



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ELABORACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN
FARMACOCINÉTICA DE LIPOMICS RADIOMARCADOS CON
TECNECIO-99m (^{99m}Tc).”**

TESIS

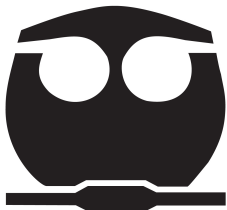
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DAVID RAMÍREZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ



CDMX

AÑO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: M. en C. MA. GUADALUPE LEMUS BARAJAS

VOCAL: Profesor: Dra. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

SECRETARIO: DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. GERARDO LEYVA GÓMEZ

2do. SUPLENTE: Profesor: DR. CARLOS JUÁREZ OSORNIO

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

ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ _____

SUPERVISOR TÉCNICO: CARLOS JUÁREZ OSORNIO _____

SUSTENTANTE: DAVID RAMÍREZ HERNÁNDEZ _____

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química**, por darme la oportunidad de formar parte de su gran comunidad y permitirme concluir mis estudios como Químico Farmacéutico Biólogo en tan prestigiosas instituciones.

Al **Instituto Nacional de Cancerología** y en especial al Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, por facilitarme el uso de sus instalaciones, equipos y materiales para la realización de este trabajo.

Al **Laboratorio Central de Microscopía** del instituto de Física, por el valioso apoyo técnico que complemento esta investigación.

Al **Laboratorio de Biología Celular** de la UAM Unidad Cuajimalpa, por facilitarme el uso de sus instalaciones, equipo de microscopía de fluorescencia y valioso apoyo para complementar este trabajo.

Al **Programa de Apoyo de investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM** (proyectos; **IA205818** y **IN104919**) por los apoyos recibidos para la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia, por todo su apoyo y comprensión a lo largo de mi carrera, principalmente a mis abuelos; Juana y Félix que me abren las puertas de su hogar cada semana, a si como a mis tíos; Ana Berta, Gustavo, Hilario y Pilar que siempre me han apoyado y aconsejado, son como unos padres para mí.

A mis padres Carlos y Ubalda que han estado conmigo en los buenos y malos momentos apoyándome y dándome las facilidades para continuar con mis estudios.

A mi Hermano Gadiel, esposa Nayeli e hijos Estephania, Scarlett y Gadiel a los que no tengo la forma de agradecerles todo su apoyo, sus consejos, ayuda y alegrías que me han brindado durante todo este proceso, espero algún día recompensarlo.

A mis hermanos Elizabeth, Luis, Saúl y Rúben por su apoyo, cariño y sobre todo paciencia.

Al Doctor Luis Alberto Medina Velázquez por su apoyo, valiosos consejos y su gran interés por inculcarme el espíritu científico.

A la Doctora Janeth Serrano, por su apoyo y aportaciones en este proyecto.

Al M. en I. Pável Adolfo Figueroa Rodríguez por su apoyo en la determinación de los puntos de turbidez gracias al desarrollo del Turbidímetro.

A los Doctores; Carlos, Diana, Elena, Héctor, Monserrat, y Vanesa por su apoyo y guía durante el desarrollo de este trabajo.

A la QFB y amiga Ilse Monserrat Mendoza, por su ayuda durante la elaboración de farmacocinéticas, por su apoyo y gran amistad a lo largo de la carrera.

A mis amigos del laboratorio de Física Médica; Alexis, Álvaro, Ángel, Arely, Edgar Omar, Edmundo, Efrén, Itzel, Josefina, Josue, Manuel, Omar, Roberto, Sandra y Sirio, por cada uno a su modo aportar en este proyecto, otorgando una visión multidisciplinaria a esta tesis y por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos Sara García, Sofía Casillas, Alberto Colín, Camila Campos, Adrián Rodríguez, Aldo Lemus, Gisela Preciado, Salvador Acosta, Jessica Audifred, Giovanni Gonzales, Jorge Ochoa, Miguel Gonzales, Raymundo Beltmon, Mayra Aquino, Ricardo Cabrera, Ameyalli Vázques, Karren Garduño y Arlette Segura por hacer el paso por la facultad una experiencia inolvidable y por su amistad invaluable.

A Erick Verdeja, Martin Rivera, Demetrio Cumplido, Mario Peña, y Miguel Bernal, por su apoyo, compañerismo, amistad invaluable y experiencias que compartieron conmigo durante este tiempo, gracias por todo.

A Paulina, Oscar y Ana Félix por brindarme su apoyo y abrirme las puertas de su hogar durante mucho tiempo, siempre estaré muy agradecido con ustedes.

DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada a mis sobrinos; Estephania, Scarlett y Gadiel, que son el principal motivo de mis esfuerzos, sigan adelante, logren grandes cosas y siempre piensen en grande, los amo.

Y por último a ti que fuiste una gran persona, que me ayudo a revalorar las situaciones, que ha orientado mi camino y a la que le debo mucho, te prometí que un día te lo iba a compensar, muchas gracias por todo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	2
3.- HIPÓTESIS	13
4.- OBJETIVOS	
4.1.- Objetivos generales	13
4.2.- Objetivos particulares	13
5.- MATERIALES	14
6.- MÉTODOS	
6.1.- Diseño Experimental de Taguchi	15
6.2.- Determinación del Punto de turbidez (PT)	15
6.3.- Elaboración de lipomic	
6.3.1.- Lipomics (Blanco)	16
6.3.2.- Lipomics cargados con acetato de uranilo	16
6.3.3.- Lipomics marcados con Rodamina (RhB) y Fluoresceína (NaFi)	16
6.4 Elaboración de Liposomas	
6.4.1.- Elaboración de Liposomas Blanco	17
6.4.2.- Elaboración de liposomas cargados con Glucoheptanato	17
6.5 Evaluación Fisicoquímica	
6.5.1.- Diagramas Ternarios	17
6.5.2.- Tamaño de Partícula	18

6.5.3.- Potencial Zeta	18
6.5.4.- Estabilidad Fisicoquímica	18
6.5.5.- Microscopía STEM, SEM y TEM	18
6.5.6.- Cuantificación de Fosfolípidos	19
6.5.7.- Microscopía de Fluorescencia	20
6.6.- Radiomarcado	
6.6.1.- Elaboración de Kits de BMEDA para Radiomarcado	21
6.6.2.- Radiomarcado de liposomas y Lipomics	21
6.6.3.- Estabilidad de radiomarcado <i>In vitro</i>	22
6.7.- Evaluación Farmacocinética	
6.7.1.- Animales de experimentación	23
6.7.2.- Estudios de farmacocinética sanguínea y biodistribución en ratas	23
6.7.3.- Adquisición de imágenes	23
7.- RESULTADOS	
7.1.- Diseño Experimental de Taguchi	24
7.2.- Determinación del Punto de turbidez (PT)	24
7.3.- Elaboración del Lipomic	25
7.4.- Diagramas Ternarios	26
7.5.- Cuantificación de Fosfolípidos	28
7.6.- Estabilidad Fisicoquímica	29
7.7.-Microscopía	33
7.8.- Radiomarcado	37

7.8.1.- Estabilidad <i>In vitro</i> de Radiomarcado	38
7.9 Evaluación Farmacocinética	39
8.- ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
9.- CONCLUSIÓN	55
10.- PERSPECTIVAS	55
11.- BIBLIOGRAFÍA	59
I. ANEXO	

LISTA DE ABREVIATURAS

LNPs	Nanopartículas Lipídicas
RES	Sistema Retículo Endotelial
NP	Nanopartículas
CMC	Concentración Micelar Crítica
PT	Punto de turbidez (Cloud Point)
STEM	Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
RhB	Rodamina B
NaFi	Fluoresceína Sódica
CT	Tomografía Computarizada
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
^{99m}Tc	Tecnecio-99 metaestable
BMEDA	N,N-Bis(2-mercaptoetil)-N',N'-dietiletilendiamina
^{99m}TcO₄⁻	Pertecnecato sódico de Tecnecio
%W/W	Porcentaje Peso-Peso
NaCl	Cloruro de Sodio
rpm	Revoluciones por minuto
UO₂(CH₃COO)₂·2H₂O	Acetato de Uranilo
GSH	Glucoheptanato de Sodio
((NH₄)₂SO₄)	Sulfato de Amonio
KCl	Cloruro de Potasio
CHCl₃	Cloroformo
NH₄FeSCN	Ferrotiocianato de Amonio
DMSO	Dimetilsulfoxido
SnCl₂	Cloruro de Estaño
HCl	Ácido Clorhídrico
CH₃COOH	Ácido acético
N₂	Nitrógeno

NaOH	Hidroxido de Sodio
mCi	millicurie
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
nm	nanómetros
DE	Diámetro Efectivo
DP	Diámetro Promedio
IP	Índice de Polidispersión
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
mV	Milivolts
^{99m}Tc2BMEDA	Complejo Tecnecio-BMEDA
Cp	Concentración plasmática
t ½ β	Tiempo de vida media de la fase de eliminación
t ½ α	Tiempo de vida media de la fase de distribución
K12	Constante de velocidad de paso compartimento 1-2
K21	Constante de velocidad de paso compartimento 2-1
K10	Constante de eliminación del compartimento central
VD1	Volumen de distribución compartimento 1 (central)
VD2	Volumen de distribución compartimento 2 (periférico)
Cl	Depuración
ABC	Área bajo la curva
μPET	Micro tomografía por emisión de positrones
DDL	Dispersión dinámica de Luz

1. RESUMEN

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos para el desarrollo de un sistema de transporte de fármacos que no requiere el uso de disolventes orgánicos, y con potencial para transportar tanto fármacos lipofílicos como hidrofílicos en un sistema coloidal mixto de micelas incorporadas dentro de un liposoma, denominado “*lipomics*”. Estos sistemas fueron obtenidos a partir del uso de diagramas ternarios.

Los sistemas fueron caracterizados mediante estudios fisicoquímicos determinando: tamaño de partícula y potencial zeta para evaluar la estabilidad de los sistemas coloidales; posteriormente los sistemas que resultaron estables se analizaron por medio de técnicas de microscopía electrónica (SEM, TEM, STEM) para la determinación y confirmación de tamaño de partícula y morfología. Y por medio de una tinción a base de acetato de uranilo se confirmó la existencia de compartimentos acuosos (micelas) en el interior de las estructuras. Estos compartimientos se confirman de igual manera por medio de microscopía de fluorescencia a partir de Rodamina B y fluoresceína de sodio. Posteriormente se realizó un estudio de farmacocinética plasmática mediante el radiomarcado de los lipomics con el complejo ^{99m}Tc -2BMEDA, y un estudio de biodistribución *in vivo* mediante técnicas de imagen molecular microSPECT/CT que permitió evaluar la distribución de los lipomics en tiempo real.

Con ésta metodología se encontraron dos sistemas con características apropiadas para su uso como nanoacarreadores farmacéuticos, además de poseer parámetros farmacocinéticos que los hacen sistemas atractivos para un futuro uso terapéutico.

2. INTRODUCCIÓN

Desde la invención de los liposomas en 1965 por Bangham, se han propuesto múltiples modelos para mejorar la administración de fármacos dentro del organismo. Los liposomas están entre los primeros sistemas desarrollados para el acarreamiento de fármacos. Un liposoma se define como una vesícula esférica con un núcleo central acuoso rodeado por una bicapa lipídica. A este tipo de estructuras también se les conoce como nanopartículas lipídicas (LNPs), las cuales tienen importantes ventajas como acarreadores farmacéuticos, por ejemplo: la protección de fármacos a la degradación enzimática, poseen baja toxicidad, alta permeabilidad que permite la eficiente liberación del fármaco, biocompatibilidad, biodegradación completa dentro del organismo y una inmunogenicidad mínima. Sin embargo, algunas de estas ventajas son limitadas por presentar una vida media de circulación corta, (menor al tiempo de acción del fármaco, debido a la rápida degradación por el organismo o por la rápida acción del sistema inmune), baja eficiencia de encapsulación de fármacos lipofílicos, remoción por el sistema retículo endotelial (RES), interacciones celulares y la interferencia intermembrana (Neda Naseri, 2015).

El desarrollo de acarreadores farmacéuticos ha sido uno de los objetivos más importantes de la nanomedicina. Ya que otorga tratamientos más eficientes y menos tóxicos con sistemas de liberación de fármacos, el diagnóstico mediante acarreadores de agentes de contraste o radionúclidos, el monitoreo de enfermedades con biomarcadores y el control de sistemas biológicos por medio de DNA son algunas de las posibles aplicaciones de la nanotecnología en la medicina (Torchilin, 2007).

Con este fin, una gran variedad de nanopartículas (NP) han sido diseñadas en las últimas décadas; entre las más destacadas se encuentran las nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, liposomas, niosomas, partículas lipídicas sólidas y micelas. De éstas las más populares y más investigadas como acarreadores farmacéuticos son los liposomas (principalmente para la entrega de

fármacos hidrofílicos) y las micelas (principalmente como acarreadores de fármacos hidrofóbicos) . El desarrollo de nanoacarreadores para fármacos con una baja solubilidad es una tarea importante, debido a que una gran proporción de nuevos candidatos a fármacos o agentes de diagnóstico tienen naturaleza hidrofoba (baja solubilidad en agua). Las aplicaciones terapéuticas de agentes hidrofóbicos, son asociados con una mínima absorción y una baja biodisponibilidad, en adición, la agregación del fármaco sobre la administración intravenosa provoca problemas de embolismo y toxicidad local. Por otro lado, la baja solubilidad o hidrofobicidad es una propiedad intrínseca de muchos fármacos, la cual ayuda a la molécula o fármaco a penetrar la membrana celular y alcanzar importantes objetivos intracelulares. Para superar la baja solubilidad de ciertos fármacos se han usado diferentes tensoactivos formadores de micelas, las cuales son dispersiones coloidales con un tamaño de partícula de 5 a 100 nm. Una propiedad importante de las micelas es su capacidad de aumentar la solubilidad y la biodisponibilidad de fármacos poco solubles o insolubles (Torchilin, 2007).

Actualmente los avances en el desarrollo de nuevos acarreadores farmacéuticos ha sido de gran importancia para la aplicación de nuevas terapias y mejorar la eficiencia de las mismas. En el presente trabajo se ha propuesto un sistema con la capacidad de acarrear tanto fármacos hidrofóbicos como hidrofílicos formando un sistema mixto llamado lipomic. El lipomic es una nanoestructura lipídica compuesta por una mezcla de tensoactivos y fosfolípidos, los cuales bajo ciertas condiciones fisicoquímicas forman un núcleo de micelas mixtas (monómeros fosfolípidos y surfactantes), rodeado de una bicapa de fosfolípidos. Al ser la fusión de dos acarreadores farmacéuticos (liposoma y micela) este sistema puede transportar tanto fármacos hidrofílicos en el espacio acuoso sobrante en el liposoma y fármacos hidrofóbicos dentro de las micelas.

En la Figura 1 se representa esquemáticamente la estructura propuesta en este trabajo, la cual mostró evidencia significativa de que puede actuar como un sistema mixto de transporte de fármacos.

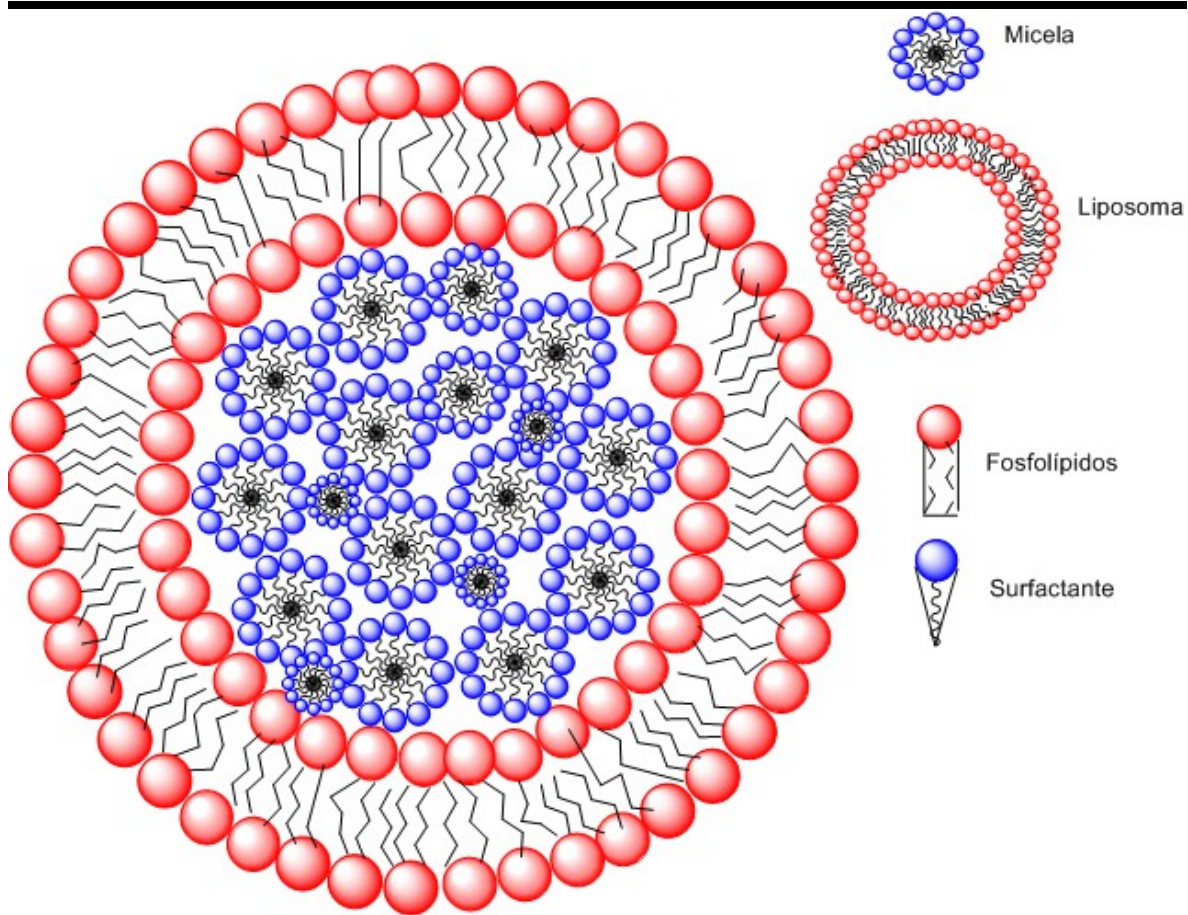


Figura 1. Representación esquemática del sistema denominado como “Lipomic”, el cual se define como un sistema mixto compuesto por una mezcla de surfactantes y fosfolípidos que forman un núcleo de micelas rodeado por una bicapa lipídica.

El uso de fosfolípidos o tensoactivos en la formación de estructuras nanométricas con un potencial uso como acarreadores farmacéuticos, requiere el entendimiento y el control de parámetros críticos para el proceso de manufactura, en particular la temperatura y la proporción de constituyentes en el sistema, ya que la nanoestructura resultante es función directa de este tipo de parámetros (Osornio, 2016).

En la naturaleza los fosfolípidos forman membranas semipermeables que juegan un papel importante en la separación, protección, y transporte de constituyentes celulares. Estos excipientes se usan en la industria farmacéutica para contribuir en la apariencia, textura, estabilidad y aroma; también son empleados frecuentemente como emulsificadores, siendo importantes para formar emulsiones estables con tiempos de vida apropiados y atributos funcionales (David, 2016).

Las emulsiones son sistemas bifásicos constituidos por dos líquidos inmiscibles: uno denominado fase dispersa, la cual está uniformemente dispersada como glóbulos a través de la segunda fase denominada fase continua. Ya que las emulsiones son termodinámicamente inestables, es necesario la aplicación de agentes emulsificadores, como lo son los fosfolípidos y los tensoactivos para proporcionar estabilidad a estos sistemas (Barkat, 2011).

Los tensoactivos son moléculas anfifílicas, es decir pueden disolverse en sustancias polares como no polares, además de tener la capacidad de formar micelas al llegar a la concentración micelar crítica (CMC). Al igual que los fosfolípidos los tensoactivos son empleados como emulsificantes, aunque recientemente los tensoactivos también han sido usados como sistemas de descontaminación de agua, esto debido a su capacidad de formar una bifase dentro de una solución al llegar a su punto de turbidez o cloud point (PT). En el presente trabajo, el PT es utilizado para crear una red micelar que concentre el tensoactivo en una interface, la cual es capturada por medio de la bicapa lipídica formada por fosfolípidos, integrándose de esta manera a la fase acuosa dando origen a la estructura mostrada en la Figura 1.

En la elaboración del lipomic se utilizan fosfolípidos y tensoactivos, la mezcla de estos componentes otorga diferentes estructuras dependiendo de la proporción utilizada. En el estudio de este sistema se utilizan diagramas ternarios, los cuales otorgan información del comportamiento de los excipientes conforme las proporciones de estos son modificadas; a esta serie de modificaciones se les conoce como trayectorias. Un diagrama ternario otorga una representación gráfica, en la cual se muestran las proporciones en las que se encuentra cada componente o mezcla de componentes; cabe resaltar que tanto los surfactantes como los fosfolípidos tienden a comportarse de manera distinta al modificar sus proporciones en una mezcla, por tal motivo el seguimiento de cada uno de los componentes es de vital importancia para la localización de puntos específicos en cada trayectoria. De esta manera es posible encontrar condiciones específicas en

las cuales la mezcla de componentes otorgó un sistema con las características fisicoquímicas deseadas.

A la par de la elaboración de las trayectorias de los diagramas ternarios se elaboró un estudio basado en un diseño experimental de Taguchi, el cual permite determinar de manera eficiente el proceso que funcione con mayor consistencia en el entorno operativo. Con el diseño experimental de Taguchi se planeó identificar los parámetros controlables que minimicen el efecto de los factores de ruido; un proceso diseñado bajo esta metodología será más robusto, otorgando un producto (el lipomic) más consistente. Los factores que intervienen en su elaboración son: la temperatura, el tiempo de agitación y la proporción de los componentes; la evaluación de estos parámetros permite garantizar una alta reproducibilidad del método. Posteriormente se procedió a la evaluación fisicoquímica de cada una de las formulaciones obtenidas mediante este método de manufactura.

Uno de los atributos que influyen en un sistema de liberación de fármacos es el tamaño de la partícula, pues siempre se ha creído que solo las sustancias en forma de dispersión molecular (es decir, en solución) se transportan a través del organismo. Sin embargo se ha demostrado que partículas con tamaños nanométricos pueden de igual forma interactuar con las barreras del organismo e incluso ser transportados a través de las membranas celulares alcanzando de este modo objetivos intracelulares de importancia clínica (Attwood, 2006). El tamaño de las NP puede influir en su distribución en el organismo, incluso pequeñas diferencias en el tamaño pueden cambiar la distribución real y por lo tanto la biodisponibilidad (Jong, 2008). Un tamaño de partícula de entre 10 y 200 nm, requiere que el control y estandarización del proceso de manufactura sea reproducible para garantizar que la superficie de contacto sea capaz de unir, absorber o transportar otros compuestos.

En el estudio del tamaño de diversos agregados lipídicos se han utilizado varios métodos espectroscópicos, uno de los más empleados, y el cual se uso en este trabajo, es la dispersión dinámica de luz. Esta determina el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas en solución. El principio en el que se basa la estimación del tamaño de partícula por la técnica de dispersión dinámica de luz laser (DLS) es el efecto Doppler (se conoce como velocimetría laser Doppler); esto es, cuando la luz laser incide en un medio que contiene partículas en movimiento Browniano, la frecuencia de la luz dispersada por estas partículas se corre un poco en función de la velocidad de la partícula, la cual depende de su tamaño. De esta forma la técnica DLS analiza la distribución de la velocidad del movimiento de partículas midiendo las fluctuaciones dinámicas de la intensidad de dispersión de la luz y determina un coeficiente de difusión (D). Esta técnica estima un diámetro hidrodinámico, que se calcula a través de la ecuación de Stokes-Einstein ($d_H = kT/3\pi\eta D$), donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura η es el coeficiente de viscosidad del medio y D es el coeficiente de difusión. (Murdock, 2008; NIST-NCL, 2015).

La evaluación del potencial Zeta, es un parámetro que permite determinar la movilidad electroforética de suspensiones coloidales cargadas e indica la repulsión o atracción que hay entre las moléculas, también se basa en la técnica de DLS (velocimetría laser Doppler). La técnica mide la velocidad de las partículas ante la presencia de un campo eléctrico de un valor conocido que se denomina movilidad electroforética. Se espera que para un sistema estable, el potencial mantenga suficientemente dispersas a las NP en el medio, evitando aglomeraciones que eventualmente lleven al sistema a flocular. Tomando en cuenta estos dos parámetros se llevo acabo un estudio de estabilidad de las emulsiones, en el cual se evalúa su variación a través del tiempo para determinar la coalescencia, floculación, “creaming” o la separación definitiva de ambas fases (Barkat, 2011).

Para la evaluación física de los sistemas, es decir, para corroborar la morfología y el tamaño físico de cada formulación, se utilizaron técnicas de Microscopía como;

Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM); cada una de estas técnicas fueron empleadas con objetivos diferentes. La microscopía SEM, se usa para determinar la morfología de una estructura produciendo una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes. La generación de imágenes se consigue al hacer incidir un haz de electrones sobre la superficie de la muestra, interaccionando con los átomos y provocando la emisión de electrones secundarios, electrones retrodispersados y rayos X. El SEM detecta y utiliza los electrones secundarios para formar una imagen que proporciona información topográfica de la muestra. En el caso del TEM, el haz de electrones se hace incidir sobre la muestra, parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan, estos últimos son utilizados para formar una imagen aumentada de la muestra. El TEM emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra. Por último STEM es una mezcla de ambas técnicas, la cual otorga una idea más general sobre los sistemas estudiados (Egerton, 2016).

Un complemento de la microscopía electrónica, es la técnica de fluorescencia, los estudios de fluorescencia se realizan con diferentes materiales que nos permiten delimitar las zonas hidrofílicas de las zonas hidrófobas; a estos materiales se les conoce como fluoróforos. La tinción con rodamina B (RhB) es usada como biomarcador catiónico debido a su afinidad a los grupos fosfato con carga negativa; esta propiedad ocasiona que la RhB sea afín a la cabeza polar de los fosfolípidos y una vez que los lipomios sean excitados con una haz de luz de 540 nm, la RhB logrará la emisión de 625 nm, otorgando un color rojo a la superficie del lipomic.

En el caso de la fluoresceína Sódica (NaFi); al ser una molécula altamente soluble se utilizó como marcador de los compartimentos acuosos dentro del lipomic, al

hacer incidir una haz de luz de 495 nm la NaFi emite un haz de 517 nm, mostrando las zonas de su incorporación de un color verde.

El radiomarcado; se define como la unión de un compuesto unido a una sustancia radioactiva. Existen varios métodos para lograr el marcaje de las moléculas con un radionúclido, el más frecuente es la coordinación de un radionúclido por medio de un quelante. El Tecnecio-99m (^{99m}Tc), posee una rica química de coordinación, que depende principalmente del estado de oxidación y los sistemas de ligandos propuestos. Para la coordinación del (^{99m}Tc), con N,N-Bis(2-mercaptoetil)-N',N'-dietiletilendiamina (BMEDA), se usa el reductor Cloruro de estaño (SnCl_2), al ser reducido el ^{99m}Tc se une con dos moléculas de BMEDA, que dependiendo del pH del medio tendrá naturaleza lipofílica o hidrofílica, que es capaz de atravesar la membrana lipomica o liposomal, generando de está manera el radioconjugado (Abram, 2006).

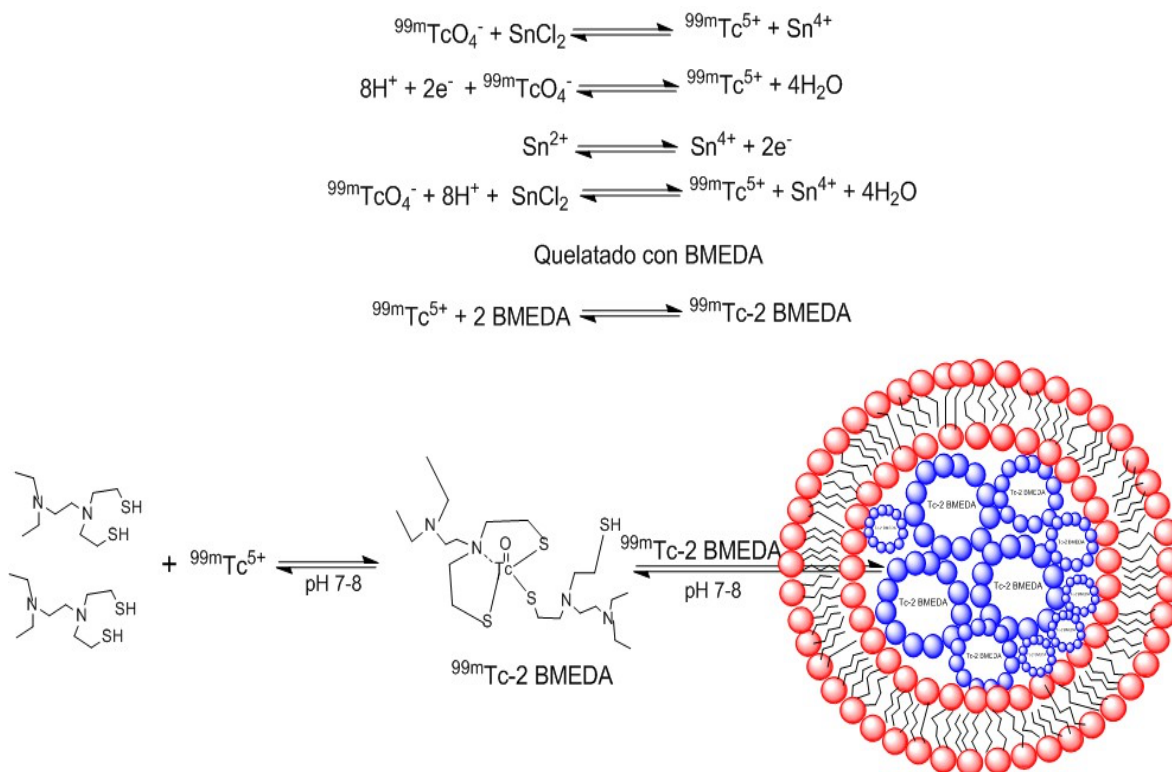


Figura 2. La Figura 2 es una representación del proceso del radiomarcado de los lipomics, este proceso comienza con la reducción del pertechnetato de tecnecio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) por cloruro de estaño II (SnCl_2) en medio ácido; posteriormente el Tecnecio V ($^{99m}\text{Tc}^{5+}$) se pone en contacto con el quelante bifuncional BMEDA y se modifica al pH hasta alcanzar un valor que oscile entre 7-8, volviendo de este modo al complejo $^{99m}\text{Tc-2BMEDA}$ hidrófobo permitiendo el paso a través de la bicapa lipídica por difusión simple y posteriormente incorporándose dentro de las micelas con núcleo hidrófobo.

Para evaluar la calidad del radiomarcado se usaron dos técnicas, que evalúan la eficiencia del radiomarcado y la estabilidad en suero del mismo. La primera de ellas se basa en la técnica de cromatografía en papel, la cual separa los componentes de la mezcla por medio de la elución de los componentes por medio de una fase móvil permitiendo de esta manera cuantificar la pureza y la eficiencia radioquímica por medio de un contador de pozo, el cual detectará los fotones emitidos por el ^{99m}Tc impregnado en el papel. La prueba de estabilidad en suero, consiste en una simulación de las condiciones fisiológicas a las cuales son sometidas las NP's cuando se encuentran dentro de un sistema biológico, es decir agitación constante, temperatura de 37°C y la presencia de suero por un periodo de 24 horas, lo que otorga una idea muy general del comportamiento del sistema una vez en circulación.

Para la evaluación *in-vivo*, se realizaron estudios farmacocinéticos por método plasmático y por imagen molecular. La farmacocinética nos permite caracterizar el proceso LADME (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) de un compuesto, ya sea en el organismo o compartimentos del mismo y suele emplearse en las fases de descubrimiento o selección de sustancias con potencial terapéutico o de diagnóstico (Rang, 2011).

La farmacocinética se suele centrar en las concentraciones de fármaco en el plasma sanguíneo, que pueden determinarse con facilidad mediante venopunción, ya que se presupone que las concentraciones plasmáticas mantienen una relación directa con la concentración de fármaco en el líquido extracelular que rodea las células donde se expresan los receptores u otras dianas con las que se combinan las moléculas de un fármaco. La interpretación formal de los datos farmacocinéticos se centra en ajustar los datos de concentración y tiempo en un modelo teórico y en determinar los parámetros que describen el comportamiento observado. Dependiendo del comportamiento del fármaco se emplean distintos modelos, en el caso actual los datos son ajustados a un modelo bicompartamental; el cual representa una aproximación muy utilizada en la que se agrupan los tejidos en un compartimento periférico. Las moléculas solo pueden

entrar y salir del compartimento periférico a través del compartimento central, el que se suele representar el plasma (Rang, 2011).

Un modelo bicompartamental se expresa matemáticamente a través de la ecuación ($Cp = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$) donde Cp es la concentración plasmática, A corresponde a la concentración plasmática inicial, α corresponde a la fase de distribución, B es el intercepto de la fase de eliminación, β corresponde a la fase de eliminación y t es el tiempo. A partir de ésta ecuación podemos calcular los parámetros más importantes que permiten comprender el comportamiento del sistema:

$t_{\frac{1}{2}\beta}$: Tiempo de vida media de la fase de eliminación.

$t_{\frac{1}{2}\alpha}$: Tiempo de vida media de la fase de distribución.

K_{21} : Constante de velocidad de paso del compartimento dos al compartimento 1.

K_{12} : Constante de velocidad de paso del compartimento uno al compartimento 2.

K_{10} : Constante de eliminación del fármaco del compartimento central.

VD_1 : Volumen de distribución del compartimento central.

VD_2 : Volumen de distribución del compartimento periférico.

Cl: Depuración

ABC: Área bajo la curva.

Estos parámetros nos indican de manera cuantitativa el comportamiento del sistema dentro del organismo.

La obtención de imágenes y seguimiento plasmático de las NP se realizaron con el radionúclido Tecnecio 99m (^{99m}Tc), este radionúclido es ampliamente usado en medicina nuclear; uno de los usos más comunes de este radioisotopo es en imagenología médica debido a sus características nucleares ideales, como una vida media de 6 h y una energía de emisión de rayos- γ de 140 keV (Dilworth, 1998).

Se usaron técnicas de imagen molecular como μ SPECT/CT donde se toman dos tipos diferentes de escaneo y las imágenes se fusionan. La tomografía computarizada (CT), en la cual se proyecta un haz angosto de rayos X, mientras se mueve alrededor del individuo generando proyecciones y por medio de una compilación de las mismas generar una imagen 2D o 3D de las adquisiciones y la tomografía computarizada por emisión de fotón único (μ SPECT), la cual capta los rayos gamma generados por el radionuclido administrado (^{99m}Tc) para observar la biodistribución de cada formulación y su comportamiento metabólico en el organismo.

3. HIPÓTESIS

La mezcla de fosfolípidos y tensoactivos en un medio acuoso, bajo el control de parámetros fisicoquímicos como temperatura, agitación y proporción de componentes, por medio de diagramas ternarios, da como resultado estructuras nanométricas llamadas lipomics, con potencial para el transporte de fármacos en estudios *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Elaboración y evaluación de lipomics radiomarcados con tecnecio-99m (^{99m}Tc).

4.2 Objetivos particulares

- Determinar una metodología para la elaboración del Lipomic, con base en diagramas ternarios y el método de Taguchi.
- Caracterizar fisicoquímicamente el Lipomic.
- Evaluar la farmacocinética *in vivo* del Lipomic.

5. MATERIALES

Para la elaboración de lipomics y liposomas se utilizaron Lecitina de Soya, (Droguería Cosmopolitan, Ciudad de México, México), 1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina, (DSPC), (Northern Lipids INC, Burnaby, BC, Canadá), Colesterol (Chol) y N-(Carbonilo-Metoxipolietilenglicol Glicol 2000)-Distearoil-Glicerofosfoetanolamina (DSPE-mPEG (2000)), (T&T Scientific Corp, Knoxville, TN, USA), Polioxietilensorbitan monolaurato (Tween® 20), Polioxietilensorbitan monopalmitato (Tween® 40), Polietilenglicol sorbitan monoestearato (Tween® 60) y Polioxietilensorbitan Monooleato (Tween® 80), Sal Fluoresceína de Sodio, (NaFi), Dextrosa, Sal de α -D-Sodio del ácido glucoheptónico, (GSH), Sulfato de Amonio ((NH₄)₂SO₄), (Sigma-Aldrich St. Luis, MO, USA), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-Fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonilo) (Sal de amonio), (Rodamina B, RhB) (avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, AL, USA), Acetato de Uranilo, (UO₂(CH₃COO)₂·2H₂O), (Química Especializada del Noroeste, Sonora, México), Cloroformo, (CHCl₃), (Reproquifin, Ecatepec de Morelos, México), Metanol, (CH₃OH), (Honeywell Research Chemicals, USA).

Para la evaluación fisicoquímica se utilizaron BI-ZR3 Zeta, un estándar para potencial (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A), un estándar de referencia de tamaño de partícula hecho con Nanoesferas™ (Thermo Scientific, Waltham Massachusetts USA), Cloruro de Potasio, (KCl), Cloruro de Sodio, (NaCl), Ferrotiocianato de Amonio, (NH₄FeSCN), (Química Especializada del Noroeste, Sonora, México).

En el radiomarcado se utilizaron N,N-Bis(2-mercaptoetil)-N',N'-dietilendiamina (BMEDA), Dimetilsulfoxido grado MB (DMSO), Cloruro de Estaño II (SnCl₂), (Sigma-Aldrich St. Luis, MO, USA), Gas de Nitrógeno (PRAXAIR, Guildford, Reino Unido), Ácido Clorhídrico, (HCl), (Fermont, Monterrey, México), Acido Acético (CH₃COOH), (Reproquifin, Ecatepec de Morelos, México), Pertecnectato de Tecnecio (MiYMSA, CDMX, México)

6. MÉTODOS

6.1 Diseño Experimental de Taguchi

Se utilizó el programa MiniTab (Minitab Inc. Versión 18) para diseñar el método experimental de Taguchi. Se consideraron cuatro variables con dos niveles de evaluación (Bajo y Alto) para medir el efecto del tamaño de partícula.

VARIABLES EXPERIMENTALES:

- 1.- Concentración de Fosfolípido
- 2.- Concentración de Surfactante
- 3.- Velocidad de Flujo (mL/h)
- 4.- Tiempo de Sonicación

6.2 Determinación del punto de turbidez (PT)

Para la determinación del PT se utilizaron cuatro tensoactivos no iónicos; con los que se elaboraron doce soluciones a diferentes concentraciones en una relación peso-peso (%W/W) en una solución salina isotónica (0.9% NaCl). El punto de turbidez se determinó en primera instancia de manera visual; para ello se emplearon dos viales de vidrio, en el primer vial se agregó la muestra de tensoactivo no iónico, mientras que en el segundo se agrega solución salina isotónica como control.

Una vez preparados ambos viales se colocaron en un baño María, donde se calientan suavemente las muestras, observando durante todo este periodo su comportamiento y reportando la temperatura en la cual el vial con muestra de tensoactivo no iónico presente un cambio de opacidad o turbidez, esta temperatura se registra como el PT. Posteriormente se comprobaron los puntos de turbidez de los tensoactivos con un turbidímetro, para esto se prepararon doce soluciones con concentraciones diferentes, que se introducen al equipo, el cual por medio de la ley de Beer-Lambert determina el punto de turbidez (PT).

6.3 Elaboración del lipomic

6.3.1 Lipomics (Blanco)

El lipomic se elabora a base de una mezcla de tensoactivos y fosfolípidos, esta mezcla es colocada en un matraz de bola, donde se homogeniza utilizando una parrilla de agitación magnética con un calentamiento moderado alrededor de una hora; tiempo durante el cual se adiciona un volumen de solución salina isotónica (NaCl 0.9%) mediante una bomba de infusión (baby-B). Posteriormente, el matraz de bola se coloca en un rotavapor (Buchi r-3, Suiza) a 120 rpm durante 1 hora con sonicación, y a la temperatura del punto de turbidez (cp) del surfactante no iónico usado.

6.3.2 Lipomics cargados con Acetato de Uranilo.

Estos lipomics fueron elaborados de la misma forma que el lipomic blanco, con la excepción de que la solución goteada por la bomba de infusión fue una solución de acetato de uranilo ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 2 % (w/w), el acetato de uranilo no encapsulado fue removido por medio de diálisis utilizando una membrana (Spectral/Pro) y como medio, agua desionizada estéril cambiando el medio cada hora durante seis horas.

6.3.3 Lipomics marcados con Rodamina B (RhB) y Fluoresceína (NaFi)

Los lipomics utilizados en la obtención de imágenes en el microscopio de fluorescencia, fueron marcados con Rodamina B (RhB) y Fluoresceína de sodio (NaFi). Se utilizó una proporción Fosfolípidos, Tensoactivos, RhB y NaFi de 50:48:0.1:0.99 mol, respectivamente. La RhB se mezcló con los fosfolípidos dentro del matraz bola, mientras que la NaFi se disolvió en agua estéril desionizada y se agregó a la mezcla por medio de una bomba de infusión. El exceso de RhB y NaFi fue eliminado por medio de diálisis con una membrana (Spectral/Pro), utilizando

como medio una solución de Dextrosa 3mM y Cloruro de sodio al 3%. Se realizaron cambios de medio cada 6 horas durante tres días.

6.4 Elaboración de Liposomas

6.4.1 Elaboración de liposomas Blanco

En un frasco de vidrio estéril se colocaron los fosfolípidos (DSPC/Chol/PEG-200) en proporción molar 60:35:5 mol, respectivamente. La mezcla de fosfolípidos se disolvió en 15 mL de una mezcla de Cloroformo-Metanol en una proporción 2:1. Esta solución se agregó, mediante goteo pausado, en 10 mL de agua desionizada estéril a 60 °C. La mezcla se transvasó a un matraz de bola, el cual se mantuvo durante una hora en agitación a 120 rpm en un rotavapor (Buchi r-3, Suiza). Posteriormente, el matraz bola se colocó dentro de un desecador durante 24 horas para eliminar los restos de los disolventes.

6.3.2 Elaboración de liposomas cargados con Glucoheptanato

Para estos liposomas se siguió la misma metodología utilizada en la elaboración de los liposomas blanco, pero sustituyendo los 10 mL de agua desionizada por una solución de Glucoheptanato de Sodio (GSH) con una concentración de 1 mg/mL, disuelta en una solución de Sulfato de Amonio ((NH₄)₂SO₄) 300 mM. Al término del proceso, los liposomas se eluyeron en una columna PD-10 (pH 7.4) previamente equilibrada con una solución de PBS, de esta manera estos liposomas logran un gradiente de concentración y de pH.

6.5 Evaluación Fisicoquímica

6.5.1. Diagramas Ternarios

Para la elaboración de los diagramas ternarios se utilizó el programa Sigma Plot con el que se obtuvo una representación grafica de la variabilidad en la proporción de componentes a lo largo de cada trayectoria.

6.5.2. Tamaño de Partícula

El tamaño de partícula, al igual que el potencial Z, se determinó usando el equipo Zetasizer Analyzer 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A). Se utilizaron 5 μL de nanoesferas de poliestireno como estándar de referencia (Duke Scientific, U.S.A) dispersadas en aproximadamente 2 mL de KCl 10 mM (Cloruro de potasio) previamente filtrado (filtro millipore de 0.22 μm), para verificar el buen funcionamiento del equipo.

Para realizar la medición de la muestra, se tomaron 10 μL de los lipomícs diluidos en aproximadamente 2 mL de KCl 10 mM.

6.5.3. Potencial Zeta

Se determinó el potencial Z empleando un electrodo de paladio con una celda de acrílico de cuatro lados claros. Como estándar se utilizó BI-ZR3 Zeta en una solución de KCl 1 mM previamente filtrada (filtro Milipore de 0.22). La medición se realizó con 100 μL de muestra diluidos en 1.5 mL de KCl 1 mM.

6.5.4. Estabilidad Fisicoquímica

Los sistemas fueron almacenados en tubos cónicos (Thermo Fisher Scientific) a 4 $^{\circ}\text{C}$, de estos sistemas se tomó una alícuota cada quince días y se determinó el potencial Zeta y el tamaño de partícula para evaluar su estabilidad en un periodo de 30 días.

6.5.5. Microscopías STEM, SEM y TEM.

Las técnicas de microscopía se aplicaron solo a las formulaciones con una estabilidad superior de quince días. Las muestras se prepararon con Acetato de Uranilo ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). De cada muestra se realizó una dilución (1:20),

posteriormente se tomó una alícuota de 50 μL y se colocó en un soporte de cobre (rejilla o barril), esta acción se repite al menos dos veces. Una vez seca, la muestra se recubre con una capa de Carbono. Posteriormente la muestras se colocaron en el microscopio Electrónico de Barrido de Ultra-Alta Resolución JSM-7800F del Instituto de Física de la UNAM, bajo las condiciones siguientes:

Tabla 1. Condiciones de operación del Microscopio Electrónico de Barrido de Ultra-Alta Resolución JSM-7800F del Instituto de Física de la UNAM en la obtención de imágenes.

Condiciones	Técnicas de microscopía empleadas		
	SEM	TEM	STEM
Voltaje (Kv)	30	30	30
Soporte de cobre	Barril o Rejilla	Rejilla	Barril o Rejilla
Medio de Contraste	No	Si (acetato de uranilo)	Si (acetato de uranilo)

6.5.6. Cuantificación de fosfolípidos

La cuantificación de fosfolípidos se realizó con el método de Stewart; para ello se preparó una disolución del fosfolípido a analizar en cloroformo (CHCl_3) a una concentración 2 mg/mL (Stock A). Del Stock A se realizó una dilución (1:10) (Stock B). A partir del Stock B se realizó una curva patrón de acuerdo con la Tabla 2:

Tabla 2. Proporciones de referencia para elaborar la curva patrón en la cuantificación de fosfolípidos en liposomas y en lipomícs. Estas diluciones son constantes, independientemente del fosfolípido que se esté analizando por medio de esta técnica.

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

Cada dilución, se agitó durante 1 minuto y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos a 4 °C (centrifuga Eppendorf, EUA). El exceso de NH_4FeSCN se removió, sin dejar trazas en la fase orgánica. La fracción libre de NH_4FeSCN se midió con un espectrofotómetro UV-Vis (beckman Coulter, EUA) a una longitud de onda de 480 nm.

Para la cuantificación de fosfolípidos en las muestras, se realizó una dilución (1:10) en agua desionizada y estéril, de la cual se tomaron 20 μL y se secaron usando un SpeedVac (Thermo Electron Corporation, U.S.A) a 20 °C durante 20 minutos. Posteriormente la muestra se resuspendió en 750 μL de CHCl_3 y se agitó durante un minuto, sucesivamente se agregaron 750 μL NH_4FeSCN ; después de la adición de NH_4FeSCN la muestra se trató igual que los puntos de la curva patrón.

6.5.7. Microscopía de Fluorescencia

A partir de muestras de lipomícs marcados con RbH y NaFi se realizó una dilución 1:20, posteriormente se tomó una alícuota de 20 μL y se colocó de manera homogénea sobre un porta objetos, a continuación la muestra se colocó en la platina y se procedió a su visualización a una longitud de onda de 610 nm para RbH y 495 nm para NaFi, todo el procedimiento se realizó en un cuarto oscuro.

6.6 Radiomarcado

6.6.1 Elaboración de Kits de BMEDA para Radiomarcado

Para la implementación de la técnica de radiomarcado se elaboraron dos kits (1 y 2) con el fin simplificar el proceso. El kit 1 se elaboró con 70 μL de BMEDA en una concentración de 0.5 mg/mL disuelto en Dimetilsulfoxido (DMSO) y 840 μL SnCl_2 con concentración de 10 mg/mL disuelto en HCl 0.1 N. Mientras que el Kit 2 contiene los mismos componentes que el Kit 1 más 875 μL de GSH con una concentración de 50mg/mL disuelto en ácido acético al 10% V/V. Ambos Kits, se agitaron vigorosamente y se desgasificaron con Nitrógeno (N_2) durante 15

minutos. Posteriormente el Kit 1 y Kit 2 se dividieron cada uno en 11 tubos Eppendorf (Thermo Fisher Scientific) cada tubo del Kit1 uno contenía 80 μL y cada tubo del Kit 2 contenía 157 μL de mezcla.

Estos tubos fueron congelados con nitrógeno líquido, y sometidos a liofilización (LABCONCO, USA) bajo las siguientes condiciones:

Tabla 3. Condiciones de Liofilización
El proceso de liofilización se realizó en el equipo LABCONCO FreeZone 2.5 USA.

Condiciones del proceso de liofilización				
Proceso de liofilización	paso	Tiempo (hr)	Temperatura (°C)	Presión (mBar)
Pre-congelación	1	1	-80	0.12
Liofilización Primaria	2	36	-58	0.12
Liofilización Primaria	3	12	18	0.12

Las muestras liofilizadas se guardaron bajo condiciones de vacío en un desecador hasta su uso posterior.

6.6.2. Radiomarcado de liposomas y lipomics

El radiomarcado de liposomas y lipomics, se realizó resuspendiendo el Kit 1 o Kit 2 en 5 mL de solución salina isotónica (NaCl 0.9%) y posteriormente se desgasificaron durante 15 minutos con N_2 . A continuación se agregó HCl 12 M hasta obtener un pH de 2.

De la solución anterior se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en un tubo Eppendorf, seguido de la adición de 5 mCi de Pertecnectato de Tecnecio metaestable ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$), a continuación la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 min. Posteriormente se modificó el pH agregando NaOH 1 M hasta llegar a un valor de 6 o 7 según el caso.

Para el radiomarcado, se agregó un volumen de liposomas o lipomics, equivalente a 30 μmol de fosfolípidos (~ 0.5 mL), al tubo Eppendorf con el complejo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -2BMEDA, y se incubó a 39 °C por 1 hora a 300 rpm.

La eficiencia de radiomarcado se determinó utilizando un contador de centelleo de tipo pozo (LUDLUM 2200, USA) midiendo la diferencia de actividad en la parte

inferior (Bottom) y la suma de la parte inferior y la superior (Top) de la placa cromatográfica (PALL, ITLCTMSG), multiplicada por cien, obteniendo la eficiencia de radiomarcado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia de Radiomarcado} = \frac{A \text{ Bottom}}{A \text{ Bottom} + A \text{ Top}} \times 100$$

6.6.3 Estabilidad de radiomarcado *In vitro*

Se tomó una alícuota de 50 µL de lipomics radiomarcados con el complejo ^{99m}Tc-2BMEDA y se adicionaron a 250 µL de suero humano. Posteriormente, la mezcla se incubó a baño seco a 37°C con agitación constante de 300 rpm en (Multi-Therm, Thermo Fisher). Se tomaron alícuotas de 2.5 µL a las 0, 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h, cada muestra se analizó por medio de una placa cromatográfica (PALL, ITLCTMSG), eluida con solución salina isotónica. Posteriormente usando el contador de pozo (LUDLUM 2200, USA) se midió la eficiencia radioquímica.

6.7. Evaluación Farmacocinética

6.7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 18 ratas Wistar macho entre 6-8 semanas de edad, adquiridos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM en Ciudad universitaria. Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en ambiente libres de patógenos, con agua y alimento *ad libitum*, con fotoperiodo día/noche 12/12, a una temperatura de 22 °C y humedad del 40%.

6.7.2 Estudios de farmacocinética sanguínea y biodistribución en ratas

Las ratas (200-220g) se separaron en tres grupos (n=5). Al grupo control se le administró por vía intravenosa 250 µCi de ^{99m}TcO₄⁻, mientras que a los grupos experimentales se les inyectó 300 µCi ^{99m}Tc-2BMEDA-Lipomic por vía

intravenosa. Se tomaron 20 μL de sangre extraída de la punta de la cola a los tiempos 0.08, 0.16, 0.25, 0.33, 0.41, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24 h. La actividad de las muestras se midió inmediatamente en el contador de pozo (LUDLUM 2200, USA). Se elaboró una gráfica de Concentración de actividad en sangre (mCi/ml) contra tiempo y los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron a partir del cálculo de un modelo bicompartimental. Algunos animales se sacrificaron a 3, 6 y 24 h, y se extrajeron los órganos de interés (Bazo, Corazón, Estómago, Hígado, Intestino delgado, Intestino grueso, Pulmones, riñones y vejiga); estos órganos se pesaron y se tomaron porciones significativas del tejido para cuantificar la actividad en cada uno de ellos.

6.7.3 Adquisición de imágenes

Los estudios de imagen molecular fueron realizados a las 1, 3 y 6 h posteriores a la inyección para observar la biodistribución de los lipomícs en el organismo. Se utilizó un equipo microPET/SPECT/CT (Albira, Bruker) y como radionúclido Tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) en el caso del grupo control y en el caso de los grupos experimentales $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -2BMEDA-Lipomic, administrando en promedio 250 μCi por vía intravenosa. Durante el estudio las ratas fueron anestesiadas con el Isoflurano/oxígeno (3:100). A partir de estos estudios se cuantificó la captación de las formulaciones lipómicas en órganos usando el software PMOD.

El análisis estadístico se realizó con el establecimiento de ROIS, en la cuales se determinó las cuentas por segundo, con las cuales se determinó la actividad por órgano en el sujeto.

7. Resultados

7.1 Diseño Experimental de Taguchi

El diseño de Taguchi para cuatro variables con dos niveles de evaluación (bajo y alto), dio como resultado un arreglo ortogonal de 16 experimentos propuestos a partir del programa Minitab (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño Experimental de Taguchi
Experimentos de síntesis obtenidos a través del programa MiniTab 18.
Nota: 1= Nivel Bajo, 2= Nivel Alto.

Experimento	[Fosfolípido] [mg/mL]	[Tensoactivo] [mg/mL]	[Flujo] (mL/h)	Tiempo de Sonicación
Lipomic 1	1	1	1	1
Lipomic 2	1	1	1	2
Lipomic 3	1	1	2	1
Lipomic 4	1	1	2	2
Lipomic 5	1	2	1	1
Lipomic 6	1	2	1	2
Lipomic 7	1	2	2	1
Lipomic 8	1	2	2	2
Lipomic 9	2	1	1	1
Lipomic 10	2	1	1	2
Lipomic 11	2	1	2	1
Lipomic 12	2	1	2	2
Lipomic 13	2	2	1	1
Lipomic 14	2	2	1	2
Lipomic 15	2	2	2	1
Lipomic 16	2	2	2	2

7.2 Determinación del punto de turbidez (PT)

La determinación de los puntos de turbidez de los cuatro tipos de tensoactivos utilizados en este trabajo se realizó de manera visual en primera instancia y los resultados para el surfactante 4 se corroboraron con un turbidímetro diseñado en el laboratorio de Física Medica del Instituto Nacional de Cancerología.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3, donde se observa que cada surfactante muestra un comportamiento diferente.

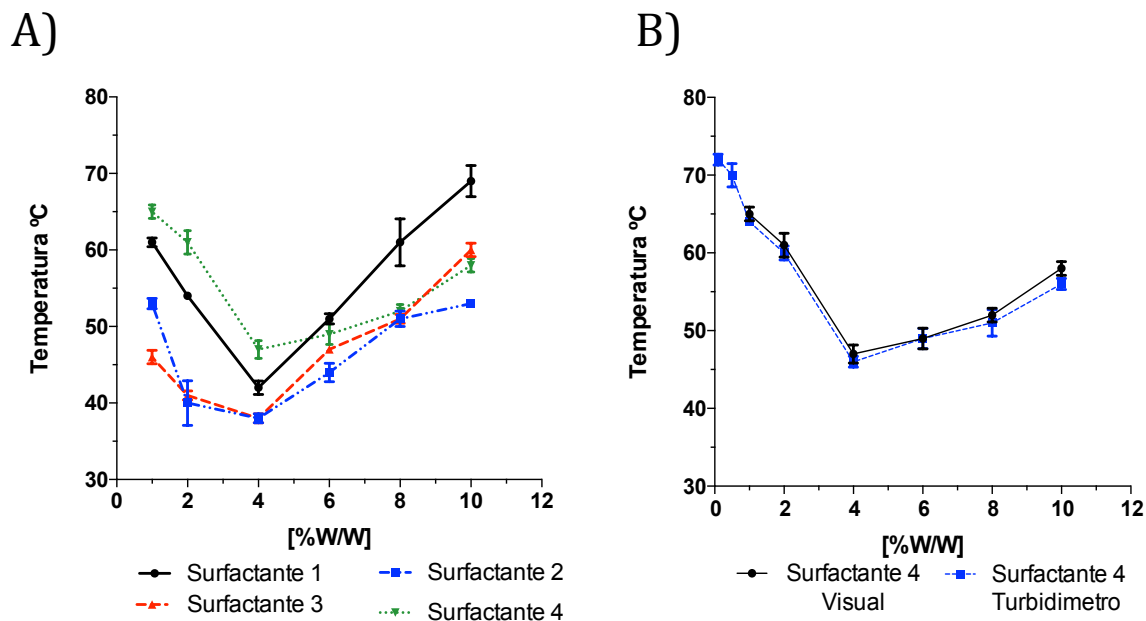


Figura 3. Punto de turbidez de Surfactantes no iónicos.

A) Puntos de Turbidez obtenidos por medio del método visual

B) Puntos de Turbidez obtenido por medio del Turbidímetro.

En la Figura 3B se comparan los resultados del *PT* usando dos métodos de medición (Visual y Turbidímetro); no se observa diferencia entre ambos métodos de medición.

7.3. Elaboración del Lipomic

En la Tabla 5 se presentan los resultados del tamaño hidrodinámico de partícula y el índice de polidispersión para cada una de las formulaciones propuestas. De estas formulaciones se descartaron las formulaciones 14 – 16 debido a que el tamaño de partícula mostrado era mayor a 1000 nm.

Tabla 5. Tamaño de Partícula e índice de Polidispersión de las formulaciones propuestas para la síntesis del lipomic.

Muestra	Tamaño (nm)		Índice de Polidispersión
	Diámetro Efectivo	Diámetro Promedio	
Lipomic 1	88.7	218.5	0.2
Lipomic 2	658.2	1904	0.13
Lipomic 3	107.4	147.6	0.188
Lipomic 4	6965.1	2242.6	0.196
Lipomic 5	1170.4	4497.1	0.33
Lipomic 6	4303.8	2778.4	0.161
Lipomic 7	5075.6	2779.1	0.14
Lipomic 8	6965.1	2242.6	0.196
Lipomic 9	157.6	418.6	0.226
Lipomic 10	1840.2	2531.7	0.238
Lipomic 11	31622.6	9989.7	0.547
Lipomic 12	695.2	1460.2	0.195
Lipomic 13	230	547.80	0.278

Con base a los resultados de la Tabla 6 se procedió a explorar distintas trayectorias en el diagrama ternario para las formulaciones Lipomic 1, 2, 3, 9, 12 y 13.

7.4 Diagramas ternarios

En la Figura 4 y 5 se muestran los diagramas ternarios para las formulaciones 1, 2, 3, 9, 12 y 13; cada punto de la trayectoria representa un cambio en la composición porcentual de los componentes del sistema expresados en %W/W.

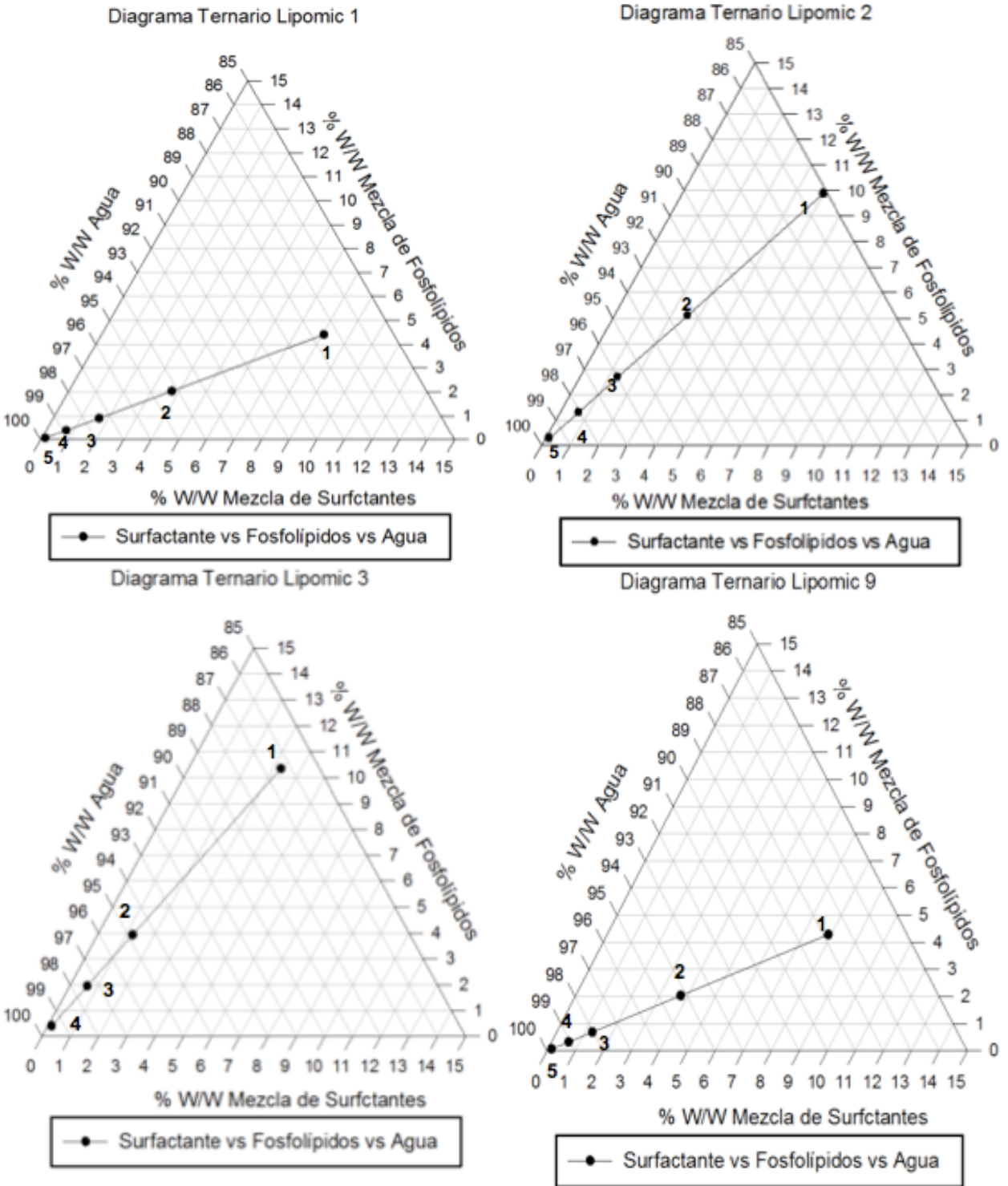


Figura 4. Diagramas Ternarios Lipomic 1, 2, 3 y 9. Se muestra la representación gráfica de las trayectorias trazadas a partir de las formulaciones previamente seleccionadas.

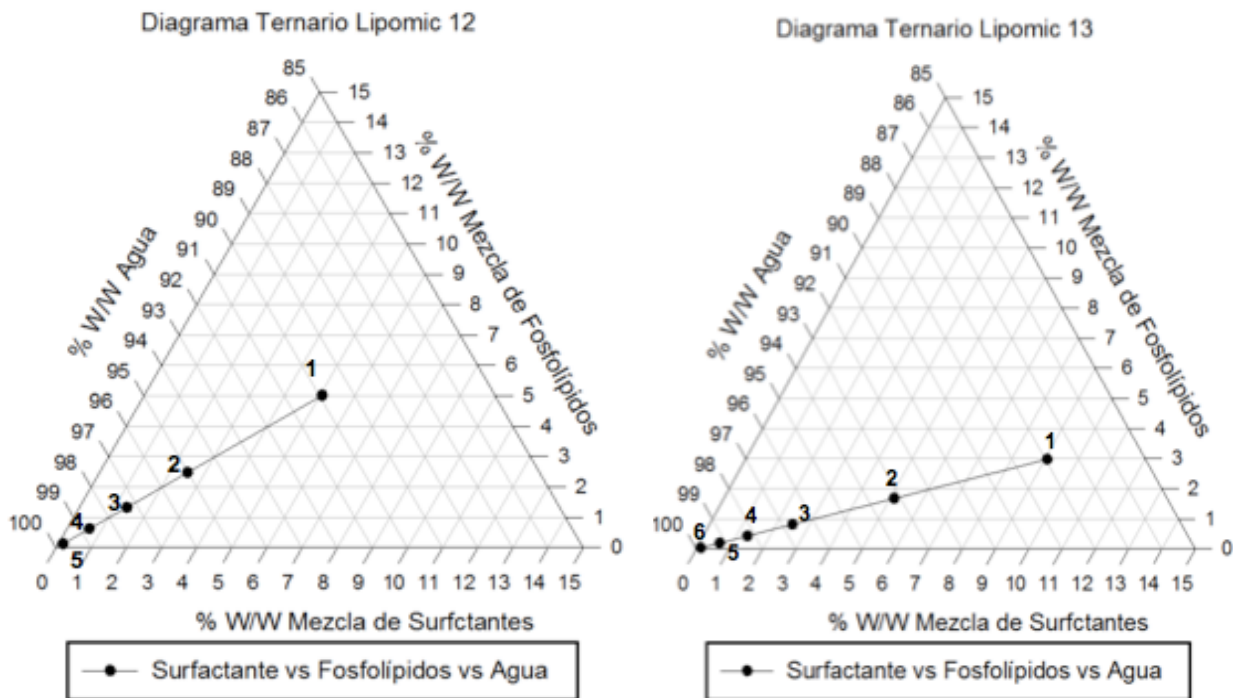


Figura 5. Diagrama Ternario Lipomic 12 y 13. Se muestra la representación gráfica de las trayectorias trazadas a partir de las formulaciones previamente seleccionadas.

7.5 Cuantificación de Fosfolípidos

En la Figura 6, se muestran la curva patrón para los fosfolípidos A y B. Los datos obtenidos se toman como referencia para el cálculo posterior de la concentración de fosfolípidos en las muestras.

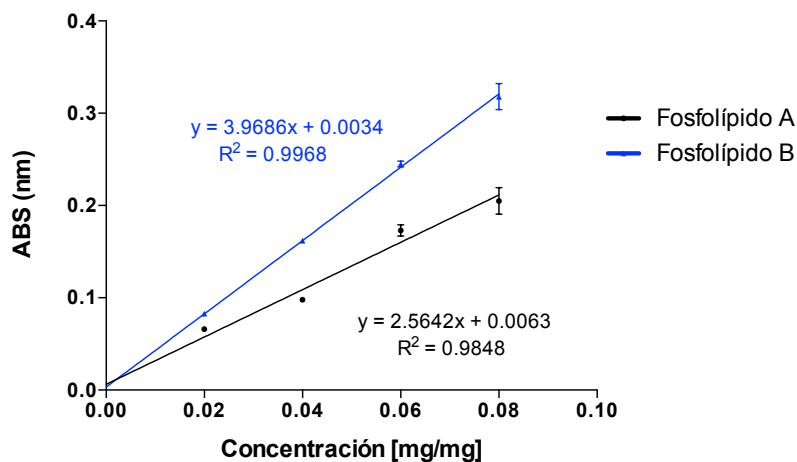


Figura 6. Curva patrón para la cuantificación de fosfolípidos
Cuantificación por método de Stewart; Promedio +/- SD

En el caso de los lipomícs, la determinación de la concentración de fosfolípidos se realizó mediante la inclusión de un blanco, el cual contiene la concentración de surfactante que se emplea en cada formulación. En la Tabla 6, se muestran las concentraciones de fosfolípidos.

Tabla 6.- Cuantificación de fosfolípidos mediante la técnica de Stewart

[mg/mL]T= Concentración de fosfolípidos Teórica

[mg/mL]R= Concentración de fosfolípidos Real

Muestra	Fosfolípido	[mg/mL]T	[mg/mL]R	% Eficiencia
Lipomic 1.1	A	59.3	55.5	93.5
Lipomic 9.2	B	42.3	40.5	95.7
Liposomas B	B	42.4	40.1	94.5
Liposomas GQ-GC	B	31.4	29.7	94.7

A partir de estos resultados se propuso modificar el método de cuantificación de fosfolípidos, para eliminar una sobreestimación de su concentración como resultado de la acción del surfactante. Las concentraciones reales son usadas como base para el cálculo de proporciones en el proceso de radiomarcado.

7.6 Estabilidad Fisicoquímica

En la Tabla 7 se muestran los resultados del análisis de tamaño de partícula y distribución poblacional de cada uno de los puntos mostrados en los diagramas ternarios. Donde: Diámetro Efectivo (DE); Desviación Estandar (SD); Índice de Polidispersión (IP).

Tabla 7. Resultados de caracterización fisicoquímica del Lipomic Diámetro Efectivo (DE), Desviación Estándar (SD), índice de Poldispersión (IP).

	Punto	Composición [%W/W]			Tamaño (nm)		IP	% Distribución Poblacional (nm)	
		Surfactantes	Fosfolípidos	Agua	DE	SD(+/-)		0-200	> 200
Lipomic 1	1	8.37	4.52	87.11	87	31	0.239	89	11
	2	3.81	2.06	94.13	94	10	0.26	100	0
	3	1.32	0.71	97.97	85	31	0.254	69	31
	4	0.63	0.34	99.03	88	38	0.247	98	2
	5	0.12	0.07	99.81	76	19	0.272	98	2
Lipomic 2	1	5	10	85.16	658	581	0.13	63	37
	2	2.57	5.1	92.33	203	412	0.145	69	31
	3	1.34	2.67	95.98	146	178	0.207	72	28
	4	0.65	1.29	98.06	111	35	0.257	57	43
	5	0.14	0.27	99.59	104	49	0.104	86	14
Lipomic 3	1	3.28	10.35	86.38	107	28	0.188	85	15
	2	1.24	3.93	94.83	119	158	0.182	88	12
	3	0.62	1.96	97.41	113	66	0.228	88	12
	4	0.13	0.41	99.46	114	40	0.299	50	50
Lipomic 9	1	8.2	4.2	87.6	89	49	0.252	69	21
	2	4.07	2.09	93.84	73	18	0.205	97	3
	3	1.34	0.69	97.97	76	24	0.246	84	16
	4	0.67	0.34	98.99	73	27	0.277	66	24
	5	0.13	0.07	99.81	82	64	0.25	80	20
Lipomic 12	1	5	5	90	695	541	0.195	73	27
	2	2.35	2.36	95.28	228	454	0.158	71	29
	3	1.08	1.08	97.84	128	134	0.181	83	17
	4	0.48	0.49	99.03	109	43	0.264	66	34
	5	0.22	0.22	99.57	97	23	0.274	100	0
Lipomic 13	1	9.21	3.06	87.73	230	225	0.278	39	61
	2	5.18	1.72	93.11	58	15	0.231	100	0
	3	2.62	0.87	96.51	59	12	0.222	100	0
	4	1.31	0.44	98.25	64	29	0.244	76	24

Con base en los resultados se seleccionaron aquellos puntos de las trayectorias que presentaron una distribución poblacional con tamaño en el intervalo de 0-200 nm en un porcentaje mayor o igual a 85% (Tabla 8).

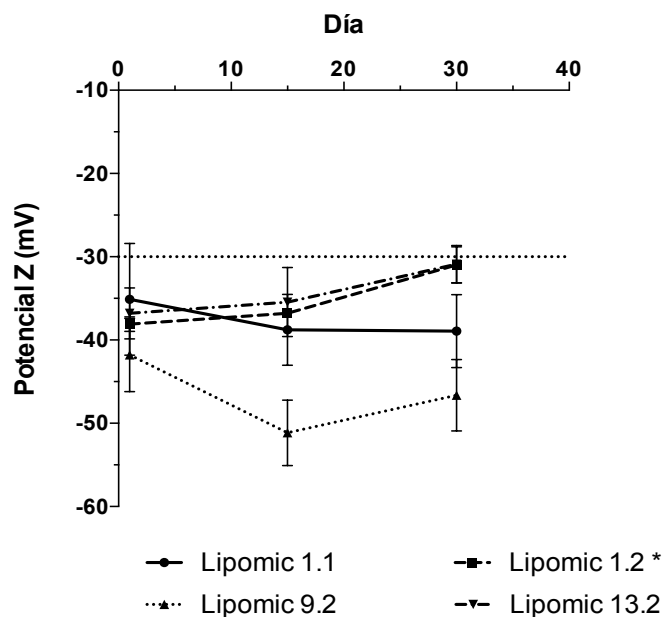
Tabla 8. Formulaciones con tamaño menor a 200 nm

Lipomic 1			
Muestra	Composición [%W/W]		
Lipomic	Surfactantes	Fosfolípidos	Agua
Lipomic 1.1	8.37	4.52	87.11
Lipomic 1.2	3.81	2.06	94.13
Lipomic 1.4	0.63	0.34	99.03
Lipomic 1.5	0.12	0.07	99.81
Lipomic 2			
Lipomic 2.5	0.14	0.27	99.59
Lipomic 3			
Lipomic 3.2	1.24	3.93	94.83
Lipomic 3.3	0.62	1.96	97.41
Lipomic 9			
Lipomic 9.2	4.07	2.09	93.84
Lipomic 12			
Lipomic 12.5	0.22	0.22	99.57
Lipomic 13			
Lipomic 13.2	5.18	1.72	93.11
Lipomic 13.3	2.62	0.87	96.51
Lipomic 13.5	0.64	0.21	99.15

La nomenclatura corresponde a la formulación original del lipomic y el número que ocupa en la trayectoria.

En la Figura 7 se muestra la evaluación del tamaño de partícula y potencial Z, durante un mes, para las formulaciones: 1.1, 1.2, 9.2 y 13.2. En 7A se muestra la variación en el potencial Z, mientras que en 7B se muestra la del Tamaño de partícula. El resto de las formulaciones (Tabla 8) se descartaron por mostrar inestabilidad al precipitarse en los primeros días de evaluación.

A)



B)

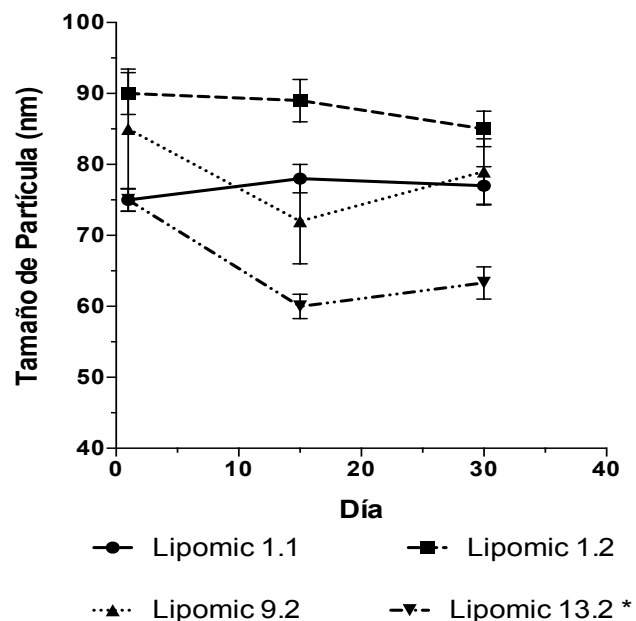


Figura 7. Evaluación de la estabilidad de tamaño y potencial Z de las formulaciones de Lipomics 1.1, 1.2, 9.2 y 13.2. A) El asterisco (*) indica diferencia estadísticamente significativa punto 1 vs 2 de Lipomic 1.2. B) El asterisco (*) indica diferencia Diferencia estadísticamente significativa punto 1 vs 2 y 3 del Lipomic 13.2.

En 7A el potencial de los Lipomic 1.2 y 13.2 muestran un aumento a través del tiempo, sin embargo no alcanzan valores mayores a -30 mV. En el caso de 7B, los Lipomic 1.1, 1.2 y 9.2, no muestran variaciones significativa, pero en el sistema

13.2 existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medidas; esto se atribuye a un mal procedimiento de resuspensión (agitación) de la formulación durante la medición. Las variaciones no se consideran significativas para clasificar a los sistemas como inestables.

7.7 Microscopía

La Figura 8 muestra imágenes de microscopía de Barrido de Ultra-Alta Resolución (Microscopio JSM-7800F del Instituto de Física de la UNAM).

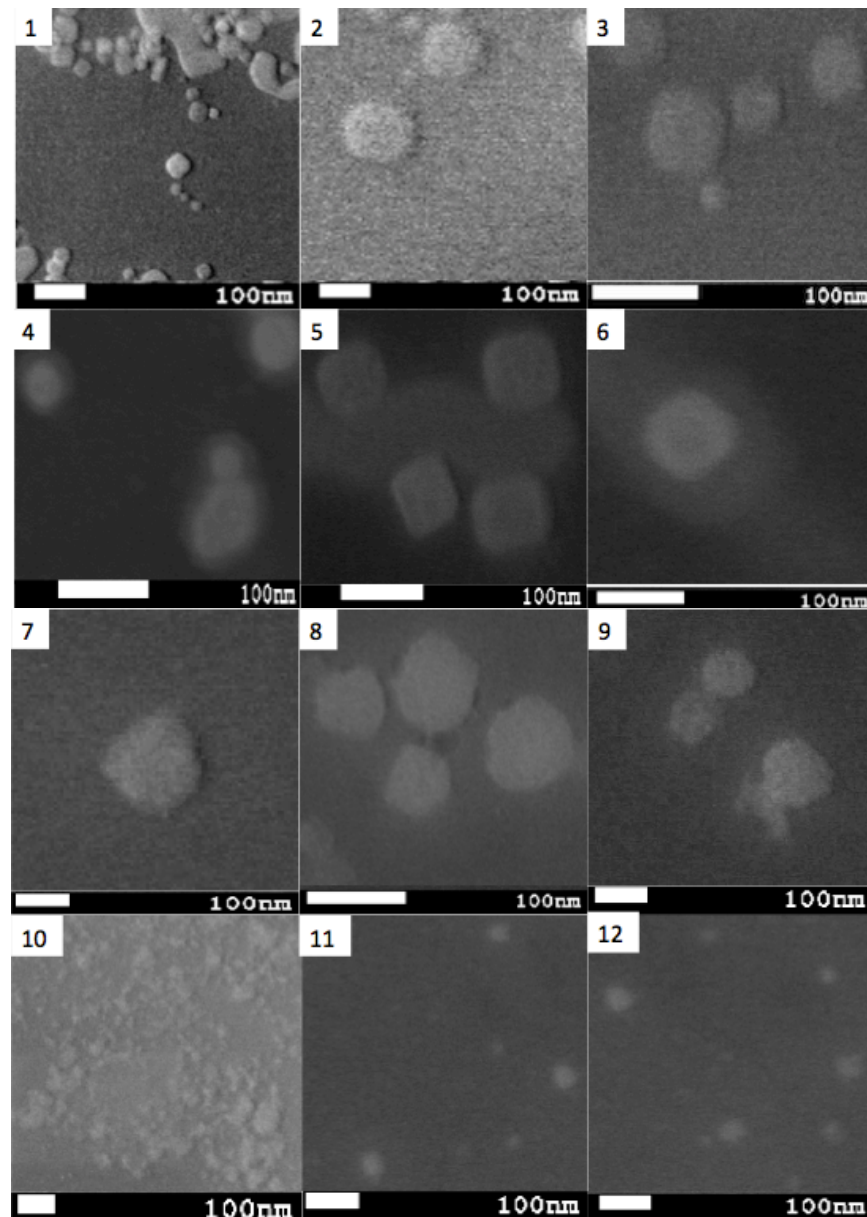


Figura 8. Microscopía SEM. Lipomic 1.1 (Recuadros 1, 2 y 3), Lipomic 1.2 (Recuadros 4, 5 y 6), Lipomic 9.2 (Recuadros 7, 8 y 9) y Lipomic 13.2 (Recuadros 10, 11 y 12).

Los estudios de microscopía demuestran variedad morfológica según entre las distintas formulaciones. Se ha demostrado que la morfología de liposomas y lipomics tiene una relación directa con la concentración de los fosfolípidos (Osornio, 2016) (Spicer, 2001). En la Figura 8 se observa que los lipomics 1.1 y 9.2, muestran en su mayoría estructuras esféricas, mientras que el lipomic 1.2 muestra morfologías cúbicas, elipsoidales y esféricas. Por último, el lipomic 13.2 muestra una gran aglomeración de estructuras, aunque también se observa la existencia de partículas esféricas aisladas de diámetro aproximado de 24 nm.

En la Tabla 9 se presenta un comparativo entre el tamaño hidrodinámico obtenido con la técnica de dispersión de luz (Zetasizer Analyzer 90 PLUS/BI-MAS) y el tamaño obtenido del análisis estadístico de las imágenes de microscopía con el programa ImageJ.

Tabla 9. Comparativo del tamaño de partícula
SD: Desviación Estandar

Lipomic	Diámetro Hidrodinámico (nm)	SD +/- (nm)	Diámetro Microscopía (nm)	SD +/- (nm)
1.1	87	31	78	40
1.2	94	10	86	36
9.2	73	18	64	52
13.2	58	15	24	18

Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre los tamaños medidos con ambas técnicas cuando las estructuras están bien definidas y la emulsión no presenta aglomeración (Lipomic 1.1, 1.2 y 9.2). En el caso del lipomic 13.2, se observa una diferencia significativa determinada mediante una prueba ANOVA, entre los resultados de las mediciones, lo que se atribuye a la incapacidad de la técnica de dispersión de luz de diferenciar los cúmulos (agregados de partículas) de las partículas individuales (Bibi, 2010).

Con estos resultados se descartaron las formulaciones Lipomic 1.2, por su variabilidad morfológica, y 13.2, por la presencia de aglomerados.

En la Figura 9 y 10, se muestran imágenes obtenidas mediante la adición de Acetato de Uranilo ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como medio de contraste para los lipomics 1.1 y 9.2.

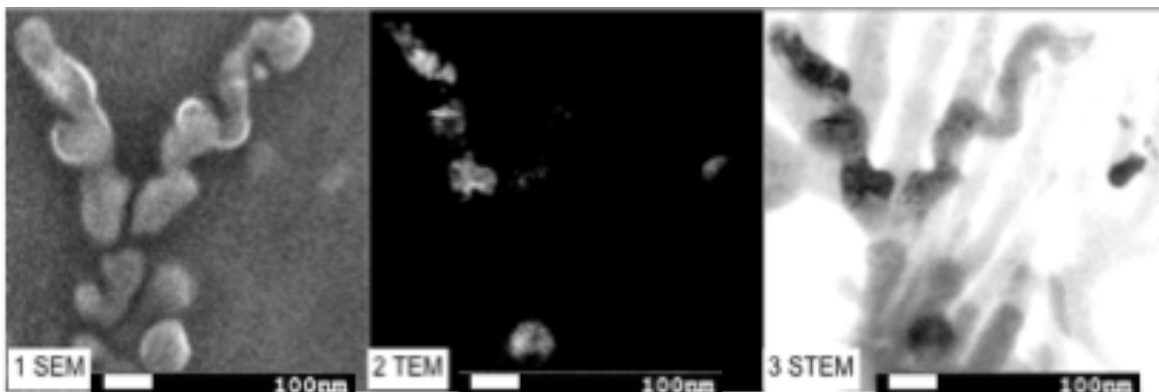


Figura 9. Microscopía realizada a Lipomic 1.1

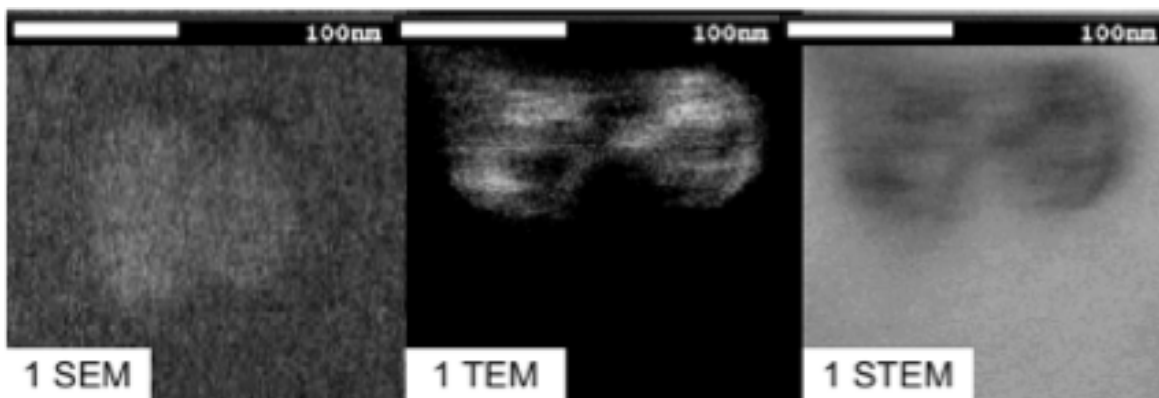


Figura 10. Microscopía realizada a Lipomic 9.2

Cada Figura comienza con una toma SEM, la cual aporta información sobre la estructura; la morfología observada se atribuye a el procesamiento de la muestra, que provoca un cambio en la osmolaridad y a los constantes secados provocando la aglomeración. Las tomas TEM y STEM, muestran compartimentos de mayor contraste, lo que indica la existencia de regiones hidrofílicas dentro de las estructuras y muestran la posible existencia de la estructura lipomic.

En la Figura 11 se muestran las imágenes de fluorescencia utilizando los fluoróforos: (Rodamina B (RhB) y Fluoresceína de Sodio (NaFi)). En donde las imágenes 1-2 pertenecen a imágenes continuas del Lipomic 1.1 y las imágenes 3-4 al Lipomic 9.2.

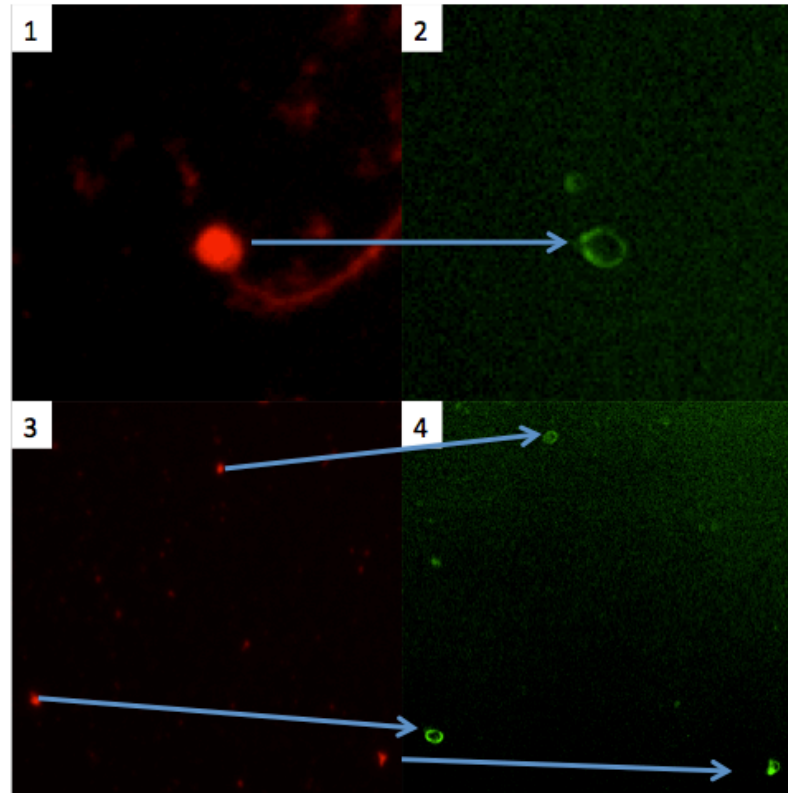


Figura 11. Imágenes representativas de microscopía óptica de Fluorescencia. Lipomic 1.1 (1-2)
Lipomic 9.2 (3-4).

Al insertarse en la bicapa de fosfolípidos, la RhB permite corroborar la estructura esférica observada en las microscopías electrónicas. El NaFi, al ser hidrofílico se incorpora en los compartimentos micelares dentro del liposoma o las rodea formando un halo, como se observa en las figuras 2 y 4. Al tratarse de un microscopio óptico, se optó por no sonicar las muestras, esto con el fin de obtener una estructura de mayor tamaño. El proceso de sonicación solo es un método físico para la reducción del tamaño de partícula y no interfiere en la formación de los compartimentos acuosos dentro de las estructuras.

7.8 Radiomarcado

En el proceso de radiomarcado se utilizaron tanto liposomas como lipomics, con el fin de comparar la eficiencia en condiciones donde el quelante BMEDA es hidrofílico (Figura 12) o lipofílico (Figura 13), lo cual se logra a través de la manipulación del pH.

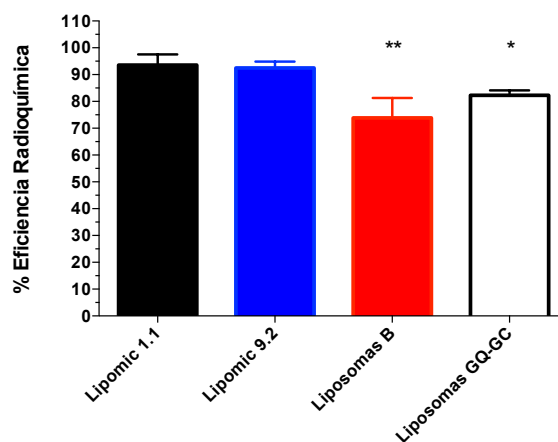


Figura 12. Eficiencia de Radiomarcado a pH 6

- * Diferencia estadísticamente significativa entre Liposomas GQ-GC vs Lipomic 1.1 y Lipomic 9.2
- ** Diferencia estadísticamente significativa entre Liposomas B vs Lipomic 1.1 y Lipomic 9.2

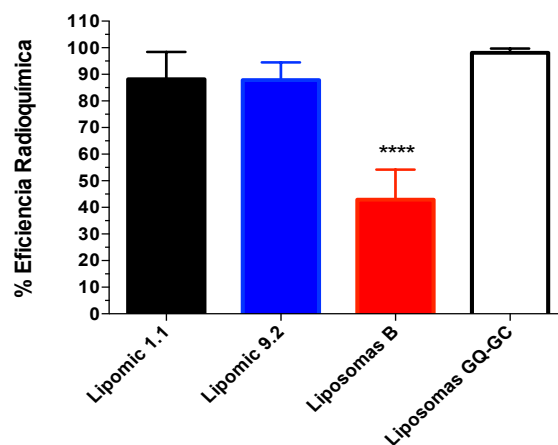


Figura 13. Eficiencia de Radiomarcado pH 7

- **** Diferencia Estadísticamente significativa entre Liposomas B vs. Las distintas formulaciones.

En la Figura 12, se muestran los resultados del radiomarcado de los liposomas y lipomics a pH 6 y un gradiente de concentración con Glucoheptanato en el medio, lo que provoca, que el complejo se encuentra en su forma hidrofílica $^{99m}\text{Tc-BMEDA-H}^+$, en esta forma al complejo le es más complicado atravesar la bicapa lipídica, sin embargo bajo las condiciones de marcaje le es posible atravesar la misma. En la figura 12 se puede observar que los lipomics muestran una mayor captación del complejo, debido a que la concentración de colesterol es menor, dando una mayor flexibilidad a la membrana (Li S. , 2011).

En la Figura 13, se observa que las condiciones lipofílicas aumentan el paso del complejo a través de la membrana lipídica, al poseer un espacio lipofílico en el núcleo los lipomics, son capaces de almacenar una mayor cantidad de $^{99m}\text{Tc-2BMEDA}$ que los liposomas blanco, que al poseer un núcleo totalmente hidrofílico repelen al complejo. En el caso de los liposomas con gradiente químico y de concentración, se observa una captación cercana al 100 %, debido al cambio en el pH que lo transforma a su forma hidrofílica: $^{99m}\text{Tc-BMEDA-H}^+$, provocando que éste sea incapaz de abandonar el núcleo, sin embargo, estadísticamente no hay diferencia entre los lipomics y los liposomas GQ-GC, haciendo el marcado de los lipomics más práctico, al no requerir de dichos gradientes.

7.8.1 Estabilidad de Radiomarcado In vitro

En la Figura 14, se muestra la estabilidad *in vitro* de los lipomics 1.1 y 9.2 durante un periodo de tiempo de 24 h a una temperatura de 37 °C y agitación constante. En las primeras horas la liberación se atribuye a un cambio en las condiciones como temperatura, osmolaridad y agitación, al incrementar la temperatura la fluidez de la membrana aumenta, y por medio de un movimiento de osmosis el complejo $^{99m}\text{Tc-2BMDA}$ abandona el lipomic en las primeras horas de la medición. Al llegar a un equilibrio, la variación en la concentración se ve modificada gradualmente, lo que se manifiesta una pendiente cercana a cero a partir de las 5 h. Al presentar una concentración menor al 5 % de colesterol la membrana es

menos rígida siendo posible este fenómeno (Attwood, 2006). A las 24 h ambos sistemas muestran un porcentaje de estabilidad mayor al 50 %, indicando la estabilidad de los sistemas.

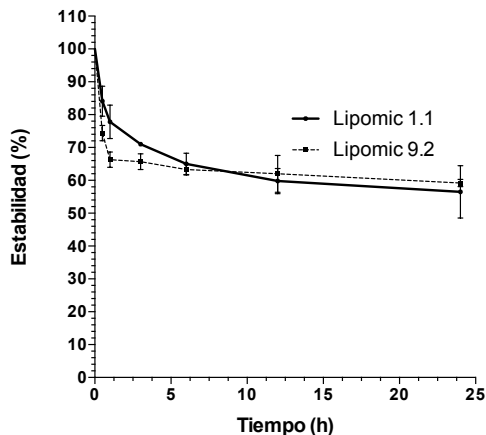


Figura 14. Estabilidad In Vitro de lipomics 1.1 y 9.2. Se reporta el promedio +/- error estándar.

7.9 Evaluación Farmacocinética

En la Figura 15, se muestran los resultados de las pruebas de farmacocinética plasmática elaboradas para los lipomics 1.1, 9.2 y el control (^{99m}Tc), en un periodo de 9 h.

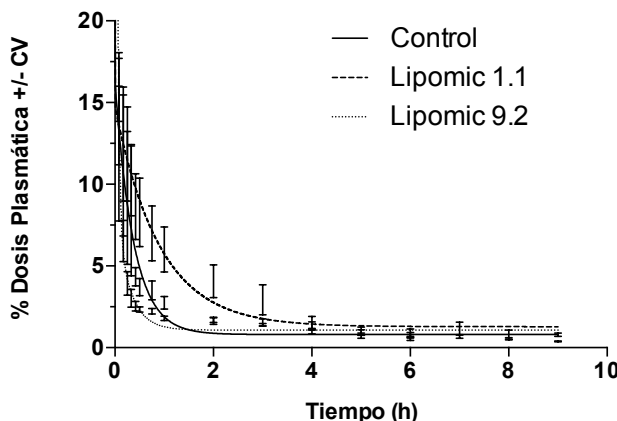


Figura 15. Farmacocinética plasmática entre TcO_4^- y Lipomic 1.1 y 9.2. Se reporta el promedio de $n=4, 6, 4$ respectivamente +/- error estándar. Una prueba ANOVA indicó que no hay diferencias estadísticamente significativa entre los sistemas.

A partir de estos resultados se calcularon los parámetros farmacocinéticos bajo un modelo bicompartamental (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros Farmacocinéticos, calculados a partir de un modelo de dos compartimentos. Los datos corresponden a el promedio +/- error estándar de la media. *: diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros grupos.

Parámetro	TcO ₄ ⁻	Lipomic 1.1	Lipomic 9.2
t1/2 β (h)	2.8 +/- 0.1	3.5 +/- 0.3	3.5 +/- 0.2
t1/2 α (h)	0.1 +/- 0.04	0.08 +/- 0.03	0.04 +/- 0.004
K21 (h-1)	1.1 +/- 0.4	1.2 +/- 0.3	0.8 +/- 0.1
K12 (h-1)	14.9 +/- 5.3	12.2 +/- 6.3	11.7 +/- 1.2
K10 (h-1)	3.5 +/- 1.2	2.6 +/- 0.6	4.3 +/- 0.4
VD 1 (mL)	30.2 +/- 9.8	21.7 +/- 4.3	38.8 +/- 6.9
VD 2 (mL)	202 +/- 40	187 +/- 50	480 +/- 41*
Cl (mL/h)	78 +/- 7	50 +/- 11	126 +/- 28*
ABC 0-inf (μci*h)/mL	3.8 +/- 0.6	5.9 +/- 0.8*	2.8 +/- 0.4

Los resultados mostrados en la Tabla 10, muestran valores cuantitativos del fenómeno farmacocinético representado en la Figura 15. En los tres casos analizados no se observa diferencia estadísticamente significativa (Figura 15), sin embargo los parámetros farmacocinéticos demuestran un comportamiento diferente de los tres sistemas en el organismo. En los tres sistemas se observó que el tiempo de vida media en el compartimento central (t1/2 α) es prácticamente nulo, lo cual es corroborado por los parámetros de tiempo de vida media en el compartimento periférico (t1/2β) al mostrar un mayor tiempo de permanencia, además, la constante de velocidad de paso del compartimento 1-2 (K12), al mostrar valores significativamente mayores a los de la constante de velocidad de paso del compartimento 21 (K21) y la constante de eliminación (K10), demuestra que el flujo hacia el compartimento periférico es mayor que el retorno de los sistemas a circulación sanguínea, indicando que el sistema no es eliminado por completo si no que es absorbido por órganos, lo que se ve reflejado en la rápida disminución de la concentración plasmática (Figura 15) y confirmado con las técnicas de imagen molecular (Figura 16, 17 y 18).

Se corrobora una alta concentración de los sistemas en el compartimento periférico al comparar los volúmenes de distribución de los compartimentos 1 y 2 (VD1 y VD2) respectivamente, en donde se muestra que el VD2 es

aproximadamente 10 veces mayor que el mostrado por el VD1 y mostrando diferencia estadísticamente significativa entre el lipomic 9.2 y los otros dos sistemas, siendo esta formulación la más captada por el compartimento periférico y a su vez la de mayor aclaramiento (Cl). El aclaramiento es un cálculo teórico que indica el procesamiento de los sistemas por los órganos, que el lipomic 9.2 presente una mayor Cl es consistente al presentar un mayor VD2.

El área bajo la curva (ABC0-inf), representa la cantidad de los sistemas presente en circulación sanguínea a través del tiempo, el lipomic 1.1 presenta la mayor ABC0-inf con una diferencia estadísticamente significativa con los otros sistemas, lo cual significa que permanece más tiempo en circulación, sin embargo no significa que sea el que más tiempo permanece en el organismo.

A la par de los estudios farmacocinéticos se realizó un estudio de biodistribución *in vivo* usando la técnica de imagen SPECT/CT. En las figuras 16, 17 y 18 se presentan las imágenes más representativas para el control ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), el lipomic 1.1 y el lipomic 9.2 respectivamente. En el caso del $^{99m}\text{TcO}_4^-$, éste se evaluó a 1 y 3 h después de la administración; de acuerdo con la literatura, el tecnecio libre tiene una vida media biológica de 3 h en el organismo por lo que se determinó que el estudio a 6 horas no era necesario. En las imágenes se observó una mayor captación de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en intestinos, hígado y estómago, siendo este órgano el más representativo en la Figura 16. En el caso de los lipomics 1.1 y 9.2, se tomaron imágenes 1, 3 y 6 h después de la administración; para el lipomic 1.1 se observa una biodistribución mayoritariamente concentrada en intestinos e hígado (Figura 17), mientras que para el lipomic 9.2 se encuentra mayoritariamente en hígado, como se puede observar en la Figura 18.

Estómago

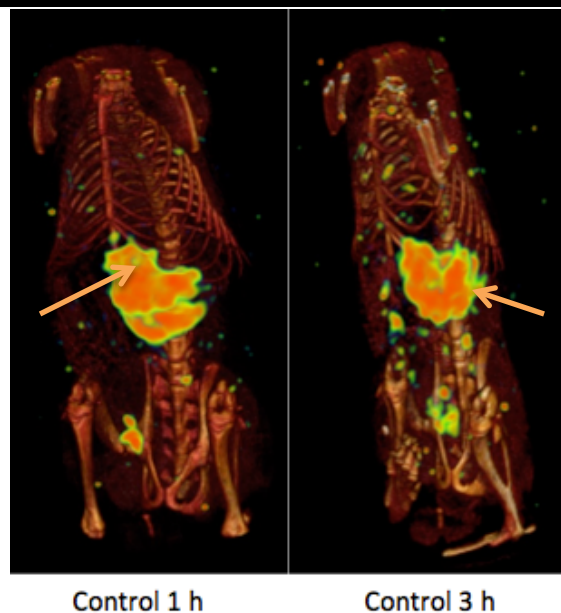


Figura 16. Imágenes SPECT/CT representativas de la biodistribución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, 1 y 3 h después de la inyección. La acumulación se da principalmente en estómago (\rightarrow), que es una vía normal de metabolismo y eliminación del $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

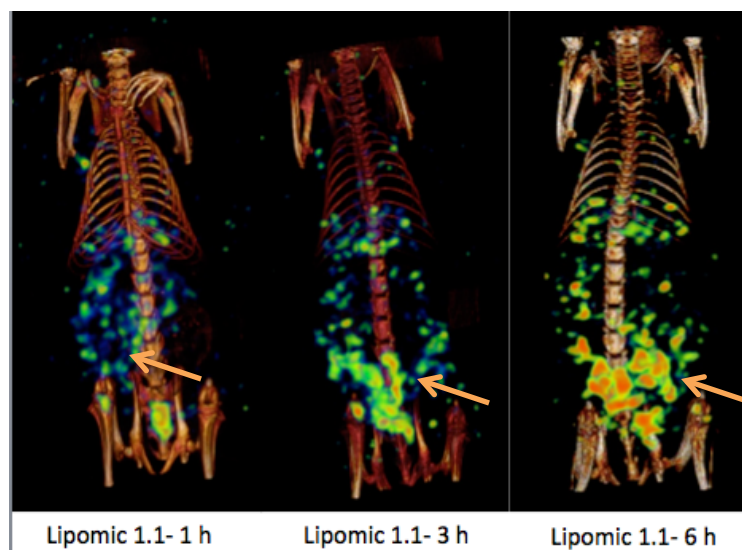


Figura 17. Imágenes SPECT/CT representativas de la biodistribución de Lipomic 1.1 evaluadas a 1, 3 y 6 h después de la administración. La captación del lipomic se observa en intestinos (\rightarrow).

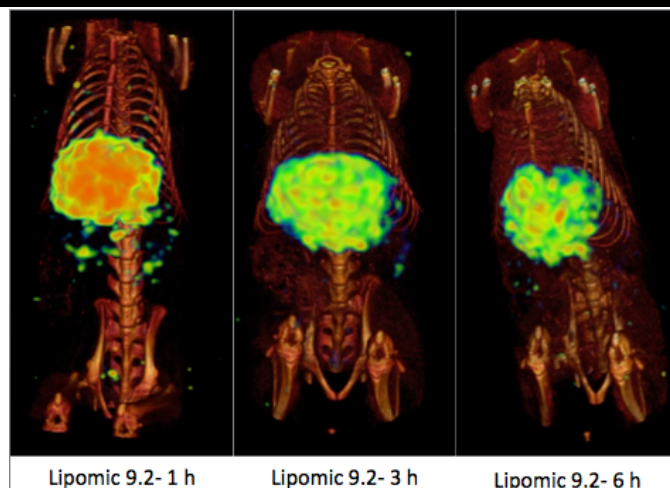


Figura 18. Imágenes SPECT/CT representativas de la biodistribución de Lipomic 9.2 a 1, 3, y 6 h después de la administración. Se observa una acumulación y retención del lipomic en el hígado (→), una vía normal en el procesamiento de fosfolípidos.

Los resultados del análisis de las imágenes se presenta en la Figura 19, en ésta se muestra el porcentaje de biodistribución por órgano. El metabolismo del $^{99m}\text{TcO}_4^-$, está ligado principalmente a mucosas y glándulas, el aparato gastrointestinal es el principal compartimento de metabolización y eliminación de este radionúclido (Bennink, 2003) (Meltem Caglar, 2002). La biodistribución de la forma libre (Figura 16), muestra una captación mayoritaria en el estómago, coincidiendo con lo reportado con la literatura. Mientras que los sistemas lipómicos presentan una biodistribución distinta, atribuida a la bicapa de fosfolípidos que encapsulan al $^{99m}\text{TcO}_4^-$, impidiendo la interacción con sus receptores naturales. Al ser elaborado con un fosfolípido impuro (mezcla estructural de fosfolípidos) el lipomic 1.1 presenta una mayor metabolización por parte del hígado, provocando su paso a intestinos en un periodo de tiempo menor y acumulándose en este órgano (Figura 17). Mientras que el lipomic 9.2 al estar compuesto por un fosfolípido puro, este sufre pasos previos antes de su metabolización, provocando su mayor estadía en el hígado (Figura 18).

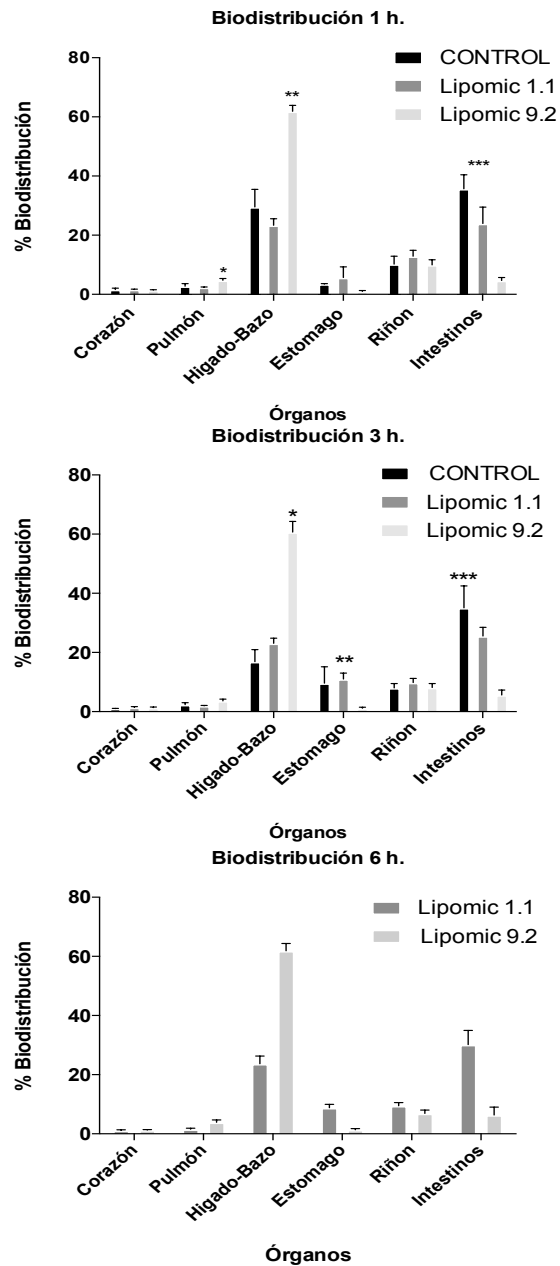


Figura 19. Biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular microSPECT/CT adquiridas a 1, 3 y 6 h inyectadas con TcO_4^- y las formulaciones de lipomic marcadas con Tc-2BMEDA. *: representa diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los otros grupos.

El análisis *in vivo* se corroboró con un estudio *ex vivo*, mediante la cuantificación de la dosis restante en los órganos después de 24 h de la administración (Figura 20). Se muestran los resultados de la biodistribución en órganos de interés, en términos del porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%DI/g), para el $^{99m}TcO_4^-$ y las formulaciones de lipomics, 24 h después de la inyección. A este

tiempo se puede observar que la cantidad de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ es mínima, siendo expulsado en las primeras horas. En el caso del lipomic 1.1 las concentraciones son mayores en hígado e intestinos; mientras que para el lipomic 9.2, se observa una concentración mucho mayor en el hígado y bazo, que es estadísticamente significativa con respecto al lipomic 1.1 y el control. Ambos órganos se caracterizan por tener un mayor metabolismo de fosfolípidos.

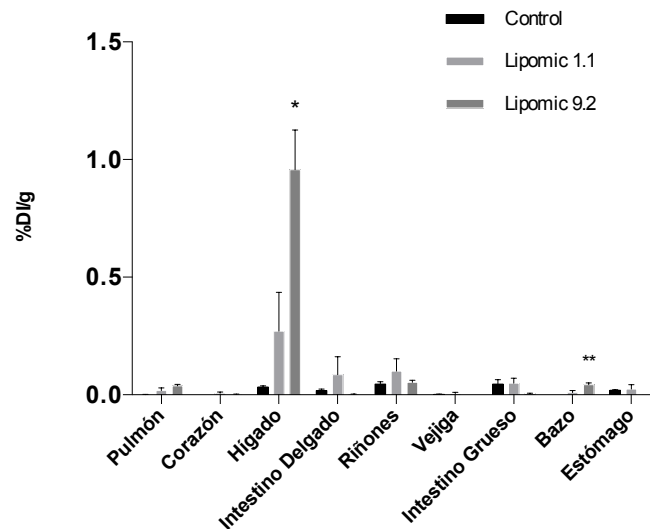


Figura 20. Porcentaje de dosis inyectada por gramo en órganos de interés (corregida por decaimiento radiactivo). Se reporta el promedio +/- error estándar. *: Diferencia estadísticamente significativa entre Lipomic 9.2 vs Lipomic 1.1 y Control. **: Diferencia estadísticamente significativa entre Lipomic 9.2 vs Lipomic 1.1 y Control.

8. Análisis de Resultados

Los resultados del trabajo sustentan el desarrollo de los lipomícs como posibles sistemas de liberación de fármacos. Los resultados se pueden dividir en tres secciones: la evaluación fisicoquímica, el radiomarcado y la evaluación *in vivo*.

A partir de un trabajo previo (Osornio, 2016), se plantea que los lipomícs se pueden obtener a partir del control de parámetros fisicoquímicos como la concentración de componentes, el flujo y el tiempo de sonicación. El diseño experimental de Taguchi (Tabla 4), permitió la exploración de 16 condiciones experimentales, cada una con una combinación única de parámetros, otorgando las condiciones experimentales para que el lipomic sea formado de una manera reproducible.

Otro parámetro de importancia en la obtención de estas estructuras es la determinación del punto de turbidez (*PT*). Cuando un tensoactivo llega a la temperatura de turbidez forma una red micelar, la cual es rodeada por la formación de la doble bicapa lipídica de los fosfolípidos en el medio, formando de esta manera el lipomic. El *PT* depende principalmente de tres factores: la concentración del tensoactivo, su estructura química (la extensión de la cadena de carbono) y la concentración de iones en el medio. La concentración del tensoactivo está directamente relacionada con la concentración micelar crítica (CMC), al incrementar la temperatura se aumenta la CMC, provocando que la formación de micelas dependa de una mayor concentración. Los tensoactivos no iónicos pertenecen a la familia de los tensoactivos etoxilados; cuando se incrementan las unidades de óxido de etileno (porción hidrofílica) y la cadena de carbono se mantiene constante, el *PT* presenta un aumento, de este modo al aumentar la longitud de la cadena de carbonos, el *PT* presenta una disminución (Mukherjee, 2011). En este estudio se modificaron tanto concentraciones como tipos de tensoactivos, manteniendo constante la concentración de iones en el medio, cada tensoactivo posee un *PT* distinto (Pytlakowska, 2013).

El análisis de *PT* con los distintos tensoactivos (Figura 3 A y 3 B) determinó la selección del tensoactivo número 4 para la elaboración del lipomic, considerando que una solución homogénea de surfactante con un alto punto de turbidez (*PT*) presentará una mayor estabilidad. (Kosegarten-Conde, 2012).

En el caso del tensoactivo 2 y 3, estos se descartan por su bajo *PT*, en el intervalo de concentración necesario para la elaboración del lipomic (0.5-6 %w/w), además de que el tensoactivo 3 presenta problemas para su manipulación. En el caso del tensoactivo 1, a pesar de que presenta *PT*'s elevados, tiene el inconveniente de que las soluciones elaboradas con éste presentan una separación de fases en muy poco tiempo después de su elaboración.

Los *PT*'s del tensoactivo 4, obtenidos de manera visual, se compararon y validaron con un Turbidímetro desarrollado en el Laboratorio de Física Médica del INCan. Este se diseñó bajo el principio de la ley de Beer-Lambert, de tal forma que el punto de turbidez es determinado a partir de una disminución en la señal de captación de la intensidad de luz por el detector, que se da como resultado de la formación de una red micelar que provoca la opacidad de la solución (Batigöc, 2011). Como se puede observar en la Figura 3 B, la detección de este fenómeno es más sensible con el turbidímetro que de manera visual, mejorando la exactitud de la determinación del *PT*.

Al hablar de sistemas coloidales en el área de sistemas de liberación de fármacos, se consideran tamaños en el intervalo de 100 a 400 nm, debido a su capacidad de carga y transporte de una cantidad suficiente de fármaco en ellas (Jong, 2008). De las formulaciones de la Tabla 5, se evaluó en primera instancia el tamaño de partícula, ya que esta propiedad puede afectar directamente la distribución, función y permanencia en el organismo (He, 2010). De esta forma se descartaron las formulaciones 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 11, ya que presentan tamaños mayores a los 1000 nm, que resultan en una alta respuesta del sistema inmunológico provocando una rápida eliminación y baja estabilidad (Oyewumi, 2010). También se

ha observado que con un tamaño mayor a 1000 nm las emulsiones comienzan la separación de fases y la coalescencia entre las partículas suspendidas es mayor provocando de esta manera su precipitación (Litzinger, 1993). Con base en este análisis, los sistemas 1, 2, 3, 9, 12 y 13 fueron seleccionados para la exploración de trayectorias mediante el uso de diagramas ternarios.

Los diagramas Ternarios se utilizan ampliamente porque en ellos es más fácil entender el comportamiento de un sistema en equilibrio y determinar las composiciones de las fases y las cantidades relativas de cada una de ellas (Cisternas, 2009) (Novelo-Torres, 2010). En este trabajo, los diagramas ternarios permitieron definir los puntos de la trayectoria que resultaron en sistemas con potencial para su uso como acarreadores farmacéuticos (Figuras 4 y 5). Cada diagrama contiene puntos específicos colocados a partir de las concentraciones de cada uno de los componentes en el sistema, definiendo zonas en donde las concentraciones de los excipientes tenderán a comportarse de una manera específica. A partir de esto, podemos definir regiones de interés en donde es muy probable encontrar sistemas con características definidas.

Cada punto analizado de las trayectorias cuenta con un tamaño de partícula cercano a los 100 nm, a excepción de los lipomícs 2.1 y 12.1 (Tabla 7), según lo reportado en la literatura todos aquellos sistemas que se encuentren por debajo de 200 nm permanecerán por mayor tiempo en circulación (Litzinger, 1993). Los sistemas con una distribución global porcentual mayor o igual al 85% en un intervalo de 0-200 nm son seleccionados para el estudio de estabilidad (Tabla 8).

Los sistemas coloidales se consideran sistemas termodinámicamente inestables, la estabilidad física de estos sistemas depende de varios factores como: Variación de temperatura, estrés durante el transporte, compatibilidad de los excipientes, tamaño de partícula y el potencial Zeta del sistema (Tadros, 2004). Un sistema coloidal deja de considerarse estable en el momento que la separación de sus fases se considera irreversible, los sistemas más estables son aquellos en donde

las fuerzas de repulsión predominan entre las partículas suspendidas evitando de esta manera la coalescencia y floculación de las partículas (Ivanov, 1996), (Gao, 2018).

El estudio de estabilidad con base en el potencial Z (Figura 7 A) y el tamaño de partícula (Figura 7 B) demostró que los lipomics 1.1, 1.2, 9.2 y 13.2 son estables a través de un periodo de 30 días. Se considera que las fuerzas electrostáticas entre las partículas no sufren de alteraciones debido a que en ninguno de los sistemas se observa un aumento en el tamaño de partícula mayor a los 200 y el potencial Z no aumenta de -30 mV y por tanto se evita la aglomeración, fusión, coalescencia y precipitación de las partículas (Zeta-Meter Inc., 2001). Cuando las partículas en suspensión no presentan aglomeración, tanto la técnica de dispersión dinámica de luz como la microscopía electrónica no presentan variaciones estadísticamente representativas (Tabla 9), como es el caso de los lipomics 1.1, 1.2 y 9.2. En el caso del lipomic 13.2, se presenta una notable diferencia en los tamaños, que indica que en solución las partículas se encuentran en forma de cúmulos, como se observa en las imágenes de microscopía (Figura 8 recuadros 10, 11 y 12). Se ha demostrado que cúmulos con partículas menores a 100 nm, no presentan alteraciones en el potencial Z, ya que las repulsiones electrostáticas entre cúmulos es proporcional a las mostradas por las partículas individuales en este rango de tamaños (Zeta-Meter Inc., 2001).

La forma y tamaño de las nanopartículas tiene gran influencia sobre la biodistribución y eliminación de las mismas (Decuzzi, 2009), por medio de la microscopía SEM, se obtienen imágenes que permiten la determinación de estas propiedades (Bibi, 2010). Una geometría esférica (Figura 8 recuadros 1, 2, 3 lipomic 1.1 y 7, 8 y 9 lipomic 9.2), complementada con tamaños de partícula de 78 y 64 nm respectivamente, son cualidades que permiten una baja detección por el sistema inmune y teóricamente un tiempo de circulación prolongado (Li X. D., 2013). En el caso del lipomic 13.2, que a pesar de poseer una geometría esférica, individualmente posee un tamaño de partícula de 24 nm, lo que en diferentes

referencias bibliográficas propone una rápida eliminación del organismo por medio del RES o por filtración glomerular (Decuzzi, 2009). Por último el lipomic 1.2, muestra una variedad polimórfica presentando geometrías esféricas, elipsoides y cubicas (Figura 8, recuadros 4, 5 y 6). La internalización celular, ya sea de macrófagos y otros tipos celulares, depende del ángulo de contacto con la superficie; si, es menor o igual a 45° como es el caso de morfologías esféricas y elipsoides (Figura 21), la internalización de las partículas se lleva a cabo exitosamente, provocando la eliminación de la circulación en caso de los macrófagos y una mayor internalización en células blanco, cuando el ángulo de contacto es mayor a 45° como es el caso de morfologías cubicas y elipsoides, la superficie de contacto es superior y se demuestra gran adherencia a la membrana sin embargo la internalización se inhibe (Figura 22) (Li X. D., 2013).

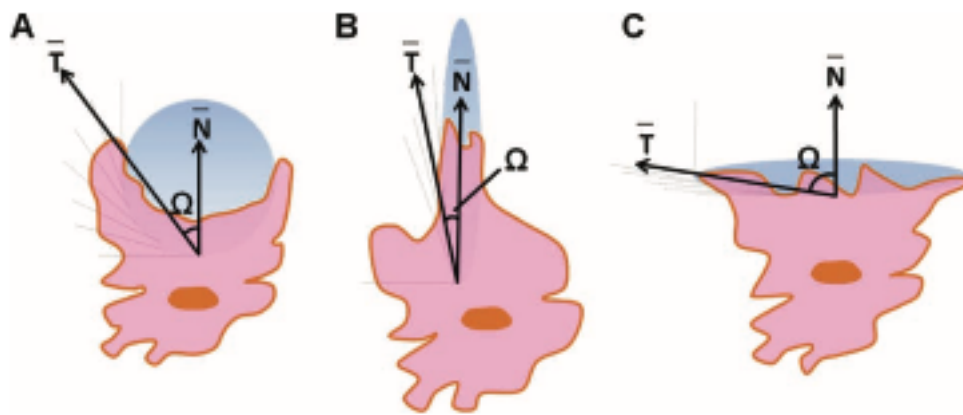


Figura 21. Dependencia de la forma en la endocitosis

La presencia de estructuras cubicas en el lipomic 1.2, se atribuye a las proporciones de fosfolípidos, así como a las condiciones experimentales, en un trabajo previo, se mostró la existencia de estas morfologías en condiciones experimentales similares (Spicer, 2001). La variedad morfológica en el caso del lipomic 1.2 y la visualización de cúmulos en el lipomic 13.2 descartaron estas formulaciones para procedimientos posteriores.

Tanto la microscopía TEM/STEM y la microscopía de fluorescencia, se realizaron con el objetivo de probar la existencia de la estructura propuesta en este trabajo. La inclusión de un medio de contraste hidrofílico como el acetato de uranilo a la formulación tiene el objetivo de resaltar las regiones hidrofílicas dentro de la estructura, al poseer una mayor Z, los electrones que inciden sobre las molécula de acetato de uranilo son detenidos, lo que se traduce en la imagen como regiones con mayor contraste y de características hidrofílicas, corroborando la posible existencia de la estructura propuesta (Figuras 9 y 10) (Hargreaves, 1978). Mientras que la microscopía de fluorescencia es comúnmente utilizada para el rastreo de los sistemas de liberación en ambientes biológicos, esta técnica además puede proveer información valiosa respecto a los atributos estructurales de varios sistemas (Bibi, 2010). El marcaje de la bicapa lipídica intuye la existencia de estructuras esféricas en suspensión (Recuadros 2 y 3, Figura 11), en tomas continuas (después del cambio de lámpara), se observa la formación de pequeños halos alrededor de la partícula y pequeños cúmulos en el interior de los mismos. Sin embargo por la baja resolución del equipo, no se puede apreciar de una manera significativa este fenómeno. Los resultados de la microscopía electrónica y la microscopía de fluorescencia, permiten proponer la generación de lipomics con la metodología implementada en este trabajo.

La cuantificación de fosfolípidos, demuestra que después de la purificación a través de una columna PD-10, los sistemas presentan una eficiencia mayor al 90% (Tabla 6), indicando que los métodos de producción favorecen el acoplamiento y formación de estructuras liposómicas y lipomics. A demás de ser un parámetro estequiométrico para métodos posteriores. La segunda etapa en esté trabajo fue el proceso de radiomarcado, por medio de la reducción del $^{99m}\text{TcO}_4^-$, con SnCl_2 , lo que forma un complejo octaédrico estable (Kieviet, 1981). El complejo ^{99m}Tc -2BMEDA tiene un patrón de complejación "SNS/S" es decir que el núcleo de tecnecio está unido por un lado a dos átomos de azufre y uno de Nitrógeno y además se encuentra unido a otro átomo de azufre perteneciente a una segunda

molécula de BMEDA. (BAO, 2003). El resultado del proceso nos otorga un complejo con carácter hidrófobo o hidrofílico dependiente del pH (CHANG, 2007).

El radiomarcado de los diferentes sistemas hace referencia a la estructura, de esta forma a un quelante hidrofílico le será más difícil atravesar la bicapa lipídica sin ayuda de un gradiente de concentración o acarreador presente. Al realizar los experimentos con un gradiente de concentración de Glucoheptanato se observó que la inclusión de la forma hidrofílica para todos los sistemas está por arriba del 70% (Figura 12), demostrando una mayor afinidad por los lipomics. Este resultado sugiere la presencia de compartimentos hidrofílicos dentro de los lipomics, al ser capas de acarrear un compuesto de esta naturaleza. Cuando el mismo quelante se encuentra en un intervalo de pH (7-8) adquiere propiedades lipofílicas, lo cual facilita la entrada a través de la bicapa lipídica, en estas condiciones los lipomics y los liposomas GQ-GC no muestran diferencias estadísticamente representativas, los tres sistemas son capaces de acarrear más del 90 % del complejo. Para los lipomics una vez que el complejo de tecnecio entra a través de la bicapa lipídica, las regiones hidrofílicas desplazan las moléculas hidrófobas al interior de las micelas dentro del núcleo, siendo incapaz de abandonar éste. Por su parte, los liposomas blanco no logran una captación mayor al 50 % en condiciones hidrofóbicas por la repulsión del complejo por su interior acuoso (Figura 13). Los resultados del radiomarcado proponen la existencia del lipomic, mostrando su naturaleza híbrida, al ser capaz de “cargar” tanto compuestos hidrofílicos como lipofílicos, siendo más eficientes que los liposomas al no requerir el uso de condiciones específicas como en el caso de los Liposomas GQ-GC.

La tercera etapa, consistió en la evaluación *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* de los lipomics. La evaluación *in vitro* se realizó, en suero fetal bovino, midiendo la estabilidad de los lipomics emulando condiciones fisiológicas (Figura 14). La determinación de la estabilidad, tanto del radiomarcado como de los lipomics, se llevó a cabo a la par. Cuando el sistema libera su carga al medio es debido a la ruptura de la bicapa lipídica. Después de 24 h de estudio, los lipomics mostraron

un nivel de estabilidad mayor al 50 %, lo que no garantiza una liberación prolongada homogénea. La manifestación de inestabilidad, reflejada en la caída abrupta de concentración en las primeras horas de estudio se puede evitar, al asegurarse que la emulsión contará con un balance osmótico apropiado. Al observar la Figura 14, la curva descrita para el lipomic 1.1 describe un proceso de adaptación osmótica en el cual las estructuras no se rompen al contacto con el medio, sino que se adaptan a él; por otro lado, la curva del lipomic 9.2, muestra un proceso de desestabilización estructural con una caída significativa en el porcentaje de estabilidad en las primeras horas, traducida como la inestabilidad de las estructuras más sensibles liberando el complejo de tecnecio al medio. Estos resultados indicaron que el lipomic 1.1 es un sistema más estable.

Actualmente el Tecnecio $^{99m}\text{TcO}_4^-$ es uno de los radioisótopos más utilizados en el campo de la medicina nuclear, aproximadamente el 80 % de los procedimientos alrededor del mundo emplean derivados de este isótopo (Eckelman, 2013). Este radiofármaco presenta una variedad de mecanismos de acción dependiendo del conjugado al cual este unido; algunos de los órganos blanco más comunes son el riñón, corazón, hígado, hueso y cerebro. La vía farmacocinética principal está determinada por su forma libre, es decir el Pertecnecato Sódico de Tecnecio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), este ión tiene una biodistribución dirigida hacia la glándula tiroidea, glándulas salivares y mucosas gástricas donde se elimina sin sufrir ninguna alteración, la vía secundaria de eliminación de este ión es la vía renal. (Bennink, 2003) (Meltem Caglar, 2002)

Los estudios de farmacocinética plasmática e imagen molecular, nos permiten tener una visión general del comportamiento cinético de los sistemas dentro del organismo. Al comparar la biodistribución del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ con los lipomics 1.1 y 9.2, se evidencian las diferencias farmacodinámicas entre estos. Al no presentar un recubrimiento protector como el PEG, las diferencias en el tiempo de circulación del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y los lipomics no son estadísticamente representativas; se ha demostrado que liposomas sin este recubrimiento duran en circulación

aproximadamente 90 minutos (Wu, 2019). Lo que coincide con lo mostrado en la Figura 15; el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se realizó a partir de estos resultados (Figura 15 y Tabla 10) y muestran un comportamiento diferente del $^{99m}\text{TcO}_4^-$, y los lipomics. Mientras que el $^{99m}\text{TcO}_4^-$, al tratarse de una molécula libre de menor tamaño que los lipomics, es eliminado con mayor velocidad vía el sistema renal y glandular; el tiempo de eliminación es muy cercano a lo reportado en la literatura, que es de 3 h (Foradori, 1993). Sin embargo los lipomics presentan una mayor permanencia en el organismo, y una biodistribución distinta. A su vez el lipomic cumple con los objetivos de un sistema de transporte de fármacos al aumentar el tiempo de vida media en el organismo y modificar la conducta del $^{99m}\text{TcO}_4^-$. El tiempo de vida media en el organismo se podría prolongar aún más, al adicionar PEG al sistema.

El análisis cuantitativo de biodistribución de lipomics (Figura 19) muestra una mayor captación en órganos como intestinos e hígado. En el caso del lipomic 9.2 podemos observar que esta formulación tiende a acumularse a lo largo del tiempo casi exclusivamente en el hígado, por ser el órgano encargado del metabolismo de fosfolípidos, este sistema podría ser empleado como acarreador para fármacos relacionados a problemas hepáticos. Por su parte el lipomic 1.1, es metabolizado por el hígado y el bazo, sin embargo este sistema también presenta una distribución más heterogénea manifestándose en órganos como intestinos y estomago. Es posible que la baja estabilidad o la rápida metabolización de este sistema en el hígado y el bazo provoque la liberación del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y una vez libre este siga su vía de metabolismo normal. Los estudios *in vivo* fueron corroborados mediante las determinaciones *ex vivo* demostrando el mismo comportamiento (Figura 20).

9. Conclusión

La implementación del método de Taguchi y diagramas ternarios permitieron el desarrollo de una técnica reproducible para la elaboración de lipomics, además la caracterización fisicoquímica del lipomic demuestra evidencia concreta de la posible existencia de la estructura propuesta, la cual es capaz del transporte de moléculas lipofílicas como hidrofílicas, mientras que la evaluación farmacocinética demuestra su capacidad como acarreador farmacéutico.

10. Perspectivas

Es necesario mejorar este sistema a futuro considerando la inclusión de PEG-2000, con el fin de incrementar el tiempo de circulación en el organismo, además de la inclusión de algún fármaco o fármacos para probar su actividad terapéutica y poder emplear el Lipomic 9.2 como posible sistema para el tratamiento para enfermedades Hepáticas.

ANEXO I

Lipomic

El lipomic es una nanoestructura conformada por un núcleo de micelas mixtas formado por una mezcla de surfactantes, rodeado por una bicapa de fosfolípidos. Esta estructura podría ser otra opción para el transporte de compuestos hidrófobos e hidrofílicos. La obtención de estructuras distintas está directamente relacionado con la composición y condiciones experimentales. Los lipomic presentan algunas ventajas en comparación de los liposomas, en particular su compartimiento interno híbrido con la capacidad de almacenar tanto sustancias hidrófobas como hidrofílicas, además de que su fabricación no hace uso de solventes orgánicos, siendo un método más amigable con el medio ambiente además de no contar con trazas de estos en su presentación final. (Osornio, 2016)

Fosfolípidos

Actualmente los fosfolípidos se pueden clasificar debido a su origen ya sea natural o sintéticos, los cuales son ampliamente usados para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos como son las nanopartículas lipídicas. (Sercombe, 2015) Los bloques de construcción fundamentales de todas las membranas celulares son los fosfolípidos, estos son moléculas anfífilicas que consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobas, unidas a un grupo fosfato y un grupo hidrófilo. Debido a estas características estos compuestos tienen la capacidad de formar barreras estables entre dos compartimentos acuosos, representando la estructura básica de todas las membranas biológicas.

Tensoactivos

Las sustancias que poseen una región polar unida a una región no polar son llamados surfactantes. Estos sistemas son solubles tanto en medios acuosos como no acuosos. En adición los surfactantes en un sistema disperso, el grupo

polar y el no polar se orientan selectivamente al medio al que tengan más afinidad provocando de esta manera la disminución de la tensión superficial. Los surfactantes son clasificados en cuatro categorías dependiendo de la naturaleza de la carga presente en la parte hidrofílica del surfactante: aniónicos, catiónicos, no iónicos y Anfifílicos. (Kim, 2004)

Colesterol (Chol)

El colesterol es una molécula lipídica que desempeña importantes funciones fisiológicas dentro de los organismos debido a su biocompatibilidad e hidrofobicidad, frecuentemente se utiliza como componente de formulaciones de nanopartículas lipídicas. Además, el colesterol evita la transición de fase de los fosfolípidos para hacer una formulación más estable, otorgando rigidez a la membrana, reduce la permeabilidad de las moléculas solubles en agua a través de la misma y previene la liberación del fármaco encapsulado. Por lo tanto, la incorporación de un grupo de colesterol en formulaciones de nanopartículas lipídicas es una estrategia típica para la estabilidad a largo plazo. (Mallick, 2017)

Radiación

El estudio y el uso de la radiación ionizante comenzó con el descubrimiento de los rayos x y el descubrimiento de la radioactividad natural. Desde entonces la radiación ionizante ha jugado un papel importante en física atómica y nuclear donde ha acompañado en diversas áreas del desarrollo humano como:

- Medicina, donde es usada para imagen y diagnóstico radiológico y medicina nuclear, tratamiento del cáncer usando radioterapia, irradiación de sangre para prevenir una posible contaminación en las transfusiones y esterilización de equipos médicos.
- Producción de energía en reactores nucleares y producción de radionúclidos empleados en la industria y la medicina.
- En la industria en la producción de comida.
- En la industria química donde el proceso de radiación produce una modificación química de los materiales industriales tales como los polímeros.

Decaimiento Radioactivo

Henri Becquerel descubrió en 1896 la radioactividad natural abriendo todo un mundo nuevo para la física que eventualmente desarrollo avances importantes en la física moderna tales como la física nuclear y física de partículas (Podgorsak).

Los nuclídos radioactivos, producidos ya sea naturales o artificialmente por reacciones nucleares, son inestables debido a esto estos núcleos se esfuerzan para regresar a una configuración mas estable a través de varios procesos de decaimiento radiactivo espontáneo que involucra la transformación a un núcleo mas estable y emisión de partículas energéticas. El proceso de decaimiento radiactivo se puede dividir en tres categorías:

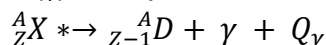
- Decaimiento Alfa (α)
- Decaimiento Beta (β)
- Decaimiento Gamma (γ)

C) Decaimiento gamma (γ).

El decaimiento α , como los tres tipos de decaimiento β , pueden producir núcleos hijas en un estado excitado sin gastar toda la energía disponible para el decaimiento. El núcleo hija excitado puede liberar este exceso energético a través de dos procesos:

- Emisión de energía por un proceso de decaimiento gamma (γ).
- Un proceso de conversión interna (IC) donde a energía en exceso es transferida a un electrón.

En sentido general, el decaimiento γ se considera como la desexcitación nuclear ya sea por la emisión de fotones en forma de rayos- γ o por conversión interna. El proceso de decaimiento gamma (γ) se representa de la siguiente manera:



Donde ${}^A_ZX^*$ representa el estado excitado del núcleo A_ZX y Q_γ es la energía del decaimiento gamma (γ).

11. Bibliografía

CHANG, Y. J. (2007). Biodistribution, Pharmacokinetics and MicroSPECT/CT Imaging of ¹⁸⁸Re-BMEDA-Liposome in a C26 Mutine Colon Carcinoma Solid Tumor Animal Model. *ANTICANCER RESEARCH*, 27, 2217-26.

Cisternas, L. A. (2009). *Diagramas de fases y su aplicación* (Vol. 1). Barcelona, España: Reverte.

Li, S. (2011). Remote-Loading labeling of liposomes with ^{99m}Tc-BMEDA and its stability evaluation: effects of lipid formulation and pH/chemical gradient. *Journal of liposome Research*, 21 (1), 17-27.

Li, X. D. (2013). Physicochemical Characteristics of Nanoparticle Affect Circulation, Biodistribution, Cellular Internalization, and trafficking. *Small*, 9 (19), 1521-1532.

Litzinger, D. C. (1993). Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* (1190), 99-107.

Stewart, J. C. (1979). Colorimetric Determination of phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 104, 10-14.

Sercombe, L. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6 (286), 1-13.

Spicer, P. T. (2001). Novel Process for Producing Cubic Liquid Crystalline Nanoparticles (Cubosomes). *Langmuir* (17), 5748-5756.

Wu, N. Z. (2019). Increased Microvascular Permeability Contributes to Preferential Accumulation of Stealth Liposomes in Tumor Tissue. *Cancer Research* (53), 3765-3779.

Zeta-Meter Inc. (2001). Potencial Zeta: Un curso Completo en 5 minutos.

Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in colloid and interface Science*, 108 (109), 227-258.

Torchilin, V. P. (2007). Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. *The AAPS Journal*, 9 (2), 128-147.

Attwood, A. T. (2006). *Physicochemical Principles of Pharmacy* (Vol. 4). Gran Bretaña: Pharmaceutical Prees.

Abram, U. (2006). Technetium and Rhenium - Coordination Chemistry and nuclear medical applications. *Sociedade Brasileira de Química*, 17 (8), 1486-1500.

Batigöç, C. (2011). Spectrophotometric determination of cloud point of Brij 35 nonionic surfactant. *Fluid Phase Equilibria*, 303, 91-95.

BAO, A. (2003). A Novel Liposome Radiolabeling Method Using ^{99m}Tc -“SNS/S” Complex: In Vitro and In vivo Evaluation. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 92 (9), 1893-1904.

Barkat, K. A. (2011). Basics of pharmaceutical emulsions: A review. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 5 (25), 2715-2725.

Bennink, R. J. (2003). Noninvasive Measurement of Gastric Accommodation by Means of Pertechnetate SPECT: Limiting Radiation Dose Without Losing Image Quality. *The journal of Nuclear Medicine*, 45 (1), 147-151.

Bibi, S. (2010). Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*, 417, 138-150.

David, M. J. (2016). Natural emulsifiers- biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 03 (02), 101.

Decuzzi, P. (2009). Particles, Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected. *Journal of Controlled Release*, 141, 320-327.

Dilworth, J. R. (1998). The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chemical Society Reviews*, 27, 43-55.

Eckelman, W. C. (2013). Progress using Tc-^{99m} radiopharmaceuticals for measuring high capacity sites and low density sites. *Drug Discovery*, 18 (19/20), 984-991.

Egerton, R. F. (2016). *Physical Principles of Electron Microscopy An Introduction to TEM, SEM and AEM* (Vol. 2). Canada: Springer.

Foradori, C. A. (1993). El sliabario de medicina nuclear propiamente tal. *Revista de ciencias médicas*, 1-31.

Hargreaves, W. R. (1978). Liposomes from ionic, Single-Chain amphiphiles. *Monoalkyl Liposomes*, 17 (18), 3759-3768.

He, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31, 3657-3666.

Gao, X. (2018). Progress towards standardized and validated characterizations for measuring physicochemical properties of manufactured nanomaterials relevant to nano health and safety risks. *NanoImpact*, 9, 14-30.

Ivanov, I. B. (1996). Stability of emulsions under equilibrium and dynamic conditions. *COLLOIDS AND SURFACES*, 128, 155-175.

Jong, W. H. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3 (2), 133-149.

Kamalgharibi, M. (2015). Experimental studies on the stability of CuO nanoparticles dispersed in different base fluids: influence of stirring, sonication and surface active agents. *CrossMark*, 52, 55-62.

Kieviet, W. d. (1981). Technetium Radiopharmaceuticals: Chemical Characterization and Tissue Distribution of Tc-Glucoheptanate Using Tc-99m and Carrier Tc-99. *Radiochemistry and Radiopharmaceuticals*, 22, 703-709.

Kim, C.-j. (2004). *Advanced Pharmaceutics Physicochemical Principles* (Vol. 1). US: CRC PRESS.

Kosegarten-Conde, C. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6 (2), 1-18.

Mukherjee, P. (2011). Clouding behaviour in surfactant systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162, 59-79.

Murdock, R. C. (2008). Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 101 (1), 239-253.

Mallick, S. (17 de 10 de 2017). Liposomas containing Cholesterol and mitochondria-Penetrating peptide (MPP) for targeted delivery of antimycin a to A549 cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*.

Meltem Caglar, M. (2002). Scintigraphic Evaluation of Salivary Gland Dysfunction in Patients with Thyroid Cancer After Radioiodine Treatment. *Clinical Nuclear Medicine*, 27 (11), 767-771.

Moreno, A. C. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Journal Latino america Education physics*, 8 (4), 1-5.

Neda Naseri, H. V.-M. (2015). Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5 (3), 305-313.

NIST-NCL . (2015). Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. *NIST Special Publication 1200-6 , 1.2*, 1-9.

Novelo-Torres, A. M. (2010). Trayectorias en diagramas ternarios. *Profesores al día , 21*, 299-305.

Pytlakowska, K. (2013). Complex-forming organic ligands in cloud-point extraction of metal ions: A review. *Talanta , 110*, 202-228.

Podgorsak, E. B. *Radiation Physics for Medical Physicists* (Vol. 3). Montreal, QC, Canada: Springer.

Osornio, C. J. (16 de may de 2016). Structures similar to lipid emulsions and liposomes. Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 in aqueous media. *Journal of Liposome Research , 1-12*.

Oyewumi, M. O. (2010). Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Vaccines , 9* (9), 1095-1107.

Rang, H. P. (2011). *Farmacología* (Vol. 7). Barcelona , España: Elsevier España.