5 \mu\text{m}$ [Torchilin V. 2005] mientras que las Vesículas Multivesiculares (MVV por sus siglas en inglés: *Multivesicular Vesicle*) se componen por dos o más vesículas

unilaminares dentro de una misma vesícula. [Hermanson G., 2013; Elizondo E., et al., 2011; Kim S. 1983]

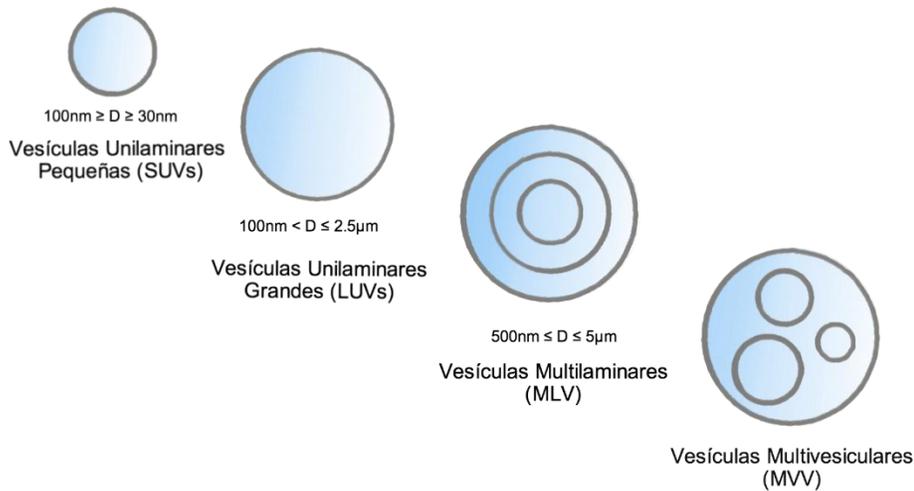


Figura 4. Clasificación de liposoma por tamaño y laminaridad. (Modificado de: Elizondo E., et al., 2011)

Desde su descubrimiento, los sistemas liposomales han sido estudiados y aplicados en el área clínica, tanto en el tratamiento como en el diagnóstico de enfermedades. Su potencial como sistemas de liberación modificada de fármacos y productos biotecnológicos se debe, primeramente, a la composición anfipática de las vesículas lo que les proporciona la capacidad de retener especies hidrofílicas dentro del núcleo acuoso, hidrofóbicas en los dominios lipídicos de la bicapa, y moléculas con carga asociadas a la bicapa ya sea dentro o fuera del liposoma, aunado a esto, la naturaleza de sus componentes los hace biocompatibles [Sercombe L., et al., 2015]. Además de proteger al fármaco del medio exterior, evitan la inactivación mejorando la biodisponibilidad y reduciendo la toxicidad del mismo. La composición lipídica, tamaño, laminaridad, carga y moléculas de superficie (ligandos, polímeros, anticuerpos, entre otros) de los liposomas pueden ser modificados (Figura 5) durante o después de su fabricación, dichas alteraciones mejoran la estabilidad, permiten la liberación modificada, brindan la oportunidad de controlar el sitio y cinética de liberación, mejoran la penetración celular y prolongan el tiempo de circulación. [Elizondo E., et al., 2011; Torchilin V., 2005]

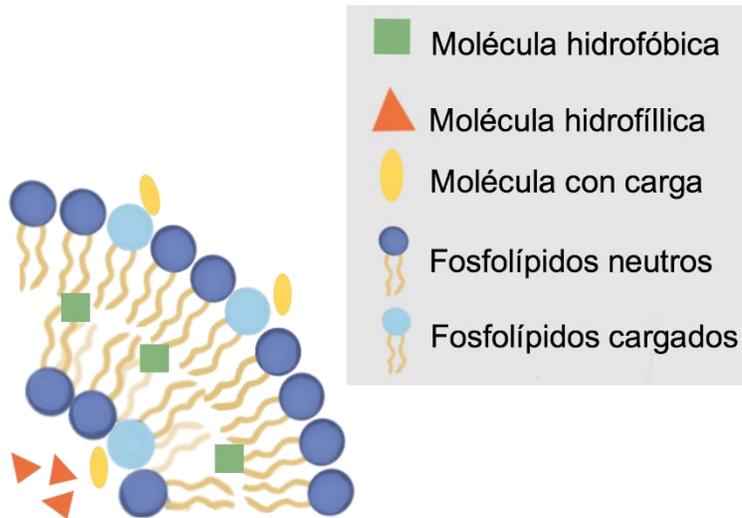


Figura 5. Esquema de la asociación de moléculas con el liposoma. (Modificado de: Elizondo E., et al., 2011).

1.3 Materiales utilizados para la fabricación de liposomas

Como se mencionó anteriormente, el componente principal de los liposomas son los fosfolípidos de doble cadena. Los fosfolípidos son una clase de lípidos que se caracterizan por presentar en su estructura un grupo fosfato, un fragmento polar y un fragmento no-polar. [Fox S., 2011; Li J., 2014]. Los fosfolípidos se clasifican en glicerofosfolípidos y esfingofosfolípidos, dependiendo del alcohol que los conforme. [Li, J., et al., 2014]

1.3.1 Fosfolípidos

Los glicerofosfolípidos son los fosfolípidos más abundantes en la naturaleza y son el principal componente de la membrana de células eucariotas. Dichos fosfolípidos están formados por una molécula de glicerol, un poli-alcohol simétrico de tres carbonos, sin embargo, el carbono dos se convierte en un centro quiral en el momento en el que el carbono uno y el tres se sustituyen de manera asimétrica, como es el caso de los fosfolípidos. [Mouritse O., Bagatolli L. 2016] Comúnmente, el fragmento hidrofílico de los glicerofosfolípidos se conforma por un grupo fosfato, el cual se une al carbono tres del glicerol a través de un enlace fosfodiéster, y que puede estar sustituido con otras moléculas. [Mouritse O., Bagatolli L. 2016] El fragmento hidrofóbico de los glicerofosfolípidos se conforma por dos cadenas de ácido graso de longitud y saturación variable, la estructura general de los glicerofosfolípidos se muestra en la Figura 6.

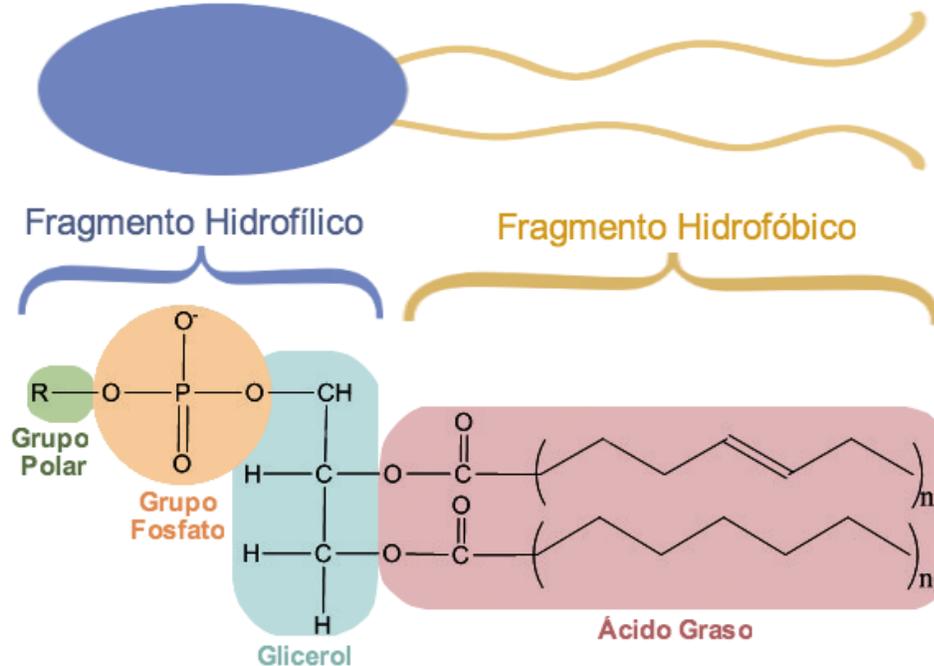


Figura 6. Estructura general de los glicerofosfolípidos. (Modificado de: Nogueira E., Gomes A., et al. 2015)

Los glicerofosfolípidos pueden clasificarse dependiendo del grupo químico que sustituye al fosfato en la cabeza polar, la longitud y saturación de las cadenas hidrocarbonadas y el tipo de enlace entre el glicerol y la cadena alifática. [Li, J. 2014]. Los grupos químicos que habitualmente están unidos al grupo fosfato son: hidrógeno, glicerol, colina, etanolamina, e inositol; generando ácido fosfatídico (PA), Fosfatidilglicerol (PG), Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI) respectivamente. [Mouritsen, O., Bagatolli, L. 2016] La clasificación según la longitud y saturación de la cadena hidrocarbonada depende del ácido graso del cual provenga dicha estructura, por ejemplo: Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), Diesteroilfosfatidilcolina (DSPC). Los ácidos grasos pueden unirse al glicerol a través de una esterificación, generando un enlace éster, o bien, a través de un enlace éter, este último genera una clase de glicerofosfolípidos llamados plasmalógenos. Por último, los fosfolípidos pueden tener una o dos cadenas alifáticas, cuando hablamos de fosfolípidos con una sola cadena hidrocarbonada se denominan lisofosfolípidos. [Li J. et al. 2014]

Los esfingofosfolípidos se diferencian de los glicerofosfolípidos por presentar una molécula de esfingosina en lugar del glicerol. En el caso del esfingolípido, el fragmento no polar de la molécula lo aporta la cadena alifática de la esfingosina y, generalmente, se une una cadena de ácido graso al grupo amino mediante un enlace amida. El grupo polar se une a través de un enlace fosfodiéster al alcohol primario de la esfingosina, este puede ser fosforilcolina (esfingomielina), fosforiletanolamina, fosforilinositol, siendo la esfingomielina la que se utiliza con mayor frecuencia para la fabricación de liposomas. [Carrero I., Herráez A.]

Los FL utilizados para fabricar liposomas pueden ser de origen natural o sintético. Dentro de las fuentes de origen natural, los fosfolípidos pueden provenir de aceites vegetales de diversas semillas: soja, algodón, maíz, girasol y colza; así como de origen animal: yema de huevo y cerebro bovino; siendo los fosfolípidos extraídos del aceite de soja y yema de huevo los más utilizados. Existen diferencias significativas entre la variedad de fosfolípidos extraídos de estas fuentes (Tabla 2). A pesar de que hoy en día existen métodos de purificación que permiten obtener fosfolípidos de grado farmacéutico, aun no es posible obtener un único componente aislado a partir de una fuente natural, por ende, la comunidad científica ha optado por la semi-síntesis o la síntesis de fosfolípidos que permite obtener un componente único de estructura y configuración definida. La semi-síntesis de fosfolípidos consiste en modificar la cabeza polar o las cadenas hidrocarbonadas de fosfolípidos naturales. [Li J. et al. 2014]

Tabla 2. Diferencias entre FL de fuente vegetal (Soja) y animal (yema de huevo)

Fuente vegetal (Soja)	Fuente animal (Yema de huevo)
Los FL pueden tener ácidos grasos insaturados tanto en la posición sn-1 como sn-2.	Mayor cantidad de Fosfatidilcolina.
	Fosfolípidos que contienen ácidos grasos de cadenas largas. Principalmente del ácido araquidónico y ácido docosaheptanoico.
	Presencia de Esfingomielina.
	Mayor grado de saturación, mejorando la estabilidad oxidativa.
	Los FL generalmente presentan ácidos grasos saturados en la posición sn-1, e insaturados en sn-2.

Los FL se caracterizan por tener una Temperatura de Transición (T_m), a dicha temperatura ocurre un cambio físico donde los FL transitan de un estado gel-sólido a un estado líquido-cristalino, estado en el que los liposomas son más permeables y fluidos. Dicha propiedad es importante en el momento de desarrollar la formulación de un sistema liposomal. En la Tabla 3 se describen algunos factores que afectan la T_m . [Li J. et al. 2014]

Tabla 3. Factores que afectan la T_m de los Fosfolípidos.

Característica	Efecto	Ejemplo
Naturaleza de la cabeza polar.	Mayor interacción entre la cabeza polar aumenta la T_m .	DPPC/DPPG= 41 °C DPPE= 63 °C
Longitud de la cadena hidrocarbonada.	A mayor longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor T_m .	DSPC= 55 °C DPPC= 41°C
Grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas.	A mayor grado de saturación mayor T_m .	DSPC= 55 °C DOPC= 20 °C
Pureza.	Los FL obtenidos de fuentes naturales suelen ser una mezcla de FL que presentan diversas temperaturas de transición, mientras que los FL sintéticos, al presentar mayor pureza presentan una temperatura de transición definida.	EPC= ~5 a ~15 °C. DMPC= 23 °C

Los liposomas sufren de inestabilidad física y degradación química, fenómenos que comprometen la estabilidad durante la vida de anaquel tanto del producto como del principio activo. [Nogueira E., et al. 2015] Físicamente, los liposomas pueden sufrir procesos de inestabilidad como agregación/floculación y fusión/coalescencia. Con el fin de mejorar la estabilidad física de los liposomas es importante mantener la rigidez de la bicapa lipídica, esto puede lograrse utilizando fosfolípidos con alta T_m , y añadiendo colesterol a la formulación, asegurando así la efectividad y seguridad de estos sistemas. [Bruglia M., Rotella C., et al. 2015].

1.3.2 Colesterol

El colesterol (COL), al igual que los FL, forma parte de la membrana de células eucariotas; la concentración de esta especie química depende del tipo de célula.

[Magarkar A., et al. 2014] El colesterol se encuentra dentro del grupo de moléculas esteroideas, es decir, su estructura se basa en el sistema de anillo del androstano tetracíclico. [Wade L. 2011] Al igual que los fosfolípidos, el COL se considera una molécula anfipática. El fragmento polar del COL está formado por un grupo hidroxilo (OH), mientras que el anillo esteroideo y una cadena hidrocarbonada conforman la parte no polar (Figura 7). [Mouritse O., Bagatolli L. 2016] Las estructuras antes mencionadas le otorgan al COL la capacidad de influenciar las propiedades mecánicas de las bicapas lipídicas, aumentando la fuerza mecánica, reduciendo la permeabilidad pasiva de la membrana al agua, moléculas pequeñas, iones y gases; también regulan la fluidez de la membrana inhibiendo transiciones de fase y reduciendo la agregación de las vesículas. [Magarkar A., et al., 2014; Róg T., et al., 2009; Briuglia M., Rotella C., et al. 2015]

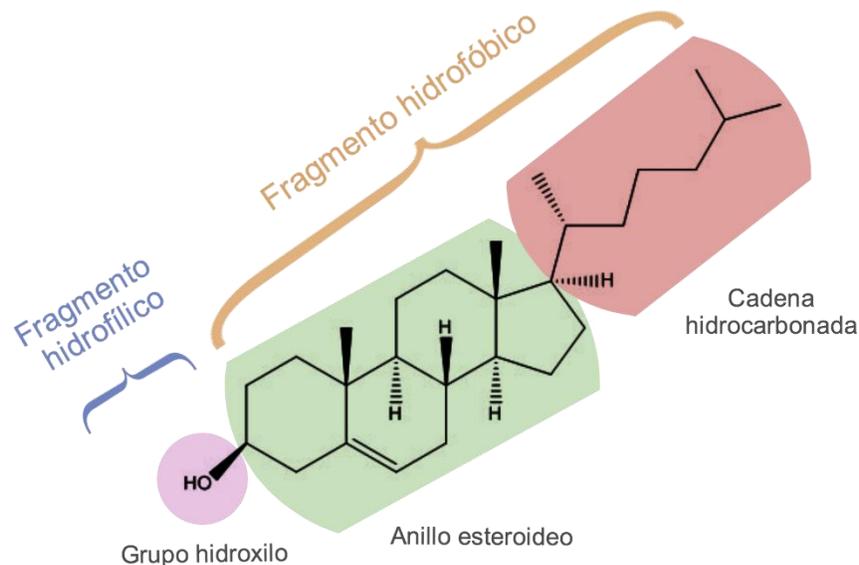


Figura 7. Estructura química del Colesterol. Creación propia.

Cuando el colesterol se encuentra embebido en la bicapa lipídica, el grupo hidroxilo se orienta en dirección a la cabeza polar de los fosfolípidos, formando puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno del grupo carbonil de estos, mientras que el anillo y la cadena hidrocarbonada interactúan con las regiones hidrocarbonadas de las cadenas de los FL (Figura 8). Los cambios que genera el COL sobre las bicapas lipídicas

se deben principalmente al efecto “ordenamiento-condensación”. En el caso del efecto de ordenamiento, el colesterol induce un aumento en el orden de las cadenas hidrocarbonadas al reducir la isomerización conformacional reduciendo la inclinación de las cadenas hidrofóbicas. Por otro lado, el efecto de condensación está estrechamente relacionado con el ordenamiento de las cadenas hidrofóbicas, pues al incrementar las interacciones de tipo van der Waals entre las cadenas acilo, el COL disminuye el área superficial ocupada por los FL. [Róg T., et al., 2009] Este efecto sobre la matriz lipídica depende de la proporción molar entre FL:COL, es decir, de la concentración de COL; además de depender de la estructura del fosfolípido, especialmente de la longitud de la cadena hidrocarbonada así como del número y posición de insaturaciones. [Róg T., et al., 2009; Magarkar A., et al., 2014] Diversos estudios han demostrado que la concentración que favorece de mejor manera la estabilidad física de los liposomas es 30% mol de COL, o bien, una proporción 70:30 de FL:COL. Dicha concentración logra mantener el tamaño de partícula de los liposomas a través de un periodo prolongado, además de mejorar la morfología y evitar el colapso de los FL durante la fabricación. [Bruglia M., Rotella C., et al. 2015]

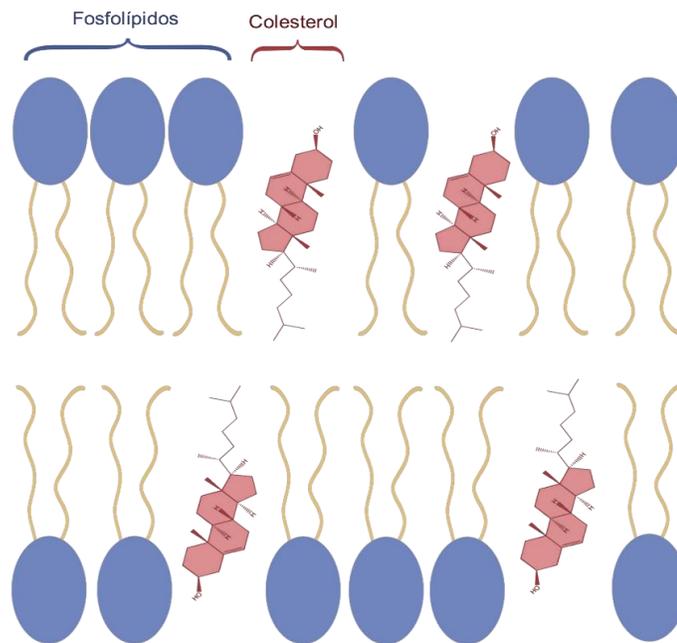


Figura 8. Esquema de la interacción entre el colesterol y fosfolípidos. (Modificado de Bruglia M., Rotella C., et al. 2015).

1.4 Formación y estabilidad del sistema liposomal

En términos fisicoquímicos, un sistema liposomal se define como un sistema coloidal. Este tipo de sistemas se singularizan por ser sistemas heterogéneos en donde una fase sólida se encuentra finamente dispersa en un medio líquido o gaseoso. El tamaño de partícula en los sistemas coloidales se encuentra en un intervalo entre 1 nm a 1,000 nm, lo que los diferencia de las soluciones y suspensiones. Debido a su tamaño, los sistemas coloidales ofrecen una gran área superficial, así como ciertas propiedades que los caracterizan. Entre estas se distinguen el movimiento Browniano, el cual se describirá más adelante, así como el efecto Tyndall. Éste último efecto se observa al atravesar una dispersión coloidal con un haz de luz, las partículas suspendidas en el medio son capaces de dispersar la luz provocando la observación de las partículas. Este tipo de sistemas muestran resistencia a la sedimentación debido a que las partículas que se encuentran suspendidas en medio acuoso adquieren carga eléctrica en la superficie, lo que les confiere estabilidad por fuerzas electrostáticas. El origen de dicha carga puede deberse a la ionización de grupos de superficie, como la disociación de protones de moléculas ácidas y asociación de protones en moléculas básicas, o la adsorción a la superficie de especies cargadas. [Kohli N., 2009; Elizondo E., et al., 2011]

Para llevar a cabo la formación de liposomas, la bicapa lipídica laminar debe curvarse lo suficiente para formar la vesícula esférica. La energía asociada a dicha curvatura provoca que el sistema tenga un exceso de energía libre de Gibbs, es decir, que no se encuentre en su estado de menor energía y, por tanto, sea termodinámicamente inestable. Este exceso de energía se debe principalmente a que las bicapas lipídicas de un solo componente presentan curvatura espontánea nula, por lo que no son capaces de formar estructuras curvas por sí mismas y para que dichas estructuras puedan formarse debe existir una fuerza externa que favorezca el autoensamble. A pesar de ello, es posible generar sistemas liposomales que presenten estabilidad por tiempos determinados, sin embargo, el sistema buscará constantemente disminuir el exceso de energía. [Lasic D.D., 1990; Yadav A.V., et al 2011; Guida V., 2010]

Físicamente, la inestabilidad del sistema liposomal se presenta como la agregación/floculación o fusión/coalescencia de las partículas. Cuando la agregación de

las vesículas ocurre, éstas se unen formando un aglomerado, sin embargo, se conservan como unidades independientes; es un proceso que se caracteriza por ser reversible ya que con las técnicas adecuadas es posible dispersarlo. A pesar de ello, la agregación de liposomas puede acelerar el proceso de coalescencia, en donde se da la fusión de dos o más partículas, generando una nueva, y disminuyendo el área superficial del sistema. Dicho proceso es espontáneo e irreversible, y puede, eventualmente, generar la separación de fases con el fin de llevar al sistema al estado de menor energía. La estabilidad física del sistema liposomal puede explicarse con el modelo teórico Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek, teoría DLVO, donde se describe que la interacción total entre las partículas está en función de un componente repulsivo y uno atractivo. La atracción entre las partículas del sistema coloidal se da por fuerzas de van der Waals, mientras que la repulsión se da por repulsión electrostática. Es la relación y el balance entre estas fuerzas lo que determina la estabilidad del coloide. Por tanto, en el caso de los liposomas, debe existir suficiente repulsión electrostática para evitar la coalescencia de las partículas. [Yadav A.V., et al 2011; Nogueira E., et al. 2015]

Químicamente, hay dos procesos principales que pueden alterar la estructura de los liposomas al modificar la composición química de los fosfolípidos. Entre estas reacciones se encuentra la hidrólisis del enlace éster entre el glicerol y el ácido graso y peroxidación de las cadenas hidrocarbonadas insaturadas. La generación de estos productos de degradación provoca la desestabilización del sistema liposomal al deformar la bicapa lipídica. La estabilidad de un sistema liposomal puede favorecerse al modular el tamaño de partícula, pH, fuerza iónica del medio, así como añadiendo antioxidantes a la formulación y al liofilizar el sistema para prolongar la vida de anaquel de la dispersión de liposomas. [Yadav A.V., et al 2011; Nogueira E., et al. 2015]

2. Métodos de Fabricación

La formulación y método de preparación utilizados al fabricar un sistema liposomal determinan el tamaño, laminaridad y porcentaje de encapsulación de los liposomas obtenidos. [Basu S., Basu M. 2002] Los sistemas liposomales utilizados *in vivo* para la administración de fármacos deben cumplir con criterios de distribución de tamaño de partícula y porcentaje de encapsulación que afectan directamente la biodistribución y el

aclareamiento de los liposomas presentando un efecto sobre la eficacia terapéutica. [Jaafar-Maalej C., et al., 2011] Debido a esto es de suma importancia seleccionar el método y las condiciones adecuadas para obtener un sistema que presente las características deseadas.

2.1 Hidratación de película fina (*Thin film hydration*)

Esta técnica es una de las más utilizadas para la formación de liposomas, obteniendo MLV (10 μm -100 μm) con bajas eficiencias de encapsulación y que son posteriormente tratados para obtener SUV's a través de diversos métodos. [Elizondo E., et al., 2011] La técnica *Thin film hydration* (Figura 9) consiste en disolver una mezcla de lípidos en un disolvente orgánico - usualmente se utiliza cloroformo, cloroformo:metanol, terbutanol o ciclohexano- formando una disolución homogénea con una concentración aproximada de 10-20 mg/mL o mayor si los lípidos lo permiten. En este momento es posible realizar una filtración para remover componentes insolubles o pirógenos. Posteriormente, se evapora el disolvente utilizando nitrógeno o argón seco cuando se trata de volúmenes pequeños, o utilizando un rotavapor para formar una película lipídica en el fondo y paredes del matraz de bola. Después se realiza la hidratación de la película, la cual consiste en añadir medio acuoso a la película mientras se lleva a cabo una agitación vigorosa. La temperatura del buffer acuoso debe estar por encima de la T_m , y debe mantenerse durante todo el proceso de hidratación permitiendo que se lleve a cabo la hidratación en el estado líquido-cristalino de los FL. El tiempo de hidratación depende de los lípidos utilizados, pero generalmente tiene una duración de alrededor de una hora. El medio de hidratación es determinado por la aplicación que se les dará a los liposomas fabricados. Los medios utilizados pueden ser: agua destilada, solución buffer, salina o no-electrolítica (glucosa, sacarosa, dextrosa). Para preparaciones *in vivo*, se recomienda utilizar soluciones fisiológicamente isosmóticas: 0.9% salina, 5% dextrosa o 10% sacarosa. Los compuestos a encapsular pueden añadirse al buffer acuoso cuando se trata de moléculas hidrofílicas o al disolvente orgánico cuando se trata de moléculas hidrofóbicas. [Basu S., Basu M. 2002, Dua. J.S, 2012; Akbarzadeh A., et al., 2013]

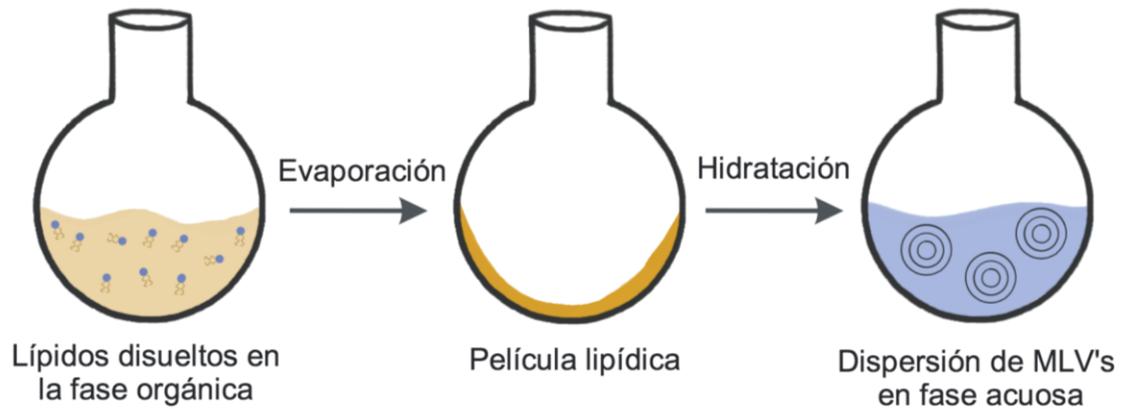


Figura 9. Formación de MLV's utilizando el método de hidratación de película fina. (Modificado de Dua. J.S, 2012).

Las variables principales que influyen las características de los liposomas y la homogeneidad del lote fabricado al utilizar el método descrito anteriormente son la fuerza de agitación, la temperatura del medio de hidratación, el tiempo de hidratación y la concentración y carga de los componentes lipídicos. [Basu S., Basu M. 2002]

2.2 Evaporación de Fase Reversa

La técnica de evaporación de fase reversa se utiliza para la fabricación de LUV's con altas eficiencias de encapsulación de moléculas hidrofílicas (65%). Los liposomas se forman al evaporar el disolvente orgánico a bajas presiones de una emulsión agua en aceite (w/o por sus siglas en inglés – *Water in Oil*). Los lípidos que conforman el sistema se disuelven en éter etílico o isopropil éter y se agrega la fase acuosa, que puede contener a la molécula hidrofílica a encapsular. El sistema bifásico es sonificado para generar la emulsión w/o, formando micelas invertidas. Posteriormente el disolvente orgánico es evaporado en un rotavapor a 20-30 °C, la lenta evaporación del disolvente orgánico desestabiliza las micelas provocando que algunas de ellas se desintegren, este fenómeno genera un gel muy viscoso. Al continuar con la evaporación, los FL libres en el medio complementan las micelas sobrevivientes, por lo que el gel colapsa formando la dispersión acuosa de LUV's. Los liposomas obtenidos pueden filtrarse a través de una membrana de carbonato de tamaño de poro 0.2 μm para homogenizar el tamaño de partícula en la muestra. [Basu S., Basu M. 2002; Elizondo E., et al., 2011; Dua. J.S, 2012; Akbarzadeh A., et al., 2013]

2.3 Inyección de disolvente

La técnica de inyección de disolvente produce vesículas unilaminares con eficiencias de encapsulación de 20-45%. Ésta técnica consiste en disolver la mezcla de lípidos en un disolvente orgánico, para después inyectar con ayuda de una jeringa con aguja la disolución sobre la fase acuosa, sin embargo, esta técnica tiene dos vertientes. [Basu S., Basu M. 2002; Dua. J.S, 2012; Akbarzadeh A., et al., 2013] En ambas variantes, la composición y concentración lipídica influye sobre el tamaño de los liposomas obtenidos por este método, así como la temperatura del medio y la velocidad de agitación.

2.3.1 Éter- Inyección de disolvente

La mezcla de lípidos se disuelve en éter etílico o en una mezcla de éter/metanol, posteriormente la disolución se inyecta lentamente en la fase acuosa a 55-65 °C o bajo presión reducida lo que genera la evaporación del disolvente formando vesículas unilaminares con diámetros de alrededor de 50 – 200 nm. Como alternativa, es posible utilizar diclorofluormetano para evitar el uso de éter etílico. [Akbarzadeh A., et al., 2013]

2.3.2 Etanol- Inyección de disolvente

En este caso, los lípidos se disuelven en etanol -también puede utilizarse glicerina y poliglicoles- y a través de una aguja la disolución se inyecta rápidamente en un exceso de fase acuosa. Los SUV's se forman debido a la dilución del solvente orgánico en el medio acuoso, como se muestra en la Figura 10. [Akbarzadeh A., et al., 2013]

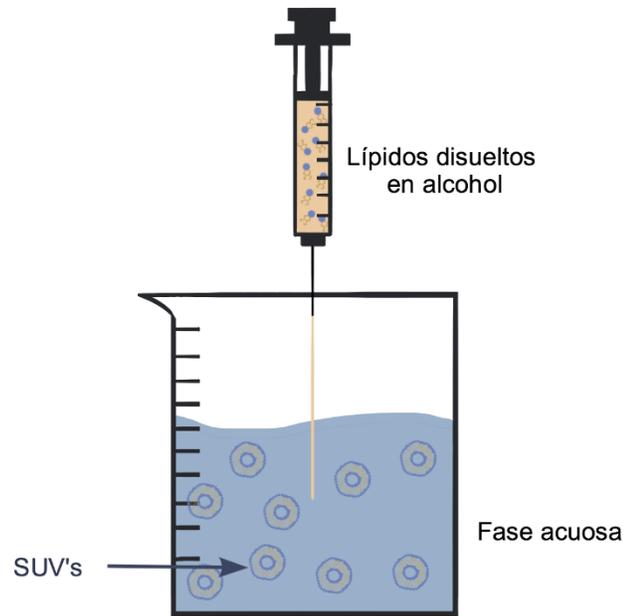


Figura 10. Formación de SUV's utilizando el método de inyección de disolvente. (Modificado de: Carugo D., Bottaro E., et al., 2016).

2.4 Eliminación de Tensoactivo

Esta técnica utiliza tensoactivos con alta Concentración Micelar Crítica (CMC) para solubilizar los lípidos en una fase acuosa. La técnica consiste en la hidratación de la película de lípidos con una solución de detergente o tensoactivo, formando micelas de tensoactivo-lípido. El siguiente paso consiste en remover el tensoactivo, lo que genera que las micelas se vuelvan ricas en lípidos, coalescan y después, formen LUV's de alrededor de 100 nm. El tensoactivo puede ser removido por diálisis, cromatografía en columna o dilución. El tamaño final de las vesículas es determinado por la composición de lípidos, el buffer, temperatura y la eficacia con la que el detergente es removido. [Basu S., Basu M. 2002; Akbarzadeh A., et al., 2013]

2.5 Deshidratación-Rehidratación

Esta técnica consiste en liofilizar vesículas lipídicas preformadas en medio acuoso que contiene el soluto a encapsular, posteriormente se realiza una rehidratación controlada. Conforme se realiza el secado, ocurre una concentración concomitante tanto de las vesículas preformadas como del soluto, eventualmente estos dos componentes forman grandes agregados. La rehidratación controlada induce la fusión

de los liposomas preformados generando MLVs que alcanzan altos porcentajes de encapsulación. [Kirby C., Gregory G., 1984; Basu S., Basu M. 2002; Akbarzadeh A., et al., 2013]

2.6 Microfluídica para la producción de Liposomas

La tecnología microfluídica permite manipular y controlar con alta precisión fluidos y sus interfaces a escalas micrométricas (5 – 500 μm), proporcionando una plataforma tecnológica factible para la fabricación de liposomas. [Bo Y. et al., 2009; Patil Y., Jadhav S., 2014]. Existen varias metodologías microfluídicas para la fabricación de liposomas, dentro de estas se encuentran la electroformación e hidratación “*electroformation and hydration*”, extrusión “*extrusion*”, chorro pulsado “*pulsed jetting*”, plantilla de emulsión doble “*double emulsion templating*”, hidratación de gotas de hielo “*ice droplet hydration*”, inyección transitoria de membrana “*transient membrane injection*”, transferencia de gotas de emulsión “*droplet emulsion transfer*” y enfoque hidrodinámico “*hydrodynamic focusing*”. La mayoría de las metodologías mencionadas producen vesículas unilaminares grandes o gigantes comprometiendo las aplicaciones clínicas potenciales, sin embargo, el método de enfoque hidrodinámico es un método viable para la formación de liposomas dentro de la escala nanométrica con aplicaciones clínicas. [Carugo D., Bottaro E., et al., 2016]

2.6.1 Microfluídica de enfoque hidrodinámico (MHF)

Este método produce una población monodispersa de SUV's y LUV's con un alto control sobre el tamaño de partícula. El método utiliza un dispositivo o chip, el cual posee canales micrométricos de geometría de flujo cruzado o de geometría anular coaxial, este dispositivo también se conoce como “Laboratorio en un chip” (del inglés *Lab-in-a-chip*). [Carugo D., Bottaro E., et al., 2016]

Para fabricar liposomas, en el canal central del sistema fluye una disolución de lípidos en alcohol -generalmente etanol o Isopropanol-, esta corriente es interceptada por dos corrientes laterales o coaxiales de solución acuosa -agua destilada o buffer-. Las vesículas se forman debido a que la difusión y dilución del isopropanol en agua genera una región crítica en donde los fosfolípidos se autoensamblan debido a su baja solubilidad en este medio, formando estructuras

intermediarias -micelas- y posteriormente liposomas (Figura 11). [Carugo D., Bottaro E., et al., 2016]

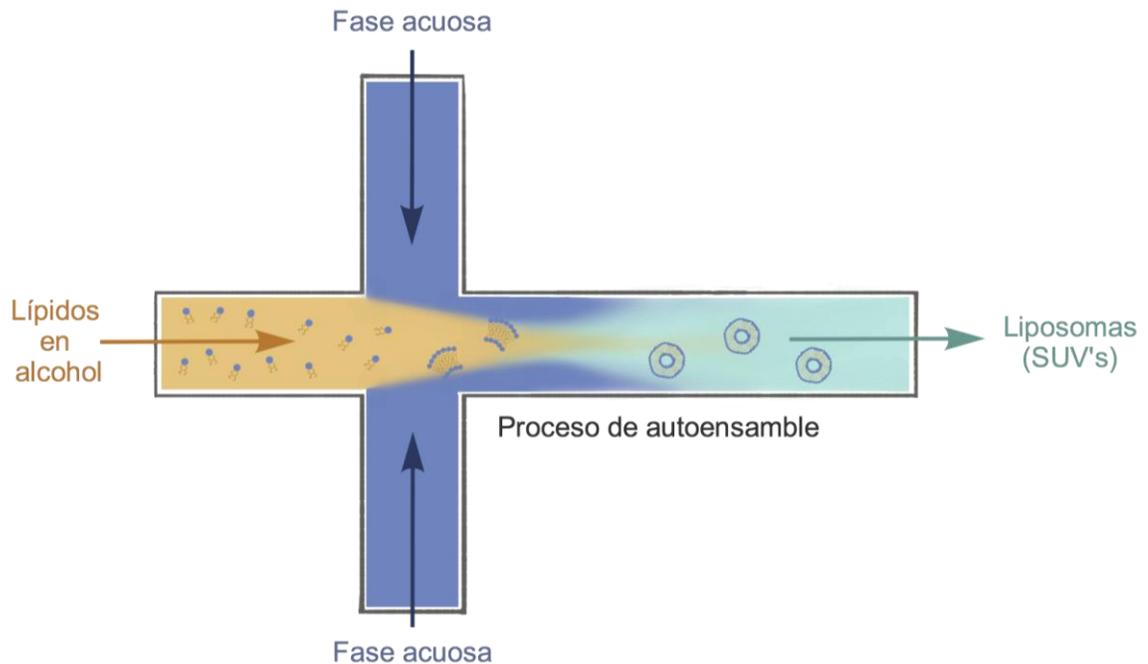


Figura 11. Esquema del proceso de formación de liposomas por el método de Microfluídica de enfoque hidrodinámico (MHF). (Modificado de: Carugo D., Bottaro E., et al., 2016).

El diámetro promedio de los liposomas fabricados por MHF, así como en los métodos descritos anteriormente, se relaciona directamente con la concentración de la fase lipídica; mientras que mantiene una relación inversamente proporcional con la proporción de la tasa de flujo entre la fase lipídica y la fase acuosa. Además, se ha observado un efecto de la geometría del chip así como de sus dimensiones. [Carugo D., Bottaro E., et al., 2016]

2.7 Preparación de liposomas utilizando un contactor de membrana.

Basado en el fundamento del método de inyección de disolvente, este método utiliza un contactor de membrana (*membrane contactor*) para la generación de sistemas liposomales. Los contactores de membrana son dispositivos que permiten la transferencia de masa entre dos fases -gas/líquido, líquido/líquido- evitando la dispersión de una fase en otra. El dispositivo está formado por una membrana porosa de tamaño micrométrico, generalmente de vidrio poroso Shirasu (SPG del inglés:

Shirasu Porous Glass), lo que permite el paso de cada una de las fases en lados opuestos de ella. El movimiento de una especie a través de la membrana es consecuencia de un gradiente de concentración, presión o temperatura.

En el caso de la preparación de liposomas (Figura 12), la fase acuosa es bombeada a través del módulo de membrana, mientras que la disolución de etanol que contiene los componentes lipídicos es contenida en un recipiente presurizado con nitrógeno gaseoso. Cuando la fase acuosa ha cubierto por completo la superficie de la membrana, la válvula que conecta el recipiente que contiene la fase lipídica a la membrana se abre, permitiendo que la fase lipídica permee a través de la membrana. Cuando la fase lipídica y la acuosa finalmente se encuentran los liposomas se forman espontáneamente. La dispersión liposomal se mantiene en agitación hasta que la disolución lipídica ha permeado por completo y posteriormente el etanol es eliminado por evaporación. [Gabelman A., Hwang S., 1999; Stanojevic M., et al., 2003; Huang Z., et al., 2014; Jaafar-Maalej C., et al., 2011]

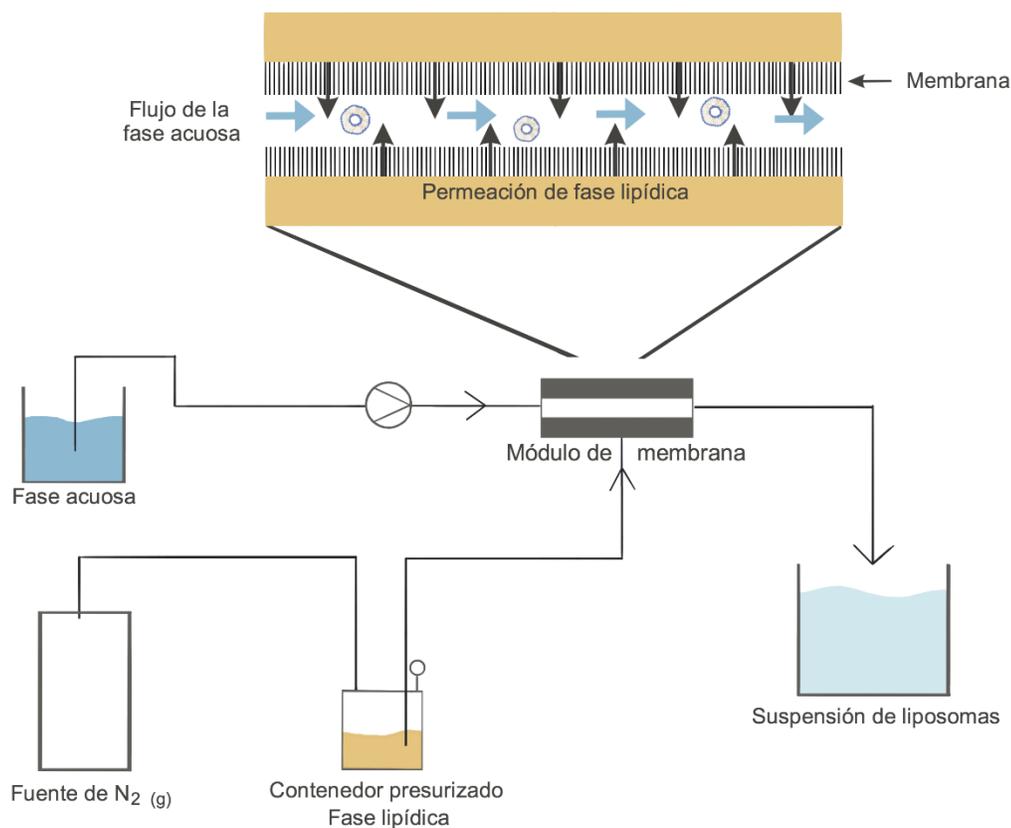


Figura 12. Esquema de la preparación de liposomas utilizando un contactor de membrana. (Modificado de: Jaafar-Maalej C., et al., 2011).

El proceso de fabricación de liposomas por contactor de membrana es afectado principalmente por cuatro parámetros: la tasa de flujo de la fase acuosa, la presión ejercida en la fase orgánica, la concentración de los componentes lipídicos y el tamaño de poro de la membrana. [Jaafar-Maalej C., et al., 2011]

A continuación, en la Tabla 4, se presentan algunas ventajas y desventajas de cada método, así como el tipo de vesícula que producen.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de algunos métodos de producción de sistemas liposomales, así como el tipo de vesículas que producen.

Método	Ventaja	Desventaja	Tipo de vesícula
Hidratación de película fina	<p>Método simple y el más utilizado a nivel laboratorio.</p> <p>Las moléculas hidrofílicas no son expuestas a disolventes orgánicos. Ya ha sido aplicado a nivel industrial.</p>	<p>Baja eficiencia de encapsulación (5-15%) de moléculas solubles en agua.</p> <p>Método difícil de escalar a nivel industrial, presenta baja reproducibilidad, bajos rendimientos, y, además, es necesario un proceso posterior para disminuir el tamaño de partícula.</p> <p>No hay control sobre la formación de las vesículas.</p>	MLV's
Evaporación de fase reversa	<p>Método eficiente cuando se busca encapsular grandes cantidades de moléculas hidrosolubles.</p> <p>Se ha utilizado para encapsular moléculas pequeñas, grandes y macromoléculas.</p>	<p>Los materiales por encapsular son expuestos a disolventes orgánicos.</p> <p>Produce sistemas heterogéneos y con baja reproducibilidad.</p>	LUV'S
Inyección de solvente	<p>Eficiencia de encapsulación (20-45%).</p> <p>Método simple, rápido y gentil, ya que no produce degradación ni oxidación tanto de los materiales como de las moléculas a encapsular.</p> <p>Alta reproducibilidad.</p> <p>La producción a escala es viable y ya se ha implementado a nivel industrial en la encapsulación de econazol e imidazol.</p>	<p>Población heterogénea tanto en la inyección con etanol y éter.</p> <p>En el caso de la inyección con etanol, la dispersión de liposomas es muy diluida y la remoción del disolvente puede complicarse ya que tiende a formar una mezcla azeotrópica con el agua.</p> <p>Alta probabilidad de inactivar moléculas biológicamente activas.</p>	<p>Eter-Vesículas unilaminares 50 – 200 nm</p> <p>Etanol – SUV's</p>

Continuación. Tabla 4. Ventajas y desventajas de algunos métodos de producción de sistemas liposomales, así como el tipo de vesículas que produce

Método	Ventaja	Desventaja	Tipo de vesícula
Eliminación de detergente	No utiliza disolventes orgánicos.	Baja eficiencia de encapsulación. Método largo.	LUV's
Deshidratación-Rehidratación	Eficiencia de encapsulación (40-50%) Alta proporción entre el volumen acuoso y el volumen lipídico, lo que los hace óptimos para encapsular altas cantidades de moléculas hidrofílicas.	Los materiales por encapsular son expuestos a disolventes orgánicos.	MLV's
Microfluídica de enfoque hidrodinámico (MHF)	Mayor control sobre el tamaño y laminaridad de las vesículas. El método permite monitorear la formación de vesículas <i>in situ</i> .	Los canales pueden taparse, comprometiendo la producción. Debido a que es un método nuevo, aún se desconocen los requisitos para poder escalar el método a nivel industrial.	Dispersión uniforme de LUV's y SUV's
Contactador de membrana	Alta eficiencia de encapsulación de moléculas liposolubles (93-98%) Las condiciones del proceso son fáciles de controlar, por lo que es un método reproducible y fácil de escalar.	La encapsulación de moléculas hidrosolubles aún no es clara y necesita mayor investigación.	MLV's

2.8 Disminución de tamaño de partícula.

Los MLV's obtenidos pueden ser sometidos a un proceso de disminución de tamaño de partícula con el objetivo de obtener SUV's. Los métodos más utilizados son sonicación, extrusión y homogenización.

2.8.1 Sonicación

Se fundamenta en la disrupción de MLV's utilizando energía sónica (ultrasonido) para obtener SUV's con diámetros de alrededor de 15-50 nm. La técnica consiste en colocar la dispersión de MLV's en un baño ultrasónico o insertando una sonda ultrasónica por 5-10 min a una temperatura por encima de T_m . El baño ultrasónico es utilizado con mayor frecuencia que la sonda ultrasónica debido a que esta última tiende liberar partículas de titanio que deben ser removidas posteriormente, además de acelerar el proceso de desesterificación de los FL debido al calor que se genera en la punta. [Basu S., Basu M. 2002; Elizondo E., et al., 2011]

2.8.2 Extrusión

Consiste en filtrar la dispersión de MLV's a través de una membrana con tamaño de poro definido. Generalmente, se realiza una prefiltración utilizando una membrana de alrededor de 1 μm , después se utilizan membranas con poros de 0.4-0.2 μm para finalmente realizar la extrusión al utilizar un poro de alrededor de 0.1 μm . Esta técnica permite controlar de mejor manera el tamaño de partícula generando alta homogeneidad en la muestra. [Basu S., Basu M. 2002]

2.8.3 Homogenización

Este método consiste en forzar la dispersión de MLV's a través de un orificio pequeño a una presión de 20,000 psi. Ésta técnica tiene la ventaja de ser simple y rápida, pero existe el riesgo de degradar y/o contaminar la muestra. [Basu S., Basu M. 2002]

2.9 Purificación

El proceso de purificación de la dispersión de liposomas tiene dos objetivos principales, primeramente, la remoción de moléculas de bajo peso molecular que no hayan sido encapsuladas (moléculas hidrofílicas) así como moléculas que no hayan sido incorporadas en la bicapa lipídica (moléculas hidrofóbicas), además, la purificación remueve productos residuales de la formación de liposomas tales como detergentes, micelas y vesículas mixtas. Existen tres métodos principales de purificación los cuales se describen a continuación [Torchilin V., Weissing V., 2001].

2.9.1 Filtración en columna –Cromatografía de exclusión molecular

La técnica de separación por cromatografía de exclusión molecular consiste en la separación de los componentes de una mezcla debido a la diferencia en peso molecular y tamaño de estos. Se utiliza una columna donde se encuentra la fase estacionaria empacada y a través de ésta eluye la fase móvil, la cual contiene la mezcla a separar, a un flujo determinado a través de la columna. El material que conforma la fase estacionaria es poroso (agarosa, dextrano, silica, vidrio o partículas de poliestireno) lo que permite la retención de moléculas al controlar el tamaño del poro. Las moléculas pequeñas penetran los poros conforme eluyen mientras que las moléculas de mayor tamaño eluyen libremente. Durante la purificación de sistemas liposomales utilizando esta técnica, el material no encapsulado y productos residuales se retienen temporalmente en la fase estacionaria mientras que los liposomas se filtran a través de ésta. A mayor tamaño del poro se da mayor separación de la mezcla. Es importante mencionar que al purificar sistemas liposomales es necesario realizar un pretratamiento de la columna eluyendo una suspensión de liposomas vacíos o “blanco”, para evitar la adsorción de los fosfolípidos sobre el soporte generando la fuga del material encapsulado. [Brand M., 2001; Torchilin V., Weissing V., 2001; Vemuri S., Rhodes C.T., 1995]

2.9.2 Centrifugación

2.9.2.1 Centrifugación diferencial

Este método de centrifugación utiliza varias velocidades con el fin de separar componentes individuales de una mezcla. Generalmente, se utiliza el método de ultracentrifugación a altas velocidades para separar LUV's obteniendo

una dispersión homogénea de SUV's. Este método se fundamenta en la diferencia en la velocidad de sedimentación de una partícula en una mezcla. La velocidad de sedimentación de cada componente depende de la diferencia entre la densidad de partícula y la densidad del medio que lo rodea y la viscosidad de este último. La velocidad de sedimentación se describe a través de la ecuación de Stokes:

$$v = \frac{d^2(\rho_p - \rho_m)g}{18\eta} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde:

v: velocidad de sedimentación, d: diámetro de partícula, g: fuerza relativa de centrifugación, ρ_p : densidad de partícula, ρ_m : densidad del medio, η : viscosidad del medio.

Las condiciones de centrifugación dependen del tipo de liposoma, de los lípidos utilizados, del método de preparación, el tipo de buffer y la temperatura. El método de centrifugación diferencial también puede utilizarse para separar material no encapsulado. Durante la centrifugación de una muestra, es posible que se dé la fuga de material encapsulado, sobre todo si se trata de moléculas pequeñas debido al estrés mecánico que sufre el sistema. [Torchilin V., Weissig V., 2003; Kulshreshtha A.K., et al., 2010]

2.9.2.2 Centrifugación con gradiente de densidad

Este método se utiliza generalmente cuando la velocidad de sedimentación de las partículas a separar es similar y el método de centrifugación diferencial no permite una buena resolución. El método consiste en variar la densidad del medio en el que se encuentran las partículas produciendo un gradiente de densidad. Al llevar a cabo una centrifugación rápida y de larga duración, las partículas se posicionan en la zona donde el medio presenta la misma densidad que éstas, es decir, la diferencia entre la densidad del medio y de la partícula tiende a cero. Como medio para generar el gradiente de densidad se utiliza glicerol, metrizamida o sacarosa a distintas concentraciones. Este método presenta altos rendimientos cuando se purifican sistemas liposomales en grandes cantidades y/o altas

concentraciones. [Hinton R., Dobrota M., 1978; Torchilin V., Weissig V., 2003; Luttmann W., et al., 2006]

2.9.2.3 Centrifugación de tamiz molecular

Este método utiliza una minicolumna de filtración molecular, la cual se centrifuga a una velocidad determinada con el fin de separar moléculas de bajo peso molecular de los liposomas. Se utilizan jeringas de 1-5 mL donde se empaca la fase estacionaria, la dispersión liposomal a purificar se coloca sobre esta y posteriormente se centrifuga. Durante la centrifugación, los liposomas son forzados a eluir a través de la columna mientras que las moléculas de menor tamaño y peso molecular son retenidas en ella. La ventaja de este método de purificación es que no genera dilución de la muestra y se obtiene un alto porcentaje de recuperación de los liposomas, de alrededor del 92 al 100%. [Torchilin V., Weissig V., 2003]

2.9.3 Liofilización

El proceso de liofilización consiste en la remoción de agua por congelación y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Las principales ventajas de la liofilización de un producto farmacéutico residen en la mejora de la estabilidad a largo plazo ya que las reacciones químicas y físicas degradativas son desaceleradas mientras que las características del producto se mantienen, la reconstitución del material es rápida y fácil, es un proceso óptimo para sustancias termolábiles y, además, disminuye la contaminación microbiana. Sin embargo, suele ser un proceso largo y costoso. [Chen C., et al., 2010; Kasper J.C., Fries W., 2011]

La liofilización consta de tres etapas principales [Kasper J.C., Fries W., 2011]:

- i. *Congelación*. La formulación líquida es enfriada hasta la nucleación de cristales de hielo los cuales posteriormente, comienzan a crecer. Esta etapa genera la separación de agua en forma de hielo de una matriz de sólidos vítreos o cristalinos.
- ii. *Secado primario (sublimación)*. Durante esta etapa el agua es removida por sublimación de los cristales de hielo. Se lleva a cabo a bajas presiones mientras que la temperatura aumenta, evitando la formación de agua en estado líquido. Durante esta etapa, la mayor cantidad de agua es eliminada.

- iii. *Secado secundario (desorción)*. Al término del secado primario, la muestra aún contiene alrededor de 15-20% de agua, por lo que la desorción del agua remanente es removida a altas temperaturas y bajas presiones durante el secado secundario.

Existen diversos parámetros que afectan al producto terminado, entre estos la velocidad de congelación de la muestra determina la porosidad del material liofilizado, así como la velocidad de secado. Cuando la velocidad de congelación es lenta, se generan cristales de agua de mayor tamaño y por tanto una menor cantidad de estos, de modo que, la desecación primaria es rápida pero la secundaria es lenta. Por otra parte, cuando la velocidad de congelación es rápida, los poros generados son de menor tamaño y más abundantes, por consecuencia, la desecación primaria es más lenta mientras que la secundaria es más rápida debido a que el área superficial es mayor. Así mismo, la temperatura durante ambas etapas de secado es crítica, ya que el proceso de secado debe realizarse por debajo de la temperatura de transición de los FL para poder generar una matriz porosa y evitar el colapso de la estructura. [Chen C., et al., 2010; Kasper J.C., Fries W., 2011]]

El proceso de liofilización de un sistema liposomal puede generar defectos en la bicapa lipídica lo que conlleva a la generación de liposomas de los cuales el material encapsulado se fuga fácilmente, además, las vesículas son propensas a la fusión y agregación durante la deshidratación comprometiendo la estabilidad del sistema. Por tanto, existe un interés particular en la protección de la integridad de la bicapa lipídica con el fin de evitar las situaciones mencionadas. Para esto se han utilizado diversos lioprotectores, con mayor frecuencia se encuentra el uso de disacáridos -trehalosa y sacarosa-, los cuales ejercen sus efectos mediante el reemplazo de la interacción de los FL con el agua permitiendo la conservación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del disacárido y el fosfato de los últimos. También se ha descrito la protección mediante el modelo de vitrificación, donde los disacáridos forman una matriz vítrea de alta viscosidad y baja movilidad, evitando la agregación y fusión de las vesículas. [Chen C., et al., 2010]

3. Métodos de Caracterización

El potencial y eficiencia de los liposomas como sistemas de liberación modificada de fármacos depende de la estructura y de diversas características que estos presenten al término de su fabricación, de estos factores depende la estabilidad, la liberación del fármaco, la fuga del material encapsulado y eficacia de liberar el fármaco en un sitio blanco. Debido a esto, es de suma importancia determinar distintos aspectos relacionados con las propiedades fisicoquímicas de dichas estructuras de autoensamble. La caracterización de los sistemas permite llevar a cabo el control de calidad del proceso de fabricación, también permite comparar un lote de producción con otro de forma cuantitativa y así definir si el método utilizado es reproducible, establecer una correlación estructura-propiedades y comprender el desempeño del sistema. Al someter el registro de un nuevo producto, la *Food and Drug Administration FDA*, a través del documento *Guidance for industry: Liposome drug product*, recomienda reportar, entre otros aspectos, las características fisicoquímicas del sistema liposomal, por lo que la caracterización del sistema es un requerimiento legal. A continuación, se describen algunas de las propiedades y técnicas más utilizadas para la caracterización de sistemas liposomales. [Elizondo E., et al., 2011; Laouini et al., 2012, FDA, Ran C., et al., 2016]

3.1 Tamaño y distribución de partículas

El tamaño y distribución del tamaño de partícula es de suma importancia cuando los sistemas liposomales tienen un fin terapéutico. El tamaño de los liposomas presenta un efecto sobre el tiempo de circulación y biodistribución de las vesículas, así como sobre la cinética de liberación del material encapsulado afectando el desempeño farmacológico.

3.1.1 Dispersión dinámica de luz

La técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), del inglés *Dynamic Light Scattering*, también conocida como Espectroscopia de Correlación de Fotones o Dispersión de Luz Quasi-Elastica, es la técnica de elección para determinar el tamaño y distribución de nanopartículas. Esta técnica mide la fluctuación de la intensidad de luz dispersada debido al movimiento Browniano de las partículas a través de un periodo de tiempo. [Xu C., et al., 2015; Xu R. 2015; Li Z., et al., 2014; Laouini, A., et al., 2012]

El movimiento Browniano se define como el movimiento aleatorio de partículas suspendidas en un fluido, es decir, es el resultado de la colisión de partículas suspendidas con moléculas del medio que las suspende. La rapidez de dicho movimiento depende del tamaño de la partícula, así como de la temperatura y la viscosidad del medio. Esta propiedad permite determinar el tamaño de partícula al estudiar la fluctuación de la intensidad de luz dispersada debido al movimiento, por lo que el monitoreo y control de la temperatura es esencial. [Xu C., et al., 2015; Xu R. 2015; Li Z., et al., 2014; Laouini, A., et al., 2012]

En la técnica de DLS, una luz monocromática incide sobre la muestra bajo investigación, las partículas suspendidas dispersan la luz en diversas direcciones, la intensidad de la luz dispersada es medida en un punto fijo utilizando un tubo multiplicador de fotones en un lapso determinado. A partir de la gráfica que se obtiene tras esta medición, es posible observar que las partículas de menor tamaño generan una fluctuación de intensidad de luz mayor debido a que su movimiento es más rápido, comportamiento contrario a partículas de mayor tamaño. Posteriormente la señal medida es procesada por un correlacionador digital, para obtener la función de autocorrelación entre la señal medida y el tiempo (Figura 13). De esta correlación se obtiene una gráfica que muestra que la función de autocorrelación decae conforme pasa el tiempo, la tasa de decaimiento de la función de autocorrelación se relaciona con el coeficiente de difusión traslacional de las partículas D_T .

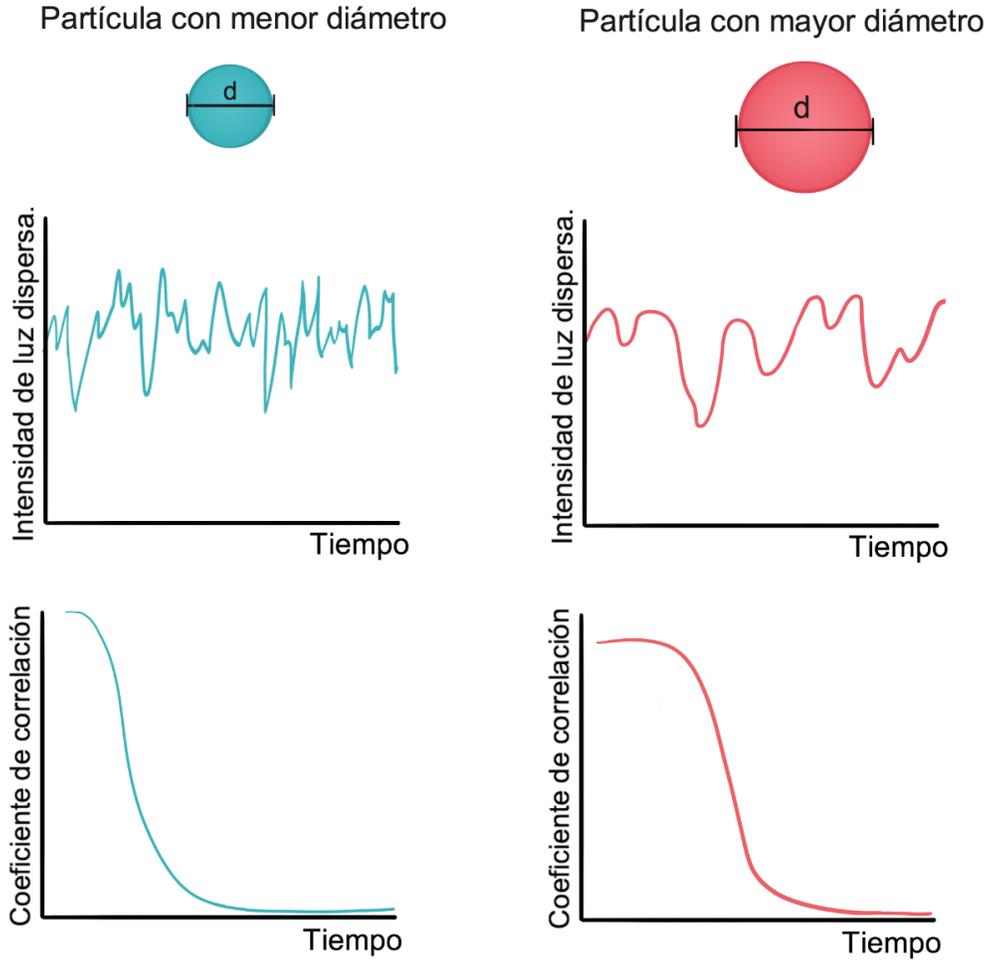


Figura 13. Intensidad de señal y decaimiento de la función de autocorrelación de partículas dependiendo del diámetro. (Modificado de: Nano Search Facility; Dynamic Light Scattering.)

La ecuación de Einstein-Stokes, relaciona el D_T con el diámetro hidrodinámico d de partículas esféricas bajo movimiento Browniano de la siguiente manera:

$$D_T = \frac{k_b T}{3\pi\eta d} \text{ ecuación (3)}$$

Donde k_b es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad del medio, y d el diámetro hidrodinámico.

A través del tratamiento matemático mencionado de la señal medida a través del tiempo, es posible determinar el tamaño de partícula de muestras monodispersas. Las ventajas de esta técnica son principalmente que permite realizar la determinación en medios nativos, es una técnica no invasiva, requiere un volumen mínimo de muestra,

cubre un amplio intervalo de medida, el instrumento que se utiliza se encuentra comercialmente disponible y los requisitos de preparación de la muestra son mínimos. Dentro de los requisitos considera que el medio dispersante debe ser transparente, debe tener un índice de refracción distinto al de las partículas bajo estudio y debe ser compatible con estas, es decir, no debe causar hinchamiento, disolución o agregación. Los límites de concentración dependen del equipo utilizado y generalmente es necesario definir los límites de manera experimental con series de diluciones para asegurar que el tamaño de partícula es independiente de la concentración. Sin embargo, la técnica no ofrece información acerca de la morfología de las partículas, además, tiende a reportar diámetros mayores cuando la muestra presenta una baja concentración de agregados de bajo peso molecular o cuando la muestra contiene impurezas. [Xu C., et al., 2015; Xu R. 2015; Li Z., et al., 2014; Laouini, A., et al., 2012]

Existen otras técnicas para determinar el tamaño y distribución de partículas tales como: sedimentación por gradiente de densidad, cromatografía de exclusión molecular, dispersión de luz estática, citometría de flujo, electroforesis capilar en zona, así como otras técnicas microscópicas. [Xu C., et al., 2015; Xu R. 2015; Li Z., et al., 2014; Laouini, A., et al., 2012]

3.2 Propiedades de la superficie

Las características de los liposomas fabricados, como el tamaño de partícula, carga de superficie y estabilidad, presentan un efecto importante sobre su comportamiento *in vivo* ya que determinan las interacciones entre los liposomas y las proteínas plasmáticas, y estas su eficiencia como sistemas acarreadores. La interacción entre liposomas y proteínas plasmáticas se da por la adsorción de estas sobre la superficie lipídica, entre las proteínas involucradas se encuentran las inmunoglobulinas, fibronectinas, lipoproteínas y proteínas del complemento, proteínas que atribuyen la opsonización de los liposomas y por consecuencia la eliminación del mismo. En cuanto al tamaño, se ha observado que la interacción disminuye conforme disminuye el tamaño de partícula, ya que, debido a la curvatura, éstas no soportan la actividad opsónica. En cuanto a la carga superficial, se ha observado que los sistemas que presentan cargas negativas en la superficie son eliminados con mayor que rapidez que los cargados de

manera positiva, siendo los liposomas neutros los que presentan mayor tiempo de circulación, sin embargo, la presencia de alta carga electrostática puede promover la interacción protéica con los liposomas. También se ha observado que aquellos liposomas cargados tienen mayor tendencia a activar complemento. La adición del colesterol, además de brindar estabilidad a la bicapa, minimiza el intercambio de fosfolípidos con lipoproteínas, previniendo la desintegración del liposoma y fuga prematura del material encapsulado. Además de su importancia *in vivo*, la propiedad electrostática de la superficie de los liposomas juega un papel importante sobre la estabilidad en suspensión del sistema liposomal. [Elizondo E., et al., 2011; Sercombe L., et al., 2015; Bhattacharjee S., 2016]

3.2.1 Potencial Zeta (ζ)

Como se mencionó anteriormente, en un sistema coloidal, las partículas que se encuentran suspendidas en medio acuoso adquieren carga eléctrica en la superficie, debido a esto, los liposomas presentan la capacidad de moverse hacia el electrodo de carga opuesta bajo la influencia de un campo eléctrico, a dicho fenómeno se denomina electroforesis. La carga eléctrica en la superficie de la partícula ocasiona la adsorción de una doble capa eléctrica *Electrical Double Layer (EDL)* sobre la superficie de ésta debido al efecto que tiene sobre la distribución de iones en el medio. [Elizondo E., et al., 2011; Laouini A., et al., 2012; Bhattacharjee S., 2016]

La EDL se conforma por una capa interna, capa de Stern, la cual se caracteriza por presentar iones de carga opuesta a la partícula fuertemente asociados a ésta, y una capa externa, capa difusa, en la cual se encuentran moléculas tanto de carga opuesta como carga igual a la carga de la partícula, se extiende hasta algunos nanómetros desde la superficie de la partícula y depende del pH, fuerza iónica y concentración de moléculas en el medio. El efecto electrostático en la capa difusa debido a la carga de la partícula disminuye conforme la distancia aumenta a partir de la capa de Stern. Dentro de esta segunda capa, se encuentra un plano hipotético definido como plano de corrimiento o plano de corte *Shear/Slipping Plane* (Figura 14). Dicha región establece una interface en la cual los iones que se encuentran antes de este plano están asociados de manera estable a la partícula, es decir, conforme la partícula se mueve estos iones se mueven

junto con ella, y posterior a este plano se encuentran aquellos iones atraídos por la carga electrostática pero que, con el movimiento de la partícula, permanecen en el medio dispersante. [Elizondo E., et al., 2011; Laouini A., et al., 2012; Bhattacharjee S., 2016]

El potencial Zeta (ζ) se define como el potencial en el plano de corrimiento de una partícula cargada dispersa en medio líquido. El ζ no puede ser medido directamente por lo que se obtiene a partir de la medición de otra propiedad eléctrica y a través de una deducción matemática se obtiene dicha magnitud. [Elizondo E., et al., 2011; Laouini A., et al., 2012; Bhattacharjee S., 2016]

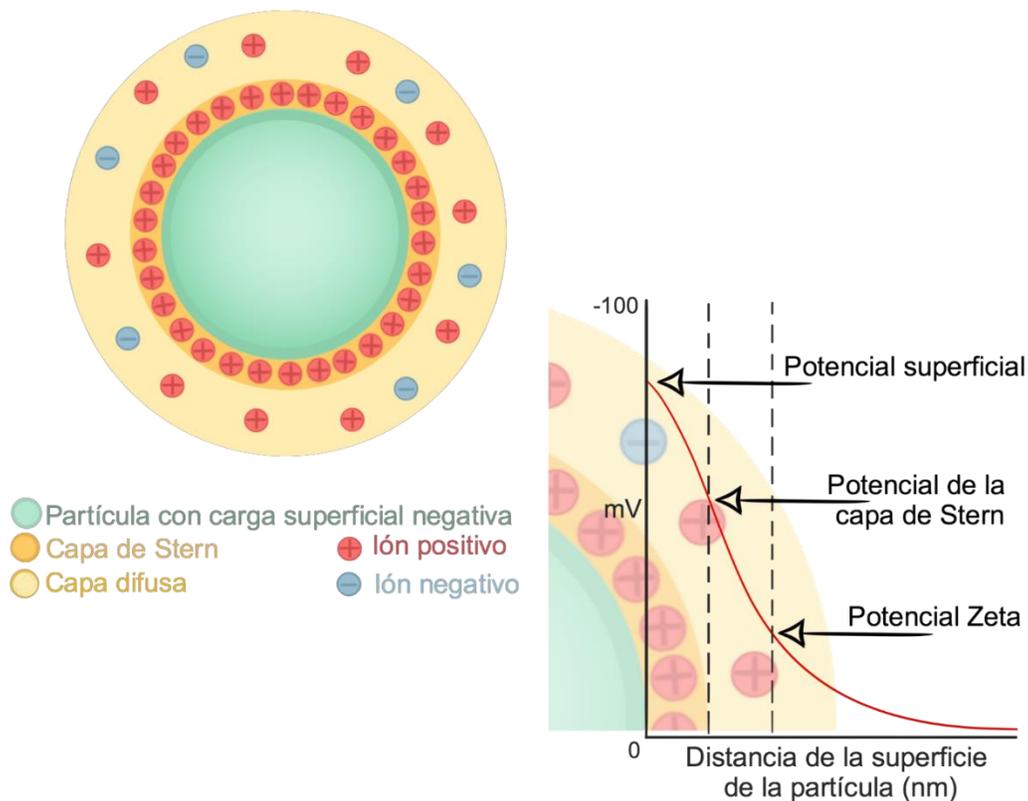


Figura 14. Representación esquemática del Potencial zeta. (Modificado de: Elizondo E., et al., 2011).

Para determinar la potencial zeta de una muestra, se determina la movilidad electroforética de la partícula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad \text{ecuación (4)}$$

Donde V: velocidad de la partícula ($\mu\text{m/s}$) y E: magnitud del campo eléctrico (V/cm).

La velocidad de la partícula se obtiene a partir de la técnica *dispersión de luz electroforética*, al medir la frecuencia de la dispersión de un láser que incide sobre la muestra durante la electroforesis. Sin embargo, este valor también puede obtenerse por medios microscópicos *microelectroforesis*. La velocidad con la que las partículas migran de un electrodo a otro, velocidad electroforética, es proporcional al campo eléctrico aplicado. La constante de proporcionalidad se define como la movilidad electroforética (μ_e). Ésta constante es proporcional al potencial zeta de la partícula, por lo que a partir de la ecuación de Henry se obtiene dicho valor:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta f(ka)}{3\eta} \quad \text{ecuación (5)}$$

Donde ε_r : permitividad relativa/constante dieléctrica, ε_0 : permitividad del vacío, ζ : Potencial Zeta, $f(ka)$: función de Henry, η : viscosidad a la temperatura experimental. [Elizondo E., et al., 2011; Laouini A., et al., 2012; Bhattacharjee S., 2016]

Durante el desarrollo de formulaciones nano particuladas, se utiliza la aproximación de Smoluchowski, en la cual el valor de la función de Henry $f(ka)$ se aproxima a 1.5. Dicha aproximación considera que el espesor de la EDL es menor que el radio de la partícula, considera a las partículas en medio acuoso y una concentración moderada de electrolitos. [Elizondo E., et al., 2011; Laouini A., et al., 2012; Bhattacharjee S., 2016]

La determinación del ζ del sistema liposomal indica la carga general que adquiere una partícula al estar dispersa en un medio, generalmente acuoso, así como el grado de repulsión entre la partícula cargada y partículas adyacentes de carga similar. Aunado a eso, la determinación del ζ permite predecir la estabilidad de las vesículas en suspensión. Cuando el valor absoluto del ζ del sistema coloidal es mayor a 30 mV, las partículas presentan suficiente repulsión evitando la sedimentación de esta, manteniendo al sistema en su estado disperso. Sin embargo, cuando los valores se encuentran por debajo de 30

mV las partículas tienden a sedimentar formando floculos debido a la baja repulsión entre ellas. [Elizondo E., et al., 2011; Laouini A., et al., 2012; Bhattacharjee S., 2016]

3.3 Morfología

El análisis morfológico de los liposomas forma parte esencial de la caracterización de este sistema. Además del tamaño, distribución y potencial zeta, la forma y laminaridad de los liposomas tiene un efecto sobre la eficiencia de encapsulación y cinética de liberación *in vivo* de la preparación farmacéutica. Asimismo, la laminaridad determina el destino intracelular de los liposomas una vez que estos han penetrado una célula. [Elizondo E., et al., 2011; Hoppe S., et al., 2013]

Varias técnicas son utilizadas para determinar la forma y laminaridad de un sistema liposomal. En cuanto a la determinación de la laminaridad se utiliza con frecuencia resonancia magnética nuclear, dispersión de rayos X- de ángulo bajo, absorbancia UV del ácido 2,4,6 – trinitrobenzeno sulfónico (TNBS), sin embargo, dichas técnicas no proporcionan información sobre la forma de las vesículas. La microscopía electrónica *EM* por sus siglas en inglés *Electronic Microscopy*, permite observar tanto la forma de los liposomas, como la laminaridad dependiendo de la preparación de la muestra, por lo que es la técnica para la determinación y confirmación de forma y laminaridad utilizada con mayor frecuencia. [Edwards K.A., Baeumner A.J., 2005]

3.3.1 Microscopía electrónica EM

La microscopía electrónica es un tipo de microscopía que utiliza como “fuente de luz” un haz de electrones, que a través de lentes electromagnéticos es enfocado y acelerado hacia el espécimen en estudio. Este tipo de microscopía permite visualizar órdenes de magnitud entre 10^{-4} – 10^{-7} cm, por lo que la resolución es varias órdenes de magnitud mayores a la microscopía de luz. [Elizondo E., et al., 2011; Egerton R.F., 2016]

3.3.1.1 Microscopía de transmisión de electrones TEM

En la técnica microscópica TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy* el haz de electrones es enfocado y acelerado a través de lentes electromagnéticos provocando que estos alcancen suficiente energía cinética y sean capaces de atravesar el objeto bajo estudio. Al encontrarse con la muestra se genera un patrón de difracción de electrones esto se debe a que, en zonas de menor densidad los electrones atraviesan

por completo el espécimen, mientras que, en zonas de mayor densidad, los electrones se difractan. Los electrones capaces de atravesar la muestra golpean una pantalla de metal recubierta por una capa delgada de polvo que fluoresce bajo el bombardeo de electrones, lo que da lugar a una imagen bidimensional en escala de grises. Una de las principales desventajas de este tipo de microscopía reside en que la muestra debe ser delgada para permitir el paso de los electrones a través de la muestra. [Elizondo E., et al., 2011; Egerton R.F., 2016;

3.3.1.2 Microscopía electrónica de barrido SEM

En el caso de la microscopía electrónica de barrido *SEM* del inglés *Scanning Electron Microscope*, el haz de electrones es móvil, y escanea la muestra en el plano cartesiano. Los electrones que inciden sobre la muestra, *electrones primarios*, se impactan sobre la muestra proporcionando suficiente energía a los electrones presentes en el sólido (muestra), provocando que estos sean liberados como *electrones secundarios*. Estos últimos son enfocados y utilizando una pantalla de fósforo se traducen a una imagen tridimensional en escala de grises. La ventaja de este tipo de microscopía sobre TEM, es que la muestra no necesita ser delgada. [Egerton R.F., 2016]

3.3.2 Preparación de muestra

Generalmente, es necesario realizar un tratamiento previo a la muestra para que esta pueda ser examinada bajo microscopía electrónica, a continuación, se mencionan las tres técnicas más utilizadas al caracterizar vesículas.

3.3.2.1 Fractura por Congelación

Esta técnica consiste en observar la réplica de distintos cortes o planos de la superficie de la muestra expuesta tras un proceso de congelación-fracturación. La muestra por estudiar es tratada previamente con un crioprotector, generalmente glicerol, y posteriormente es congelada rápidamente utilizando nitrógeno líquido en condiciones de vacío. La fractura o corte se realiza utilizando la cuchilla de un micrótopo enfriado con nitrógeno o impactando la muestra sobre un dispositivo con bisagras. A partir de este punto la muestra puede ser visualizada por SEM, sin embargo, para ser observada por TEM es necesario realizar una réplica. La formación de la réplica consiste en formar una película fina de platino-carbono sobre la muestra congelada para reproducir la superficie,

y posteriormente endurecerla aplicando una película de carbono electrón-traslucido. De esta manera la topografía de la muestra se representa en la réplica como una variación de grosor. Por último, la réplica se separa de la muestra utilizando hipoclorito de sodio u otros agentes y finalmente se visualiza por EM. La capacidad de observar la laminaridad al utilizar este tipo de preparación depende del lugar donde se realice la fractura, por lo que no es la mejor opción para determinar laminaridad. [Elizondo E., et al., 2011; Severs N. J., 2007., Torchilin V., Weissing V., 2003]

3.3.2.2 Tinción negativa

La tinción negativa se realiza al mezclar la dispersión de liposomas con una solución diluida de materiales electrónicamente opacos, tales como: molibdato de amonio, acetato de uranilo o ácido fosfotúngstico. Posteriormente, la suspensión teñida se coloca sobre una cuadrícula de soporte *grid* y se deja secar por completo. Una vez realizado este procedimiento es posible observar la muestra por EM. La desventaja de dicha preparación se debe a que puede inducir fusión o agregación de los liposomas, lo que limita la determinación de la laminaridad. [Elizondo E., et al., 2011., Torchilin V., Weissing V., 2003]

3.3.2.3 Criofijación

En este caso, la muestra se observa a temperaturas criogénicas, generalmente utilizando nitrógeno líquido. La muestra se coloca en un soporte para EM, después es congelada utilizando algún agente criogénico y es preservada en estado de congelación hidratación *Frozen-hydrated*. Finalmente, la muestra congelada puede ser observada por EM. Esta técnica de preparación de muestra permite observar los liposomas en forma nativa e inalterada, ya que no se lleva a cabo un proceso de tinción ni destrucción previa a la observación. Esta técnica evita la destrucción de la muestra y los artefactos, por lo que representa una opción factible tanto para observar forma como laminaridad. [Elizondo E., et al., 2011, Hoppe S., et al., 2013., Torchilin V., Weissing V., 2003]

3.4 Calorimetría

Las técnicas calorimétricas se utilizan para medir y evaluar los efectos del calor sobre procesos físicos, químicos y biológicos. A dichas técnicas se les refiere comúnmente como técnicas de análisis térmico, dentro de estas se encuentran el análisis

térmico diferencial, análisis termogravimétrico, análisis termomecánico, calorimetría diferencial de barrido, etc. El análisis térmico estudia las propiedades fisicoquímicas de los materiales en función de la temperatura o el tiempo y aporta información sobre la pureza, polimorfismos y puntos de fusión de moléculas, es utilizado con frecuencia durante el desarrollo de productos farmacéuticos. [Demetzos C., 2008]

3.4.1 Calorimetría diferencial de barrido DSC

La calorimetría diferencial de barrido DSC por sus siglas en inglés *Differential Scanning Calorimetry*, es utilizado con frecuencia para determinar la capacidad calorífica específica del material, y a partir de este obtener la entalpía asociada a cambios estructurales y transición de fase, como punto de fusión, calor de fusión, polimorfismo, evaporación, desorción, transición vítrea, interacción, compatibilidad, estabilidad a la oxidación, descomposición, entre otros. En el caso de los liposomas, el análisis térmico ofrece información sobre la estabilidad de las vesículas durante el proceso de manufactura, a través del tiempo y sobre la interacción del componente activo con el liposoma. [Demetzos C., 2008]

Para realizar la evaluación, se utilizan dos plataformas de calentamiento independientes conectadas a una computadora. En una de las plataformas se coloca la muestra a evaluar y en la otra una referencia, ambas placas se calientan de manera independiente y de acuerdo con un programa de calentamiento. Al inicio de la evaluación, la temperatura en ambas placas aumenta a la misma velocidad, cuando en la muestra ocurre una transición de fase, por ejemplo, la fusión de la muestra, ésta absorbe calor del sistema por lo que no se observa un aumento en la temperatura. Esto genera una diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia, que se traduce a una señal en el equipo. Dicha señal genera una gráfica del flujo de calor en función del tiempo o de la temperatura, como se observa en la figura 15. En la gráfica se observan transiciones de fase de primer orden como picos positivos o negativos dependiendo si el proceso que se lleva a cabo es endotérmico o exotérmico, mientras que, procesos como la transición vítrea se observa como una pendiente ligera. Por tanto, es posible determinar la temperatura de transición de fase del material o de mezclas de componentes. [Demetzos C., 2008]

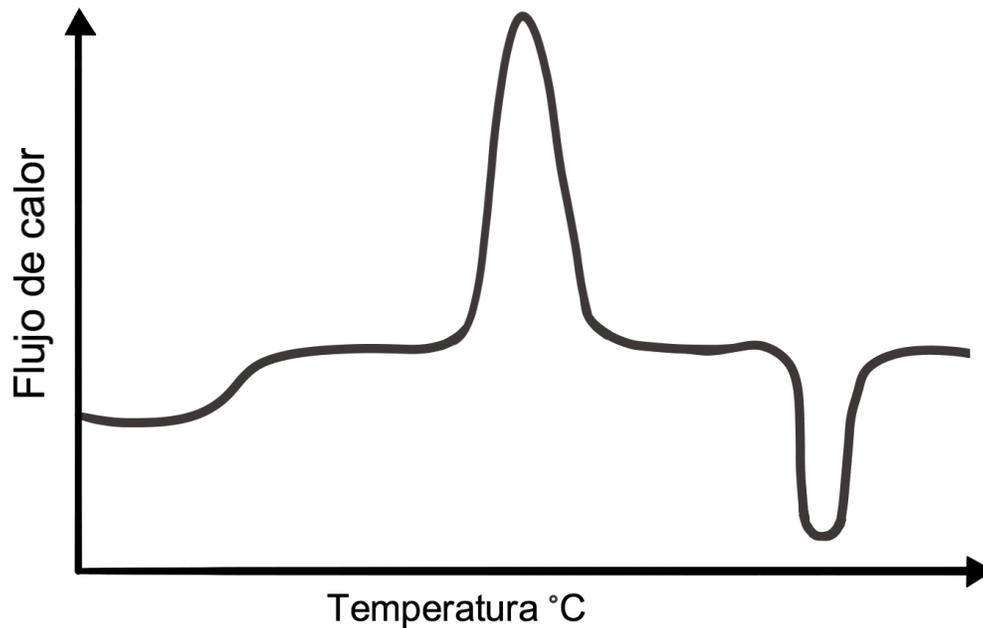


Figura 15. Curva DSC. Creación propia.

Como se mencionó anteriormente, los fosfolípidos se caracterizan por presentar una transición de fase de gel a líquido-cristalino a una temperatura determinada, dicha temperatura puede modificarse dependiendo del medio en el que se encuentran los fosfolípidos, y de las interacciones que puedan darse con otros componentes. La determinación de la temperatura a la cual se da dicha transición y la energía asociada a ésta es importante durante el desarrollo de un sistema liposomal, ya que la estabilidad de este se asocia a dicho parámetro. [Demetzos C., 2008]

Existen varios parámetros que modifican la T_m de los fosfolípidos, algunos de ellos se describen en la tabla 3. Además, es importante considerar que la mezcla de fosfolípidos en una formulación cambia drásticamente la T_m de los liposomas, generando la transición en un mayor intervalo de temperatura, el cual debe ser considerado tanto para la fabricación como la estabilidad *in vivo* e *in vitro*. Así mismo, la interacción de la bicapa lipídica con las moléculas a encapsular y/u otros excipientes considerados en la formulación puede causar una variación sobre dicha temperatura por lo que es importante determinar la compatibilidad entre los componentes. [Biltonen R.L., Lichtenberg D., 1993; Demetzos C., 2008]

Cuando los liposomas se encuentran en estado líquido-cristalino, la bicapa lipídica es fluida por lo que la liberación del material encapsulado se da con mayor facilidad. Éste

parámetro adquiere importancia cuando se considera el desempeño *in vivo* del sistema, ya que si la T_m del sistema se encuentra por debajo de la temperatura fisiológica, se dará con facilidad la fuga del material de manera prematura, por tanto, dicha determinación permite asegurar que el sistema liposomal se encuentra en el estado gel-sólido a dicha temperatura. [Li J., et al., 2014]

3.5 Material encapsulado

La capacidad de encapsulación o atrapamiento de un sistema liposomal es un parámetro significativo ya que la efectividad del liposoma como vehículo de administración de principios activos depende de la concentración de la molécula atrapada. Por tanto, constantemente se buscan materiales y métodos que mejoren la efectividad de carga de moléculas. [Zhang X. et al., 2004; Elizondo E., et al., 2011]

En la literatura, se han reportado diversos términos para expresar la eficiencia o cantidad de material encapsulado/atrapado, dichos términos se definen por la capacidad de los liposomas para encapsular/atrapar moléculas y esto depende de la composición, la concentración de lípido, del tipo de liposoma (SUV, LUV, MLV) y del método de fabricación. [Edwards K.A., Baeumner A.J., 2005; Elizondo E., et al., 2011]

El término reportado con mayor frecuencia es Eficiencia de Encapsulación (%EE), porcentaje encapsulado o eficiencia de atrapamiento y se calcula de la siguiente manera:

$$\%EE = \frac{\text{masa del material encapsulado}}{\text{masa inicial del material}} * 100 \text{ ecuación (6)}$$

Este término se utiliza generalmente, cuando se trata de la encapsulación de moléculas dentro del núcleo acuoso del liposoma. La particularidad de este término reside en que además de depender de los parámetros antes mencionados, depende de la concentración inicial de material encapsulado. Este término es útil cuando se requiere comparar métodos de fabricación en donde no hay una pérdida de material a encapsular durante el proceso, sin embargo, es necesario mantener la concentración de material inicial y lípidos constante.

La cantidad de material encapsulado también puede expresarse como la proporción molar de la molécula encapsulada por cada mol de lípido, la cual se obtiene al dividir la concentración de la molécula de carga entre la concentración de lípidos. Este

término se utiliza con frecuencia cuando la molécula de carga es encapsulada y/o adsorbida/integrada en la membrana. Otro término que se utiliza comúnmente es el volumen contenido o encapsulado (μL) sobre la cantidad de lípidos (μmol). Para el cálculo de estos últimos términos es necesario conocer tanto la concentración/cantidad de material encapsulado como la concentración/cantidad de lípidos. Para determinar la concentración de lípidos se utilizan métodos químicos o enzimáticos con el fin de generar complejos coloridos u otras moléculas que puedan ser cuantificados utilizando espectrofotometría. [Edwards K.A., Baeumner A.J., 2005; Elizondo E., et al., 2011]

La determinación de material encapsulado, en cualquiera de sus términos, consiste en tres pasos fundamentales:

i. Separación del material no encapsulado.

Las técnicas para la separación de material no encapsulado son similares a las utilizadas en la purificación de los sistemas liposomales (sección 2.9). Se utilizan técnicas como cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, centrifugación y diálisis. Este paso representa una desventaja en la determinación de material encapsulado debido al estrés mecánico al que es sometido el sistema ya que las técnicas utilizadas pueden ocasionar la fuga de material dando resultados poco confiables. [Edwards K.A., Baeumner A.J., 2005; Elizondo E., et al., 2011, Ran C., et al., 2016]

ii. Disrupción de la bicapa lipídica para liberar el material encapsulado.

La ruptura de la bicapa lipídica puede realizarse por dilución de la dispersión vesicular con 2-propanol, etanol o metanol, extracción de los lípidos utilizando mezclas de cloroformo o adición de tensoactivos para inducir la ruptura. [Edwards K.A., Baeumner A.J., 2005; Elizondo E., et al., 2011]

iii. Cuantificación del material encapsulado

El método de cuantificación del material encapsulado depende de la naturaleza de la molécula cargada. Los métodos utilizados con mayor frecuencia son espectrofotometría, espectroscopia fluorescente, métodos

enzimáticos y técnicas electroquímicas. [Edwards K.A., Baeumner A.J., 2005; Elizondo E., et al., 2011]

Como se mencionó anteriormente, el primer paso de la determinación es crítico para poder obtener resultados confiables. Por esto, se han buscado alternativas que permitan cuantificar el material encapsulado sin la necesidad de separar el material que se encuentra al exterior de las vesículas. Para este propósito, se ha reportado el uso de caseína fluorescente para cuantificar material encapsulado, añadiendo cobalto al medio después de la carga para interferir y apagar la señal del material no encapsulado. También se ha utilizado resonancia paramagnética espectroscópica, la cual se basa en la adición de un material paramagnético impermeable que amplía la señal del material no encapsulado. Por último, se ha aplicado ^1H resonancia magnética nuclear en conjunto con marcadores sensibles a cambios de pH con el fin de diferenciar la señal obtenida del material encapsulado y del no encapsulado. Particularmente, se ha reportado el uso de homocarnosina como marcador. Posterior a la carga, el pH del medio se modifica generando la protonación o desprotonación del marcador cambiando la señal observada entre el material encapsulado y el no encapsulado. [Zhang X. et al., 2004; Elizondo E., et al., 2011]

3.6 Densidad

Se ha reportado que la determinación de la densidad de sistemas nano particulados tiene como propósito verificar la encapsulación del material, así como evaluar la distribución poblacional de estos de acuerdo con su tamaño y laminaridad. Para ello, se utilizan metodologías basadas en la separación por centrifugación con gradiente de densidad. Existen diversas técnicas de centrifugación con gradiente de densidad, en este caso las técnicas de interés se basan en la centrifugación zonal y la centrifugación isopícnica. La centrifugación zonal utiliza un gradiente de densidad preformado (generalmente con glucosa o sacarosa), y la muestra se coloca encima del gradiente para su posterior centrifugación. En este tipo de centrifugación, la separación depende de la velocidad de sedimentación, la cual es determinada por el tamaño, densidad y laminaridad de la partícula. Este tipo de centrifugación se utiliza para conocer la distribución poblacional del sistema. La centrifugación isopícnica se emplea para verificar la encapsulación de sistemas nano particulados. Esta técnica utiliza un gradiente

de densidad generado *in situ*, es decir, se genera conforme se centrifuga la muestra, generalmente se utilizan partículas de silica coloidal cubiertas con PVP con diámetros que van de los 15-30 nm, este sistema se encuentra comercialmente bajo el nombre de Percoll®. La separación resulta de la diferencia de densidad boyante de las partículas, por lo que estas migran a la posición donde la suspensión presenta la misma densidad que está. [Sánchez-López V., et al., 2009; Mendoza-Muñoz N., et al., 2011]

4. Funcionalización

La investigación de formas farmacéuticas no convencionales se ha encargado de desarrollar distintas estrategias con el fin de superar algunas de las desventajas de las formas farmacéuticas convencionales. Los sistemas liposomales convencionales han logrado reducir la toxicidad *in vivo* de algunas moléculas al modificar la farmacocinética y biodistribución del componente activo, sin embargo, son sistemas propensos a ser eliminados de la sangre rápidamente a través del Sistema Fagocítico Mononuclear *SFM* en hígado y bazo principalmente, limitando la eficacia terapéutica. Debido a esto, los liposomas han sido funcionalizados, es decir, modificados estructuralmente (Figura 16) para incrementar y proporcionar nuevas ventajas, así como mejorar su desempeño como sistemas de liberación modificada. [Elizondo E., et al., 2011; Mura S., et al., 2013]

Algunos de los principales motivos de la funcionalización de liposomas se expresan a continuación:

- i. Incrementar la estabilidad y vida media del sistema, evitando la eliminación de este a través de *SFM*.
- ii. Maximizar el efecto terapéutico al dirigir los liposomas a la célula o tejido blanco, minimizando efectos tóxicos y secundarios en tejido saludable. Esto puede lograrse uniendo ligandos a la superficie de la partícula capaces de reconocer o ser reconocidos. Los ligandos pueden ser: péptidos, polímeros, proteínas y anticuerpos.
- iii. Liberación del material encapsulado en respuesta a un estímulo externo o interno el cual puede ser físico o químico. Además, ésta cualidad permite generar sistemas de liberación bajo demanda, también conocidos como “switch on/off”

La funcionalización de los liposomas le confiere al sistema la capacidad de mantener control espacial, temporal y sobre la dosificación de la molécula activa. [Elizondo E., et al., 2011; Mura S., et al., 2013; Belletti D., et al., 2014; Sercombe L., et al., 2015;] A continuación, se abordarán algunos aspectos referentes al tema.

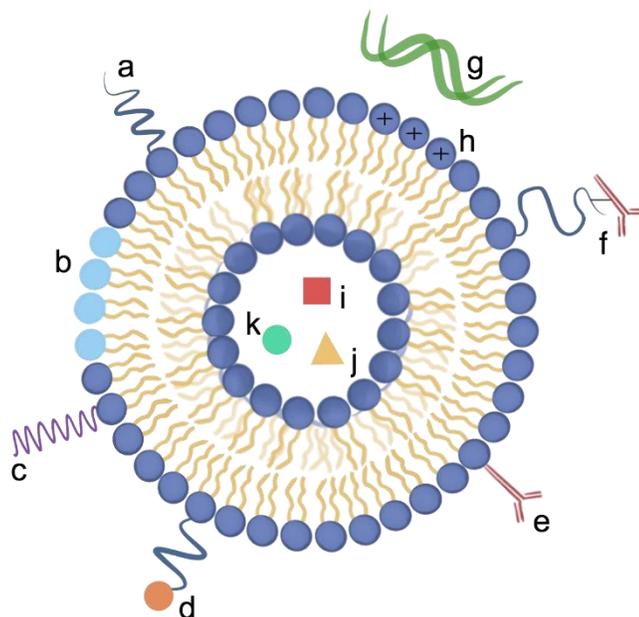


Figura 16. Representación esquemática de algunas modificaciones que pueden llevarse a cabo en el liposoma: (a) Polímero de protección o sensibles a la temperatura, (b) lípidos sensibles a la temperatura, (c) conjugación con péptido, (d) conjugación con componentes virales, (e) anticuerpo, (f) Polímero conjugado con anticuerpo, (g) asociación con ADN, (h) fosfolípidos con carga, (i) fármacos hidrofílicos, (j) partículas magnéticas, (k) agentes de contraste. (Modificado de Elizondo E., et al., 2011).

4.1 Liposomas con respuesta a un estímulo

Una de las de las estrategias desarrolladas para optimizar la administración de moléculas activas es la utilización de sistemas liposomales que responden a un estímulo. Los liposomas con fines terapéuticos son formulados para presentar alta estabilidad *-in vitro* e *in vivo-*, debido a esto, es posible que aun cuando alcanzan el blanco terapéutico no se logre la liberación eficiente de la molécula activa y por consecuencia, la concentración terapéutica. Por ello, este tipo de liposomas son acarreadores prometedores para la liberación controlada y localizada de moléculas activas. [Movahedi F., et al., 2015; van Elk M., et al., 2016]

La liberación del material encapsulado se fundamenta en la desestabilización de la bicapa lipídica debido a un cambio en el micro o macroambiente en el que se encuentran. Dicho cambio se traduce como un estímulo que puede ocurrir naturalmente en el sitio afectado, estímulo endógeno, o ser externamente inducido, estímulo exógeno. [Ganta S., et al., 2008; Mura S., et al., 2013; Movahedi F., et al., 2015]

En el caso de los estímulos endógenos, se busca evaluar la patología del cuadro clínico para aprovechar los cambios biológicos, químicos y físicos del tejido o células afectadas para poder generar una diferenciación al cual el sistema liposomal pueda responder. La ventaja principal del estímulo endógeno es que existe por sí mismo y no necesita de otros medios para generar la respuesta, además de que ofrece la oportunidad de generar sistemas de tipo “switch on/off”. Por otro lado, los estímulos exógenos son aplicados de manera externa, por lo que la utilización de material y equipos son necesarios para generar el cambio estructural en las vesículas. En este caso, la ventaja principal reside en la opción de generar protocolos estandarizados para poder alcanzar la liberación regulada y localizada de la molécula activa. Los estímulos se subclasifican de acuerdo con la naturaleza del proceso o del tipo de energía utilizada: [Ganta S., et al., 2008; Lopes J.R., et al., 2013; Movahedi F., et al., 2015; Van Elk M., et al., 2016]

- i. Estímulos químicos: pH, especies reactivas del oxígeno, potencial redox, enzimas, fuerza iónica, carbohidratos y otras moléculas.
- ii. Estímulos físicos: luz, temperatura, campo magnético, ultrasonido, presión osmótica, campo eléctrico, etc. [Lopes J.R., et al., 2013]

A continuación, se describen algunos sistemas que responden a estímulos químicos o físicos.

4.1.1 Estímulos químicos

4.1.1.1 Liposomas sensibles a cambios de pH

Una de las estrategias desarrolladas para optimizar la liberación del material encapsulado de los liposomas una vez que han alcanzado el blanco terapéutico es la desestabilización de la membrana por cambios en el pH del medio donde se encuentran. Existe una diferencia en el microambiente extracelular entre tejido sano y el tejido patológico, un ejemplo claro es el pH extracelular. Mientras que en tejido sano el pH

extracelular tiene un valor aproximado de 7.4, en tumor neoplásico es alrededor de 6.5-7.0 debido al proceso irregular de angiogénesis. A pesar de esta diferencia, es difícil diseñar liposomas que presenten la sensibilidad para distinguir dichos microambientes. Sin embargo, la sensibilidad a cambios de pH puede utilizarse para mejorar la liberación de moléculas activas en el citoplasma celular. Uno de los mecanismos de internalización de liposomas es mediante la endocitosis, por lo que una vez que el liposoma se encuentra en contacto con la membrana celular, ésta lo invagina formando un endosoma. El endosoma presenta un pH intracelular entre 6.5-5.0, mientras que, al fusionarse con el lisosoma, se alcanzan valores entre 4.0 y 5.0. Al utilizar liposomas convencionales la degradación enzimática de la molécula activa en el lisosoma representa una razón por lo que la concentración intracelular del principio activo no es suficiente para llevar a cabo el efecto farmacológico. Por ello, es necesario funcionalizar el liposoma para evitar su degradación o liberar intacto el material encapsulado en estos. [Mura S., et al., 2013; Lopes J.R., et al., 2013; Ferreira D.S., et al., 2013; Liu X., Huang G., 2013].

Los liposomas sensibles a cambios de pH están conformados por materiales que experimentan un cambio morfológico al estar expuestos a estímulos de este tipo. El FL utilizado con mayor frecuencia es PE/DOPE. Dicho fosfolípido tiene la característica de ser incapaz de formar bicapas por sí mismo debido a que presenta una geometría de cono truncado invertido, por lo que tiende a formar micelas invertidas tipo H_{II} . Para favorecer la formación de bicapas lipídicas, se combina PE/DOPE con lípidos cargados negativamente, generando repulsión con el grupo fosfato del PE y disminuyendo interacciones intermoleculares entre los grupos polares del PE; esto provoca un incremento en el volumen de la región polar de estas moléculas permitiendo la formación de liposomas. En cuanto a la formulación de liposomas con respuesta a cambios de pH se utilizan estabilizadores lipídicos o agentes fusogénicos sensibles a pH para poder formar liposomas estables que puedan responder a cambios en la concentración de protones en el medio. Se utiliza con frecuencia el ácido oleico (OA), N-palmitoil homocisteína, Hemisuccinato de colesterol, (CHEMS) N-succinil-dioleoilfosfatidiletanolamina, 1,2-dioleoil-sn3-succinilglicerol (Figura 17) como estabilizantes para la formación de la vesícula, estos lípidos tienen en común la presencia de un grupo carboxilo, y es dicho grupo el que confiere la sensibilidad a cambios de pH.

Con base a esta técnica, se han preparado liposomas a través de la técnica de hidratación de película fina, utilizando PE: COL: CHEMS en proporción 35:15:15, posteriormente se redujo el tamaño de partícula a través del método de ultrasonificación obteniendo liposomas unilaminares con un intervalo de diámetro entre 250-260 nm. A través de estudios de microscopía de transmisión electrónica se observó la desestabilización de los liposomas debido a la disminución del pH del medio. [Mura S., et al., 2013; Ferreira D.S., et al., 2013; Fan Y., et al., 2016; Liu X., Huang G., 2013]

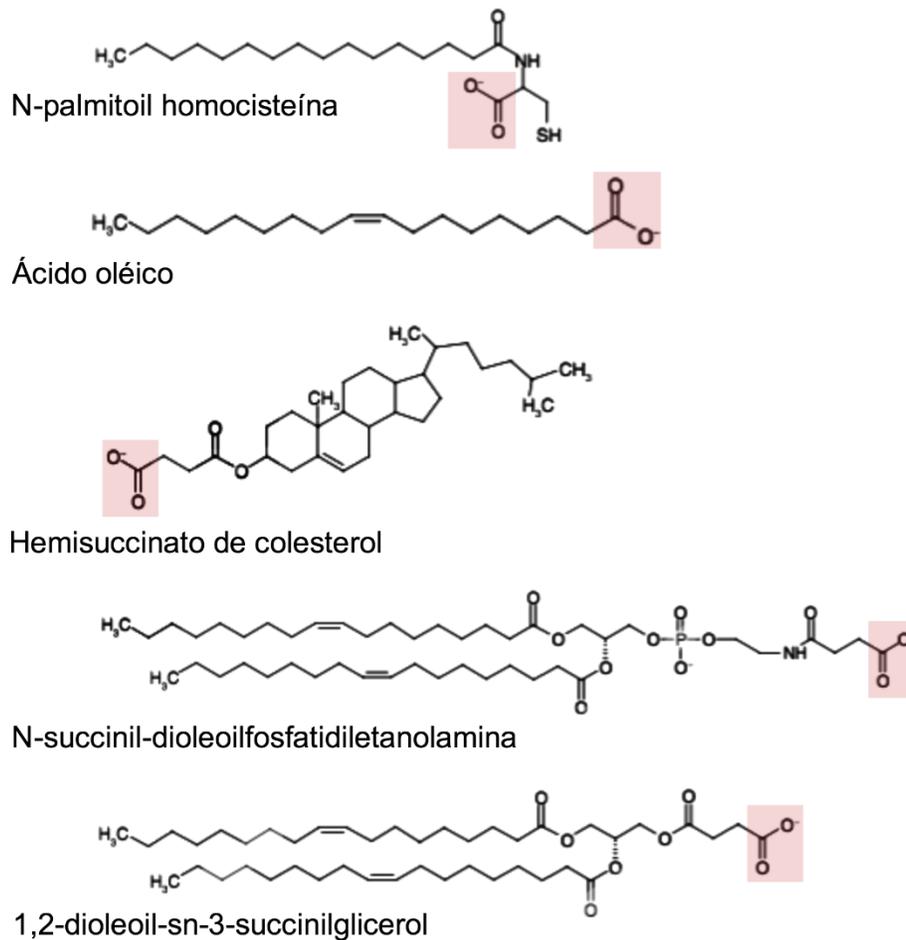


Figura 17. Estabilizadores lipídicos sensibles a pH. (Modificado de Ferreira D.S., et al., 2013).

El mecanismo de acción para la liberación del liposoma o del material encapsulado del endosoma se fundamenta en la transición de fase del PE/DOPE, de bicapa a micelas invertidas, generando la ruptura del liposoma, mecanismo que se muestra en la Figura 18. A pH fisiológico, 7.4, el grupo carboxilo de los lípidos estabilizantes se encuentra ionizado, por lo que la repulsión electrostática entre esta carga y la carga negativa del

grupo fosfato de PE/DOPE induce el acomodo y la estabilización de los liposomas. En el momento en el que el liposoma es endocitado y el pH del medio disminuye, el grupo carboxilo de los estabilizantes se protona y la repulsión cesa, causando la transición de fase de PE/DOPE y la desestabilización de la bicapa lipídica. El uso de CHEMS ha demostrado mejores resultados debido a que la estructura química que presenta, similar a la del colesterol, brinda mayor estabilidad a las vesículas y muestra sensibilidad satisfactoria a cambios de pH. [Ferreira D.S., et al., 2013; Fan Y., et al., 2016]

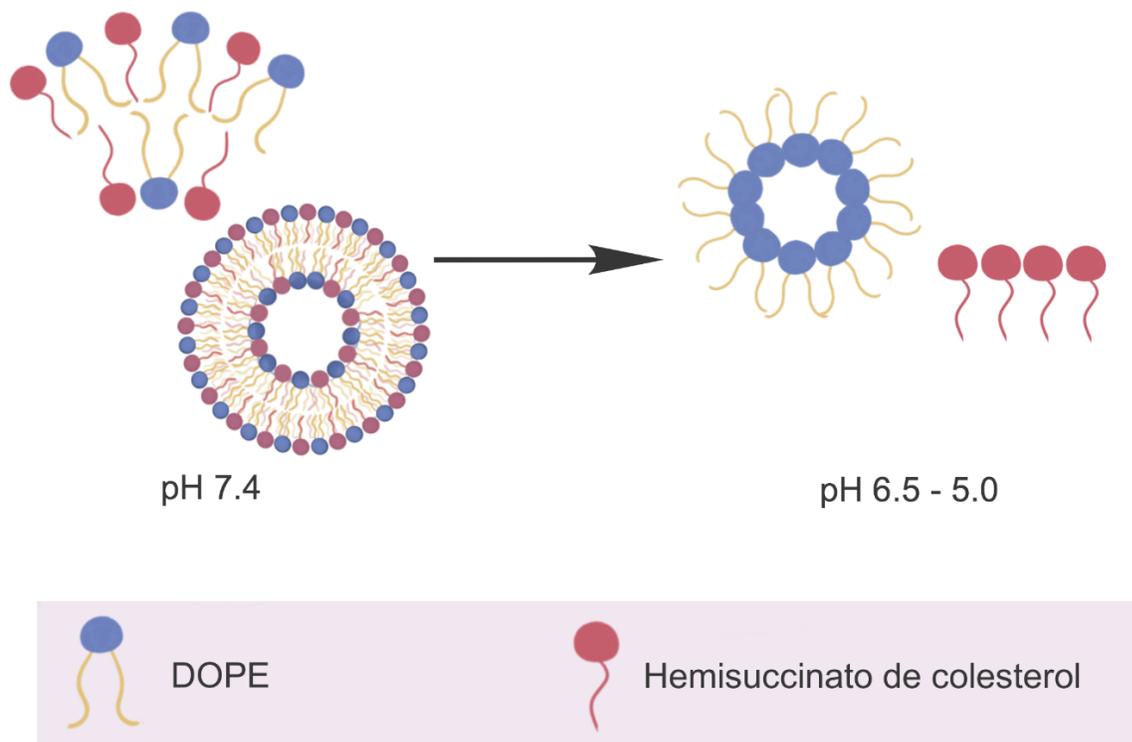


Figura 18. Esquema del mecanismo de acción de la liberación de material liposomas formulados con DOPE y CHEMS. (Modificado de: Fan Y., et al., 2016; Ferreira D.S., et al., 2013).

Alternativamente, se han utilizado péptidos sensibles a cambios de pH para estimular la liberación de material encapsulado de liposomas. Mimetizando el mecanismo de acción de algunos péptidos fusogénicos virales, GALA fue el primer péptido sintetizado y utilizado para la liberación de material encapsulado con respuesta a cambios de pH en liposomas SUVs y LUVs compuestos por DMPC y DPPC principalmente. GALA es un péptido anfipático de 30 residuos de amino ácidos, el cual, adopta una conformación α -hélice en medios ácidos, generando canales o poros produciendo la desestabilización de la bicapa lipídica. [Li W., Nicol F., Szoka Jr F.C., 2003; Ferreira D.S., et al., 2013]

Así mismo, se ha reportado el uso de polímeros anfipáticos que contienen grupos funcionales con características ácidas/básicas. Comúnmente se utilizan copolímeros derivados de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) anclados a los liposomas. Este polímero contiene un grupo carboxilo el cual le otorga sensibilidad a cambios de pH a los liposomas, ya que a pH fisiológico este grupo funcional se encuentra ionizado, por lo que el polímero se acomoda de forma extendida; en medio ácido, el grupo carboxilo se protona aumentando la hidrofobicidad del polímero, lo que provoca que los segmentos hidrofóbicos penetren la membrana produciendo defectos en esta y provocando la fuga del material encapsulado (Figura 19). Se ha reportado la asociación de copolímeros de N-isopropilacrilamida a liposomas formados por EPC:COL, observando una mejora en la liberación del material encapsulado in vitro tanto de principios activos hidrofílicos como hidrofóbicos tras la acidificación del medio. Además de funcionalizar al liposoma de esta manera, los polímeros aumentan la estabilidad y optimizan el tiempo de circulación de los liposomas. [Ferreira D.S., et al., 2013]

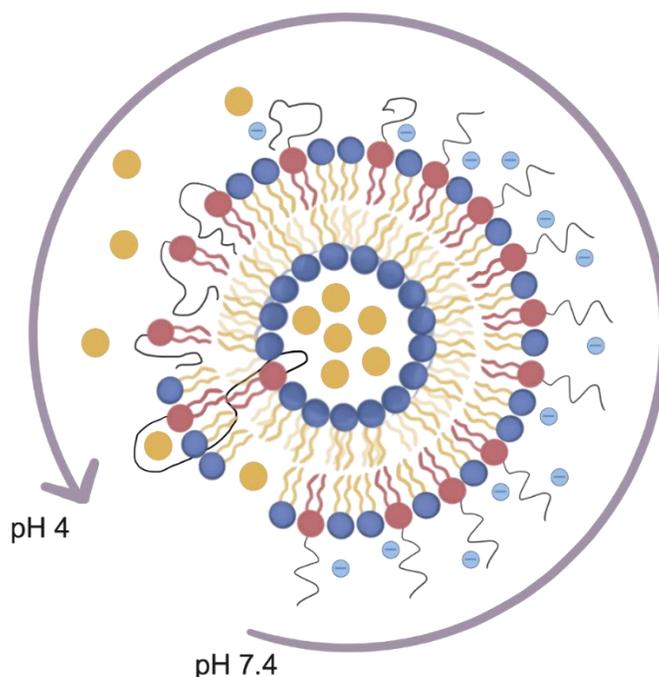


Figura 19. Esquema de liberación de material encapsulado por polímeros sensibles a cambios de pH. (Modificado de: Ferreira D.S., et al., 2013)

4.1.1.2 Liposomas sensibles a cambios redox

La liberación de material encapsulado de sistemas liposomales puede lograrse al utilizar materias primas que respondan a un estímulo de óxido-reducción. En la literatura,

se ha reportado el uso de moléculas conjugadas que permiten la formación de liposomas estables y que, a través de una reacción redox, logran la desestabilización de la bicapa lipídica. [Goldenbogen B., et al., 2011]

El ambiente extracelular se caracteriza por ser de carácter oxidativo, mientras que intracelularmente, el ambiente es de carácter reductor. La regulación del ambiente intracelular esta mediado principalmente por enzimas y moléculas que presentan grupos sulfhidrilos (-SH) y que se encuentran en el citosol. Dentro de estas se encuentran las enzimas de la familia tiorredoxina y glutarredoxinas, las cuales contienen residuos de cisteína circundantes. Estas enzimas se encargan de realizar diversos procesos de óxido-reducción dentro de las células, por lo que es necesario que los residuos de cisteína se encuentren en su estado activo, es decir, reducido. Para ello, existe una concentración alta de glutatión y tiorredoxina reductasa las cuales se encargan de mantener dichos sitios activos, y se debe a estas el potencial reductor del citosol. El glutatión (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) es la principal fuente intracelular no-proteica de grupos tiol capaz de reducir el enlace disulfuro de diversas moléculas. La concentración extracelular en tejido sano de glutatión es alrededor de 2-20 μ M mientras que, intracelularmente, se encuentra entre 2-10 mM, sobre todo dentro del citosol, mitocondria y núcleo. Sin embargo, debido a la alta demanda energética en la masa tumoral, la concentración extracelular de glutatión puede elevarse y alcanzar valores 100 veces más altos que en tejido sano. [Saito G., et al., 2003; Movahedi F., et al., 2015].

La diferencia entre el potencial redox extracelular e intracelular de tejido tumoral referente al tejido sano proporciona la oportunidad de diseñar liposomas que respondan a este estímulo y que, debido a la baja concentración de glutatión en sangre, permanezcan estables hasta alcanzar el blanco terapéutico. El mecanismo de acción de este tipo de liposomas se fundamenta en la reducción del enlace disulfuro por la presencia de glutatión lo que genera la disociación de un segmento del conjugado, provocando la desestabilización y la liberación del material encapsulado. Es importante mencionar que la reducción del enlace puede llevarse a cabo tanto en el espacio extracelular como en el espacio intracelular. Se han sintetizado y reportado polímeros y FL conjugados con puentes disulfuro, algunas de estas moléculas son mPEG-SS-DOPE,

COL-SS-mPEG, entre otros. Utilizando estos conjugados, se ha reportado la preparación de liposomas por mezclas de DPPC y DOPE por el método de hidratación de película fina, posteriormente se realizaron tres ciclos de congelamiento-deshielo con el fin de promover la encapsulación de caseína como medio de contraste. De la dispersión obtenida, se disminuyó el tamaño de partícula por extrusión, obteniendo liposomas unilaminares con diámetros de alrededor de 100 nm. [Maeda T., Fujimoto K., 2006; Movahedi F., et al., 2015; Chi Y., et al., 2017; Kim C.H., et al., 2017]-

Una alternativa prometedora se fundamenta en el uso de quinonas para la producción de liposomas sensibles a la actividad de quinona reductasa. Se ha reportado la conjugación entre DOPE con una quinona trimetilada (*trimethyl-lock quinone*) para la formación de liposomas. Los liposomas reportados se prepararon a través del método de hidratación de película fina, reduciendo el tamaño de partícula posteriormente por extrusión, obteniendo liposomas unilaminares con diámetros entre 80-200 nm. El mecanismo de liberación se basa en la reducción de la quinona (Q), la cual al ganar dos electrones forma la hidroquinona (HQ) correspondiente, dicha hidroquinona es conformacionalmente inestable, por lo que de manera espontánea se disocia del FL en forma de lactona (L) (Figura 20). Como se mencionó anteriormente, DOPE no es capaz de formar liposomas por sí solo, en este caso, la conjugación con la quinona permite la formación de la vesícula y al perder dicha molécula el liposoma colapsa, liberando su contenido. Este sistema ha demostrado ser eficiente *in vitro* utilizando como agente reductor $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Sin embargo, la posibilidad de respuesta a enzimas reductoras endógenas existe. [Ong W., 2008; Mura S., et al., 2013]

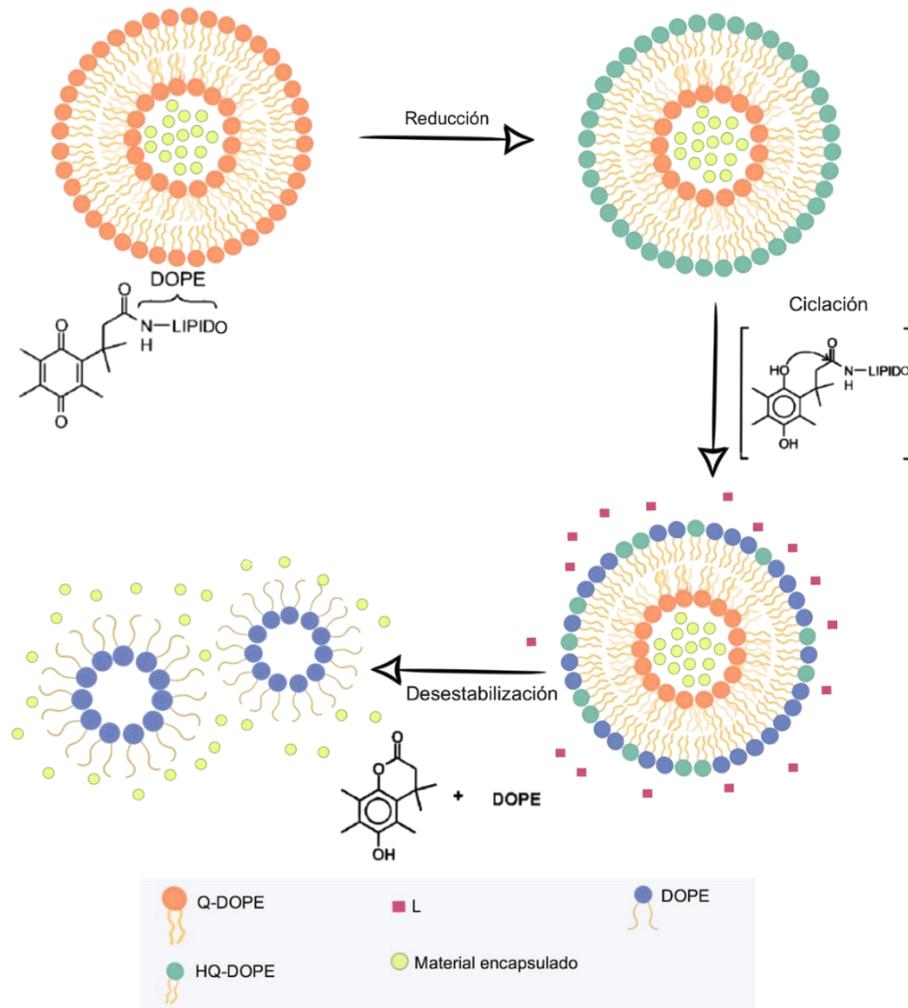


Figura 20. Mecanismo de liberación del material encapsulado con conjugados Quinona-DOPE. (Modificado de: Ong W., 2008).

La NADPH:quinona oxidoreductasa-1 es una flavoproteína citosólica que cataliza la reducción, mediante la donación de dos electrones, de una gran variedad de moléculas. Esta enzima ha sido utilizada para la activación de profármacos que contienen quinonas en su estructura química, y que son activados con la formación y disociación de la lactona y el fármaco correspondiente, dicho mecanismo se ha demostrado con distintos agentes quimioterapéuticos. Distintas fuentes han reportado también, que existe una diferencia importante en la concentración de NADPH durante la proliferación celular de tejido tumoral y sano, siendo mucho mayor en tumores neoplásicos, por lo que el desarrollo de un sistema liposomal con base a las características mencionadas es prometedor. [Volpato M., 2007; Ong W., 2008]

4.1.1.3 Liposomas con respuesta enzimática

Diversas aplicaciones son posibles al utilizar lípidos conjugados que bajo ciertas condiciones lleven a cabo reacciones enzimáticas. Como se mencionó anteriormente, el diseño de este tipo de liposomas aprovecha la presencia anormal de cierto tipo de enzimas asociadas con alguna patología. [Zhu L., et al., 2012]

Las metaloproteinasas de matriz *MMPs* -del inglés *Matrix Metalloproteases*- forman parte de las enzimas degradativas dependientes de Zn^{2+} y Ca^{2+} encontradas en la matriz extracelular. Se han identificado alrededor de 26 grupos de *MMPs* encargadas de degradar distintos tipos de moléculas, dentro de estas, *MMP-2* y *MMP-9* han sido de interés por su relación con la progresión y metástasis de una variedad de tumores neoplásicos. Entre estos se encuentran tumores relacionados con cáncer de mamá, colorrectal, pulmón, páncreas y ovarios, en donde las enzimas antes mencionadas se encuentran sobre expresadas. Considerando esto, se han diseñado y desarrollado sistemas liposomales que respondan a la presencia anormal de estas proteínas. [Sarkar N., et al., 2008, Elegbede A I., 2008; Banarjee., et al., 2009, Zhu L., 2012].

El sustrato natural de *MMP-2* y *MMP-9* es el colágeno, el cual se caracteriza por tener una estructura terciaria de triple hélice, mientras que el sitio de escisión se realiza entre los residuos de amino ácidos Glucina-Valina, sin embargo, también reconoce el enlace peptídico entre G-X, donde X: leucina, isoleucina y valina. [Sarkar N., et al., 2008; Banarjee., et al., 2009].

Teniendo esto en cuenta, se han sintetizado lipopéptidos para ser incorporados en la bicapa lipídica y funcionalicen al sistema liposomal. Para la síntesis de estos lipopéptidos se ha considerado lo siguiente: la porción peptídica debe exhibir conformación de triple hélice, debe contener el sitio de escisión del sustrato natural (Glu-X), debe ser resistente a la acción de otras proteasas y debe presentar la capacidad de desenrollarse para permitir la interacción enzima-sustrato. Se ha reportado la fabricación de liposomas MLV con 30% de lipopéptido y DOPC o DSPC, formados por el método de hidratación de película fina, el tamaño y laminaridad fueron disminuidos por sonicación con el fin de generar LUV, posteriormente la muestra fue homogenizada por extrusión a través de una membrana con tamaño de poro de 100 nm, observando una liberación de

carboxifluoreseina encapsulada rápida en la presencia de enzimas extracelulares. [Sarkar N., et al., 2008; Elegbede A I., 2008; Banarjee., et al., 2009]

Se han reportado dos enfoques distintos de la funcionalización de los liposomas utilizando esta estrategia, uno de ellos consiste en desestabilizar por completo al liposoma, liberando su contenido y el segundo prolongar el tiempo de circulación y mejorar la internalización celular del liposoma. [Sarkar N., et al., 2008; Elegbede A I., 2008; Banarjee., et al., 2009; Zhu L., 2012]

Con el fin de estimular la liberación del liposoma en respuesta a la presencia de las enzimas, se ha reportado la conjugación de péptidos sintetizados con distintos ácidos grasos, entre ellos: ácido esteárico, ácido oleico y ácido palmítico. Los lipopéptido conjugados se añaden en menor proporción a la formulación liposomal para su fabricación. Por lo que la parte lipídica del lipopéptido queda embebida en la bicapa lipídica mientras que el péptido se encuentra en la superficie exterior del liposoma, aunque también puede encontrarse en la superficie interior. El mecanismo de acción de la liberación del material encapsulado consiste en “descorchar” o “desmembrar” al liposoma. La escisión enzimática del lipopéptido resulta en la desestabilización de los dominios lipídicos de los liposomas causando la liberación del material encapsulado, posteriormente es posible que los FL se reorganicen y logren estabilizar al liposoma. La cantidad de material liberado depende tanto de la concentración de lipopéptido, la concentración de MMP-2/9 y de la estabilidad de la interacción entre el ácido graso y el segmento hidrofóbico del FL que conforma el liposoma una vez escindido el péptido. La capacidad del liposoma de reorganizarse y detener la liberación del material ofrece la oportunidad de generar sistemas de retroalimentación negativa. [Sarkar N., et al., 2008; Elegbede A I., 2008; Banarjee., et al., 2009]

Además, se han sintetizado lipopéptidos conjugados con polímeros de polietilenglicol *PEG* con el fin de prolongar el tiempo de circulación de los liposomas, mecanismo que se abordará posteriormente. Este tipo de funcionalización le brinda al sistema mayor estabilidad y permite que las cadenas poliméricas se disocien en el sitio donde la concentración de enzima es alta manteniendo la integridad del liposoma, de

esta manera es posible exhibir otras moléculas conjugadas o mejorar la penetrabilidad celular al haber mayor proximidad entre el liposoma y la célula. [Zhu L., 2012]

Así mismo, se ha reportado la formulación de liposomas sensibles a la esterasa *Fosfolipasa secretora A2* -sPLA₂ por sus siglas en inglés *Secretory Phospholipase A₂*. Dicha enzima se encarga de hidrolizar el enlace éster de glicerofosfolípidos en la posición sn-2 liberando el ácido graso y lisofosfolípido correspondiente. En la literatura se ha reportado que la concentración de dicha enzima se sobre expresa en cáncer de colon, mamario, pancreático y próstata de manera localizada, mientras que, en shock séptico e inflamación hay un aumento de la enzima en circulación sistémica, dicha situación permite desarrollar un sistema liposomal que responda a la presencia de esta enzima. [Zhu G., et al., 2011; Pourhassan H., et al., 2017].

Debido a que la enzima ha demostrado preferencia por estructuras lipídicas organizadas, el uso de sistemas liposomales para la administración de diversos agentes citotóxicos parece un candidato prometedor. Se ha reportado la formación de liposomas sensibles a dicha enzima por hidratación de película fina y posterior disminución de tamaño de partícula por extrusión, obteniendo liposomas unilaminares con un intervalo de diámetro de 80-100 nm. Se ha demostrado que sPLA₂ presenta alta especificidad por fosfolípidos aniónicos y de cadenas hidrocarbonadas cortas, demostrado tener mejores rendimientos en cuanto a la liberación controlada de liposomas que presentan dichas características, además de que esto permite modular la actividad de la enzima sobre la degradación del liposoma al modificar los componentes del sistema. El mecanismo de acción de estos liposomas se fundamenta en la desestabilización de la bicapa liposomal debido a la hidrólisis de los glicerofosfolípidos que los conforman, provocando la liberación del material encapsulado. Además, se ha reportado que los productos de la hidrólisis del éster potencian la permeabilidad de moléculas a través de la membrana, y en altas concentraciones, genera toxicidad celular al formar agregados con propiedades detergentes. [Zhu G., et al., 2011; Pourhassan H., et al., 2017].

Actualmente, LiPlaCis, un sistema liposomal sensible a sPLA₂ para la administración del agente quimioterapéutico cisplatino, es el primer sistema con respuesta a un estímulo enzimático que se encuentra en estudios clínicos Fase I/II para

evaluar la seguridad y tolerabilidad de LiPlaCis en pacientes con tumores avanzados o refractarios. [Pourhassan H., et al., 2017; Clinicaltrials.gov 2017].

4.1.2 Estímulos físicos

4.1.2.1 Liposomas termosensibles

El uso de calor (hipertermia leve) como método terapéutico ha sido utilizado a través de los años como coadyuvante en el tratamiento de diversas enfermedades, entre estas, se ha distinguido por presentar resultados favorables en el tratamiento tumores malignos al presentar un efecto sinérgico entre la hipertermia y la quimioterapia. En el caso del tratamiento de cáncer, la hipertermia consiste en aumentar la temperatura de algún tejido de forma localizada, alcanzando temperaturas entre 39-42°C, potenciando la sensibilidad de células cancerígenas a los efectos de la radiación y agentes quimioterapéuticos. [Ta T., Porter T.M., 2013; Dou Y., et al., 2017].

La hipertermia leve localizada presenta varios efectos sobre el tejido y las células, entre estos se encuentran:

- i. Aumento del flujo sanguíneo en el sitio donde el calor es aplicado, aumentando la permeabilidad vascular y celular.
- ii. Interferir con procesos bioquímicos dependientes de la temperatura, como son la regulación de la apoptosis, ciclo celular, reparación de ADN y síntesis de proteínas.
- iii. Necrosis del tejido dependiendo de la temperatura y tiempo de exposición.

Es importante mencionar que tanto tejido neoplásico como tejido sano son susceptibles a presentar los efectos antes mencionados, sin embargo, la alta demanda energética, falta de oxigenación y estrés que sufre el tejido canceroso lo hace menos tolerante al aumento de temperatura y más susceptible a sus efectos. [Ta T., Porter T.M., 2013; Dou Y., et al., 2017].

El éxito de la hipertermia leve depende de la eficiencia de la elevación de la temperatura en el lugar deseado, hoy en día existen diversas técnicas para inducir calor. A continuación, se muestran algunas de las técnicas utilizadas. [Ta T., Porter T.M., 2013]

Tabla 5. Técnicas de inducción de hipertermia leve.

Técnica	Características
Hipertermia regional	Consiste en el calentamiento de una zona superficial utilizando un baño de agua. Se aplica cuando se tratan tumores superficiales y es altamente utilizado en estudios preclínicos. Este tipo de calor eleva la temperatura tanto en tumores como en tejido sano adyacente.
Hipertermia localizada: Aplicadores electromagnéticos externos	Se utilizan aplicadores que emiten microondas o radioondas para generar calor de manera superficial localizada. Típicamente tienen un diámetro de calentamiento de 15 cm y una profundidad de 3 cm. Sin embargo, la profundidad está limitada en superficies irregulares.
Hipertermia intersticial localizada	El uso de antenas o aplicadores que se insertan directamente en el tumor para generar calor de manera directa, localizada y a mayor profundidad. Entre estas se utilizan antenas de microondas, electrodos de radiofrecuencia, etc, con invasión mínima. Para asegurar una temperatura homogénea se utilizan múltiples aplicadores a distancias o electrodos con extremidades extensibles.
Hipertermia localizada: Ultrasonido enfocado	Utiliza ultrasonido enfocado a altas frecuencias para generar calor localizado a altas profundidades de manera no invasiva. Actualmente, se ha buscado acoplar resonancia magnética con esta técnica con el fin de guiar y monitorear en tiempo real la aplicación de calor.

Considerando las ventajas que proporciona la inducción de hipertermia leve en tejido neoplásico, se han desarrollado sistemas liposomales termosensibles para el tratamiento de este tipo de padecimientos. Con este tipo de sistemas, se busca que los liposomas sean estables a temperatura fisiológica con mínima fuga de material encapsulado, y que al encontrarse con el aumento en la temperatura liberen el material de manera rápida y efectiva. Actualmente, la formulación de liposomas termosensibles se clasifica en tres categorías: Liposomas Termosensibles Tradicionales -*TTSL*- por sus

siglas en inglés *Traditional Thermosensitive Liposomes*, Liposomas Termosensibles que contienen Lisolípidos -LTSL- por sus siglas en inglés *Lysolipid-containing Thermosensitive Liposomes* y Liposomas Termosensibles modificados con Polímeros -PTLS- por sus siglas en inglés *Polymer-modified Thermosensitive Liposomes*. [Ta T., Porter T.M., 2013; Dou Y., et al., 2017].

4.1.2.1.1 Liposomas Termosensibles Tradicionales TTSL

Como se mencionó anteriormente, los fosfolípidos transitan de un estado gel-sólido a líquido-cristalino a una temperatura determinada. La formulación de TTSL se fundamenta en esta cualidad física, por lo que se utilizan fosfolípidos con un T_m alrededor de 42-43 °C. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk M., et al., 2016].

A temperaturas menores a T_m , las cadenas hidrocarbonadas se encuentran ordenadas, condensadas y completamente extendidas, los fosfolípidos tienen poco movimiento y son compactos. Conforme la temperatura aumenta y se acerca a T_m , la movilidad de los fosfolípidos aumenta gradualmente, formando interfaces entre dominios que permanecen en estado gel-sólido y líquido-cristalino, generando incompatibilidad en el empaquetamiento molecular e incompatibilidad hidrofóbica, aumentando la permeabilidad de la bicapa y provocando la liberación de material encapsulado. A temperaturas por encima de T_m , la bicapa se encuentra por completo en estado líquido-cristalino, permitiendo el libre y rápido movimiento de los fosfolípidos en el plano, lo que hace a la bicapa fluida y completamente permeable. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk M., et al., 2016].

Los primeros liposomas termosensibles fueron LUVs obtenidos por métodos de hidratación de película fina y posterior disminución de tamaño de partícula, formulados con DPPC, fosfolípido que presenta una T_m de 41 °C. Se observó que los liposomas formulados con este FL respondían al estímulo, sin embargo, la liberación del material encapsulado era lenta e insuficiente. Debido a esto, se agregaron otros FL tales como DSPC y HSPC, la adición de estas especies generó una mejora en la cantidad de material liberado ya que la mezcla de FL provoca mayor incompatibilidad de empaquetamiento aumentando la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, la mezcla de FL para la fabricación de liposomas termosensibles trajo consigo una desventaja importante. La

mezcla FL con cadenas hidrocarbonadas de distintas longitudes (DPPC:C16, DSPC:C18) genera un aumento en la T_m , lo que compromete la aplicación clínica de los TTSL, por lo que la adición de DSPC a la formulación inicial aumentaba la T_m a 46°C arriesgando el bienestar de tejido sano. Así mismo, se ha reportado que la adición de PEG y colesterol comprometen la sensibilidad de los liposomas hacia al estímulo. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk M., et al., 2016].

Con el fin de desarrollar sistemas con T_m dentro del rango clínicamente aceptado (39-42 °C) y liberación de material encapsulado eficiente, se han añadido lisofosfolípidos y polímeros a la formulación, otorgándole al sistema dichas cualidades. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk M., et al., 2016; Dou Y., et al., 2017].

4.1.2.1.2 Liposomas Termosensibles que contienen Lisofosfolípidos *LTSL*

Como se mencionó anteriormente, los lisofosfolípidos son FL con una sola cadena hidrocarbonada y una cabeza polar, debido a su geometría los lisofosfolípidos tienden a formar micelas. Dichas especies químicas disminuyen la T_m de TTSL, mejoran la liberación de material encapsulado y disminuyen la dosis térmica logrando resultados favorables. Se ha reportado el uso de Miristoilpalmitoilfosfatidilcolina (MPPC), la adición de este lisofosfolípido disminuyó la T_m de una formulación de TTSL de 43 °C a un rango entre 39-42 °C, liberando el 50% del material encapsulado en 20 segundos a 42 °C.

Conforme la fluidez de la bicapa lipídica aumenta con el ascenso y aproximación de la temperatura a T_m , los lisofosfolípidos obtienen mayor movilidad, lo que les permite concentrarse en las interfases y eventualmente, debido a la tendencia de ensamblarse en micelas, formar poros en la bicapa potenciando la liberación del material encapsulado. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk M., et al., 2016; Dou Y., et al., 2017].

Así mismo, se ha reportado el uso de DSPE debido a la tendencia de dicho FL a formar micelas invertidas. Por lo que, bajo un mecanismo de acción similar, tanto los lisofosfolípidos como DSPE tienden a formar poros en la bicapa lipídica. [Ta T., Porter T.M., 2013].

La desventaja principal de LSTL, reside en que alrededor del 70% de los lisofosfolípidos se disocia de los liposomas durante la primera hora tras haber sido

administrado *in vivo*, y se ha demostrado *in vitro*, que entre el 20%-80% del material encapsulado se fuga a 37°C en medio que contiene suero dentro de los primeros 15 minutos. Estos resultados indican que la termosensibilidad del sistema está comprometida por la disociación de los componentes, exponiendo el tejido sano a los efectos del fármaco por liberación prematura del material encapsulado, mientras que la cantidad que llega al blanco terapéutico es insuficiente. Para contrarrestar estos efectos, se ha propuesto inducir la hipertermia previa a la administración o inmediatamente posterior a esta. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk., et al., 2016; Dou Y., et al., 2017].

4.1.2.1.3 Liposomas Termosensibles modificados con Polímeros PTLs

La incorporación de polímeros sintéticos termosensibles a la formulación ofrece tanto la capacidad de funcionalizar liposomas no termosensibles como de potenciar la termosensibilidad de liposomas termosensibles. [Ta T., Porter T.M., 2013].

Los polímeros utilizados para este tipo de funcionalización se caracterizan por presentar una transición de fase a una temperatura determinada, conocida como Temperatura Inferior de Disolución Crítica -LCST- del inglés *Low Critical Solution Temperature*. A temperaturas por debajo de este valor, el polímero es soluble en agua, ya que existen enlaces de hidrógeno entre el polímero y el disolvente. Conforme la temperatura aumenta y se aproxima a LCST, la interacción entre el agua y el polímero se debilita, los enlaces de hidrógeno se pierden y las interacciones hidrofóbicas del polímero aumentan, provocando la precipitación de este. Dicha transición de fase provoca la disrupción de la bicapa lipídica y por consecuencia, la liberación de material encapsulado. La LCST, puede ser modificada variando la proporción de monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos de la cadena polimérica. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk., et al., 2016].

Los polímeros incorporados con mayor frecuencia a liposomas para otorgar o potenciar termosensibilidad son: poli (N-sustituido acrilamidas), siendo el más estudiado poli (N-isopropilacrilamida) (p(NIPAAm)), poli(N-vinileters) y poloxámeros, estos últimos presentan un mecanismo de acción diferente, el cual se abordará más adelante. [Ta T., Porter T.M., 2013].

Los polímeros basados en la estructura de poli (N-sustituido acrilamidas) son la clase de polímeros termosensibles más estudiados, siendo el (p(NIPAAm)) el aplicado con

más frecuencia en la formulación de liposomas termosensibles, el cual presenta una LCST de 32°C. Para evitar la desorción de los polímeros de la bicapa lipídica como en el caso de los lisofosfolípidos, el p(NIPAAm) ha sido conjugado con octadecil acrilato, ya que la cadena alquílica proporciona un sitio de anclaje entre el polímero y el liposoma. Sin embargo, la LCST resultante disminuía a 27°C, lo que comprometía la aplicación clínica de dicha formulación. Posteriormente, se realizó la copolimerización de p(NIPAAm) con acrilamida hidrofílica (AAm) utilizando distintas concentraciones, se observó que existía una relación directamente proporcional entre la concentración de AAm y la LCST. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk., et al., 2016].

Es importante mencionar que existen varios factores que afectan tanto la LCST como la cantidad liberada de material encapsulado. Se ha demostrado que la posición de anclaje del polímero al liposoma y el copolímero utilizado son factores críticos. En cuanto al anclaje, se ha reportado una respuesta al estímulo más acentuada cuando el sitio de anclaje se encuentra al final de la cadena del polímero, al contrario de cuando se encuentra anclado en distintas y múltiples posiciones a lo largo del polímero. Esto se debe a que cuando la cadena está anclada por un extremo de la molécula, la transición hidrofílica-hidrofóbica tiene mayor libertad conformacional, provocando la liberación de material encapsulado de manera más eficiente. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk., et al., 2016].

Así mismo, el comonómero de elección presenta un efecto sobre la eficiencia de la liberación de material encapsulado. En la literatura se ha reportado que aquellos copolímeros que generen dominios más hidrofóbicos presentan interacción más fuerte con la bicapa lipídica, causando mayor liberación del material encapsulado. La copolimerización de p(NIPAAm) con N-acriloilpirrolidina (Apr), N,N-dimetilacrilamida (DMAMA) y N-isopropilmetacrilamida (p(NIPMAM)) demostró lo anterior. De manera que la mayor cantidad de material liberado se alcanzó con p(NIPAAm)>DMAM>Apr, ya que el copolímero p(NIPAAm)-co-p(NIPMAM) forma dominios más hidrofóbicos. Considerando esto, es posible concluir que la elección del comonómero utilizado define tanto la LCST como el grado de material liberado, esto representa una ventaja ya que

ofrece la oportunidad de diseñar copolímeros con características determinadas. [Ta T., Porter T.M., 2013].

Los copolímeros basados en p(NIPAAm) no son biodegradables, lo que representa la desventaja principal de los sistemas formulados con este tipo de material. Una alternativa ha sido la aplicación de poli (N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (p(HPMA)), los cuales han sido estudiados como acarreadores de fármacos antineoplásicos biodegradables. [Ta T., Porter T.M., 2013].

Otro enfoque con el fin de otorgar termosensibilidad a los sistemas liposomales es el uso de poli (N-vinileters), sin embargo, no han sido tan estudiados como los polímeros antes mencionados. Dentro de este tipo de polímeros, se ha desarrollado el uso de (2-etoxi)etoxietil vinil éter (EOEOVE), utilizando como molécula de anclaje a la bicapa lipídica octadecil vinil éter (ODVE). Se ha demostrado que dicho copolímero presenta LSCT de 40°C lo que lo hace candidato para la aplicación clínica, mientras que la eficiencia de liberación depende de la longitud de la cadena de EOEOVE. Conforme la longitud de dicha cadena aumenta, la liberación del material encapsulado es más potente, lo que indica que el aumento de la longitud de la cadena genera la formación de dominios más hidrofóbicos. En la figura 21 se muestra el mecanismo de acción de la liberación de TTSL, LSTL y PTLs. [Ta T., Porter T.M., 2013; Van Elk., et al., 2016].

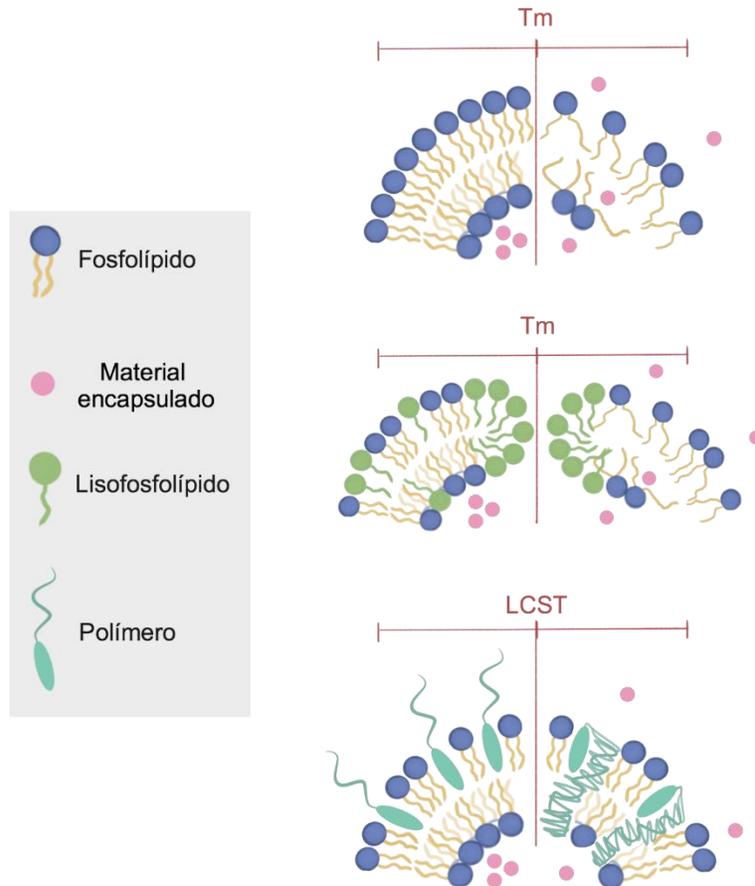


Figura 21. Mecanismo de acción de TTSL, LSTL, y PTLs. (Modificado de Ta T., Porter T.M., 2013).

Los poloxámeros son copolímeros conformados por tres bloques repetitivos. Cada polímero consiste en un núcleo hidrofóbico constituido por óxido de propileno, PPO, flanqueado por dos bloques hidrofílicos de polietileno, PEO. Este tipo de copolímeros han sido utilizados para conferir termosensibilidad a los liposomas, sin embargo, el mecanismo de acción difiere de los copolímeros mencionados anteriormente. En medio acuoso, los poloxámeros se mantienen en cadenas individuales no asociadas, conforme la temperatura aumenta y alcanza un valor determinado, la hidrofobicidad del polímero aumenta y las cadenas se asocian formando estructuras micelares. A la temperatura a la que ocurre la formación de micelas se le conoce como Temperatura Micelar Crítica, CMT. En los liposomas, los poloxámeros se encuentran encapsulados en el núcleo acuoso y no interaccionan con la bicapa lipídica, conforme la temperatura se aproxima a CMT, las micelas formadas se embeben en la bicapa causando defectos y provocando la liberación

del material encapsulado. La CMT de los poloxámeros puede ser modificada al variar el peso molecular, el balance hidrofílico-lipofílico y la concentración del copolímero. [Ta T., Porter T.M., 2013].

Celsion Corporation ha desarrollado una formulación de LSTL para la administración del agente quimioterapéutico doxorubicina, llamado ThermoDox. Actualmente, ha culminado el estudio clínico Fase III de ThermoDox con ablación estandarizada de radiofrecuencia (RFA) para el tratamiento de carcinoma hepatocelular (HCC) (OPTIMA) con el propósito de determinar la efectividad del tratamiento, así como el estudio clínico fase I/II de ThermoDox con hipertermia aprobada en el tratamiento de la recurrencia del cáncer de mama en la pared torácica (DIGNIT) con el propósito de evaluar la bioequivalencia/farmacocinética, seguridad y eficacia del tratamiento. (Celsion Corporation 2017; Clinicaltrials.gov 2017).

4.1.2.2 Magnetoliposomas

Los magnetoliposomas (ML) se refieren a la clase de liposomas que entrapan nano partículas magnéticas, y, por tanto, responden a la inducción de un campo magnético externo. El interés por este tipo de nanoacarreadores surge de la posibilidad de ser utilizados como agentes teranósticos, por lo que su aplicación combina tanto el diagnóstico, como medio de contraste en resonancia magnética nuclear, como en el tratamiento de distintos padecimientos. Sobre este último, los magnetoliposomas permiten tanto dirigir el sistema liposomal al blanco terapéutico y mantenerlo en ese sitio por la atracción magnética de las nanopartículas con un campo magnético externo aumentando la concentración de fármaco en el sitio, como la liberación controlada del material encapsulado en respuesta a este mismo estímulo. [Guo H., et al., 2015; German S.V., 2015; Yang Y., et al., 2016; Kang T., et al., 2017].

El uso de nanopartículas magnéticas ha demostrado tener gran potencial en diversos campos. En el área biomédica, las nanopartículas de óxido de hierro han demostrado biocompatibilidad y propiedades magnéticas que permiten sean utilizadas. Se utilizan con mayor frecuencia la Maghemita, Fe_2O_3 , y Magnetita, Fe_3O_4 , ambos presentan propiedades ferrimagnéticas. Sin embargo, cuando las partículas de estos óxidos se encuentran por debajo de los 200 nm, pierden la magnetización permanente y

se comportan como un solo dominio magnético adoptando características superparamagnéticas (SPIONs del inglés *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*), por lo que las nanopartículas pueden ser magnetizadas de forma similar a un paramagneto pero la susceptibilidad magnética es mucho más elevada. [German S.V., 2015; Monnier C.A., 2014; Tietze R., et al., 2015].

La preparación de SPIONs puede realizarse tanto con métodos de tipo “top down” o “bottom up”. Los métodos “top down”, dentro de los que se encuentra la disminución de tamaño de partícula por medios físicos, presentan la desventaja de tener poco control sobre el tamaño y dispersión de la partícula. Debido a esto, se utiliza con mayor frecuencia la coprecipitación de sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} en medios alcalinos, o por descomposición térmica, donde se utiliza un precursor organometálico, oleato de hierro o carbonilos de hierro, y se coloca en un solvente con alto punto de ebullición, ambos son métodos de tipo “bottom up”. Posteriormente, la superficie de las SPIONs es modificada con el propósito de conferir estabilidad al coloide y evitar la aglomeración de las partículas, además, el recubrimiento determina la interacción y posicionamiento de las SPIONs en los liposomas. Se ha reportado que las SPIONs pueden ser encapsulados en el núcleo acuoso del liposoma al recubrir las nanopartículas con citrato o hidróxido de tetrametilamonio, o bien, situarse en la bicapa lipídica al recubrirlos con ácidos grasos. Generalmente, los magnetoliposomas se obtienen a través del método de hidratación de película fina, obteniendo MLV que posteriormente son sonicados o extruidos con el fin de disminuir el tamaño y laminaridad de las vesículas. Sin embargo, el método varía dependiendo de la naturaleza del recubrimiento de las NP. Se ha reportado que cuando éstas están recubiertas por materiales de naturaleza hidrofóbica, como por ácido oleico, las NP se agregan a la fase lipídica para la consecuente formación de la película fina por evaporación de solventes. Por otro lado, cuando las NP presentan recubrimientos hidrofílicos como el citrato, se añaden al medio de hidratación. [Monnier C.A., 2014; Mohammed L., et al., 2017; Guo H., et al., 2015; Nappini S., et al., 2011].

Como se mencionó anteriormente, los ML presentan varias aplicaciones, entre estas se encuentra la orientación del sistema liposomal a un sitio específico al colocar un campo magnético estático y continuo en la zona requerida, ya que las SPIONs son

capaces de magnetizarse fuertemente para ser guiadas y localizadas en el blanco terapéutico. Mientras que, al retirar el campo magnético, las SPIONs pierden la magnetización lo que previene la agregación de las nanopartículas *in vivo*. [Ridi F., et al., 2014; Kang T., 2017].

En cuanto a la liberación controlada del material encapsulado, se han descrito dos mecanismos principales. El primero de estos se fundamenta en la exposición de las SPIONs a un campo magnético de corriente alterna a altas frecuencias, lo que resulta en la liberación de energía en forma de hipertermia magnética. El calentamiento de las nanopartículas es causado por mecanismos de pérdida de relajación de Néel y Brown, la cual consiste en la rotación del momento magnético para alinear dicho dominio con el campo magnético externo. La eficiencia de calentamiento depende tanto de la estructura de los SPIONs y las propiedades magnéticas de éstas, como de la intensidad y frecuencia del campo magnético de corriente alterna inducido. La liberación de material encapsulado se logra a través del mismo mecanismo que en el caso de TTSL, debido a que el aumento de la temperatura genera una transición de fase de los FL de la bicapa. [Hervault A., Thanh N.T.K., 2014; Laurent S., et al., 2011; Ridi F., et al., 2011; Tomitaka A., et al., 2015; Mohammed L., et al., 2017].

Adicionalmente, se ha reportado el control de la liberación de material encapsulado al utilizar campos magnéticos alternos de baja frecuencia (LF-AMF del inglés *Low Frequency Alternating Magnetic Field*), mecanismo por el cual se evita la generación de hipertermia. Este mecanismo es una alternativa prometedora para la aplicación de ML en órganos en donde el aumento de temperatura podría ocasionar daño severo, como el cerebro, hígado y riñones. De acuerdo con la literatura, la permeabilidad de los ML aumenta cuando son expuestos a LF-AMF debido a la oscilación mecánica de las nanopartículas inducida por el campo, lo que provoca la deformación estructural del liposoma. La liberación del material encapsulado a través de este tipo de campo magnético se ha demostrado tanto con las nanopartículas encapsuladas en el núcleo acuoso como en la bicapa lipídica. [Nappini S., et al., 2010; Nappini S., et al., 2011; Ridi F., et al., 2014; Guo H., et al., 2015; Tomitaka A., et al., 2015].

4.1.2.3 Liposomas ecogénicos o sónicamente activos

El ultrasonido (US) consiste en el uso de ondas mecánicas longitudinales que se propagan en el medio a través de cambios de presión a frecuencias mayores de 20 KHz, por lo que resultan inaudibles para el oído humano. Actualmente, el uso de ultrasonido ha dejado de ser exclusivo para el diagnóstico y monitoreo de diversos padecimientos, sino que se ha aplicado de manera terapéutica para la liberación controlada y en respuesta a este estímulo, del material encapsulado de sistemas liposomales, así como la ablación de tejido tumoral a través de los diversos efectos biológicos que provoca. [Boissenot T., et al., 2016]

El uso de ultrasonido como estímulo físico para la liberación del material encapsulado presenta diversas ventajas, entre estas sobresale que es una herramienta que ha sido utilizada anteriormente, por lo que está bien caracterizada y ha demostrado biocompatibilidad, puede generar imágenes en tiempo real lo que permite monitorear la inducción del estímulo y la liberación del material encapsulado, es una técnica no invasiva pero que permite penetrar de manera profunda los tejidos. [Huang S., 2008].

Es importante definir algunos parámetros que modulan las ondas ultrasónicas, ya que de la variación de estas desencadenan diversos efectos biológicos. Entre estos se encuentra la frecuencia, de la cual depende la resolución de la imagen obtenida, la profundidad de la penetración de la onda, la cavitación potencial del sistema, y la intensidad ultrasónica, la cual determina la cantidad de energía liberada en el sitio expuesto. El ultrasonido puede clasificarse en tres categorías dependiendo de la frecuencia, el número de ciclos realizados por unidad de tiempo, de la onda: baja frecuencia (20-200 KHz), frecuencia media (0.7-3 MHz), y de alta frecuencia (>3 Mhz). La resolución de la imagen obtenida a través del ultrasonido aumenta conforme aumenta la frecuencia de la onda, mientras que la profundidad de la penetración está inversamente relacionada con la frecuencia, es decir, a mayores frecuencias la profundidad de penetración es menor. A una frecuencia de 1 MHz, se alcanza una penetración de alrededor de 10 cm de profundidad, mientras que, a 10 MHz de alrededor de 1 cm, eso permite modular el grado de exposición del tejido. La intensidad del ultrasonido se define como la potencia de la onda ultrasónica sobre el área a la cual es expuesta, y está

relacionada con la presión acústica, la cual está relacionada con la cantidad de energía que recibe el sitio expuesto. Dependiendo de la intensidad, el ultrasonido puede clasificarse como US de baja intensidad ($0.125 - 3 \text{ W/cm}^2$) y de alta intensidad ($>3 \text{ W/cm}^2$), biológicamente, el US de baja intensidad es capaz de inducir cambios reversibles y por tanto no daña de manera permanente el tejido, mientras que los daños ocasionados por el US de alta intensidad suelen ser irreversibles. La exposición continua del tejido al ultrasonido puede causar daño tisular por sobrecalentamiento debido a la acumulación de energía, por tanto, la onda continua se fragmenta en pulsos de longitud determinada, los cuales son repetidos periódicamente para evitar daño indeseado. [Huang S., 2008; Boissenot T., et al., 2016].

El US tiene la capacidad de generar diversos efectos biológicos los cuales han sido aprovechados como estímulos para la liberación de moléculas activas o agentes de contraste de diversos nanoacarreadores, entre estos, sistemas liposomales. A continuación, se abordan algunos de estos efectos y la aplicación asociada con sistemas liposomales. [Huang S., 2008; Boissenot T., et al., 2016].

Uno de los efectos principales del uso de US es el aumento de temperatura de manera localizada. Cuando la onda se propaga a través del cuerpo, es atenuada por efectos de absorción y dispersión al contacto con los tejidos, siendo el fenómeno de absorción la razón de la hipertermia observada. El aumento de temperatura está directamente relacionado con la frecuencia de la onda, por lo que a mayor frecuencia se alcanzan temperaturas mayores, sin embargo, el aumento de la temperatura comienza a ser significativo a frecuencias mayores de 1 MHz. Dicho efecto se ha utilizado de manera terapéutica para tratar tumores neoplásicos al inducir la necrosis del tejido, así como un estímulo para la liberación de material encapsulado tanto de TTSL, LTSL y PTSL, a través de los mecanismos antes mencionados. [Boissenot T., et al., 2016].

Además del efecto térmico, la inducción de US tiene la capacidad de generar efectos mecánicos. Al propagarse, la onda induce cambios de presión en el medio seguido de eventos de compresión (por aumento de la presión) y descompresión (por disminución de esta misma). Esta variación provoca que burbujas de aire u otro gas se expandan y compriman, fenómeno que se conoce como cavitación. El fenómeno de

cavitación está mediado por la frecuencia, la tensión superficial, la presión y la presencia de núcleos o cuerpos que puedan llevar a cabo la cavitación, la probabilidad de que ocurra aumenta conforme se alcanzan menores valores de presión y conforme la frecuencia disminuye. Dos tipos de cavitación pueden ocurrir (Figura 22), la cavitación estable o no inercial, en la cual las burbujas se expanden hasta alcanzar el tamaño de equilibrio, seguido por un periodo de oscilación dentro del diámetro estable, mientras que la cavitación inercial provoca una oscilación no simétrica por lo que en cada oscilación la burbuja alcanza mayores diámetros hasta provocar la explosión de la burbuja. Biológicamente, cada tipo de cavitación provoca efectos distintos, la cavitación estable genera en la región cercana a la burbuja un vórtice, la fuerza de corte o cizalla generada por dicho fenómeno puede ser lo suficientemente fuerte como para aumentar la permeabilidad de las células, por otra parte, las ondas de impacto ocasionadas por la explosión durante la cavitación inercial tiene la capacidad tanto de mejorar la penetración de moléculas activas como de romper por completo la membrana celular. [Huang S., 2008; Boissenot T., et al., 2016]

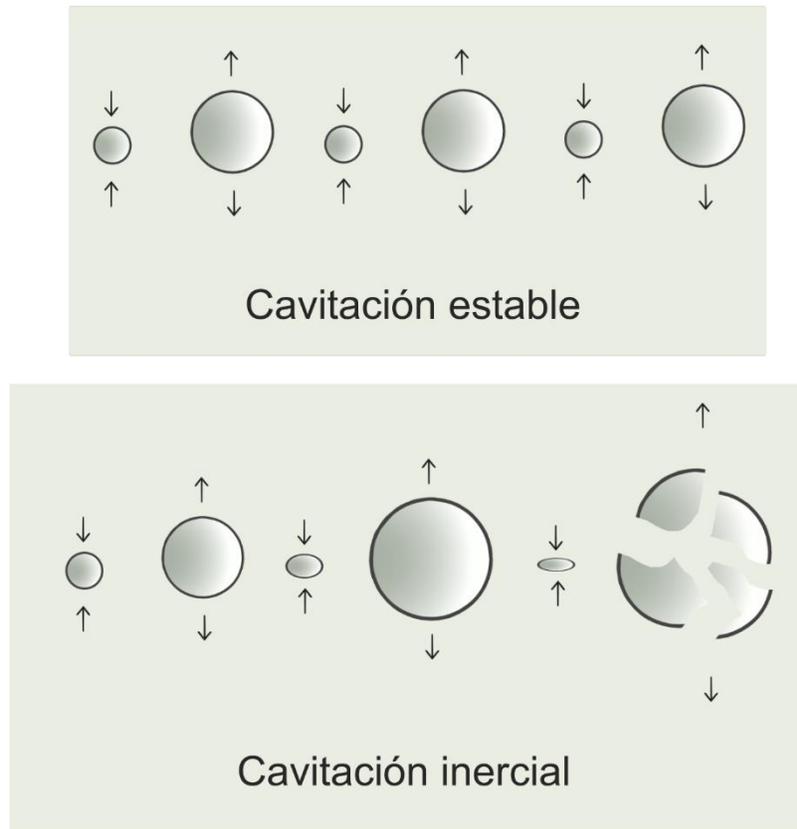


Figura 22. Esquema de la cavitación estable y la cavitación inercial. (Modificado de Boissenot T., et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, la presencia de un núcleo o cuerpo que pueda llevar a cabo el proceso de cavitación es necesario, por tanto, se han formulado liposomas ecogénicos (LE) o sónicamente activos. La encapsulación de gas en liposomas se realizó, primeramente, con el propósito de ser utilizados como agentes de contraste en el diagnóstico de padecimientos por ultrasonido de imagen, sin embargo, hoy en día existe interés para utilizarlos como vehículos para la liberación del material encapsulado por efectos de cavitación. En la literatura se ha reportado que los liposomas ecogénicos mantienen las propiedades de los liposomas convencionales, es decir, la capacidad de encapsular moléculas activas, así como la capacidad de ser funcionalizados con otras moléculas en la superficie, además, la liberación del material encapsulado puede ser modulado para que se dé de manera completa o sostenida. [Huang S., 2008].

Se han desarrollado tres estructuras de LE (Figura 23) para ser aplicados como vehículos para la liberación modificada de fármacos y material genético. El primero de estos es un liposoma ecogénico con dos compartimentos, en uno de ellos se forma una burbuja de aire cubierta por una monocapa lipídica, mientras que en el otro compartimento se encuentra el núcleo acuoso del liposoma. Se ha reportado la fabricación de este tipo de liposomas por el método de hidratación de película fina, donde el método de hidratación contiene manitol. Los MLV obtenidos son sonicados y posteriormente se realizan ciclos de congelamiento-deshielo para incorporar el aire a los LUV obtenidos, los cuales alcanzan diámetros de alrededor de 800 nm. La incorporación del gas a los liposomas se logra al llevar a cabo el proceso de congelamiento-deshielo a altas presiones, debido a que la solubilidad de un gas es proporcional a la presión del gas sobre el líquido. Conforme la muestra se congela, el aire disuelto comienza a ser desplazado a regiones líquidas, y cuando este alcanza una concentración suficientemente alta, una burbuja de aire puede nuclear en la bicapa y posteriormente crecer. El manitol tiende a cristalizar fuera de la solución conforme la muestra es congelada, por lo que se ha observado que puede favorecer tanto la encapsulación de aire como de otros solutos. Así mismo, se realizó la encapsulación de aire con otras moléculas, como glicina y trehalosa, siendo el manitol el que genera mejor encapsulación de aire. [Huang S., MacDonald R.C., 2004; Huang S., 2008., Huang S., McPherson D.D., MacDonald R.C., 2008., Nguyen A.T., 2017].

La segunda estructura de LE consiste en la formación de burbujas de aire estabilizadas por una monocapa lipídica encapsuladas dentro del núcleo acuoso del liposoma, este tipo de LE también se conocen como Liposomas-burbuja (del inglés *Bubble Liposomes*), y se forman al ser sonicados en viales cargados con gas perfluoropropano alcanzando diámetros aproximados de 1.0–3.0 μm . La administración de este tipo de liposomas ha demostrado ser una herramienta prometedora en terapia génica al demostrar la transfección de material genético tanto *in vivo* como *in vitro*. Por último, se ha reportado la conjugación de liposomas convencionales con microburbujas a través de la unión biotina-avidina, sin embargo, el uso de este tipo de LE podría causar una reacción inmunogénica, lo que comprometería el uso repetido del sistema por lo que

se investigan métodos alternativos para realizar la conjugación. [Huang S., MacDonald R.C., 2004; Huang S., 2008].

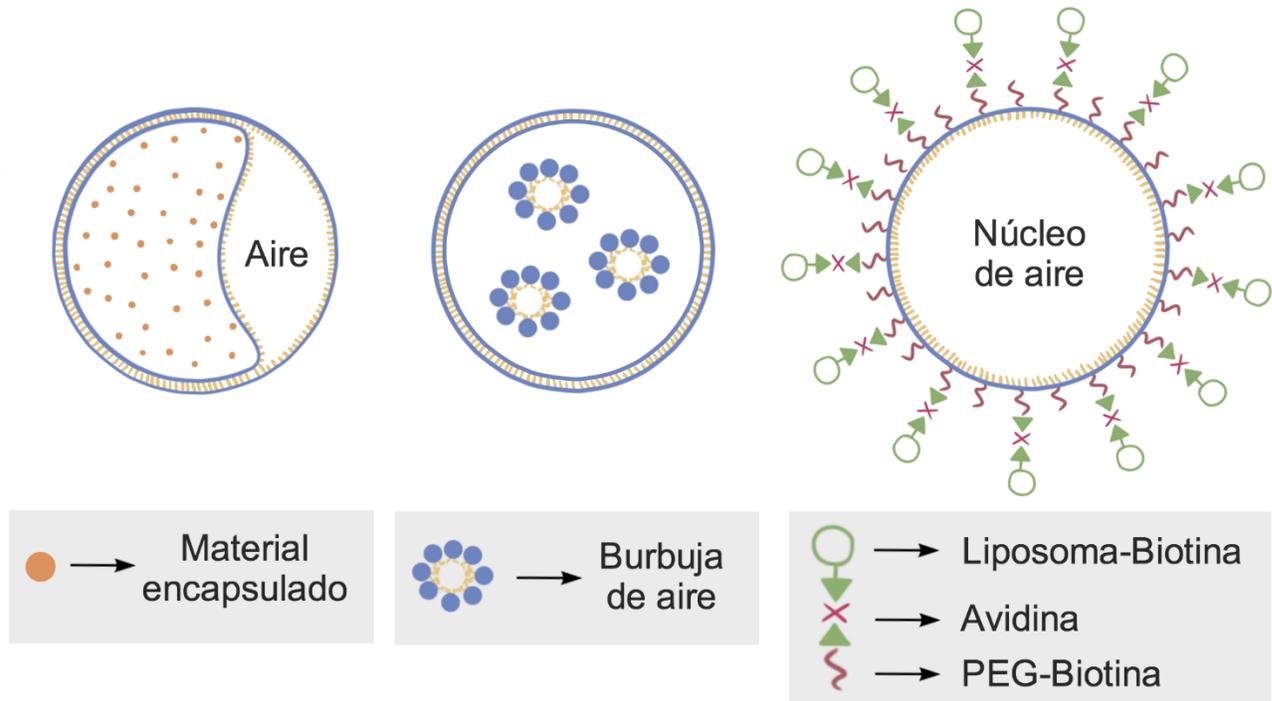


Figura 23. Esquematización de los tipos de liposomas ecogénicos. (Modificado de Huang S., 2008)

4.2 Inmunoliposomas

La funcionalización de liposomas a través de la conjugación de anticuerpos o fragmentos de estos genera inmunoliposomas (IL), estrategia que aprovecha la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos son moléculas proteicas (inmunoglobulinas) que forman parte del sistema inmunológico, estos se encargan de reconocer y unirse de manera específica a antígenos, así como de reclutar otras células y moléculas para destruir patógenos. Estructuralmente los anticuerpos se caracterizan por presentar forma de "Y", se conforman por dos cadenas pesadas unidas por dos puentes disulfuro y dos cadenas ligeras, cada una unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro (Figura 24). Los dos brazos superiores componen las regiones variables del anticuerpo encargados de reconocer y unirse al antígeno y se denominan fracción ab (Fab) del inglés *antigen binding fraction*. El tallo se denomina, Fc (fracción cristalizable) y conforma la región constante del anticuerpo. La especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo radica en la variabilidad del extremo

terminal de las cadenas que conforman la Fab donde se encuentra la zona hipervariable, lo que permite que cada anticuerpo se una a un antígeno específico diferente. En general, los anticuerpos sólo reconocen una pequeña región sobre la superficie de una molécula, la estructura reconocida se denomina determinante antigénico o epítipo. La unión específica de las inmunoglobulinas confiere al sistema liposomal la ventaja de acumularse selectivamente en un tejido u órgano donde se exprese de manera única o sobreexpresada un antígeno específico. [Murphy K., et al., 2009; Sapa O., Shoe B., 2013; Eloy J.O., et al., 2017]

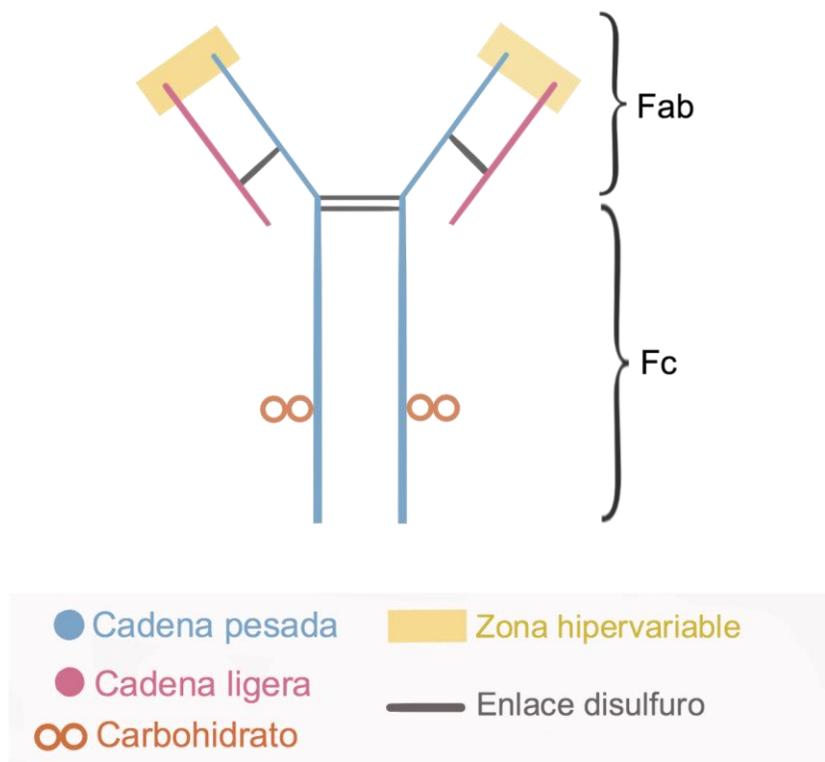


Figura 24. Esquema de la estructura de inmunoglobulina IgG. (Modificado de Manjappa A., et al., 2010)

Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases las cuales son definidas por la estructura de la cadena pesada que los conforman y por tanto presentan funciones diferentes entre ellas. Las cinco clases principales de inmunoglobulinas son: Inmunoglobulina G (IgG), Inmunoglobulina A (IgA), Inmunoglobulina M (IgM), Inmunoglobulina D (IgD) e Inmunoglobulina E (IgE). En general, se ha estudiado IgG de manera más extensa para la fabricación de inmunoliposomas, esta clase de

inmunoglobulinas son las más abundantes en torrente sanguíneo y linfático. [Eloy J.O., et al., 2017].

Los inmunoliposomas son generados al conjugar anticuerpos monoclonales completos o fracciones de estos a la superficie del liposoma. Los anticuerpos monoclonales se caracterizan por reconocer un solo epítipo, es decir, son clonas derivadas de una única célula B por lo que todos los anticuerpos producidos tienen la misma estructura, incluso el sitio de unión a antígeno. Este tipo de anticuerpos se obtienen tras la hibridación de una célula B con células plasmáticas tumorales. El uso de anticuerpos monoclonales proporciona una reserva ilimitada de anticuerpos de especificidad única y conocida. Se ha observado que la Fc de este tipo de anticuerpos provoca reacciones inmunogénicas ya que provienen generalmente de células de ratón, por lo que se ha optado por utilizar anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados para disminuir dicha respuesta. [Murphy K., et al., 2009; Sapra O., Shoe B., 2013; Eloy J.O., et al., 2017].

Los inmunoliposomas generados deben cumplir con una serie de requerimientos para poder llevar a cabo su función. El sitio de unión a antígeno debe mantenerse sin perturbaciones y libre para la asociación con el antígeno, el tiempo de circulación y estabilidad del sistema deben permitir el reconocimiento del antígeno. Así mismo, el inmunoliposoma debe encapsular y retener de forma eficiente la molécula activa. [Manjappa A., et al., 2010].

Dependiendo del sitio de conjugación del anticuerpo con el liposoma se han definido tres tipos de inmunoliposomas (Figura 25). Los inmunoliposomas tipo A, son liposomas convencionales conjugados a anticuerpos directamente en la superficie. Este tipo de inmunoliposomas muestran alta especificidad y eficiencia de unión con el antígeno *in vitro*, sin embargo, son eliminados de torrente sanguíneo rápidamente por SFM, por tanto, la eficiencia de unión a antígeno *in vivo* disminuye. Los inmunoliposomas tipo B son liposomas que se encuentran estabilizados estéricamente con polietilenglicol (PEG), lo que reduce la eliminación del sistema por SFM, proporcionando mayor tiempo de circulación. Los anticuerpos se encuentran conjugados directamente a la superficie del liposoma, por lo que las cadenas de PEG tienden a disminuir la eficiencia de conjugación

anticuerpo-liposoma además de disminuir el reconocimiento antígeno-anticuerpo por efectos estéricos. En el tercer tipo de inmunoliposomas, inmunoliposomas tipo C, los anticuerpos se encuentran conjugados en el extremo terminal de las cadenas de PEG, esto permite mantener la estabilización estérica de los inmunoliposomas tipo B, mientras que la accesibilidad de los anticuerpos está aumentada. [Kozłowska D., et al., 2009].

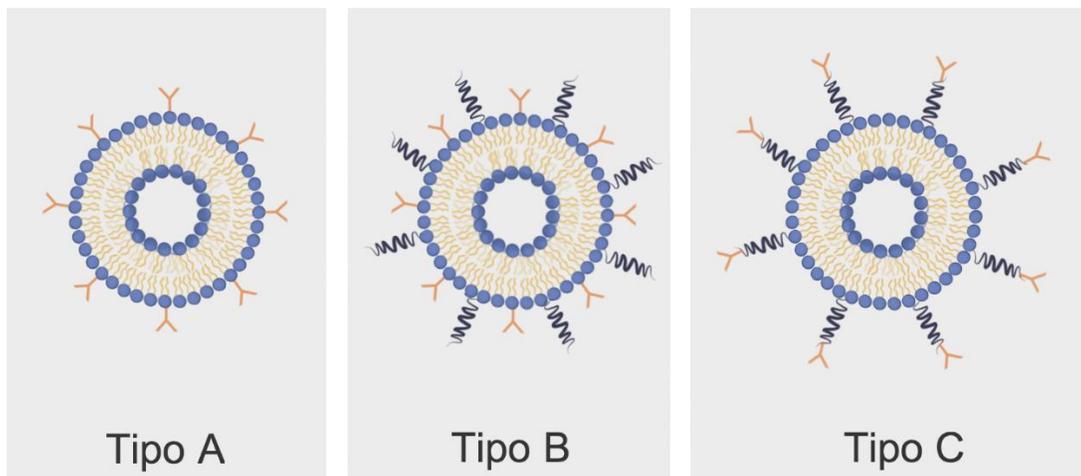


Figura 25. Representación de los tipos de inmunoliposomas. (Modificado de Kozłowska D., et al., 2009).

En cuanto a la conjugación de anticuerpos con liposomas se han reportado métodos para generar uniones covalentes y no covalentes. Es importante mencionar que los anticuerpos contienen grupos químicos funcionales que pueden utilizarse para generar uniones covalentes, entre estos se encuentran grupos amino, carboxilo, puentes disulfuro y carbohidratos asociados a la Fc de IgG. En general, las estrategias para formar enlaces covalentes entre el anticuerpo y el liposoma se basan en modificar el anticuerpo, al lípido o ambos con un agente químico que permita llevar a cabo la unión. A continuación, se describen algunas de las estrategias utilizadas. [Manjappa A., et al., 2010; Eloy J.O., et al., 2017]

La modificación a anticuerpo que se realiza con mayor frecuencia es la generación del grupo tiol, dicho grupo puede obtenerse tras la degradación enzimática del anticuerpo utilizando pepsina, la cual genera un fragmento denominado $F(ab')_2$ en el cual las dos Fab del anticuerpo permanece unidas por los puentes disulfuro que unían a las cadenas pesadas, mientras que el fragmento Fc se degrada en varias posiciones por el efecto proteolítico de la enzima. Los puentes disulfuro de $F(ab')_2$ pueden reducirse de manera

específica posteriormente utilizando agentes reductores como el 2-mercaptoetilamina generando los grupos tiol. Esta estrategia se utiliza cuando el Fab obtenido tras la degradación enzimática y reducción de los puentes disulfuro no compromete el reconocimiento del antígeno, cuando es así, existen varios agentes que permiten generar el grupo tiol. Este otro tipo de modificación utiliza comúnmente los grupos amino de las inmunoglobulinas para llevar a cabo la adición del grupo, y representan una de las estrategias utilizadas con mayor frecuencia. Entre los reactivos más utilizados se encuentra el reactivo de Traut (2-iminotiolano), SPDP (N-succinimidil 3-(2-piridilditiolpropionato)), SAMSA (Anhídrido S-acetilmercaptosuccinico), SATP (Succinimidil acetiltiopropionato), entre otros. Para la fabricación de liposomas tipo A y B, los lípidos que conforman el liposoma son modificados para poder llevar a cabo la unión. De manera similar, se realiza la generación de un grupo tiol para formar un puente disulfuro o tioéter entre el lípido y el anticuerpo modificado, siendo el segundo el de mayor estabilidad. Usualmente se modifica PE, ya que contiene un grupo amino terminal que permite la alteración, para esta modificación se utiliza SPDP o SMPB (N-succinimidil (4-(p-maleimidofenil) butirato). Para la fabricación de inmunoliposomas tipo C, se modifica la cadena PEG generando un grupo activo que pueda reaccionar con las inmunoglobulinas modificadas. Se utilizan derivados de melamida en el extremo terminal de la cadena para generar un enlace tioeter entre el anticuerpo y la cadena. En la figura 26 se muestra el mecanismo de la generación del grupo sulfhidrilo en el anticuerpo utilizando el reactivo de Traut y la conjugación con el liposoma a través del enlace covalente con PEG-melamida. [Manjappa A., et al., 2010; Eloy J.O., et al., 2017].

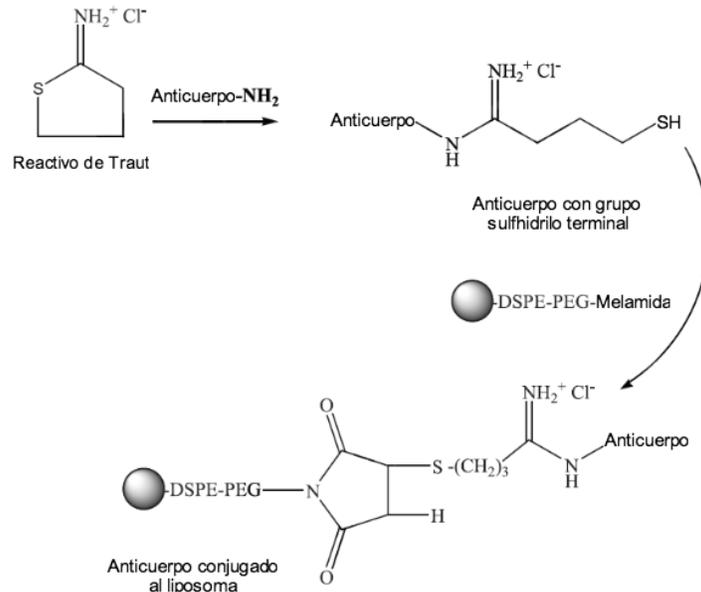


Figura 26. Mecanismo de la generación del grupo sulfhidrilo en el anticuerpo utilizando el reactivo de Traut y la conjugación con el liposoma a través del enlace covalente con PEG-melamida. (Modificado de Modificado de Manjappa A., et al., 2010).

Otra estrategia para realizar la conjugación aprovecha los carbohidratos localizados en la Fc de los anticuerpos. Estos carbohidratos son oxidados para formar grupos aldehído reactivos, y posteriormente son unidos a cadenas PEG modificados en el extremo terminal con derivados de hidrazidas, que al conjugarse con los anticuerpos forman un enlace hidrazona. Este tipo de conjugación presenta la ventaja de favorecer la orientación del anticuerpo por lo que presenta mejor accesibilidad, sin embargo, el enlace tiende a hidrolizarse en pH ácido. [Manjappa A., et al., 2010].

Por último, la conjugación de anticuerpos directamente al liposoma puede realizarse al activar el grupo carboxilo (C-terminal) presente en los anticuerpos con carbodiimida con el fin de catalizar la formación del enlace amida entre el carboxilo y la amina presente en PE. [Kozłowska D., et al., 2009; Manjappa A., et al., 2010].

Considerando la unión no covalente, se ha reportado la conjugación de anticuerpo-liposoma a través del sistema biotina-avidina/streptavidina, en donde se utilizan tanto lípidos conjugados con biotina para formar liposomas como cadenas de PEG conjugadas con biotina en el extremo terminal, posteriormente estos son ligados con anticuerpos asociados a avidina/streptavidina, formando el complejo. A pesar de que es una estrategia poco utilizada, ha demostrado un aumento en la captación celular de

inmunoliposomas conjugados de esta manera comparada con la conjugación covalente. [Kozłowska D., et al., 2009; Manjappa A., et al., 2010; Eloy J.O., et al., 2017].

4.2.1 Inmunoliposoma Anti-HER2: Tratamiento de Cáncer de Mama.

En México, de acuerdo con las estadísticas de mortalidad del 2015 publicada por el INEGI, el tumor maligno de mama representa el 14.4% de las defunciones por tumores en la mujer, este tipo de cáncer representa la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 44 años, y la cuarta en la población femenina de 45 a 59 años, y es la segunda causa de muerte en mujeres estadounidenses por lo que el desarrollo de nuevos tratamientos ha generado especial interés. Debido a su naturaleza heterogénea se han descrito cuatro subtipos de este tipo de cáncer, entre ellos, receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 positivo (HER2 positivo, del inglés *human epidermal growth factor receptor 2*). HER2 es una glicoproteína transmembranal con actividad tirosina cinasa la cual contribuye a la regulación de la proliferación celular de células epiteliales, y en adultos sanos se expresa a niveles bajos en ciertas células de miocardio. Este subtipo de cáncer de mama se caracteriza por presentar sobreexpresión del receptor HER2, subtipo particularmente agresivo y asociado a un pronóstico desfavorable debido a su participación en el desarrollo y progresión de la neoplasia. HER2 positivo presenta una incidencia de 20-30% del cáncer de mama diagnosticado. [Park J.W., et al., 2001; Eloy J.O., et al., 2017; Eloy J.O., Petrilli R., et al., 2017., INEGI., 2017].

En 1998, la FDA aprobó el primer anticuerpo monoclonal de clase IgG humanizado recombinante anti-HER2, Trastuzumab, comercialmente bajo el nombre Herceptin®. Dicho anticuerpo reconoce el dominio extracelular del receptor HER2, inhibiendo la activación de la cascada de señalización y por tanto inhibiendo el crecimiento tumoral. Además, induce la apoptosis de células neoplásicas por citotoxicidad mediada por anticuerpos. El tratamiento puede ser realizado sólo con Trastuzumab o en combinación con otros agentes terapéuticos. A pesar de la mejora en la supervivencia del paciente que ha demostrado Trastuzumab, se ha reportado cardiotoxicidad asociada al uso de dicho anticuerpo debido a que el receptor HER2 está involucrado en el desarrollo del miocardio y a pesar de que los niveles de expresión son bajos los efectos

antiproliferativos en este tejido son significantes. [Park J.W., et al., 2001; Eloy J.O., et al., 2017; Eloy J.O., Petrilli R., et al., 2017].

Otros tratamientos para este padecimiento incluyen cirugía, quimioterapia, radiación y terapia endócrina. Entre los quimioterapéuticos utilizados con frecuencia se encuentra Paclitaxel (PTX), Rapamicina (RAP), Doxorubicina (DOX), entre otros, sin embargo, estos fármacos no son selectivos y producen efectos secundarios severos en el paciente. Con el fin de administrar los fármacos de manera selectiva, mejorar el tiempo de circulación y disminuir los efectos adversos se ha investigado la conjugación de anti HER2 o fragmentos de este a liposomas para generar inmunoliposomas anti HER2 para el tratamiento de cáncer de mama. [Eloy J.O., Petrilli R., et al., 2017].

En la literatura se ha reportado la coencapsulación de PTX/RAP en liposomas conjugados con Trastuzumab con el fin de generar un efecto sinérgico y liberar el material de forma selectiva. La conjugación del anticuerpo con el liposoma se realizó a través del enlace entre el derivado de melamida en el extremo terminal de la cadena de PEG (DSPE-PEG-MAL) y el grupo tiol de la inmunoglobulina modificada, generando inmunoliposomas tipo C con una eficiencia de conjugación entre 63-72% mientras que la integridad del anticuerpo se mantuvo. Los liposomas se fabricaron por el método de hidratación de película fina, añadiendo el PTX y RAP a la fase lipídica. La película lipídica fue hidratada con buffer y con el fin de disminuir el tamaño de partícula la dispersión fue extruida a través de una membrana con tamaño de poro de 0.2 μm y después a través de una membrana con tamaño de poro de 0.1 μm . Por otra parte, el Trastuzumab fue diluido en buffer y posteriormente fue añadido el reactivo de Traut. Por último, el anticuerpo modificado fue añadido a la dispersión de liposomas preformados y estos fueron incubados. Se obtuvieron LUV conjugados con el anticuerpo con un diámetro de 140.3 ± 4.3 nm. [Eloy J.O., et al., 2017; Eloy J.O., Petrilli R., et al., 2017]

Se realizaron pruebas *in vitro* e *in vivo* para evaluar la eficacia de los inmunoliposomas comparado con el fármaco libre y la coencapsulación en liposomas convencionales. Los ensayos *in vitro* se realizaron sobre dos subtipos de cáncer de mama, una de las líneas celulares pertenecía al subtipo triple negativo el cual no expresa HER2 y la otra a HER2 positivo. Los inmunoliposomas demostraron mayor internalización

celular en la línea HER2 positivo y una reducción de la IC₅₀ en comparación con los liposomas convencionales, esto demostró que el sistema es capaz de reconocer al antígeno, provocando un aumento en la concentración del material encapsulado dentro de la célula debido a la endocitosis mediada por anticuerpo. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las dos formulaciones referentes a la línea celular triple negativo. En cuanto a los resultados *in vivo*, se observó que los inmunoliposomas controlaban con mayor eficiencia el crecimiento tumoral, además, los sujetos de estudio mantuvieron un peso constante a lo largo de la investigación lo que indica baja toxicidad del sistema. [Eloy J.O., Petrilli R., et al., 2017].

Con el mismo enfoque, se ha desarrollado la encapsulación de DOX en inmunoliposomas tipo C, en este caso particular se utilizó el fragmento variable monocatenario (scFv del inglés *single chain variable fragment*) y fragmentos Fab' para la funcionalización de los liposomas. Los scFv seleccionados fueron scFv c6.5 y scFv F5, los cuales se caracterizan por reconocer epítomos distintos a Trastuzumab y los Fab' en el dominio extracelular de ErbB2. Se ha reportado que dichos fragmentos provocan internalización celular mediada por anticuerpos de manera satisfactoria y, además, se ha observado que no presentan efectos sobre el ciclo celular, la proliferación celular ni la transducción de señal por tirosina cinasa, por lo que la internalización celular mediada por dichos fragmentos es independiente. Se realizó tanto la conjugación de los fragmentos scFv y Fab' directa a liposomas SUVs PEGilados, a través de PE-MAL, así como unidos al extremo terminal de cadenas PEG. Los fragmentos fueron conjugados a SUV a través del derivado PE-PEG-MAL para los liposomas tipo C alcanzando altas eficiencias de conjugación en ambos casos, mientras que el DOX fue encapsulado de forma activa. [Park J.W., et al., 2001., Neve R.M., et al., 2001].

Los estudios *in vitro* demostraron mayor internalización en la línea celular HER2 positivo en contraste con la línea celular sin expresión del receptor, además, el impedimento estérico de los liposomas tipo B formulados fue evidente al demostrar menor porcentaje de internalización comparado con los inmunoliposomas tipo C. Por otra parte, se determinó la relación de la unión a antígeno y de la endocitosis con la densidad de fragmentos del anticuerpo, demostrando una relación directamente proporcional inicial

entre ellas hasta que el sistema alcanza estado plateau. En cuanto a la farmacocinética, se evaluó y comparó la cinética de DOX en inmunoliposomas tipo A, tipo C, liposomas convencionales y DOX libre. Los inmunoliposomas y liposomas convencionales presentaron tiempos prolongados de circulación, con una vida media promedio de $t_{1/2}$ = 12-14 h y tiempo promedio de residencia de 24 h, mientras que los niveles de DOX libres fueron imperceptibles cinco minutos después de la administración intravenosa. Estos resultados demostraron la ventaja farmacocinética de los inmunoliposomas sobre el fármaco libre, aunado eso, se observó que aquellos inmunoliposomas sin cadenas PEG también presentaron mayor tiempo de circulación, por lo que la funcionalización con anticuerpos tiene un efecto sobre este parámetro. [Park J.W., et al., 2001]

Por último, los estudios *in vivo* demostraron inhibición del crecimiento tumoral, regresión del tumor y la remisión de algunos de los sujetos bajo estudio, siendo los inmunoliposomas tipo C, los que demostraron resultados superiores al resto de las formulaciones. Además, a un grupo de estudio se administraron inmunoliposomas tipo C vacíos, observando efectos mínimos sobre inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados obtenidos demostraron que la funcionalización con los fragmentos del anticuerpo únicamente provoca la liberación selectiva y la endocitosis mediada por anticuerpo, y que no se presentan los efectos antiproliferativos del Trastuzumab, esto indica que la cardiotoxicidad asociada a dicho anticuerpo puede disminuirse a través de esta estrategia. En el caso de los Fab', se logra debido a que la cardiotoxicidad de Trastuzumab se observa a concentraciones elevadas y constantes del anticuerpo, mientras que la cantidad de fragmentos Fab' asociados a los inmunoliposomas era menor. En el caso de los fragmentos variables monocatenarios se debe al reconocimiento de distintos epítomos del antígeno, evitando el efecto cardiotóxico. [Park J.W., et al., 2001].

Merrmack desarrolló una formulación de doxorubicina encapsulado en liposomas PEGilados funcionalizados con fragmentos del anticuerpo Trastuzumab el cual demostró resultados prometedores durante los estudios clínicos Fase I, sin embargo, el desarrollo del sistema fue detenido durante la Fase II debido a que la Junta de Control de Datos y Seguridad consideró y demostró que dichos inmunoliposomas no brindarían un beneficio

significativo sobre los tratamientos ya existentes. [Eloy J.O., Petrilli R., et al., 2017; clinicaltrials.gov: NCT02213744; clinicaltrials.gov: NCT01304797].

4.2.2 Inmunoliposoma Anti-CD4: Tratamiento de VIH

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aun representa uno de los grandes retos en el área de la salud. A pesar del vasto conocimiento adquirido a través de los años, la alta tasa de mutación del virus obstaculiza el desarrollo de terapias eficientes, generando resistencia del virus a fármacos existentes. Actualmente, se utiliza con frecuencia terapia retroviral altamente activa (HAART del inglés *Highly active retroviral therapy*), la cual consiste en la administración de una variedad de fármacos los cuales son activos en distintas etapas del desarrollo de la enfermedad. No obstante, el uso de la terapia es limitada debido a los severos efectos secundarios que ocasiona. Por otro lado, los fármacos utilizados presentan baja biodisponibilidad debido al metabolismo o rápida eliminación de estos, lo que compromete la eficiencia terapéutica ya que una pequeña porción de la dosis administrada alcanza el blanco terapéutico. Hasta ahora, la estrategia empleada ha sido administrar dosis más altas y con mayor frecuencia, comprometiendo la calidad de vida del paciente. [Ramana L.N., et al., 2015; Petazzi R.A., et al., 2015].

Con el fin de reducir la frecuencia de administración y por tanto los efectos secundarios, mejorar la biodisponibilidad de los fármacos y la eficiencia terapéutica, se han desarrollado distintos sistemas basados en el uso de la nanomedicina para tratar el padecimiento en cuestión, entre estos, un sistema liposomal funcionalizado con anticuerpos anti CD4. Se conencapsularon los fármacos nevirapine, inhibidor de la transcriptasa reversa, y saquinavir, inhibidor de la proteasa, con el fin de liberar los fármacos de forma selectiva en células T CD4 positivas y macrófagos, donde el virus suele acumularse y así disminuir la carga viral. [Ramana L.N., et al., 2015].

La funcionalización del sistema se realizó a través de la unión covalente entre el anticuerpo tiolado y el grupo melamida en el extremo terminal de la cadena PEG, con una eficiencia de conjugación de 75%, mientras que la eficiencia de encapsulación de los fármacos fue de 45% y 30% para nevirapine y saquinavir respectivamente. Los liposomas fueron formados por el método de hidratación de película fina utilizando DSPE-PEG-MAL

para poder llevar a cabo la conjugación. El nevirapine fue añadido a la fase lipídica para la formación de la película, mientras que el saquinavir fue añadido en el medio de hidratación. Se realizó la reducción del tamaño de partícula por extrusión de la dispersión a través de una membrana de 0.2 μm obteniendo LUVs. El anticuerpo fue tiolado utilizando el reactivo de Traut, una vez modificado fue añadido a la dispersión de liposomas y la mezcla se mantuvo en incubación, obteniendo liposomas conjugados con diámetro promedio de 150 ± 2 nm. [Ramana L.N., et al., 2015].

La internalización celular de los inmunoliposomas se evaluó de manera cuantitativa y cualitativa y se comparó con la internalización de liposomas PEGilados no conjugados en células T linfáticas de origen humano. Se observó que la distribución de los sistemas liposomales era distinta, los inmunoliposomas se encontraron localizados en la superficie de la membrana celular, mientras que los liposomas no conjugados se encontraban distribuidos a lo largo de todo el campo. De manera cuantitativa, se alcanzaron porcentajes de internalización de 98% y 54% para los inmunoliposomas y los liposomas no conjugados respectivamente, el alto porcentaje de internalización de los liposomas funcionalizados es indicativo de la endocitosis mediada por el reconocimiento del antígeno. Por último, se evaluó tanto la citotoxicidad como la eficacia antiviral del sistema *in vitro*, los resultados obtenidos demostraron mayor citotoxicidad a menor concentración de los fármacos encapsulados en los inmunoliposomas debido a la mejora en la internalización celular. En cuanto a la eficiencia antiviral, se demostró que los inmunoliposomas administran de manera más eficiente los fármacos a la célula blanco, reduciendo la carga viral a menores concentraciones en comparación con los fármacos libres. El sistema desarrollado representa una estrategia con alto potencial para administrar de manera selectiva los fármacos y reducir la carga del VIH. [Ramana L.N., et al., 2015].

4.3 Liposomas asociados con polímeros

4.3.1 PEGilación

Como se ha mencionado con anterioridad, una de las principales desventajas y limitación del uso de liposomas convencionales es el corto tiempo de circulación dada la rápida eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) debido a la opsonización de los

liposomas y posterior internalización de estos por macrófagos. La pronta eliminación del sistema provoca que la acumulación y concentración del fármaco en tejido blanco sea insuficiente para poder llevar a cabo el efecto farmacológico. Además, la interacción de los liposomas con lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus siglas en inglés *high density lipoproteins*) genera la transferencia de fosfolípidos a éstas, provocando una modificación estructural en los liposomas y consecuentemente la fuga prematura del material encapsulado. Con el fin de solucionar esto, se han desarrollado diversos enfoques para otorgar al sistema mayor estabilidad y mejor desempeño, entre estas, la funcionalización del sistema por medio de la PEGilación. [Kim J.S., 2016; Immordino M.L., et al., 2006; Guichard M.J., et al., 2017].

El proceso de PEGilación consiste en la conjugación de cadenas de polietilenglicol (PEG) en la superficie de los liposomas. Este polímero se produce por polimerización de unidades repetitivas de óxido de etileno, obteniendo una cadena lineal o ramificada, con un grupo hidroxilo terminal que permite la derivatización con distintos grupos funcionales. Dicho polímero se ha utilizado de manera preferente debido a su biodegradabilidad, flexibilidad e hidrofiliidad. Además, el peso molecular y estructura de la cadena polimérica puede ser modulada, lo que permite una variedad de aplicaciones. La PEGilación del liposoma puede llevarse a cabo por diversos métodos: adsorbiendo el polímero de manera física a la superficie, incorporando un conjugado PEG-Lípido durante la formación del sistema liposomal o uniendo de manera covalente los derivados PEG a liposomas previamente formados. El método más utilizado consiste en anclar la cadena de PEG por medio de un enlace carbamato. entre el PEG y DSPE (Figura 27). [Harris J.M., Chess R.B., 2003; Immordino M.L., et al., 2006; Guichard M.J., et al., 2017].

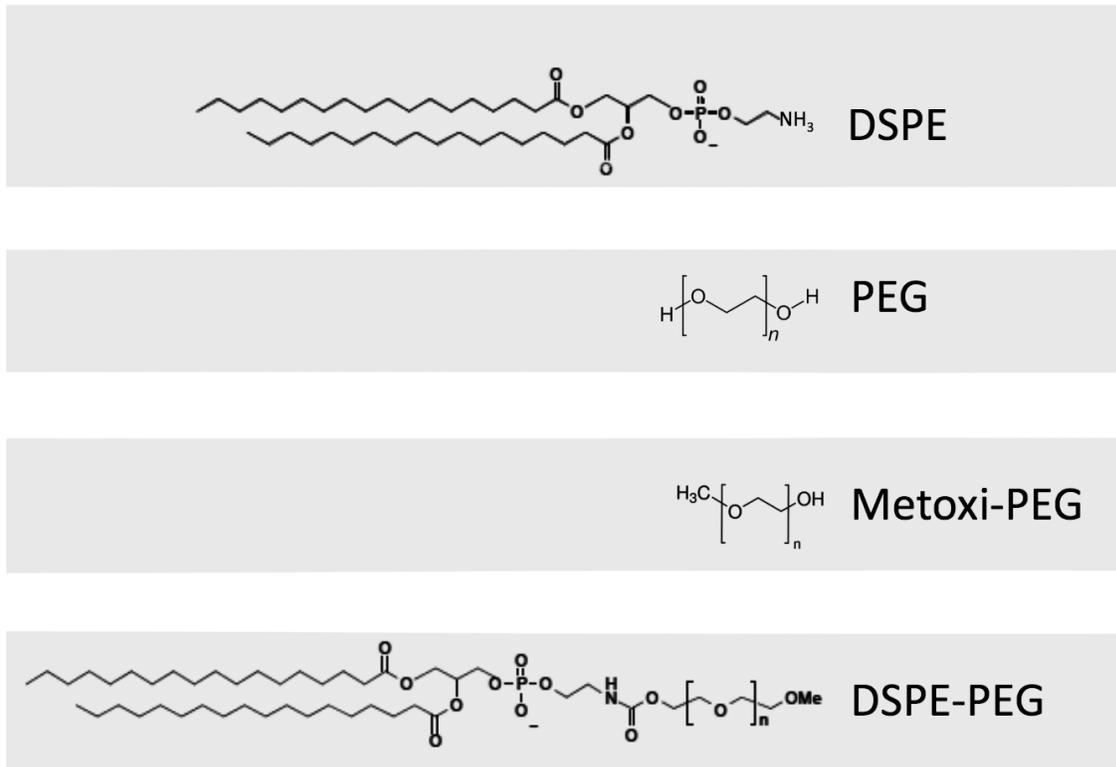


Figura 27. Estructura química del polietilenglicol (PEG), PEG metoxilado y la conjugación de este con Disteroil fosfatidiletanolamina (DSPE). (Modificado de; Immordino M.L., et al., 2006).

La PEGilación de la superficie de los liposomas mejora de manera dramática la estabilidad del liposoma además de aumentar el tiempo de circulación después de la administración intravenosa. Debido a su naturaleza hidrofílica y flexibilidad, el polietilenglicol forma una capa hidratada que recubre al liposoma, generando una barrera estérica entre el liposoma y el medio donde se encuentra. Dicha barrera (figura 28) evita la agregación de las vesículas *in vitro*, protege al liposoma de la desestabilización por interacción con proteínas plasmáticas al excluirlas del espacio adyacente a la superficie del liposoma (espacio periliposomal) evitando la liberación prematura del material encapsulado. Además, reduce la adsorción de opsoninas, por lo que el sistema es capaz de esquivar la eliminación de los liposomas por SFM, por lo que el tiempo de circulación aumenta permitiendo que los liposomas PEGilados se acumulen en tejido y órganos blanco de forma pasiva. Este proceso es evidente en tumores sólidos, donde debido al proceso de angiogénesis, el revestimiento endotelial de la vasculatura tumoral es discontinuo lo que facilita la extravasación de los liposomas hacia el espacio intersticial,

permitiendo la acumulación del sistema y por tanto aumentando la concentración del fármaco en el sitio blanco. De esta manera se reducen los efectos tóxicos sobre tejido sano, ya que este no presenta el efecto EPR por lo que la extravasación de los liposomas es mucho menor. [Immordino M.L., et al., 2006; Milla P., et al., 2012].

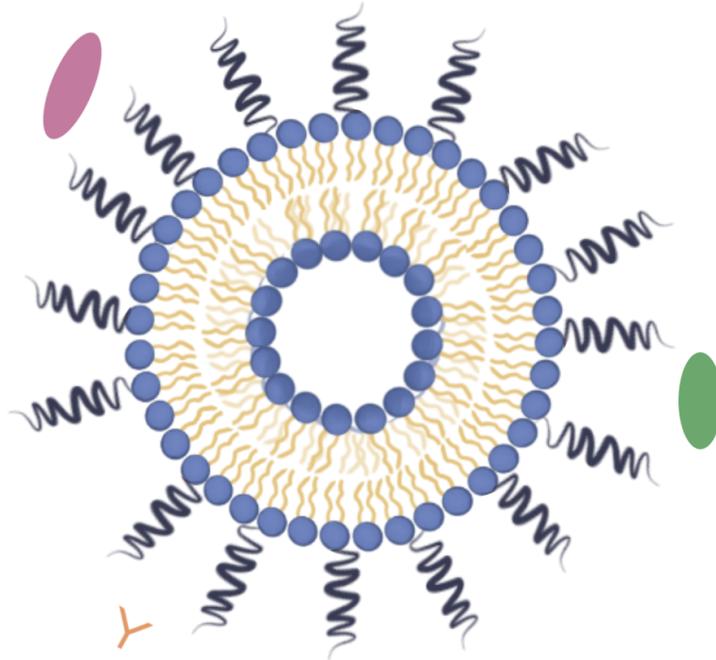


Figura 28. Representación de un liposoma PEGilado, y la barrera física que genera evitando la interacción de opsoninas con la superficie del liposoma. (Modificado de Barenholz Y., 2012).

En 1995, la FDA aprobó el primer sistema nonométrico para el tratamiento del cáncer desarrollado por Liposome Technology Inc., el cual hoy en día aún existe en el mercado y se comercializa bajo el nombre comercial Doxil[®], un sistema que encapsula doxorubicina en liposomas PEGilados. [Barenholz Y., 2012].

La formulación inicial desarrollada se basó en la utilización de liposomas convencionales lo que resultó en cuestionamiento severo sobre el uso y potencial de dicho sistema por parte de la sociedad científica ya que el sistema no mostraba ventajas significativas comparadas con el fármaco libre. Esto debido a la liberación prematura del fármaco de manera que los efectos secundarios del fármaco no se veían reducidos, además de la rápida eliminación del sistema por SFM por lo que la biodisponibilidad del

fármaco y acumulación en tumores tampoco fue observada. Dichos resultados fueron considerados un fracaso en la utilización de liposomas como sistemas acarreadores, sin embargo, el desarrollo de Doxil se enfocó en resolver, entre otros, los problemas mencionados por lo que se buscó aumentar el tiempo de circulación de los liposomas-DOX favoreciendo la acumulación del sistema en tumores sólidos de forma pasiva, así como evitar el reconocimiento y eliminación por SFM. [Barenholz Y., 2012].

Con el fin de incrementar el tiempo de circulación de los liposomas se desarrollaron y evaluaron diversas estrategias, entre estas, la utilización del ganglósido GM₁, el cual demostró reducir la eliminación del sistema por SFM *in vivo*, fosfatidilinositol hidrogenado el cual genera una barrera estérica, y un lípido PEGilado recién sintetizado, DSPE-PEG, el cual estabiliza de forma estérica al sistema, reduciendo la interacción con proteínas y prolongado el tiempo de circulación. El estudio farmacocinético *in vivo* en perros Beagle demostró que los liposomas PEGilados circulaban por mayor tiempo, eran eliminados en un 40% menos que los liposomas no PEGilados permitiendo la acumulación del sistema de forma pasiva. La aprobación de Doxil[®] marcó el inicio del uso de liposomas PEGilados como nanoacarreadores en el tratamiento del cáncer. [Barenholz Y., 2012].

A pesar de que la PEGilación de liposomas ofrece ventajas importantes al sistema, se ha observado que la barrera estérica reduce la internalización celular de los liposomas debido a la disminución de la interacción célula-liposoma. Con el fin de optimizar la internalización celular de las nanoacarreadores y de mantener las ventajas otorgadas por la PEGilación, se han desarrollado sistemas donde las cadenas de polietilenglicol son escindidas bajo ciertas condiciones ambientales o exógenas, lo que permite la acumulación del sistema de forma pasiva en el tumor y posteriormente, el aumento de la internalización celular por la pérdida de la barrera estérica. Esta estrategia consiste en generar un enlace entre el PEG y el liposoma que responda a un estímulo químico, como aquellos sensibles a pH, esterases o cambios redox. [Mei L., 2014].

La funcionalización del liposoma con cadenas escindibles de polietilenglicol se ha utilizado para ocultar péptidos no específicos que optimizan la internalización celular (CPP, del inglés *Cell Penetrating Peptide*), así como de ligandos específicos. Aplicando esta estrategia se desarrolló un sistema multietapa, el cual consiste en la conjugación de

TAT, un CPP capaz de transportar moléculas y nanoacarreadores con diámetros aproximados de 200 nm, además de un ligando específico de células tumorales a los liposomas, aunado a eso, el sistema fue PEGilado a través de un enlace disulfuro -SS- el cual puede ser reducido de manera exógena por la administración de cisteína con el objetivo de aumentar el tiempo de circulación del sistema, lograr la acumulación pasiva del sistema PEGilado en el tumor, y posteriormente exponer TAT y el ligando potenciando la selectividad e internalización celular del sistema. Los liposomas evaluados fueron fabricados a través del método de hidratación de película fina, utilizando DSPE-SS-PEG como cadena escindible. Después de la hidratación el tamaño de partícula fue reducido por sonicación obtenido SUVs con diámetro promedio de 89 nm. [Mei L., 2014].

Los resultados *in vitro* demostraron que la PEGilación ocultaba de manera efectiva tanto el TAT y el ligando, provocando una disminución en la internalización celular, mientras que conforme se adicionaba cisteína al medio, la internalización aumentaba debido a la reducción del enlace disulfuro, la separación de la cadena y la exposición de TAT y el ligando. *In vivo*, se observó la acumulación de los liposomas funcionalizados en tumores demostrando la capacidad del sistema para evitar la eliminación por SFM e indicando tiempos de circulación prolongados. Posteriormente, se administró cisteína por vía intravenosa, lo que potenció la penetración celular por la reducción del enlace disulfuro, exposición del péptido y ligando. Los estudios preliminares de dicho sistema demostraron factibilidad del uso de cadenas escindibles de polietilenglicol. [Mei L., 2014]

A pesar de las ventajas proporcionadas por la PEGilación de los liposomas, distintos grupos de investigación han reportado que la administración repetitiva de liposomas PEGilados produce que estos sean eliminados rápidamente del sistema. Este fenómeno, el cual se ha denominado fenómeno de eliminación acelerada en sangre o ABC por sus siglas en inglés *Accelerated Blood Clearance*, se debe a la producción de anticuerpos anti-PEG los cuales reconocen un epítipo en el polímero, provocando mayor opsonización, activación de complemento y eliminación por SFM. Se ha descrito que la administración de liposomas PEGilados desencadena la producción de anticuerpos IgM en bazo, y que éste reconoce alrededor de 16 unidades de etilenglicol. Se ha observado que, tras la administración de la segunda dosis de una formulación de liposomas

PEGilados, el tiempo de circulación de los liposomas se reduce, mientras que la acumulación de ellos en hígado y bazo aumenta. Dicho fenómeno representa un obstáculo en el área clínica al considerar aquellos padecimientos que necesitan un tratamiento multidosis. Además de los efectos antes descritos, la generación de anticuerpos anti-PEG pueden provocar hipersensibilidad moderada o severa al paciente, comprometiendo el balance beneficio-riesgo del sistema. [Abu A.S., et al., 2013; Zhang P., et al., 2016]

De acuerdo con la literatura, existen varios factores que modulan la generación de este tipo de anticuerpos, entre ellos se ha reportado que el intervalo de tiempo entre la primera dosis y la segunda tiene alto impacto sobre la potencia del fenómeno ABC. Se ha descrito que el efecto es más pronunciado cuando la segunda dosis se administra dentro de 4-7 días después de la primera dosis, mientras que después de 14 o 28 días el efecto ABC es casi imperceptible. Esto se debe a que la producción de anticuerpos anti-PEG en bazo se ve aumentada dentro de los 4-7 días después de la primera administración. La dosis también presenta un efecto sobre la severidad del efecto, se ha observado que a dosis más altas de liposomas PEGilados el efecto se ve reducido, probablemente por anergia de las células o por tolerabilidad. También se ha sugerido que la densidad de PEG superficial, la ruta de administración, y el tamaño de los nanoacarreadores provoque modificaciones sobre el fenómeno. Considerando esto, se han estudiado polímeros alternativos que confieran al sistema las características que ofrece la PEGilación evitando la respuesta inmunológica, dentro de estos se ha evaluado poli(N-vinil-2-pirrolidona) el cual ha demostrado buenos resultados al ser administrado por vía intravenosa. [Abu A.S., et al., 2013]

4.3.2 Bioadherencia

La bioadherencia se define como la adhesión de macromoléculas naturales o sintéticas a la mucosa o a la superficie del tejido epitelial a través de fuerzas interfaciales por tiempo prolongado, el término mucoadherencia se utiliza con frecuencia cuando se refiere específicamente a la adhesión a la mucosa. [Mansuri S., et al., 2016].

La mucosa es la superficie húmeda que recubre varias cavidades del cuerpo, entre estas el tracto gastrointestinal, respiratorio y reproductivo. Dicha superficie consiste en

tejido epitelial recubierto de moco el cual puede encontrarse adherido a la superficie como es en el caso de la vagina, cornea, esófago, estómago, etc., o de forma suspendida como en el caso de la saliva. El moco se compone principalmente de la familia de glicoproteínas denominadas mucinas, agua, sales inorgánicas y lípidos. El moco se encarga de lubricar y proteger las células endoteliales de daños físicos y químicos, modula el contenido de agua del tejido subyacente, además de ser un agente humectante. [Sogias L.A., et al., 2008].

El proceso de mucoadhesión involucra distintos mecanismos de unión entre las partes involucradas, se manifiestan interacciones electrostáticas, interacciones hidrofílicas, fuerzas de van der Waals y difusión. La mucoadhesión tiene el potencial de optimizar la liberación controlada de moléculas activas tanto de manera localizada como de manera sistémica, ya prolonga el tiempo de residencia lo que mejora la absorción del principio activo resultando en un aumento de la eficacia terapéutica, evita la degradación del componente activo debido al pH del estómago y brinda la oportunidad de administrar el sistema por diversas vías como son nasal, vaginal, bucal, ocular, pulmonar y transdérmica, lo que mejora el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. [Alavi S., et al., 2016; Mansuri S., et al., 2016].

Se ha reportado el recubrimiento de liposomas con quitosán (CS) con el fin de generar un sistema mucoadhesivo. El CS (Figura 29) es un polisacárido catiónico natural formado por la copolimerización de unidades de glucosamina y N-acetil glucosamina, el cual ha demostrado ser biocompatible. Hoy en día existen distintos tipos de quitosán los cuales difieren en peso molecular y grado de acetilación. Dicho polímero se caracteriza por ser insoluble en pH neutro y alcalino, sin embargo, es soluble en condiciones ácidas debido a la protonación de las aminas primarias presentes en la cadena. La capacidad mucoadhesiva del CS se adjudica a la posibilidad de generar interacciones electrostáticas con los residuos de carga negativa de la mucina, además, otra característica documentada del CS es la mejora de la absorción de componentes activos debido a su habilidad para interactuar con las uniones celulares potenciando el transporte paracelular. Aunado a esto, el recubrimiento con CS mejora la estabilidad del sistema al conferirle al liposoma mayor rigidez estructural evitando la liberación prematura del principio activo,

disminuyendo la tendencia de agregación por impedimento estérico; mejorando la biodisponibilidad de los componentes encapsulados. [Alavi S., et al., 2016; Mansuri S., et al., 2016].

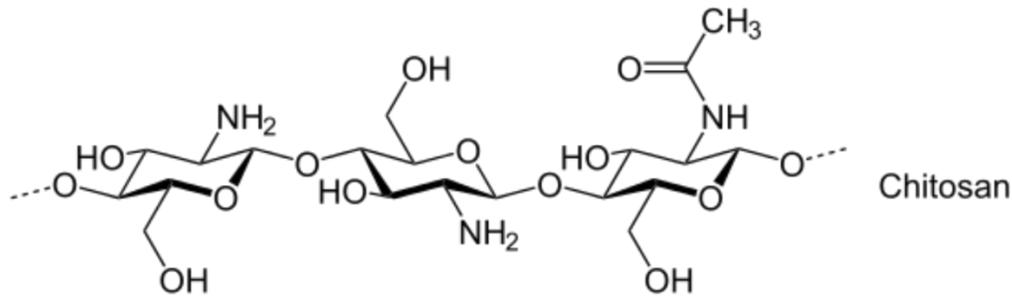


Figura 29. Estructura química del chitosan.

La vía de administración ocular de forma tópica (oftálmica) es una de las vías de mejor aceptación y apego al tratamiento por parte del paciente, sin embargo, la córnea representa una barrera mecánica que limita la entrada de sustancias exógenas al ojo, aunado a esto, los sistemas aplicados de forma tópica, como las soluciones, son eliminados rápidamente a través del recambio lagrimal, parpadeo y a través del drenaje del conducto nasolagrimal, lo que compromete la eficacia de esta vía de administración debido a su baja biodisponibilidad ocular. El uso de liposomas ha sido una estrategia que se ha desarrollado para mejorar la administración de fármacos por vía oftálmica ya que ha demostrado buena penetración corneal, tiempos de eliminación prolongados y biocompatibilidad, además de tener la capacidad de ser administrados de forma local y de mantener la actividad de la molécula activa en el sitio de acción, la desventaja de utilizar liposomas convencionales radica en que son eliminados rápidamente a través de las lágrimas. Con el objetivo de optimizar el sistema se reportó el desarrollo y evaluación de un sistema de liposomas recubiertos con chitosan, LP-CS, (Figura 30) en los cuales se encapsuló maleato de timolol (MT) para el tratamiento del glaucoma con el fin de que el sistema tuviera la capacidad de adherirse a la superficie de la córnea, de mejorar la permeación ocular, prolongar el tiempo de residencia precorneal y la biodisponibilidad del fármaco. [Alavi S., et al., 2016; Tan G., et al., 2017].

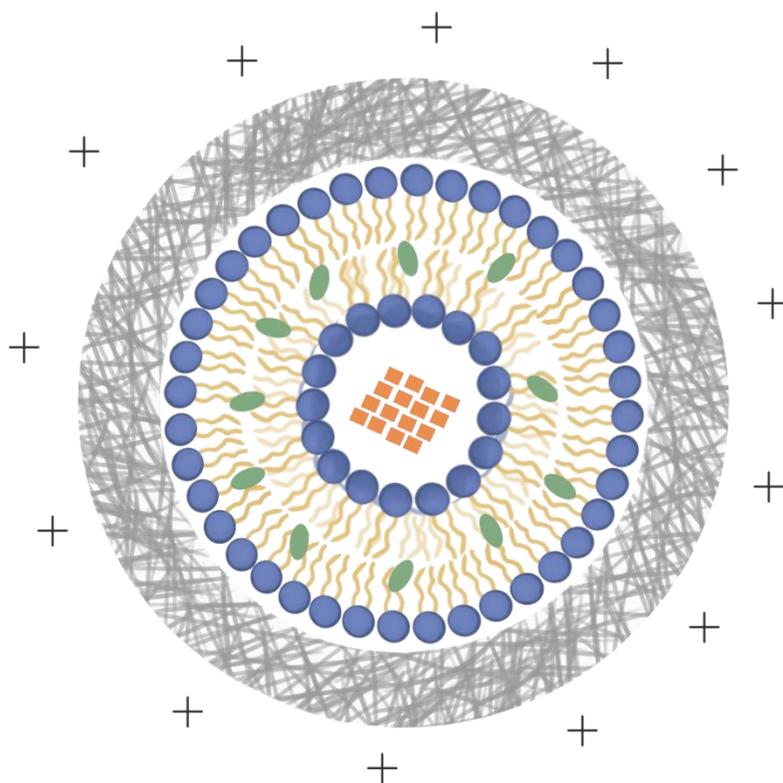


Figura 30. Representación de un liposoma recubierto con quitosán. (Modificado de Alavi S., 2016).

La fabricación de los liposomas se realizó por el método de hidratación de película fina, debido a su alta solubilidad en medio acuoso, el maleato de timolol fue encapsulado dentro del núcleo acuoso. Una vez hidrata la película, la dispersión fue sonicada con el fin de reducir el tamaño de partícula, obteniendo LUVs con diámetro promedio de 108.8 ± 3.5 nm. La dispersión de liposomas fue añadida gota a gota a la solución de quitosán. El recubrimiento de los liposomas se confirmó al observar un aumento del tamaño de partícula, alrededor de 437 ± 5.0 nm y potencial Z del sistema, además, las imágenes de microscopía electrónica corroboraron el recubrimiento al observar que la superficie era rugosa por la presencia del polímero. También se evaluó la mucoadhesión del sistema, donde se observó que el potencial zeta de la mezcla mucina - LP-CS tendía a cero debido a la interacción electrostática entre los liposomas recubiertos por el polímero catiónico y la carga negativa de la mucina, además se observó un aumento del tamaño de partícula demostrando que el quitosán es capaz de generar la mucoadhesión del sistema a la

superficie de la córnea, y consecuentemente aumentar el tiempo de interacción entre la córnea y LP-CS. [Tan G., et al., 2017].

El estudio *in vitro* del sistema mucoadhesivo exhibió la liberación sostenida del fármaco, en el cual se observó la liberación del 29% del fármaco tras la primera hora de evaluación y de 78.5% a las 12 horas. La capa de quitosán formada en la superficie del liposoma restringe la difusión del fármaco controlando la liberación lo que permitiría reducir la frecuencia de administración y por tanto mejorar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. El estudio de permeación transcorneal demostró que los liposomas recubiertos son más permeables al compararlos con liposomas convencionales (LP) y la solución de MT, resultado que se adjudica a la capacidad del quitosán de interponerse entre las uniones de las células epiteliales incrementando el transporte del sistema. [Tan G., et al., 2017].

Por último, la evaluación del sistema *in vivo* demostró un efecto prolongado de la disminución de la presión ocular del MT encapsulado en LP-CS en comparación con el efecto producido por la solución de MT, además, se demostró un aumento de la biodisponibilidad del fármaco al incrementar el área bajo la curva y la concentración máxima en comparación con los LP y la solución de MT. El sistema liposomal mucoadhesivo es una estrategia prometedora para el tratamiento del glaucoma al demostrar resultados superiores en comparación con otras formulaciones. [Tan G., et al., 2017].

Además del polímero mencionado anteriormente, se han utilizado derivados de celulosa, poloxámeros, alginatos, entre otros, para diseñar sistemas liposomales mucoadhesivos. [Sogias L.A., et al., 2008; Mansuri S., et al., 2016].

Perspectivas

A partir de la información expuesta en el presente trabajo, se ha demostrado que los liposomas aplicados a la administración de fármacos prometen ser un sistema versátil, ya que ofrecen la oportunidad de ser modificados a través diversas estrategias con el fin de generar sistemas inteligentes. Además, como se ha mencionado, se han aprobado medicamentos basados en sistemas liposomales (Doxil[®], Myocet[®], Marqibo[®], Ambisome[®], Inflexal[®] V, Experel[®], etc.) lo que demuestra la factibilidad del sistema y da pie a profundizar la investigación relacionada con este tema buscando maneras de optimizarlo al otorgándole más y mejores ventajas.

A pesar del gran avance que se ha observado en los últimos años en cuanto al uso de liposomas como nanoacarreadores, el número de formulaciones que han sido aprobadas representa un porcentaje muy bajo al compararlo con la cantidad de formulaciones que se han desarrollado. A pesar de los buenos resultados y las ventajas proporcionadas por el sistema que han sido evidenciadas en diversas investigaciones, existen situaciones que comprometen la llegada del sistema a nivel comercial relacionados con problemas de fabricación, regulación, propiedad intelectual y costo.

El problema se centra en el escalamiento de los procesos de fabricación a nivel industrial ya que no todas las técnicas de preparación realizadas a nivel laboratorio son sencillas de escalar. Esto debido a que con frecuencia se utilizan disolventes orgánicos que representan un riesgo para la salud, el escalamiento puede generar productos de baja reproducibilidad, la manufactura del sistema compromete la estabilidad de las vesículas, así como la falta de equipo adecuado para la fabricación de liposomas a gran escala. Se han desarrollado métodos exitosos que permiten la producción de liposomas convencionales, sin embargo, surgen nuevos retos cuando se habla de liposomas funcionalizados, pues requieren de una mayor cantidad de pasos de fabricación, síntesis química, en el caso de la conjugación con otras moléculas, así como la adición de materias primas como polímeros. Estas modificaciones generan procesos más costosos, que pueden comprometer el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación y hacen necesario incrementar las evaluaciones fisicoquímicas del producto final para garantizar la calidad y seguridad de los sistemas liposomales. A pesar de ello, se han desarrollo

nuevos métodos para la producción de liposomas con el objetivo de innovar, diseñar y desarrollar sistemas de producción factibles y escalables, lo que dará pie a que nuevas formulaciones sean aprobadas. [Sercombe L., et al., 2015]

Es importante mencionar el interés durante los últimos años en la formulación de sistemas multi-funcionalizados, aquellos sistemas que utilizan la combinación de varias estrategias con el propósito de generar sistemas más eficientes y selectivos. Así mismo, se han desarrollado con entusiasmo los sistemas liposomales teranósticos, los cuales se desempeñan como agentes de diagnóstico y terapéuticos, lo que da oportunidad de tratar enfermedades y monitorearlas al mismo tiempo. [Sercombe L., et al., 2015]

Por último, es importante mencionar que el desarrollo de sistemas liposomales factibles requiere de la colaboración de otras áreas de investigación, además del área farmacéutica, como la biología molecular, toxicología y medicina con el fin de caracterizar la patología que se busca tratar, generando sistemas capaces de diferenciar ambientes celulares y estructuras moleculares, utilizando materiales que eviten la activación del sistema inmunológico permitiendo la administración frecuente del medicamento, así como la implementación de diversas vías de administración, además de áreas relacionadas con tecnología de procesos y transferencia de tecnología con el fin de generar sistemas factibles y de fácil escalamiento.

Conclusiones

- Se identificaron y describieron los principales componentes de los liposomas, así como su función.
- Se identificaron los métodos de fabricación más utilizados, describiendo el fundamento de cada uno de ellos, así como sus ventajas y desventajas.
- Se identificaron los métodos más utilizados para la caracterización del sistema, se describió el fundamento de cada uno de ellos, así como su importancia.
- Se mencionaron las ventajas que brinda al sistema la funcionalización de los liposomas, se describieron y ejemplificaron algunas de las técnicas de funcionalización más utilizadas.

Bibliografía

1. Elizondo, E., Moreno E., Cabrera I., Córdoba A., Sala S., Veciana J., Ventosa N., (2011). Liposomes and Other Vesicular Systems: Structural Characteristics, Methods of Preparation, and Use in Nanomedicine I. Introduction. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Vol. 104).
2. Lee Y.S., (2012). *Self-Assembly and Nanotechnology Systems, Design, Characterization and Applications*. Hoboken, New Jersey: Wiley.
3. Palesko, John. A. (2007). *Self assembly: the science of things that put themselves together*. Boca Raton, Florida: Chapman & Hal
4. Fox, S.I. (2011). *Fisiología Humana*. Cd, México, México: McGraw Hill Interamericana.
5. Borrell, J. H., Domènech, Ò., Keough, K. M.W., (2016). *Membrane protein – lipid interactions: physics and chemistry in the bilayer*. SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology, Khalil, R. A., Zarari, A. A. (2014). Applied Surface Science Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science*, 318, 85–89.
6. Nejat, D., Gregoriadis, G. (2005). *Introduction: The origins of Liposomes: Alec Bangha, at Babraham*. Methods in Enzymology, VOL. 391. Elsevier inc. 0076-6879/05**
7. Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Guccione, C., Manconi, M., Fadda, A. M., & Sinico, C. (2016). Vesicles and micelles: Two versatile vectors for the delivery of natural products. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, 241–255.
8. Dou, Y., Hynynen, K., & Allen, C. (2017). To Heat Or Not To Heat: Challenges with Clinical Translation of Thermosensitive Liposomes. *Journal of Controlled Release*.
9. van der Meel, R., Fens, M. H. A. M., Vader, P., Solinge, W. W. Van, Eniola-adeleso, O., & Schiffelers, R. M. (2014). Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field. *Journal of Controlled Release*, 195, 72–85.
10. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Nejadi-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102.
11. Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews: Drug Discovery*. Vol. 4(February).
12. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., & Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery, *Frontiers in Pharmacology*6(December), 1–13.
13. Hermanson, G. T. (2013) *Bioconjugate Techniques. Chapter 21 – Liposome Conjugates and Derivatives*
14. Kim, S., Turker, M.S., Chi, E.Y., Sela, S., Martin, G.M. (1983). Preparation of multivesicular liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta*728 339-348.
15. Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2014). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81–98.
16. Mouritsen, O. G., Bagatolli, L. A., Mersini-houghton, L. (2016). *Life – as a matter of fat*. Switzerland: Springer
17. Carrero I., Herráez A., “El mundo de los lípidos” <http://biomodel.uah.es/model2/lip/inicio.htm>

18. Nogueira, E., Gomes, A. C., Preto, A., Cavaco-paulo, A. (2015). Design of liposomal formulations for cell targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 136, 514–526.
19. Briuglia, M., Rotella, C. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*. 231–242.
20. Wade, L. (2011). *Química Orgánica. Vol. 2*. Estado de México, Naucalpan de Juárez: Pearson Educación.
21. Magarkar, A., Dhawan, V., Kallinteri, P., Viitala, T., Elmowafy, M., Róg, T., Bunker, A. (2014). Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in physiological environment. *Scientific Reports*, 4, 5005.
22. Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I., Karttunen, M. (2009). Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(1), 97–121.
23. Kohli N., (2009) *Chemistry Longman Science*. Nueva Delhi, India: Pearson Education.
24. Yadav, A. V, Murthy, M. S., Shete, A. S., & Sakhare, S. (2011). Stability Aspects of Liposomes, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 45(4), 402–413.
25. Lasic D.D., (1990). On the Thermodynamic Stability of Liposomes, *Journal of Colloid and Interface Science*. (1), 3–5
26. Guida, V. (2010). Thermodynamics and kinetics of vesicles formation processes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 161(1–2), 77–88.
27. Basu, S., Basu, M., *Methods in Molecular Biology, vol: 199: Liposome Methods and Protocols*. (2002). Totowa, Nueva Jersey: Humana Press Inc.
28. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*. 8:102
29. Dua. J.S., Rana, A.C., Bhandari, A.K. (2012) Liposome: Methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 3/ 14-20 E-ISSN 2229-4619
30. Kirby. C., Gregory. G. (1984) Dehydration-Rehydration Vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Nature Biotechnology* 2, 979 – 98.
31. Yu, Bo., Lee. R.J., Lee. L.J., Microfluidic Methods for Production of Liposomes. (2009). *Methods in Enzymology*. 465: 129-142.
32. Patil, Y.P., Jadhav, S., (2014) Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 177:8-18.
33. Jaafar-Maalej, C., Charcosset, C., & Fessi, H. (2011). A new method for liposome preparation using a membrane contactor. *Journal of Liposome Research*, 21(3), 213–220.
34. Gabelman, A., & Hwang, S.-T. (1999). Hollow fiber membrane contactors. *Journal of Membrane Science*, 159(1–2), 61–106.
35. Stanojević, M., Lazarević, B., & Radić, D. (2003). Review of membrane contactors designs and applications of different modules in industry. *FME Transactions*, 31(1), 91–98.
36. Huang, Z., Li, X., Zhang, T., Song, Y., She, Z., & Li, J. (2014). Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 176–182.
37. Torchilin, V.P, Weissig, V. (2003) *Liposomes: A practical Approach*. Nueva York: Oxford University Press.
38. Vemuri. S., Rhodes. C.T. (1995) Preparation and characterization of liposomes as therapeutic systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 70 95-111
39. Kulshreshtha A.K., Singh O.N., Wall G.M., (2010), *Pharmaceutical suspensions: from formulation development to manufacturing*, Nueva York, EUA, Springer.

40. Hinton. R., Dobrota. M. *Density Gradient Centrifugation. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Volume 6.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
41. Chen, C., Han, D., Cai, C., Tang, X. (2010). An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release*, 142(3), 299–311.
42. Kasper, J. C., Friess, W. (2011). The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 248–263.
43. Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147–168.
44. Xu, C., Cai, X., Zhang, J., & Liu, L. (2015). Fast nanoparticle sizing by image dynamic light scattering. *Particuology*, 19, 82–85.
45. Xu, R. (2015). Light scattering: A review of particle characterization applications. *Particuology*, 18, 11–21.
46. Li, Z., Wang, Y., Shen, J., Liu, W., Sun, X. (2014). The measurement system of nanoparticle size distribution from dynamic light scattering data. *Optics and Lasers in Engineering*, 56, 94–98.
47. Wasshington University in St.Louis, school of engineering and applied science, Nano research facility, “Dynamic Light Scattering (DLS)” www.nano.wustl.edu/doc/.../DLS%20Final.pdf
48. Stetefeld, J., McKenna, S. A., Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427.
49. Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147–168.
50. Severs, N. J. (2007). Freeze-fracture electron microscopy, *Nature Protocols* 2(3), 547–576.
51. Hoppe, S. M., Sasaki, D. Y., Kinghorn, A. N., Hattar, K. (2013). In-Situ Transmission Electron Microscopy of Liposomes in an Aqueous Environment, *Langmuir letters*, ACS Publications, 29, 9958-9961
52. Egerton R.F., (2016), *Physical Principals of Electron Microscopy. An introduction to TEM, SEM, and AEM.* Springer,
53. John Innes Centre, “Microscopy”, https://www.jic.ac.uk/microscopy/intro_EM.html
54. Edwards, K. A., Baeumner, A. J. (2005). Analysis of liposomes, *Talanta*, 68, 1432–1441.
55. Demetzos, C. (2008). Differential Scanning Calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *Journal of Liposome Research*, 18(3), 159–173
56. Rodney L. Biltonen., Dov Lichtenberg., (1993). The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations, *Chemistry and Physics of lipids*, 64, 129–142.
57. Zhang, X., Patel, A. B., Graaf, R. A. De Behar, K. L. (2004). Determination of liposomal encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy, 127, 113–120.
58. Ran, C., Chen, D., Xu, M., Du, C., Li, Q., Jiang, Y. (2016). A study on characteristic of different sample pretreatment methods to evaluate the entrapment efficiency of liposomes. *Journal of Chromatography B*, 1028, 56–62.
59. Mendoza-Muñoz N., Kei, N. E., Guadalupe, N. M., Elisa, M. S., Adriana, G., David, Q. (2011). Preparation and in vitro evaluation of poly (D, L -lactide- co -glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast agent for ultrasound imaging, *Ultrasonics*, 51, 839–845.

60. Sánchez-López, V., Fernández-Romero, J. M., & Gómez-Hens, A. (2009). Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system. *Analytica Chimica Acta*, 645(1–2), 79–85.
61. Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*, 12(11), 991–1003.
62. Belletti, D., Vandelli, M. A., Tonelli, M., Zapparoli, M., Forni, F., Tosi, G., Ruozi, B. (2014). Functionalization of liposomes: microscopical methods for preformulative screening. *J Liposome Res*, 2104(September 2015), 1–7.
63. Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A., & Amiji, M. (2008). A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 126(3), 187–204.
64. Movahedi, F., Hu, R. G., Becker, D. L., Xu, C. (2015). Stimuli-responsive liposomes for the delivery of nucleic acid therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(6), 1575–1584.
65. Lopes, J. R., Santos, G., Barata, P., Oliveira, R., Lopes, C. M. (2013). Physical and chemical stimuli-responsive drug delivery systems: targeted delivery and main routes of administration. *Current Pharmaceutical Design*, 19(41), 7169–84.
66. van Elk, M., Murphy, B. P., Eufrásio-da-Silva, T., O'Reilly, D. P., Vermonden, T., Hennink, P. W. E., ... Ruiz-Hernández, E. (2016). Nanomedicines for advanced cancer treatments: Transitioning towards responsive systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1–2), 132–164.
67. Ferreira, D. S., Lopes, S. C. A., Franco, M. S., Oliveira, M. C. (2013). pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. *Therapeutic Delivery*, 4(9), 1–24.
68. Liu, X., & Huang, G. (2013). Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(6), 319–328.
69. Li, W., Nicol, F., & Szoka, F. C. (2004). GALA: A designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(7), 967–985.
70. Fan, Y., Chen, C., Huang, Y., Zhang, F., Lin, G. (2017). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Study of the pH-sensitive mechanism of tumor-targeting liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 151, 19–25.
71. Goldenbogen, B., Brodersen, N., Gramatica, A., Loew, M., Liebscher, J., Herrmann, A., ... Arbuzova, A. (2011). Reduction-sensitive liposomes from a multifunctional lipid conjugate and natural phospholipids: Reduction and release kinetics and cellular uptake. *Langmuir*, 27(17), 10820–10829.
72. Saito, G., Swanson, J. A., & Lee, K. D. (2003). Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: Role and site of cellular reducing activities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(2), 199–215.
73. Maeda, T., & Fujimoto, K. (2006). A reduction-triggered delivery by a liposomal carrier possessing membrane-permeable ligands and a detachable coating. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49(1), 15–21.
74. Chi, Y., Yin, X., Sun, K., Feng, S., Liu, J., Chen, D., ... Wu, Z. (2017). Redox-sensitive and hyaluronic acid functionalized liposomes for cytoplasmic drug delivery to osteosarcoma in animal models. *Journal of Controlled Release*, 261, 113–125.

75. Kim, C. H., Lee, S. G., Kang, M. J., Lee, S., & Choi, Y. W. (2017). Surface modification of lipid-based nanocarriers for cancer cell-specific drug targeting. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 47(3), 203–227.
76. Ong, W., Yang, Y., Cruciano, A. C., & McCarley, R. L. (2008). Redox-triggered contents release from liposomes. *Journal of the American Chemical Society*, 130(44), 14739–14744.
77. Volpato, M., Abou-Zeid, N., Tanner, R. W., Glassbrook, L. T., Taylor, J., Stratford, I., ... Phillips, R. M. (2007). Chemical synthesis and biological evaluation of a NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 targeted tripartite quinone drug delivery system. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(12), 3122–3130.
78. Sarkar, N., Banerjee, J., Hanson, A. J., Elegbede, A. I., Rosendahl, T., Krueger, A. B., ... Srivastava, D. K. (2008). Matrix metalloproteinase-assisted triggered release of liposomal contents. *Bioconjugate Chemistry*, 19(1), 57–64.
79. Zhu, L., Kate, P., & Torchilin, V. P. (2012). Matrix metalloproteinase 2-responsive multifunctional liposomal nanocarrier for enhanced tumor targeting. *ACS Nano*, 6(4), 3491–3498.
80. Banerjee, J., Hanson, A. J., Gadam, B., Elegbede, A. I., Tobwala, S., Ganguly, B., ... Mallik, S. (2009). Release of liposomal contents by cell-secreted matrix metalloproteinase-9. *Bioconjugate Chemistry*, 20(7), 1332–1339.
81. Elegbede, A. I., Banerjee, J., Hanson, A. J., Tobwala, S., Ganguli, B., Wang, R., ... Mallik, S. (2008). Mechanistic studies of the triggered release of liposomal contents by matrix metalloproteinase-9. *Journal of the American Chemical Society*, 130(32), 10633–10642.
82. Pourhassan, H., Clergeaud, G., Hansen, A. E., Østrem, R. G., Fliedner, F. P., Melander, F., ... Andresen, T. L. (2017). Revisiting the use of sPLA 2 -sensitive liposomes in cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 261(February), 163–173.
83. Zhu G., Mock J.N., Ajuffali I., Cummings B.S., Arnold R.D., (2011) Secretary Phospholipase A₂ Responsive Liposomes, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 3146-3159.
84. Clinicaltrial.gov, A service of the U.S. National Institutes of Health, (2017), “Phase I/II Study to Evaluate the Safety and Tolerability of LiPlaCis in Patients With Advanced or Refractory Tumours (LiPlaCis)” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01861496>
85. Dou, Y., Hynynen, K., Allen, C. (2017). To Heat Or Not To Heat: Challenges with Clinical Translation of Thermosensitive Liposomes. *Journal of Controlled Release*.
86. Ta, T., & Porter, T. M. (2013). Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 169(1–2), 112–125.
87. Clinicaltrial.gov, A service of the U.S. National Institutes of Health, (2017) “Phase 3 Study of ThermoDox With Radiofrequency Ablation (RFA) in Treatment of Hepatocellular Carcinoma (HCC)” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00617981>
88. Celsion Corporation, (2016), “Thermodox. Enhancing the efficacy of doxorubicin with heat-activated liposome technology.” <http://celsion.com/thermodox/>
89. Clinicaltrial.gov, A service of the U.S. National Institutes of Health, (2017) “Phase 1/2 Study of ThermoDox With Approved Hyperthermia in Treatment of Breast Cancer Recurrence at the Chest Wall (DIGNITY)” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00826085>
90. Guo, H., Chen, W., Sun, X., Liu, Y. N., Li, J., & Wang, J. (2015). Theranostic magnetoliposomes coated by carboxymethyl dextran with controlled release by low-frequency alternating magnetic field. *Carbohydrate Polymers*, 118, 209–217.
91. German, S. V., Navolokin, N. A., Kuznetsova, N. R., Zuev, V. V., Inozemtseva, O. A., Anis'kov, A. A., ... Gorin, D. A. (2015). Liposomes loaded with hydrophilic magnetite nanoparticles: Preparation

- and application as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 109–115.
92. Kang, T., Li, F., Baik, S., Shao, W., Ling, D., & Hyeon, T. (2017). Surface design of magnetic nanoparticles for stimuli-responsive cancer imaging and therapy. *Biomaterials*, 136, 98–114.
 93. Yang, Y., Xie, X., Xu, X., Xia, X., Wang, H., Li, L., ... Mei, X. (2016). Thermal and magnetic dual-responsive liposomes with a cell-penetrating peptide-siRNA conjugate for enhanced and targeted cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 607–615.
 94. Monnier, C. A., Burnand, D., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., & Petri-Fink, A. (2014). Magnetoliposomes: Opportunities and challenges. *European Journal of Nanomedicine*, 6(4), 201–215.
 95. Tietze, R., Zaloga, J., Unterweger, H., Lyer, S., Friedrich, R. P., Janko, C., ... Alexiou, C. (2015). Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(3), 463–470.
 96. Hervault, A., & Thanh, N. T. K. (2014). Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale*, 6(20), 11553–11573.
 97. Mohammed, L., Gomaa, H. G., Ragab, D., & Zhu, J. (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 30, 1–14.
 98. Nappini, S., Bombelli, F. B., Bonini, M., Nordèn, B., Baglioni, P., Bagham, A. D., ... P, N. A. (2010). Magnetoliposomes for controlled drug release in the presence of low-frequency magnetic field. *Soft Matter*, 6(1), 154–162.
 99. Nappini, S., Bonini, M., Ridi, F., & Baglioni, P. (2011). Structure and permeability of magnetoliposomes loaded with hydrophobic magnetic nanoparticles in the presence of a low frequency magnetic field. *Soft Matter*, 7(10), 4801.
 100. Ridi, F., Bonini, M., & Baglioni, P. (2014). Magneto-responsive nanocomposites: Preparation and integration of magnetic nanoparticles into films, capsules, and gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 207(1), 3–13.
 101. Tomitaka, A., Takemura, Y., Huang, Z., Roy, U., & Nair, M. (2015). Recent Advances in Magnetoliposomes as Drug Delivery Carriers Recent Advances in Magnetoliposomes as Drug Delivery Carriers. *Journal of Personalized NanoMedicine*, 1(2), 51–57.
 102. Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O., & Mahmoudi, M. (2011). Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166(1–2), 8–23.
 103. Huang, S. L. (2008). Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10), 1167–1176.
 104. Huang, S. L., & MacDonald, R. C. (2004). Acoustically active liposomes for drug encapsulation and ultrasound-triggered release. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1665(1–2), 134–141.
 105. Huang, S. L., McPherson, D. D., & MacDonald, R. C. (2008). A Method to Co-Encapsulate Gas and Drugs in Liposomes for Ultrasound-Controlled Drug Delivery. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34(8), 1272–1280.
 106. Nguyen, A. T., Sunny, Y., Bawiec, C., Lewin, P. A., & Wrenn, S. P. (2017). Investigating the spatial extent of acoustically activated echogenic liposomes. *Ultrasonics*, 77, 176–182.

107. Boissenot, T., Bordat, A., Fattal, E., & Tsapis, N. (2016). Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. *Journal of Controlled Release*, 241, 144–163.
108. Kenneth M., Travers P., Walport M., (2009), *Inmunología de Janeway*. México, D.F., McGraw Hill Interamericana editores S.A de C.V.
109. Sapra, P., & Shor, B. (2013). Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(3), 452–469.
110. Eloy, J. O., Petrilli, R., Trevizan, L. N. F., & Chorilli, M. (2017). Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.
111. Manjappa, A. S., Chaudhari, K. R., Venkataraju, M. P., Dantuluri, P., Nanda, B., Sidda, C., ... Ramachandra Murthy, R. S. (2011). Antibody derivatization and conjugation strategies: Application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. *Journal of Controlled Release*, 150(1), 2–22.
112. Kozłowska, D., Foran, P., MacMahon, P., Shelly, M. J., Eustace, S., & O’Kennedy, R. (2009). Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(15), 1402–1411.
113. Neve, R. M., Nielsen, U. B., Kirpotin, D. B., Poul, M.-A., Marks, J. D., & Benz, C. C. (2001). Biological Effects of Anti-ErbB2 Single Chain Antibodies Selected for Internalizing Function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(1), 274–279.
114. Park, J. W., Kirpotin, D. B., Hong, K., Shalaby, R., Shao, Y., Nielsen, U. B., ... Benz, C. C. (2001). Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *Journal of Controlled Release*, 74(1–3), 95–113.
115. INEGI, (2017) “Estadísticas a propósito del día de Muertos. (2 de noviembre)” Instituto Nacional de Estadística y Geografía, comunicación social, 2017. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf
116. Eloy, J. O., Petrilli, R., Chesca, D. L., Saggiaro, F. P., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2017). Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115, 159–167.
117. Petazzi, R. A., Gramatica, A., Herrmann, A., & Chiantia, S. (2015). Time-controlled phagocytosis of asymmetric liposomes: Application to phosphatidylserine immunoliposomes binding HIV-1 virus-like particles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(8), 1985–1992.
118. Clinicaltrial.gov, A service of the U.S. National Institutes of Health, (2017) “MM-302 Plus Trastuzumab vs. Chemotherapy of Physician's Choice Plus Trastuzumab in HER2-Positive Locally Advanced/Metastatic Breast Cancer Patients (HERMIONE)” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02213744>
119. Clinicaltrial.gov, A service of the U.S. National Institutes of Health, (2017) “Safety and Pharmacokinetic Study of MM-302 in Patients With Advanced Breast Cancer” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01304797>
120. Ramana, L. N., Sharma, S., Sethuraman, S., Ranga, U., & Krishnan, U. M. (2015). Stealth anti-CD4 conjugated immunoliposomes with dual antiretroviral drugs - Modern Trojan horses to combat HIV. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89, 300–311.
121. Kim, J. (2016). Liposomal drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46(4), 387–392.

122. Guichard, M.-J., Leal, T., & Vanbever, R. (2017). Pegylation, an approach for improving the pulmonary delivery of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*.
123. Immordino, M. L., & Cattel, L. (2006). Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential, *International journal of nanomedicine*. 297–315.
124. Harris, J. M., & Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2(3), 214–21.
125. Milla, P., Dosio, F., & Cattel, L. (2012). PEGylation of Proteins and Liposomes: a Powerful and Flexible Strategy to Improve the Drug Delivery. *Current Drug Metabolism*, 13(1), 105–119.
126. Barenholz, Y. (2012). Doxil?? - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160(2), 117–134.
127. Mei, L., Fu, L., Shi, K., Zhang, Q., Liu, Y., Tang, J., He, Q. (2014). Increased tumor targeted delivery using a multistage liposome system functionalized with RGD, TAT and cleavable PEG. *International Journal of Pharmaceutics*, 468(1–2), 26–38
128. Zhang, P., Sun, F., Liu, S., & Jiang, S. (2016). Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation. *Journal of Controlled Release*, 244, 184–193.
129. Abu, A. S., Kiwada, H., & Ishida, T. (2013). The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. *Journal of Controlled Release*, 172(1), 38–47.
130. Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R. K., & Jain, N. K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*, 100, 151–172.
131. Sogias, I. A., Williams, A. C., & Khutoryanskiy, V. V. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 9(7), 1837–1842.
132. Alavi, S., Haeri, A., & Dadashzadeh, S. (2017). Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. *Carbohydrate Polymers*, 157, 991–1012.
133. Tan, G., Yu, S., Pan, H., Li, J., Liu, D., Yuan, K., Pan, W. (2017). Bioadhesive chitosan-loaded liposomes: A more efficient and higher permeable ocular delivery platform for timolol maleate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 355–363.