



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**INMUNOLIPOSOMAS CARGADOS CON CISPLATINO Y RADIOMARCADOS
CON EMISORES DE PARTÍCULAS CARGADAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ERICK YAIR CASTILLO OCHOA

TUTOR

DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ
INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**INMUNOLIPOSOMAS CARGADOS CON CISPLATINO Y
RADIOMARCADOS CON EMISORES DE PARTÍCULAS
CARGADAS**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB ERICK YAIR CASTILLO OCHOA



Ciudad de México, Mayo 2021



El jurado asignado:

Presidente: Dra. Lena Ruíz Azuara

Vocal: Dra. Alicia Negrón Mendoza

Vocal: Dr. David Quintanar Guerrero

Vocal: Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén

Secretario: Dra. Yareli Rojas Aguirre

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-IFUNAM, dentro del Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México. La presente obra se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Alberto Medina Velázquez, contando con apoyo económico de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).



AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por la beca de maestría otorgada, con número de CVU 875497.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** (UNAM) y al **Posgrado en Ciencias Químicas**, por todo su apoyo y comprensión durante estos tiempos de adversidad y por brindarme las herramientas necesarias para adquirir conocimientos científicos, valores humanos, habilidades técnicas y sobre todo por inculcarme la curiosidad por seguir aprendiendo día con día.

Al **Instituto Nacional de Cancerología** (INCan) y particularmente al Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular y el Laboratorio de Oncología Experimental por todo el apoyo técnico, humano y científico que ayudó a la conclusión del presente trabajo.



AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Luis Alberto Medina por recibirme (nuevamente) en su laboratorio, por compartir su conocimiento y su amplia experiencia en el área de investigación, por confiar en mí como un colaborador y como amigo y por ser una gran persona.

Al Dr. Enrique Pérez por su paciencia y por compartir sus conocimientos de cultivo celular que contribuyeron al desarrollo de esta tesis, y por ser un buen amigo.

A la Dra. Saé Muñiz por siempre tener la disposición de ayudar con equipos o reactivos, y también por contribuir con conocimiento en este trabajo.

A la Dra. Vanessa Izquierdo por las contribuciones intelectuales que ayudaron a desarrollar este trabajo.

A los miembros del jurado:	Dra. Lena Ruiz Azuara
Dra. Alicia Negrón Mendoza	Dr. David Quintanar Guerrero
Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén	Dra. Yareli Rojas Aguirre

Por sus comentarios, correcciones y aportes a la tesis, que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la M. en C. Itzel Torres y la QFB Josefina García por apoyarme en este proyecto y hacer mi estancia en este laboratorio muy divertida.

Al QFB David Ramírez por sus comentarios y sugerencias que aportaron a la elaboración de este trabajo, y por ser un buen compañero dispuesto a enseñar y a aprender.

Al físico Alexis Nathan por escucharme y ayudarme en cuestiones académicas y por compartir su amplio conocimiento en el área de una manera muy didáctica.

A mi papá, por confiar en mí y darme todo su apoyo y cariño durante este tiempo y por sus valiosos consejos que nunca me canso de escuchar, y por siempre preocuparse por mi bienestar.

A mi mamá y a Memo, por apoyarme siempre y estar pendiente de mis avances en la tesis, por confiar en mí y también darme su cariño y confianza.

A mi hermano Ángel, por todo el apoyo en cuanto a la mejora de las imágenes mostradas en el trabajo y sobre todo por ser una magnífica persona conmigo y estar dispuesto a ayudar. A mis hermanas Nina y Caro por ser tan ocurrentes y demostrarme de una manera diferente su cariño.

A mi Joss, tu sabes más que nadie lo que significó este trabajo para mí, agradezco infinitamente todo el apoyo que me brindaste, las búsquedas de información, los trámites, por estar conmigo en las buenas y en las malas y, sobre todo, por todo el amor con que haces las cosas.



ÍNDICE

1. RESUMEN.	1
2. ABREVIATURAS.	4
3. INTRODUCCIÓN.	6
4. ANTECEDENTES.	8
4.1. <i>Generalidades del cáncer.</i>	8
4.2. <i>Cáncer en México.</i>	10
4.3. <i>Terapia convencional del cáncer.</i>	11
4.3.1. <i>Cirugía.</i>	12
4.3.2. <i>Radioterapia.</i>	12
4.3.3. <i>Quimioterapia.</i>	13
4.4. <i>Liposomas como sistemas de liberación de fármacos.</i>	14
4.4.1. <i>Influencia de los componentes en una formulación liposomal.</i>	16
4.4.2. <i>Liberación pasiva vs liberación activa.</i>	18
4.5. <i>Inmunoliposomas.</i>	20
4.5.1. <i>Blancos moleculares para el cáncer.</i>	21
4.5.2. <i>Conjugación de anticuerpos a liposomas.</i>	23
4.6. <i>Radiomarcaje de liposomas.</i>	24
4.6.1. <i>Métodos de radiomarcaje.</i>	24
4.6.2. <i>Propiedades físicas y químicas del lutecio-177 y del DOTA.</i>	27
4.7. <i>Diseño de experimentos en desarrollo de formulaciones liposomales.</i>	29
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	31
6. HIPÓTESIS.	31
7. OBJETIVOS.	32
8. MATERIALES.	33
9. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	34
9.1. <i>Preparación de liposomas cargados con cisplatino por evaporación en fase reversa.</i>	35
9.2. <i>Elaboración de inmunoliposomas.</i>	35
9.2.1. <i>Derivatización del mAb.</i>	35
9.2.2. <i>Desprotección del grupo sulfhidrilo.</i>	35
9.2.3. <i>Purificación del mAb derivatizado y desprotegido.</i>	36
9.2.4. <i>Conjugación de mAb a liposomas.</i>	36



9.3.	<i>Caracterización fisicoquímica de los liposomas.</i>	36
9.3.1.	<i>Tamaño de partícula.</i>	36
9.3.2.	<i>Potencial zeta.</i>	37
9.3.3.	<i>Cuantificación de fosfolípidos.</i>	37
9.3.4.	<i>Cuantificación de cisplatino.</i>	38
9.4.	<i>Radiomarcado de liposomas.</i>	39
9.5.	<i>Estabilidad in vitro en suero humano.</i>	40
9.6.	<i>Diseño experimental de Plackett-Burman.</i>	41
9.6.1.	<i>Diagrama de Ishikawa.</i>	41
9.6.2.	<i>Matriz experimental de Plackett-Burman.</i>	43
9.7.	<i>Estudios de viabilidad celular.</i>	44
9.7.1.	<i>Cultivos celulares.</i>	44
9.7.2.	<i>Curvas de viabilidad celular del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$.</i>	45
9.7.3.	<i>Evaluación del sistema inmunoliposomal radiomarcado.</i>	46
9.8.	<i>Análisis estadístico.</i>	46
10.	RESULTADOS.	47
10.1.	<i>Caracterización fisicoquímica de los lotes de liposomas e IL's para el diseño experimental de Plackett-Burman.</i>	47
10.2.	<i>Determinación de la influencia de las 8 variables en la eficiencia de radiomarcado.</i>	48
10.2.1.	<i>Gráfico de Pareto para los efectos.</i>	48
10.2.2.	<i>Coeficientes de regresión del modelo experimental.</i>	49
10.3.	<i>Eficiencia de radiomarcado y pureza radioquímica.</i>	50
10.4.	<i>Estabilidad in vitro del radiomarcado.</i>	51
10.5.	<i>Viabilidad celular del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$.</i>	52
10.6.	<i>Evaluación del sistema inmunoliposomal radiomarcado con $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$.</i>	54
11.	DISCUSIÓN.	56
12.	CONCLUSIÓN.	61
13.	BIBLIOGRAFIA.	62



1. RESUMEN.

Los sistemas de liberación de fármacos han demostrado ser una alternativa para optimizar la terapia contra enfermedades como el cáncer, ya que presentan una disminución en los efectos adversos comparados con la quimioterapia tradicional. Uno de los vectores de fármacos comúnmente utilizados son los liposomas que, al ser conjugados con mAb ofrecen una mayor selectividad hacia células tumorales que en células sanas.

En el presente trabajo se realizó el radiomarcaje de un sistema liposomal pegilado cargado con *cis*-diamindicloroplatino (II) y conjugado con el anticuerpo monoclonal humanizado nimotuzumab, dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El radionúclido utilizado para este estudio fue el [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ y la técnica utilizada para dicho fin fue la encapsulación activa, en donde se utiliza la oxina como quelatante lipofílico, cuya función es transportar el radionúclido al interior del liposoma. Una vez dentro, el lutecio formará un complejo con el DOTA, otro agente quelatante que fue previamente encapsulado, quedando así, incorporado en el núcleo acuoso.

En el desarrollo del trabajo se utilizó un diseño experimental de Plackett-Burman, el cuál es un diseño factorial altamente fraccionado, que nos permitió determinar las variables más influyentes en la eficiencia del radiomarcado. Una de las variables más importantes que se lograron identificar fue la temperatura de incubación de los liposomas en el radiomarcado, ya que la incrementar la temperatura de incubación, se lograba aumentar la eficiencia de radiomarcado. Otras variables que influyeron en la eficiencia fueron la presencia del mAb, el tiempo de incubación y el pH del medio. Se realizó la caracterización fisicoquímica de todos los sistemas liposomales elaborados, así como la estabilidad *in vitro* del radiomarcaje a 37°C en SSI y en suero humano.

Por último, se realizó un ensayo de viabilidad celular del [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ y de los inmunoliposomas radiomarcados en cuatro líneas celulares: HeLa, CaSki, MRC-5 y



A431. El efecto citotóxico (AI_{50}) del radionúclido fue evaluado mediante curvas de supervivencia, en donde se utilizaron actividades de lutecio de 0.01-10 MBq/mL para cada línea celular. El valor obtenido para las cuatro líneas celulares fue >2 MBq/mL. Los resultados de la evaluación de los inmunoliposomas radiomarcados no fueron los esperados, ya que no se observaron diferencias significativas con respecto al tratamiento con solución salina.



ABSTRACT.

Drug Delivery Systems (DDS) have proven to be a promising alternative to optimize therapy against different diseases such as cancer since they present lower side effects than conventional chemotherapy. One of the most promising DDS is liposomes conjugated with mAb, which can offer a higher selectivity to cancer cells than healthy ones.

Here, we report a radiolabelling method with lutetium-177 (^{177}Lu) for a PEGylated liposome system loaded with *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and conjugated with humanized monoclonal antibody (nimotuzumab), used to target the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). A remote loading technique was used to encapsulate [^{177}Lu]LuCl₃ in the internal aqueous space using oxine as a lipophilic chelating agent. Once inside the liposome, lutetium will form a coordination complex with DOTA, another chelating agent previously loaded, remaining in the inner aqueous space.

A Plackett-Burman experimental design was used to determine the significant variables that will improve the immune-liposome system's radiolabelling efficiency. We found that temperature, mAb presence, incubation time, and pH media are essential variables that affect the radiolabelling efficiency. Physicochemical characterization of the immune-liposome system and *in vitro* stability at 37°C in saline and human serum were also performed.

The 50% inhibitory activity (IA_{50}) of ^{177}Lu in tumor cells was evaluated using survival curves with activities ranging 0.01-10 MBq/mL. The IA_{50} value was >2 MBq/mL. The viability of HeLa, CaSki, MRC-5, and A431 cells was evaluated with ^{177}Lu -immune-liposomes. The result was not expected because no significant differences were found in comparison with the control (saline) group.



2. ABREVIATURAS.

1,2-diasteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[maleimido(polietileglicol)-2000]	(PEG-mal)
1,2-diasteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietileglicol)-2000]	(mPEG)
2-hidroxiquinoleina	(2HQ)
8-hidroxiquinoleina u oxina	(8HQ)
Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-N,N',N'',N'''-tetraacético	(DOTA)
Ácido 1,4,7-triazaciclononano-N, N',N''-triacético	(NOTA)
Ácido dietilentriaminpentaacético	(DTPA)
Ácido etilendiamindiacético	(EDDA)
Ácido etilendiamintetraacético	(EDTA)
Actividad inhibitoria 50	(AI ₅₀)
Administración de medicamentos y alimentos (Food and Drug Administration)	(FDA)
Agencia de medicamentos europea (European Medicines Agency)	(EMA)
Anticuerpo monoclonal	(mAb)
Atributos críticos de calidad	(ACC)
Atributos críticos de formulación	(ACF)
Calidad por Diseño	(QbD)
<i>Cis</i> -diamindicloroplatino (II)	(CDDP)
Colesterol	(Chol)
Cromatografía de exclusión molecular	(SEC)
Cromatografía instantánea en capa fina	(ITLC)
Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	(HPLC)
Diasteroilfosfatidiletanolamina	(DSPE)
Diseño de Experimentos	(DoE)
Diseño de Plackett-Burman	(PBD)
Dosis tolerada máxima	(DTM)
Fragmento de unión al antígeno	(Fab)
Fragmento divalente de unión al antígeno	(F(ab') ₂)
Fragmento sencillo de la cadena variable	(scFv)
Inmunoliposomas	(ILs)



Instituto Nacional de Cancerología	(INCan)
Instituto Nacional de Estadística y Geografía	(INEGI)
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares	(ININ)
Liposomas convencionales	(LC)
Liposomas de Larga Circulación	(LLC)
L- α -fosfatidilcolina hidrogenada de soya	(HSPC)
N, N'-dimetilformamida	(DMF)
N,N'-dietilditiocarbamato de sodio	(DDTC)
N-hidroxisuccinimida	(NHS)
N-succinimidil-S-acetiltioacetato	(SATA)
Organización Mundial de la Salud	(OMS)
Parámetros críticos de proceso	(PCP)
Receptor de transferrina	(TfR)
Receptor del factor de crecimiento epidermal	(EGFR)
Retención y permeabilidad aumentadas	(EPR)
Sistema retículo endotelial	(RES)
Solución amortiguadora de fosfatos	(PBS)
Solución salina isotónica (0.9%)	(SSI)
Temperatura de transición vítrea	(Tm)
Tomografía por emisión de fotón único	(SPECT)
Tomografía por emisión de positrones	(PET)
Vesículas multilamelares	(MLV)
Vesículas unilamelares grandes	(LUV)
Vesículas unilamelares pequeñas	(SUV)



3. INTRODUCCIÓN.

Uno de los agentes de quimioterapia que se ocupa frecuentemente en la terapia contra varios tipos de cáncer es el cisplatino o cis-diamindicloroplatino (II) (CDDP), el cual ha sido utilizado como fármaco de primera línea en el tratamiento del cáncer de ovario, cáncer gastroesofágico y en el cáncer de pulmón. Sin embargo, el tratamiento con cisplatino presenta varias desventajas incluyendo una rápida eliminación del organismo, alta toxicidad en riñón y sistema nervioso periférico, ototoxicidad, náuseas, vómito entre otros **(1)**.

Los sistemas de liberación de fármacos han sido propuestos como alternativa para optimizar la actividad terapéutica de fármacos utilizados para una gran variedad de padecimientos, y su uso en el campo de la medicina se ha extendido ampliamente. En el tratamiento contra el cáncer, cerca del 40% de los fármacos presentan baja solubilidad acuosa, por lo que el desarrollo de acarreadores hace posible la incorporación de estos agentes quimioterapéuticos, aumentando la solubilidad acuosa e incrementando la estabilidad y la acumulación en un sitio específico **(2, 3)**. En este contexto, uno de los sistemas de liberación que más atención han recibido son los liposomas, ya que al ser vesículas que contienen un núcleo acuoso rodeada de una bicapa lipídica biocompatible compuesta de fosfolípidos y colesterol, pueden encapsular tanto fármacos hidrofóbicos como hidrofílicos **(2, 4)**.

Las ventajas de los liposomas, en cuanto a sus propiedades a escala nanométrica (aproximadamente 100 nm), incluyen una mejora en las propiedades farmacocinéticas del fármaco encapsulado, así como disminuir la toxicidad asociada a los agentes de quimioterapia. Un ejemplo es el Doxil®, que es una formulación liposomal de doxorubicina, que en el año 1995 obtuvo la aprobación de la FDA para ser usado en la clínica **(5)**. Debido a la versatilidad y biocompatibilidad de los lípidos, los liposomas son extensamente estudiados como vehículos acarreadores de fármacos para una amplia variedad de fármacos **(4)**.

Sin embargo, incluso habiendo demostrado lo prometedor que son estos vectores de fármacos, es necesario mejorar su biodistribución, propiedades farmacológicas



y la liberación sitio-especifica **(6)**. A pesar de que la actividad antitumoral clínicamente útil se ha demostrado con liposomas dirigidos pasivamente (efecto EPR), aún es posible alcanzar un nivel adicional de sofisticación y especificidad hacia la célula tumoral, lo cual se puede lograr a través del direccionamiento mediado por un ligando, que se define como liberación activa **(3, 4)**. El uso de anticuerpos monoclonales (i.e. Nimotuzumab) como ligandos de reconocimiento resulta en una mejora de los sistemas de liberación debido a su alta afinidad por su blanco molecular. Los liposomas conjugados con anticuerpos (Inmunoliposomas, IL) pueden incrementar la toxicidad selectiva de agentes terapéuticos hacia las células cancerosas **(7, 8)**.

El uso de liposomas radiomarcados son de utilidad en el seguimiento *in vivo* de estos vectores de fármacos mediante técnicas de imagen molecular, pudiendo obtener datos fundamentales como los parámetros farmacocinéticos, biodistribución y eliminación **(9)**. En el presente trabajo se proporciona una metodología experimental para el radiomarcado y estabilidad *in vitro* de una formulación de inmunoliposomas cargados con cisplatino previamente publicada **(8)**.



4. ANTECEDENTES.

4.1. Generalidades del cáncer.

El cáncer engloba a un grupo de más de 100 diferentes tipos de la enfermedad que tiene como característica principal el rápido y desordenado crecimiento de células anormales (**Figura 1**) (**10**), que puede ser debido a la acumulación de alteraciones genéticas en una amplia variedad de genes relacionados con la regulación de los procesos de la multiplicación y diferenciación celulares la cuál puede ser inducida por agentes mutágenos externos (agentes químicos, físicos o biológicos) o por herencia (**11**, **12**).

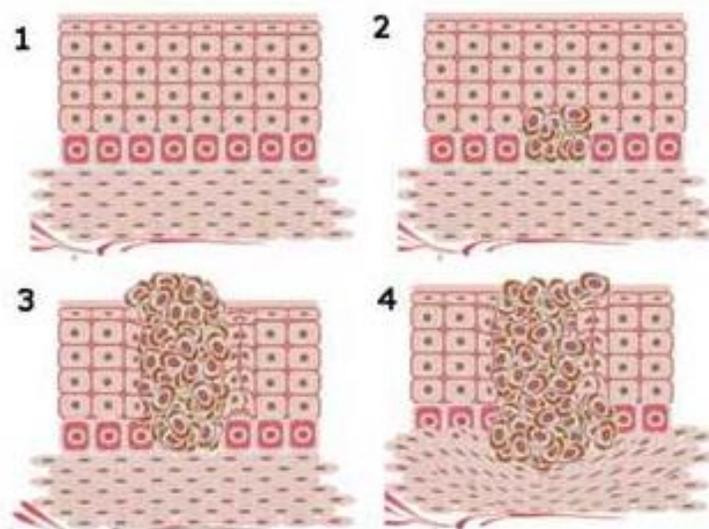


Figura 1. Representación esquemática del crecimiento de las células cancerosas, en 1) se representan a las células normales altamente organizadas, 2) comienzo del crecimiento anormal de las células cancerosas, 3) crecimiento descontrolado de las células, existe ya una desorganización de los bloques celulares, 4) inicio de la propagación de las células tumorales hacia otros sitios del organismo (**13**).

El cáncer puede originarse en cualquier parte del organismo y este comienza cuando las células crecen descontroladamente sobrepasando a las células normales, haciendo que el cuerpo humano no funcione de manera correcta (**13**).



El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública alrededor del mundo y es la segunda causa de muerte en el mundo, por debajo de las enfermedades cardiovasculares, que en el año 2015 ocasionó 8.8 millones de muertes, casi 1 de cada 6 defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud **(12, 14)**. Con base en los datos aportados por la OMS, se identificaron 5 tipos de cáncer responsables de la mayoría de las defunciones a nivel mundial en el 2015:

- i) Pulmonar (1.69 millones de defunciones)
- ii) Hepático (788000 defunciones)
- iii) Colorrectal (774000 defunciones)
- iv) Gástrico (754000 defunciones)
- v) Mamario (571000 defunciones)

Entre los factores de riesgo para estos tipos de cáncer en particular se encuentran el consumo de tabaco y alcohol, una mala alimentación y la inactividad física, así como otras enfermedades no transmisibles **(12)**. Se estima que el 13 % de los casos de cáncer que se diagnosticaron en el año 2018 se atribuyeron a infecciones causadas por patógenos como: *Helicobacter pylori*, los papilomavirus humanos de alto riesgo, virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C **(15)**. La edad también es un factor a considerar, ya con el paso de los años hay cambios fisiológicos importantes, como una respuesta inmune disminuida, desajustes hormonales, dietéticos y metabólicos, junto con la presencia de comorbilidades **(10)**.

Las células cancerosas adquieren la capacidad de propagación hacia otras partes del cuerpo. Por ejemplo, las células cancerosas en el pulmón se pueden movilizar hacia los huesos y ahí comenzar a crecer, formando una nueva masa tumoral, que siguen siendo células tumorales de pulmón. A este proceso de migración de células tumorales por el organismo se le conoce como metástasis, como se ejemplifica en la **Figura 2 (13)**.

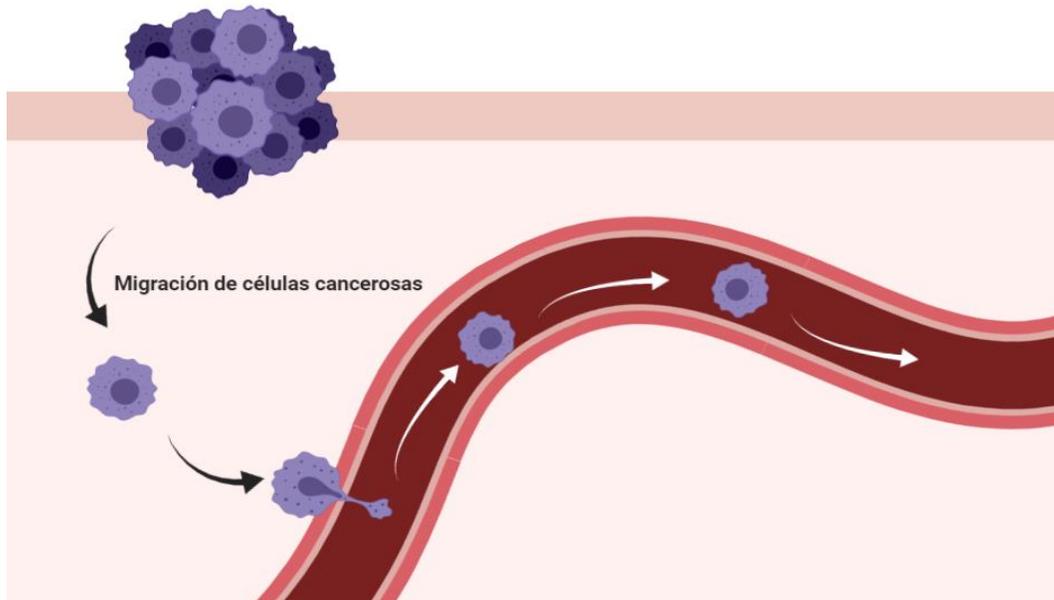


Figura 2. Después del crecimiento descontrolado de las células en un sitio tumoral, éstas comenzarán a migrar a otros sitios del organismo a través del sistema circulatorio, en donde pueden invadir otros órganos y comenzar a crecer para formar un nuevo tumor, el cual tendrá las mismas características del tumor donde se formó inicialmente.

4.2. *Cáncer en México.*

En América, durante el año 2012 el cáncer representó el 24.6% de la mortalidad en todas las edades y el 32.8% de la mortalidad prematura entre los 30 y los 70 años de edad. Por la alta prevalencia de ciertos factores de riesgos asociados con la enfermedad, se espera que la mortalidad por cáncer en la región aumente hasta 2.1 millones para el año 2030 **(11, 16)**.

En el caso de México, de acuerdo con la información del INEGI, la mortalidad por tumores malignos en población entre los 30 y 59 años de edad se presentan por estos tipos de cáncer **(10)**:

- i) Órganos digestivos
- ii) Cervicouterino y ovario
- iii) Mamario
- iv) Órganos hematopoyéticos
- v) Órganos respiratorios e intratorácicos



Mientras que, en la población de más de 60 años, la mortalidad por tumores malignos es representada por los siguientes tipos de cáncer:

- i) Órganos digestivos
- ii) Órgano reproductor masculino y próstata
- iii) Órganos respiratorios e intratorácicos
- iv) Órgano reproductor femenino
- v) Mamario

De acuerdo con la OMS en el año 2018, los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia en la población en general fueron: **(17)**:

- i) Mamario (14.3%)
- ii) Próstata (13.1%)
- iii) Colorrectal (7.8%)
- iv) Tiroides (6.4%)
- v) Cervicouterino (4.1%)

Para hombres los tipos de cáncer con mayor incidencia fueron el de próstata, colorrectal, testículo, pulmón y estómago. Mientras que para las mujeres fue el cáncer de mama, tiroides, cervicouterino y colorrectal **(10, 17)**.

4.3. Terapia convencional del cáncer.

El tratamiento para este conjunto de enfermedades va a depender del tipo de cáncer y la localización anatómica del mismo, así como su tamaño, si hay alguna migración a otra parte del cuerpo y la salud general del paciente. Algunas personas con cáncer solo recibirán un tipo de terapia, mientras que la mayoría reciben una combinación de tratamientos como cirugía con quimioterapia o radioterapia **(18,19)**.



4.3.1. Cirugía.

La cirugía es uno de los procedimientos en el tratamiento del cáncer que es usada para prevenir, diagnosticar y determinar la fase de la enfermedad, así como disminuir la incomodidad o problemas relacionados con el tumor. A veces una sola cirugía puede cumplir más de uno de esos objetivos, en otras ocasiones se requieren de más operaciones con el tiempo. En el diagnóstico, se toma una pequeña muestra del tejido el cual se analiza en laboratorio y se determina el tipo de cáncer. A este procedimiento se le conoce como biopsia. En la cirugía para determinar la fase del cáncer, el médico examina el sitio tumoral visualmente, y con ello observar si hay migración a otros sitios del cuerpo. La cirugía primaria o de curación se realiza cuando el tumor está en una sola parte del cuerpo y puede ser removido. La cirugía ofrece un buen pronóstico siempre y cuando las células tumorales no se hayan diseminado a otras partes del cuerpo **(20)**.

4.3.2. Radioterapia.

La radioterapia se refiere al uso de la radiación ionizante en la cual se utilizan altas dosis de energía para matar a las células cancerosas. El objetivo de la radioterapia es matar a las células tumorales o hacer más lento su crecimiento al dañar el ADN. Este tipo de terapia no destruye de inmediato a las células cancerosas, ya que se requieren días o semanas de tratamiento antes de que el ADN sea dañado lo suficiente para que mueran las células del tumor **(18, 19)**.

Existen dos tipos de radioterapia: 1) radioterapia interna es aquella en donde la fuente radiactiva es colocada dentro del cuerpo y esta puede ser sólida (braquiterapia) o líquida y 2) radioterapia externa es aquella en donde un dispositivo emisor de radiación enfoca un haz de energía en la zona tumoral, por lo que este tipo de terapia se considera un tratamiento local **(19-21)**.



4.3.3. Quimioterapia.

El término se refiere a aquella terapia en donde se utilizan agentes citotóxicos que tienen como objetivo matar a las células cancerosas. La quimioterapia es considerada una terapia sistémica porque los fármacos viajan por todo el organismo, y pueden matar células cancerosas que se han propagado a otras partes del cuerpo **(22, 23)**.

Los medicamentos de quimioterapia matan a las células en diferentes fases del ciclo celular. Las células cancerosas suelen formarse con mayor rapidez, lo cual permite a los medicamentos de quimioterapia dañarlas con más facilidad. Sin embargo, los medicamentos de quimioterapia no son capaces de diferenciar entre las células sanas y las células cancerosas. Esto significa que los medicamentos de quimioterapia son inespecíficos y que las células normales son afectadas junto con las células cancerosas, y esto causa efectos secundarios característicos, como lo son las náuseas, vómitos, pérdida del cabello, entre otras **(22)**.

En el mercado existen varios fármacos antineoplásicos que han sido aprobados para su uso en el tratamiento contra distintos tipos de cáncer, pero en este trabajo nos enfocaremos exclusivamente en el cisplatino, cuya estructura se muestra en la **Figura 3**.

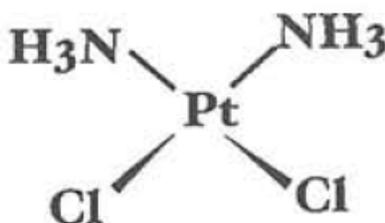


Figura 3. Estructura del cisplatino

El cisplatino es uno de los agentes citotóxicos más utilizados y efectivos en el tratamiento de neoplasias epiteliales como pulmón, cabeza y cuello, ovario, vejiga y testicular **(1, 24)**. Este fármaco entra a la célula por difusión pasiva y, una vez dentro, los grupos cloruros son reemplazados por moléculas de agua, adicionando una carga positiva y formando una especie más reactiva que puede reaccionar con



productos nucleofílicos de las células para formar aductos de proteínas, ADN o ARN, como se muestra en la **Figura 4 (25)**.

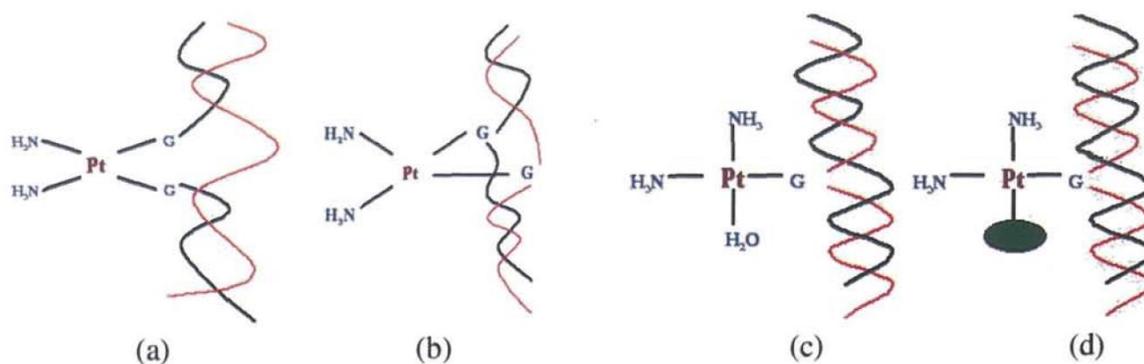


Figura 4. Algunos aductos de ADN y cisplatino: (a) aducto en la misma hebra de la doble cadena, (b) aducto entre ambas hebras de la doble hélice, (c) monoaducto en su forma hidratada con un grupo reactivo de una base nitrogenada, (d) monoaducto con otro grupo reactivo unido a una molécula pequeña (glutación) **(24)**.

A pesar de ser un agente citotóxico efectivo contra las células cancerosas, presenta varias desventajas como: 1) limitada dosificación debido a la toxicidad, particularmente la nefrotoxicidad y neurotoxicidad, 2) inactivación rápida del fármaco como resultado de la complejación con proteínas plasmáticas y 3) la resistencia a análogos de platino. También se han publicado efectos adversos como toxicidad gastrointestinal, astenia y ototoxicidad **(24, 26)**.

4.4. *Liposomas como sistemas de liberación de fármacos.*

Los sistemas de liberación de fármacos son aquellos cuyo objetivo es administrar un compuesto farmacéutico con una actividad particular de una manera controlada para obtener un efecto terapéutico en humanos o animales **(27)**. En nuestro caso, los vectores de transporte de fármacos que se investigan son los liposomas; los cuales son vesículas de naturaleza lipídica en donde un volumen acuoso es rodeado por una bicapa de fosfolípidos y en algunos casos pueden contener colesterol. El tamaño de estas vesículas puede llegar desde algunos nanómetros hasta varios micrómetros, dependiendo el uso que se les dé es el tamaño que se requiere



diseñar. Estas estructuras lipídicas pueden consistir en una o varias bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos **(28)**.

Los liposomas pueden ser clasificados con base en su tamaño y número de bicapas. Se clasifican como vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV) **(Figura 5)**. Con base en su composición, se pueden clasificar como liposomas convencionales (LC), liposomas sensibles a pH, liposomas catiónicos, liposomas de larga circulación (LLC) e inmunoliposomas (ILs). También se pueden clasificar tomando en cuenta el método de elaboración, como vesículas por evaporación en fase reversa, hidratación de una capa lipídica, inyección de éter, etc **(29-33)**.

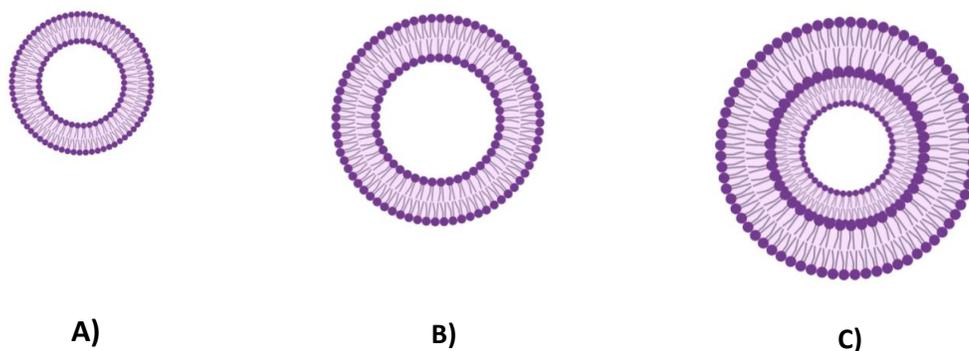


Figura 5. Representaciones de los distintos tipos de liposomas de acuerdo con su tamaño: A) Vesículas unilamelares pequeñas cuyo tamaño es de aproximadamente $\leq 0.1 \mu\text{m}$ y constituyen una bicapa concéntrica, B) Vesículas unilamelares grandes tienen un tamaño de $>0.1 \mu\text{m}$ compuestas de una sola bicapa lipídica con un mayor volumen acuoso, C) Vesículas multilamelares, pueden alcanzar tanto la escala nanométrica y micrométrica y están compuestas de varias bicapas concéntricas.

Los liposomas fueron descritos por primera vez por Bangham y colaboradores con el fin de modelar membranas celulares en estudios de biofísica **(34-36)**. Años después, gracias a sus características fisicoquímicas fueron propuestos como acarreadores de fármacos por Gregoriadis y colaboradores **(30, 37, 38)** destacando algunas ventajas que ofrecen este tipo de vectores de fármacos como: 1) Estructura versátil que se puede adaptar para alguna aplicación específica, 2) Se pueden



encapsular varios tipos de fármacos, ya sea en el interior acuoso (fármacos hidrofílicos) o entre la bicapa lipídica (fármacos lipofílicos) y 3) Presentan baja toxicidad con respecto al fármaco libre, se genera una menor inmunogenicidad y son altamente biocompatibles (29, 30, 39).

Cuando se utilizan liposomas como acarreadores de fármacos antineoplásicos, el principal objetivo es reducir los efectos tóxicos adversos derivados de la quimioterapia en órganos sensibles como el corazón y los riñones y que sea específico hacia cierto tipo de tejidos como los tumores (40, 41) así como mejorar las propiedades farmacocinéticas del fármaco y protegerlo de la degradación e incrementar su estabilidad bajo ciertas condiciones de almacenamiento (29, 42).

4.4.1. Influencia de los componentes en una formulación liposomal.

Los fosfolípidos son los principales bloques constructores de los liposomas. Son moléculas que consisten en una cabeza polar que interacciona con el agua y de una cola hidrocarbonada hidrofóbica. Los fosfolípidos muestran una excelente biocompatibilidad, lo que los convierte en un excipiente adecuado en una formulación de sistemas de liberación de fármacos. Otro componente importante en una formulación liposomal es el colesterol, el cual puede modular la rigidez de la bicapa lipídica y con ello la liberación del principio activo. La interacción del colesterol con los fosfolípidos se muestra en la **Figura 6 (33, 42, 43)**.

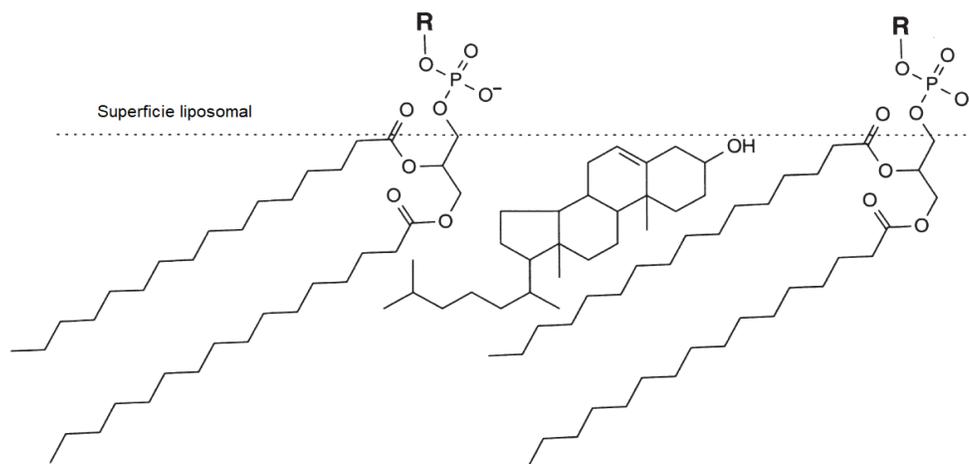


Figura 6. Representación de la interacción del colesterol con los fosfolípidos en la membrana liposomal. El colesterol se orienta con el grupo hidroxilo polar hacia la fase acuosa (33).



En un principio cuando se comenzaba a formular la doxorubicina liposomal (Doxil®), Gabizon *et. al.* observaron que los liposomas convencionales cargados con el fármaco eran eliminados rápidamente por el sistema retículo endotelial (RES por sus siglas en inglés) que fue demostrado mediante técnicas de imagen molecular con liposomas radiomarcados con ^{111}In . Los hallazgos que encontraron fueron una mayor captación en hígado y bazo, que son órganos especializados en la eliminación de estos sistemas de liberación de fármacos lo cual fue una gran desventaja ya que no representaba una mejoría con respecto a la terapia convencional **(5, 44)**. Uno de los requerimientos para lograr una formulación exitosa es prolongar el tiempo de circulación sanguínea de manera intacta, lo cual se solucionó con el desarrollo de liposomas estabilizados estéricamente, que estaban compuestos de fosfolípidos con una alta T_m , colesterol y un recubrimiento lipopolimérico ($^{2000}\text{PEG-DSPE}$) **(5, 45)**. El resultado de cubrir la superficie liposomal con PEG es un aumento en la esfera de solvatación, lo que impide el reconocimiento por opsoninas y por RES, prolongando el tiempo de circulación **(45, 46)**.

La PEGilación es una técnica útil para incrementar las propiedades de evasión del sistema inmune, aunque, por otro lado, demasiado PEG en la superficie liposomal puede llevar a una reducción en la eficiencia del sistema de liberación para entregar el fármaco **(46)**. Para concentraciones de PEG entre 5-8% mol, el polímero adopta una conformación estructural en forma de hongo, mientras que a concentraciones mayores de 8% mol, la conformación más favorable será en forma de cepillo. En este caso, porcentajes mayores al 10% mol en la formulación, las cadenas de PEG presentan una repulsión lateral que desestabiliza la bicapa lipídica, es por ello que se utilizan concentraciones de 5% mol de PEG para una formulación estable, tal como se muestra en la **Figura 7 (3, 47)**.



Figura 7. Representación de las conformaciones estructurales del PEG en la superficie liposomal. A la izquierda la conformación en forma de hongo, a la derecha la conformación en forma de cepillo.

4.4.2. Liberación pasiva vs liberación activa.

Las células cancerosas se caracterizan por tener una rápida replicación y tener una alta demanda de nutrientes y oxígeno para el crecimiento tumoral, para ello se ayuda de la formación de nuevos vasos sanguíneos que permitan incorporar esos nutrientes. Estos nuevos vasos sanguíneos no tienen uniones estrechas entre las células endoteliales, dando como resultado vascularización fenestrada de forma irregular (47, 48). Estos defectos en la vasculatura tumoral junto con el poco drenaje linfático son aprovechadas por los sistemas de liberación para poder difundir pasivamente a través de un proceso conocido como efecto de retención y permeabilidad aumentadas (EPR), el cuál fue descrito por Matsumura y Maeda (1986), en donde sugieren que debido a la alta permeabilidad de la vasculatura tumoral, los liposomas pueden acceder al intersticio celular y tener una mayor acumulación en el tumor (Figura 8) (49-53). Se estima que el tamaño de apertura de las fenestraciones en la vasculatura tumoral se encuentra entre los 400 a 700 nm, por lo que un tamaño de partícula ideal en los liposomas debe ser menor que 200 nm (3, 52). La encapsulación de agentes quimioterapéuticos dentro de estructuras liposomales puede limitar la absorción por los tejidos sanos y por ende aumentar el intervalo terapéutico (42).

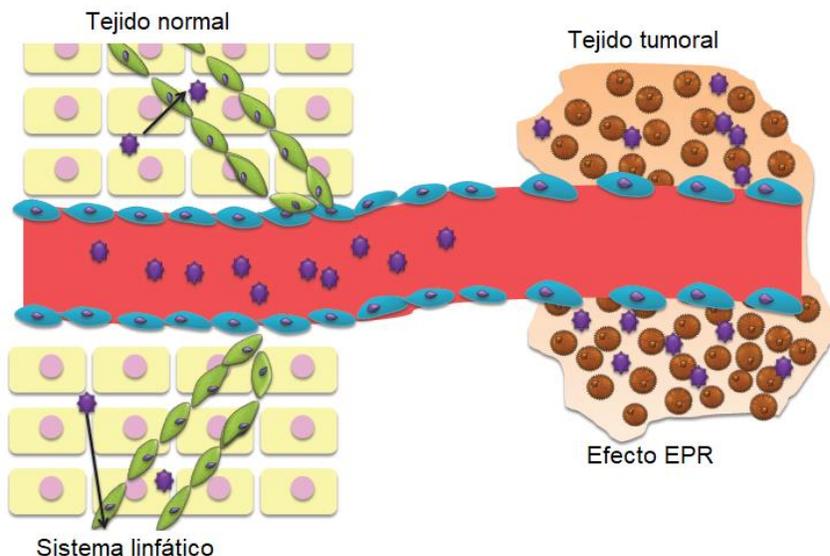


Figura 8. Representación esquemática del efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR). Los vasos sanguíneos normales se encuentran rodeados de una capa de células del músculo liso con uniones estrechas célula-célula en donde los liposomas difícilmente podrían extravasarse. En tejido tumoral, hay una pérdida de las uniones estrechas entre las células, creando huecos entre ellas, por lo tanto los liposomas pueden entrar en dicho tejido (48).

Sin embargo, se ha demostrado que la liberación pasiva por sí misma es incapaz de alcanzar una adecuada cantidad del fármaco en el sitio tumoral, teniendo como consecuencia una menor eficiencia terapéutica. Esto es consecuencia de que este tipo de sistemas de liberación de fármacos carecen de especificidad por las células tumorales (4, 8, 52). Una propuesta para aumentar el nivel de sofisticación y especificidad de los liposomas por las células cancerosas es mediante la liberación activa, que consiste en unir mediante un enlace covalente o una interacción intermolecular un ligando de reconocimiento (proteínas, péptidos, carbohidratos, etc.), que como resultado, pueden distinguir y unirse específicamente con moléculas que se encuentran sobreexpresadas en las células tumorales únicamente, incrementando la cantidad de fármaco liberado en el sitio tumoral (3, 52). La liberación activa puede incrementar la liberación de fármacos en el sitio tumoral, así como facilitar la internalización de liposomas por medio de endocitosis. Este proceso es altamente dependiente de las propiedades fisicoquímicas del ligando así como



del tamaño, carga, orientación y la adsorción física que tenga con la molécula blanco (3, 4).

4.5. Inmunoliposomas.

El uso de anticuerpos monoclonales (mAb) como una aproximación para dirigir específicamente al sitio tumoral liposomas cargados con un fármaco antineoplásico tiene el potencial para mejorar las propiedades terapéuticas de estos debido a la alta afinidad y selectividad por un blanco molecular en específico (7, 8). Bajo este principio surge el desarrollo de un nuevo sistema de liberación de fármacos llamados inmunoliposomas (IL), que son liposomas que se encuentran conjugados a un anticuerpo o a un fragmento de este (Fab, F(ab')₂ o scFv) (4). En la **Figura 9** se muestra el esquema general de la estructura de un anticuerpo.

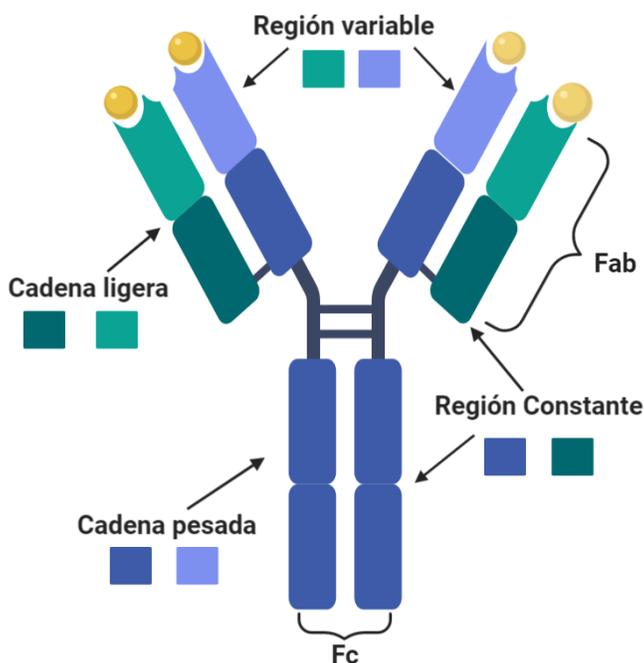


Figura 9. Esquema general de la estructura de un anticuerpo, se destacan las cadenas pesadas y las cadenas ligeras, junto con la región variable y la región constante unidas por un enlace disulfuro, las esferas en amarillo representan la unión con su antígeno.

El reconocimiento de un blanco tumoral por el ligando conjugado a liposomas genera la formación de un complejo ligando-receptor. Este complejo es internalizado por endocitosis, proceso que es fuertemente dependiente de la



interacción ligando receptor con lo que se asume que la internalización debe ocurrir para lograr un mayor efecto antitumoral (47). El proceso mediante el cual se propone este mecanismo se muestra en la **Figura 10**.

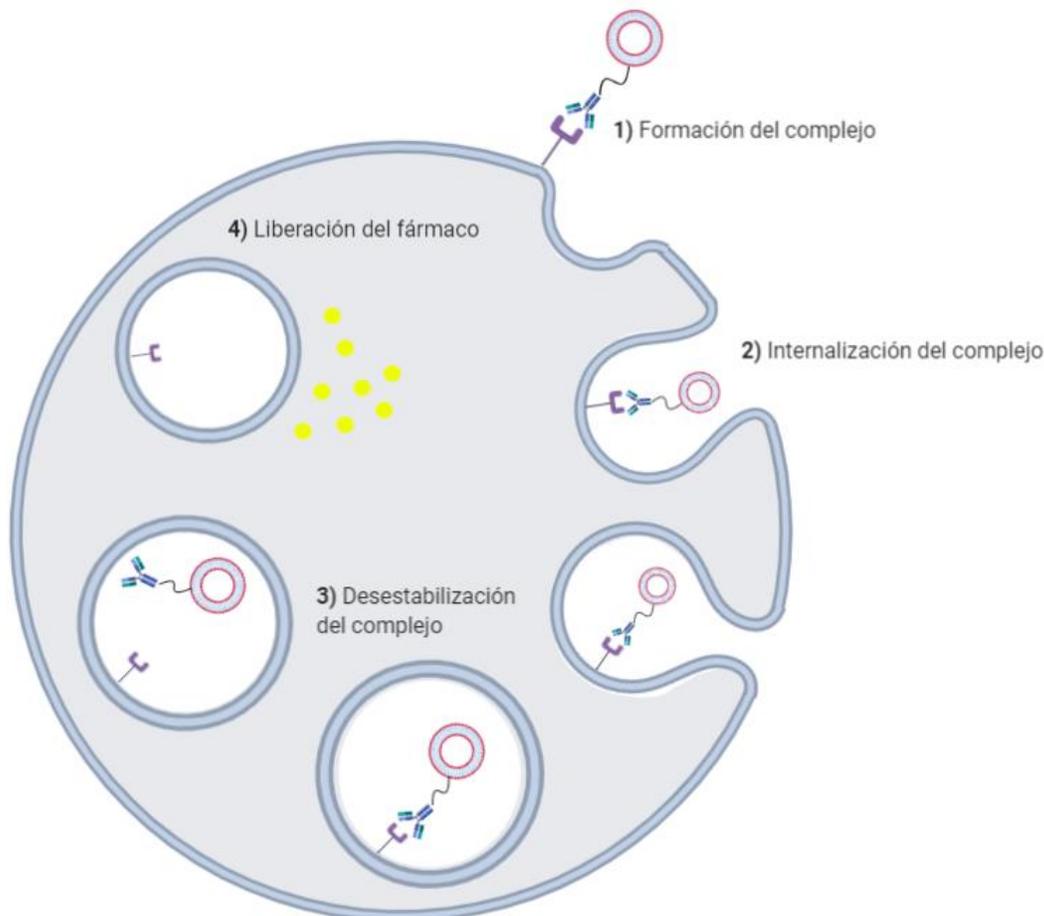


Figura 10. Representación esquemática del mecanismo provocado por la formación del complejo formado por la interacción entre un inmunoliposoma y el receptor en la célula tumoral.

4.5.1. Blancos moleculares para el cáncer.

Al momento de diseñar un sistema liposomal conjugado con un anticuerpo, se debe de seleccionar el blanco molecular al que sería dirigido este sistema y que este sea después internalizado para la liberación intracelular del fármaco que está siendo acarreado (4). Algunos blancos moleculares que se encuentran sobreexpresados en la superficie de las células tumorales son: El receptor del factor de crecimiento



epidermal (EGFR), el receptor de folato, los receptores a transferrina (TfR) y el receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER) **(47)**.

Para el cáncer de mama el blanco molecular que comúnmente se aborda es el receptor HER2, aunque también se ha encontrado en otros tipos de cáncer como próstata, vejiga, cerebro, pulmón y sistema gástrico **(6)**. Una formulación liposomal de doxorubicina denominada MM-302 fue conjugada con un fragmento de anticuerpo scFv anti-HER2 pasó a las fases clínicas, y en la fase I no se alcanzó la dosis máxima tolerada a una dosis de 50 mg/m² y a una dosis de 30 mg/m² se observó una actividad antitumoral **(54)**. Sin embargo, en estudios clínicos fase II al no haber mejora sustancial en comparación con la terapia convencional, el estudio fue cesado **(47, 55, 56)**.

Otro blanco molecular es el receptor a transferrina (TfR), el cual está asociado con la captación celular de hierro y que se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer **(2)**. Se desarrolló una formulación de liposomas conjugados con transferrina y encapsulados con oxaliplatino para el tratamiento de segunda línea contra el adenocarcinoma esofágico en combinación con leucovorin y 5-FU, los cuales se están desarrollando estudios fase Ib/II **(2, 56)**.

Un blanco atractivo que se encuentra sobreexpresado en varios tipos de células cancerosas es el EGFR, que pertenece a la familia de receptores ErbB de tirosincinasas y está involucrada en la patogénesis y progresión de diferentes tipos de cáncer como: pulmón, cabeza y cuello, cerebro, colon y mama **(2, 6)**. Existen anticuerpos monoclonales anti-EGFR como cetuximab (anticuerpo quimérico) y el nimotuzumab (anticuerpo humanizado) que ya se han utilizado en la terapia contra algunos tipos de tumor como el cáncer colorectal **(2, 8)**. Se diseñó una formulación inmunoliposomal de doxorubicina denominada C225_ILS_DOX, está conjugada con un fragmento Fab de cetuximab, que en estudios fase I se demostró una buena correlación entre la sobreexpresión de EGFR y una mejor eficacia terapéutica. Se alcanzó una dosis tolerada máxima (DTM) de 50 mg/m². Actualmente se encuentran en estudios clínicos de fase II **(47)**. Vázquez *et. al.* publicaron una formulación de cisplatino liposomal conjugada con nimotuzumab, cuyos resultados *in vitro*



muestran una buena especificidad y afinidad por el EGFR, y que hay una internalización de los ILs en células A-431 de carcinoma epidermoide **(8)**.

A pesar del gran esfuerzo que se ha realizado para mejorar estos vectores de fármacos antineoplásicos, y que varias formulaciones han alcanzado las fases clínicas, actualmente ninguna formulación ha llegado a ser aprobada para su uso en la terapia contra el cáncer.

4.5.2. Conjugación de anticuerpos a liposomas.

La estrategia convencional para la unión de un anticuerpo con algún componente de la formulación liposomal es mediante la formación de un enlace covalente, en donde el ligando se une a la superficie con un agente de acoplamiento. Para la producción de conjugados liposomales, se incorporan lípidos funcionalizados dentro de la bicapa, los cuales tienen grupos funcionales que son capaces de formar una unión química **(6, 33)**. El componente que se elige para la unión con el anticuerpo es la parte distal del DSPE-mPEG, en donde el grupo metoxi inerte ha sido reemplazado por grupos funcionales útiles (p.e. grupo maleimido) para la conjugación del anticuerpo, esto con el fin de mejorar la disponibilidad del ligando. El grupo sulfhidrilo juega un papel fundamental en la reacción, sin embargo, este grupo funcional no se encuentra de manera accesible en las moléculas del anticuerpo, debido a que se necesitarían reducir los enlaces disulfuro que mantienen unido al anticuerpo, interfiriendo con su estructura y estabilidad, por lo que se debe generar utilizando un agente derivatizante como el *N*-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) permitiendo la introducción de grupos sulfhidrilo en las proteínas por la reacción con el éster de NHS (*N*-hidroxisuccinimida) y con los grupo amino, sin afectar los enlaces disulfuro del anticuerpo. Después de la modificación, el anticuerpo puede tratarse con un agente reductor suave para generar el grupo tiol en el conector unido a los anticuerpos y una vez realizado esto se dará la reacción con los liposomas que contienen un grupo reactivo unido al componente lipídico, como el DSPE-mPEG-maleimido, formando un enlace tioéter **(2-4, 8)**.



4.6. Radiomarcaje de liposomas.

Además de ser vectores de transporte de fármacos, los liposomas también pueden ser marcados con radionúclidos que permiten el monitoreo *in vivo* a través de técnicas de imagen molecular, lo que permite una aproximación teranóstica. Si los liposomas están cargados con algún fármaco quimioterapéutico se pueden radiomarcarse para verificar que la liberación del agente antitumoral se realice mayoritariamente en el tejido de interés y para el diagnóstico de la enfermedad. Con estas técnicas es posible determinar la biodistribución de una formulación liposomal **(57)**.

La elección del radionúclido para marcar al liposoma va a depender de la aplicación que se le dé, por ejemplo; para aplicaciones diagnósticas en tomas de imagen por SPECT (Tomografía por emisión de fotón único) se suelen utilizar elementos emisores de fotones como: ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6.02$ h), ^{111}In ($t_{1/2} = 67.31$ h) y ^{67}Ga ($t_{1/2} = 78.28$ h). Para imágenes en PET (Tomografía por emisión de positrones) se utilizan emisores de positrones (β^+) como ^{68}Ga ($t_{1/2} = 67.71$ min) o ^{18}F ($t_{1/2} = 109.77$ min). En las aplicaciones terapéuticas se pueden utilizar radionúclidos emisores β^- por ejemplo: ^{131}I ($t_{1/2} = 192.60$ h), ^{186}Re ($t_{1/2} = 89.24$ h) y ^{177}Lu ($t_{1/2} = 159.53$ h) **(57-59)**.

Una de las características que debe tener una formulación radiomarcada es tener una estabilidad radioquímica alta tanto en un ambiente *in vitro* como *in vivo* para prevenir la liberación anticipada del radionúclido libre. Adicionalmente, el tiempo de vida media físico del radionúclido debería ser compatible con el tiempo de vida media en circulación de los liposomas **(57)**.

4.6.1. Métodos de radiomarcaje.

Las técnicas de radiomarcado de liposomas se pueden dividir en tres categorías: 1) Encapsulación pasiva, 2) Marcaje en la membrana y 3) Encapsulación activa (Remote loading) **(59)**. En la encapsulación pasiva el radionúclido queda en el interior de las vesículas lipídicas durante la preparación. Debido a la baja eficiencia de radiomarcado (<10%), este método es muy poco usado. El marcaje en la membrana involucra la adición de un agente lipofílico que tenga una fuerte



interacción con la bicapa lipídica, este proceso se puede realizar antes de la formación de los liposomas, o después de la elaboración de las vesículas utilizando lípidos funcionalizados con un agente quelatante en la superficie de la bicapa. Estas metodologías presentan una desventaja, que es la poca estabilidad *in vivo*, ya que una vez dentro de circulación, al interactuar con proteínas plasmáticas (p.e. transferrina) se pueden transquelar y alterar la biodistribución de la formulación. La tercera categoría es la encapsulación activa, que consiste en realizar el radiomarcaje posterior a la elaboración de los liposomas, y esta puede ser mediante la incorporación de ionóforos o con la ayuda de un quelatante lipofílico (9, 57). Con estas técnicas se proveen altas eficiencias de encapsulación (>90%) y muestran un mejor comportamiento *in vivo*, debido a la protección que brindan los componentes lipídicos al radionúclido, previniendo su interacción con biomacromoléculas en el medio biológico (59-61). En la **Figura 11** se muestra un resumen de las técnicas de radiomarcado para liposomas.

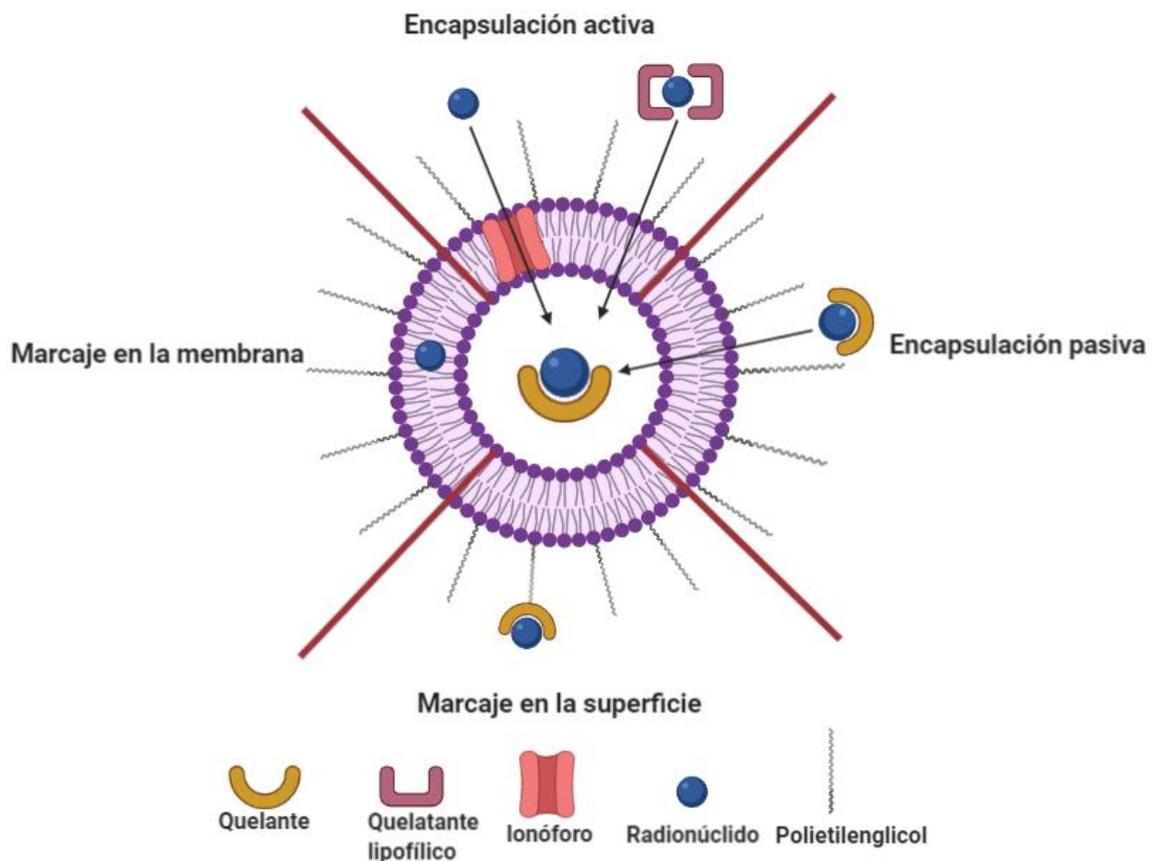


Figura 11. Esquema general de métodos de radiomarcado de liposomas.



Una manera de incorporar un radionúclido al espacio acuoso liposomal es mediante el uso de ionóforos, que son moléculas que permiten el transporte de iones metálicos (en este caso de radiometales) a través de la bicapa lipídica. Debido a la naturaleza metaestable de estos complejos, el radionúclido metálico se libera en el interior del liposoma y se une con un quelatante que ya ha sido previamente encapsulado, formando un complejo más estable **(60)**. Para poder realizar el transporte, los ionóforos deben asumir conformaciones críticas en donde los átomos de oxígeno se orientan hacia el catión, provocando que el exterior de la molécula presente una superficie rica en estructuras hidrocarbonadas **(62)**.

Se han probado varios ionóforos (quelatantes o transportadores lipofílicos) para radiomarcarse diferentes formulaciones liposomales. Un ejemplo de ello es el uso del ionóforo de calcio A23187 que ha sido utilizado para encapsular radionúclidos como ^{111}In , ^{67}Ga , ^{225}Ac y ^{223}Ra en los cuales se publicaron eficiencias de radiomarcado mayores al 90%. El ionóforo antes mencionado se encuentra embebido en la membrana liposomal, permitiendo el transporte de los radiometales al interior del liposoma **(60, 63, 64)**.

Otro tipo de quelatantes lipofílicos utilizados para encapsular radionúclidos al interior de liposomas son la 2-hidroxiquinoleína (2HQ) y la 8-hidroxiquinoleína (8HQ u oxina), que no requieren estar incorporados en la bicapa lipídica al momento de su elaboración **(57, 60)**. Petersen *et. al.* desarrollaron liposomas PEGilados radiomarcados con ^{64}Cu para imagen por PET, y en cuyo centro acuoso se encontraba el quelatante ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-*N, N', N'', N'''*-tetraacético (DOTA). Con esta metodología se propone que el ^{64}Cu es transportado a través de la membrana liposomal por el ionóforo 2HQ que, al llegar al espacio acuoso el radionúclido se unirá preferentemente con el DOTA pre-encapsulado, quedando atrapado en el interior de la vesícula. Se reporta una eficiencia de radiomarcado mayor al 99% después de la purificación **(61)**.

Se han encapsulado varios radionúclidos con la técnica descrita anteriormente y para distintas aplicaciones, tanto diagnósticas como terapéuticas. Un radionúclido que se utiliza como aproximación teranóstica es el ^{177}Lu **(65)**. Wang *et. al.* reportaron



una técnica en la que realizaron un radiomarcado de una formulación liposomal que encapsula al quelatante bifuncional ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), y como transportador de iones utilizaron oxina (8HQ) para incorporar ^{177}Lu al interior acuoso, donde formará un complejo más estable con el DTPA, quedando atrapado. La eficiencia de radiomarcaje fue de hasta el 80% con una pureza radioquímica mayor al 90%. En estudios de estabilidad *in vitro* en suero humano fue de 83% a las 72 horas del estudio. En estudios de biodistribución *in vivo* se observó la máxima acumulación en tumor a las 48 h. La vida media de circulación de estos liposomas fue de 11.5 h **(66)**.

4.6.2. Propiedades físicas y químicas del lutecio-177 y del DOTA.

El ^{177}Lu decae a ^{177}Hf estable por emisión de una partícula β^- con energía de 497 kEv y tiempo de vida media de 6.71 días, es adecuado para aplicaciones radioterapéuticas, además emite varios fotones gamma con energías de 208 kEv (11%) y 113 kEv (6.4%) que pueden ser usados para una evaluación diagnóstica por imagen molecular **(65, 67)**.

El lutecio es el último miembro de la serie de los lantánidos, con 71 electrones arreglados en la configuración $[\text{Xe}]4f^{14}5d^16s^2$. Durante una reacción química, los átomos de lutecio pierden los dos electrones más externos (6s) y el electrón de la capa 5d, generando especies catiónicas con carga 3+, siendo este el número de oxidación más común de este metal. Las sales de cloruro, nitrato, sulfato y acetato son solubles en agua, mientras que sales de fluoruro, oxido, hidróxido, carbonato, fosfato y oxalato son insolubles. En solución acuosa el lutecio forma una esfera de solvatación con 8 o 9 moléculas de agua **(65)**.

Los números de coordinación del lutecio van del 6-9, siendo 8 y 9 los más termodinámicamente estables. Tiene una fuerte tendencia para formar complejos con donadores fuertes de átomos como O y N. Dado el número de coordinación alto del lutecio (8,9), y que los complejos resultantes son más estables tanto con ligandos acíclicos (DTPA, EDTA, EDDA) y poliaminopolicarboxilatos cíclicos (DOTA, NOTA) que tienen 8 o 9 átomos donadores. El radio iónico del Lu^{3+} es de



0.861 Å **(65)**. El proceso de complejación se puede ver afectado por la presencia de otros iones metálicos como el Ca^{2+} , que requiere hasta 5 veces más la concentración de Lu^{3+} para poder competir por el DOTA, mientras que iones como el Fe^{2+} y Zn^{2+} a concentraciones equimolares de Lu^{3+} pudieron interferir con la formación del complejo **(68)**.

El DOTA es un quelatante cuya estructura es un anillo de doce miembros que contiene cuatro átomos de nitrógeno que están unidos a grupos de ácido carboxílico. Se ha publicado que el DOTA forma complejos con elementos del grupo de los lantánidos con valores de constante de estabilidad mayores que las correspondientes con DTPA ($\log K$ 25.4 y $\log K$ 22.6 respectivamente para lutecio) **(69-72)**. A pesar de que tanto los complejos de lutecio con DOTA y DTPA se han utilizado ampliamente en el desarrollo de radiofármacos, algunos complejos con DTPA han demostrado disociarse y liberar el radionúclido en condiciones fisiológicas **(65)**.

De acuerdo con datos obtenidos por cristalografía, la estructura molecular de este complejo con lutecio involucra a los cuatro átomos de nitrógeno junto con los cuatro átomos de oxígeno y aparte un oxígeno proveniente de una molécula de agua **(Figura 12) (72)**.

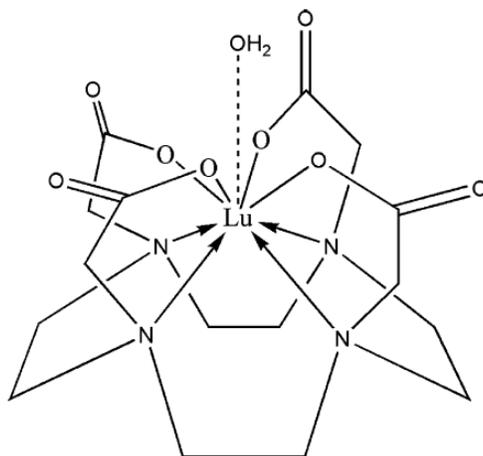


Figura 12. Estructura del complejo DOTA- Lu^{3+} . Se forma una estructura con geometría de antiprisma cuadrado cubierto en donde el plano basal lo ocupan los átomos de nitrógeno mientras que el plano que forma la cubierta lo ocupan los átomos de oxígeno del grupo carboxilo junto con una molécula de agua **(65)**.



El primer radiofármaco de lutecio aprobado por la FDA y la EMA es el [^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE (Lutathera®), el cual es un péptido (octreotato) unido a una molécula de DOTA que es responsable de la quelatación del lutecio. Este radiofármaco fue aprobado para el uso clínico en pacientes con tumores neuroendocrinos gastropancreáticos **(73)**.

4.7. *Diseño de experimentos en desarrollo de formulaciones liposomales.*

La calidad por diseño (QbD) es una aproximación sistemática basada en un análisis de riesgo en el desarrollo de productos y manufactura farmacéutica, en donde se busca asegurar la calidad y seguridad del producto en una fase temprana del desarrollo **(74, 75)**. La herramienta de QbD juega un importante papel en la optimización de sistemas de liberación de fármacos tanto del producto como del proceso al definir los siguientes factores **(75)**:

- A) Atributos Críticos de Calidad (ACC): % encapsulación, tamaño de partícula, potencial zeta, % eficiencia de atrapamiento, liberación del fármaco, etc.
- B) Parámetros Críticos del Proceso (PCP): Temperatura, Tiempo de hidratación, tiempo de sonicación, tiempo de incubación, etc.
- C) Atributos Críticos de Formulación (ACF): Peso molecular promedio de los componentes lipídicos, la carga del lípido, la proporción de: fosfolípidos, colesterol, surfactante, etc.

Por lo tanto, el objetivo de la herramienta de QbD es tener un profundo entendimiento de las variables de formulación y de proceso y la relación entre cada uno de los factores antes mencionados. A fin de estudiar la relación entre cada uno de los factores críticos de calidad de una manera matemática, se utiliza la estrategia del Diseño de Experimentos (DoE) **(74)**. El DoE es una preparación experimental que sirve para evaluar simultáneamente varios factores a un número dado de niveles en un número predeterminado de experimentos que estarán representados en una matriz a diferentes niveles de combinación **(76)**. Las técnicas de DoE son las más confiables debido a que se pueden lograr los objetivos deseados en una formulación como resultado de menos corridas experimentales, además de que en



procesos iniciales de monitoreo (screening) el diseño experimental permite reconocer las variables de entrada significantes de las que no son significantes **(75)**. El primer paso al momento de realizar un diseño experimental es definir las variables experimentales y las respuestas de medición. El siguiente paso es planear la experimentación y ejecutarla de tal manera que se obtenga la mayor cantidad de información con el mínimo de experimentos **(77)**.

Se han ocupado distintos tipos de diseños de experimentos para el desarrollo de formulaciones liposomales. Un ejemplo de la utilización de DoE fue el desarrollo de una formulación liposomal de riboflavina en su forma libre o complejada con ciclodextrina junto con la adición de distintos antioxidantes y protectores de la luz, incorporados en la bicapa lipídica o en el centro acuso. En este estudio se identificaron 11 factores, los cuales estaban relacionados con la formulación del sistema y con el proceso de elaboración. Se utilizó un diseño de Plackett-Burman para la identificación de los factores que resultan de mayor importancia para el desarrollo de esta formulación, con el objetivo de enfocarse en ellos. Los efectos más significativos de acuerdo con el diseño experimental fueron la presencia del protector solar aceite de rojo O, la riboflavina complejada con la ciclodextrina y el procedimiento de elaboración de las vesículas. Con base en estos resultados se pueden realizar estudios de optimización para encontrar mejores resultados realizando diseños con menos variables y menos corridas experimentales **(78)**.



5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a que las formulaciones liposomales para terapia contra el cáncer presentan una especificidad limitada al sitio tumoral, se requiere de un sistema inmunoliposomal estable que contenga un radionúclido de uso teranóstico, que se pueda utilizar para seguir el comportamiento *in vivo* del sistema de liberación y que además pueda ser usado para radioterapia interna. En este trabajo se plantea diseñar una metodología de radiomarcado del sistema inmunoliposomal con el radionúclido lutecio-177 (^{177}Lu), que es un emisor beta/gamma, el cual tiene potencial en la teranóstica del cáncer.

6. HIPÓTESIS.

La incorporación del radionúclido ^{177}Lu al espacio acuoso inmunoliposomal mediante la técnica de encapsulación activa utilizando el quelatante lipofílico 8HQ dará como resultado un sistema estable *in vitro*, con una alta pureza radioquímica.



7. OBJETIVOS.

El objetivo general de este proyecto es: ***Desarrollar una técnica eficiente y estable de radiomarcado con ^{177}Lu de inmunoliposomas cargados con cisplatino.***

Los objetivos específicos son:

- 1) Elaborar los sistemas liposomales e inmunoliposomales con base en el diseño experimental de Plackett-Burman y realizar la caracterización fisicoquímica.
- 2) Realizar el radiomarcado de los sistemas liposomales e inmunoliposomales con la técnica de encapsulación asistida por quelante lipofílico y determinar la estabilidad *in vitro* del radiomarcado en SSI y suero humano.
- 3) Evaluar la citotoxicidad del $^{177}\text{Lu}[\text{LuCl}_3]$ y del sistema inmunoliposomal radiomarcado en líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa y Ca Ski) y en las líneas A431 y MRC-5.



8. MATERIALES.

Componentes lipídicos: L- α -fosfatidilcolina hidrogenada de soya (HSPC), colesterol (Chol), 1,2-diasteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietileglicol)-2000] (mPEG), 1,2-diasteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[maleimido(polietileglicol)-2000] (PEG-mal) fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Estados Unidos).

La 8-hidroxiquinolina (8HQ u oxina), el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-*N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetraacético (DOTA), N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), el ácido etilendiamintetraacético (EDTA), dimetilformamida (DMF), *cis*-diaminodicloroplatino (II) (cisplatino, CDDP), la disolución amortiguadora HEPES, cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), tiocianato de amonio (NH_4SCN), *N,N'*-dietilditiocarbamato de sodio (DDTC), clorhidrato de hidroxilamina, fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Los solventes acetonitrilo, metanol grado HPLC y cloroformo grado reactivo fueron obtenidos de JT. Baker (Waltham, MA, Estados Unidos), el formaldehído grado reactivo fue obtenido de Reproquifin (Estado de México, México). Las columnas cromatográficas de exclusión molecular PD-10 (Sephadex G-25) fueron adquiridas de General Electric Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). Las membranas de diálisis Spectrapor 12-14000 MWCO fueron adquiridas de Spectrum Medical Industries (Nueva Delhi, India).

Las líneas celulares de trabajo (HELA, Ca Ski, A431 y MRC-5) fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos), mientras que el medio de cultivo DMEM-F12 y el suero fetal bovino se adquirieron de Gibco (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

Material radiactivo: El cloruro de lutecio-177 ($[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$) fue adquirido en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

Anticuerpo monoclonal: El nimotuzumab (CIMAher, Cuba) fue una donación por parte del Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Cancerología (INCan).



9. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

En la **Figura 13** se muestra un diagrama general de los experimentos que se realizaron en este trabajo.

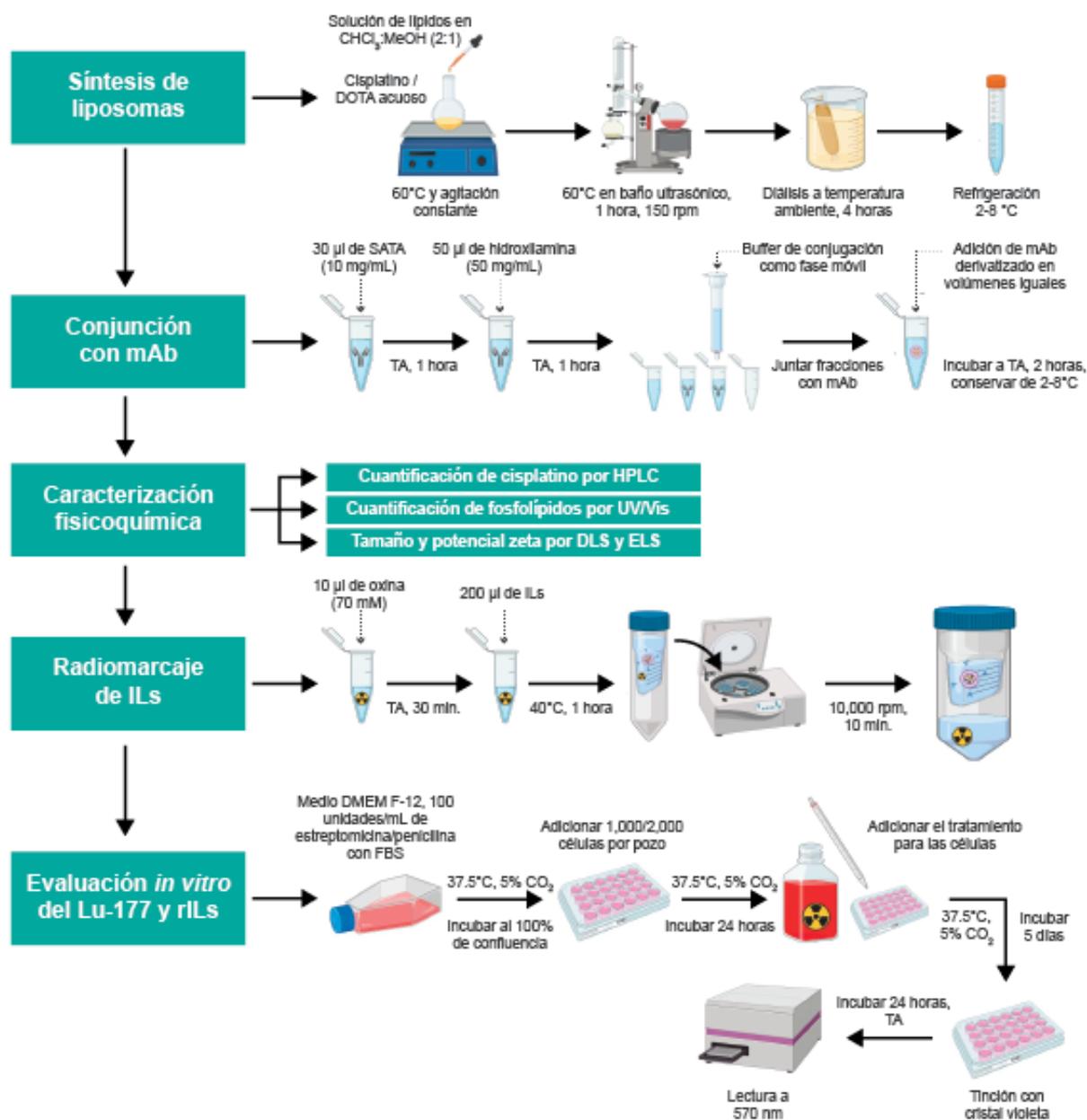


Figura 13. Diagrama general experimental.



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

La técnica que se utilizó para la elaboración de liposomas fue una modificación del método publicado por Szoka *et. al.* (79). Brevemente, se preparó una disolución de cisplatino en el amortiguador HEPES (pH 7.0), la cual fue calentada a 60°C y con agitación constante. En otro recipiente se disolvieron HSPC, Colesterol, mPE-PEG₂₀₀₀ y PEG-mal en una solución de cloroformo: metanol (2:1) a una proporción molar de 60:35:3:2. Se adicionó lentamente por goteo la solución de lípidos a la solución acuosa (aún en agitación y a 60°C) lentamente para no formar espuma. La emulsión que se formó fue trasvasada a un matraz de bola y llevada a un rotavapor (Heidolph, Schwabach, Alemania) a una velocidad de 150 rpm y a presión reducida. Todo el proceso se llevó a cabo en un baño ultrasónico (Modelo 2510, Branson Ultrasonics Co., Ltd., Shanghai, China) durante 1 h y a una temperatura de 60°C. La suspensión de liposomas fue enfriada a temperatura ambiente y colocada en un desecador por 24 horas a vacío. Los liposomas fueron dializados durante 4 horas (2 x 2h) utilizando disolución salina como medio. La elaboración de liposomas blanco se realizó de la misma manera, pero sin la carga del cisplatino.

9.2. *Elaboración de inmunoliposomas.*

9.2.1. *Derivatización del mAb.*

Se preparó una solución del reactivo SATA en DMF a una concentración de 10 mg/mL. Se adicionaron 30 µL de esta solución por cada 1 mL de mAb. Se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se conservó a refrigeración 2-8°C.

9.2.2. *Desprotección del grupo sulfhidrido.*

Se preparó una disolución de clorhidrato de hidroxilamina a una concentración de 50 mg/mL en una disolución amortiguadora de Conjugación (fosfato dibásico de sodio 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.6). Posteriormente se adicionaron 100 µL de



disolución de hidroxilamina por cada mL de mAb derivatizado. Se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante.

9.2.3. Purificación del mAb derivatizado y desprotegido.

Inmediatamente después del tiempo de reacción para la desprotección se hicieron pasar los mAbs derivatizados a través de una columna PD-10, acondicionada con 30 mL de buffer de conjugación, siendo esta misma la fase móvil. Se colectaron fracciones de 1 mL y se midió la absorbancia a 280 nm a cada una de ellas. Se reunieron todas las fracciones de mayor relevancia ($Abs_{280} \geq 0.4$) en una sola, cuya concentración final en todos los casos debe ser mayor a 2.5 mg/mL.

9.2.4. Conjugación de mAb a liposomas.

Después de la purificación de los anticuerpos derivatizados y desprotegidos, se mezclaron volúmenes iguales del mAb y de la suspensión liposomal. Se incubaron a temperatura ambiente bajo agitación constante durante 2 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se conservó la suspensión en refrigeración a 2-8°C.

9.3. Caracterización fisicoquímica de los liposomas.

9.3.1. Tamaño de partícula.

Para la determinación del tamaño de partícula se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés). Se lavaron celdas de plástico 2 veces con KCl 10 mM previamente filtrado a través de membranas de 0.22 μm (Millex GV, Merck), con el fin de remover partículas de polvo que pudieran interferir en la lectura. Se llenaron las celdas con KCl 10 mM y se agregaron 20 μL del estándar o de la muestra. Se resuspendió la muestra y se realizó la lectura en un equipo 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments Co., Holtsville, NY, Estados Unidos). El correcto funcionamiento del equipo se verificó mediante la medición de un estándar de partículas de poliestireno (Nanosphere, Thermo Scientific). La lectura del estándar debe ser: 92 ± 3.7 nm.



9.3.2. *Potencial zeta.*

El método utilizado para la determinación de potencial zeta fue la dispersión de luz electroforética (ELS). Se lavaron las celdas 2 veces con KCl 1 mM previamente filtrado. Se llenó con aproximadamente 1.0 mL de KCl y fueron agregados 30 μ L de la muestra, se resuspendieron y se les colocó un electrodo cuidando que no se formen burbujas, se conectó el electrodo y se leyó la muestra en un equipo 90 PLUS/BI-MAS.

Para la medición del estándar de referencia se lavó la celda y se llenó aproximadamente con 1.0 mL de una solución de 5 mg/20 mL (0.25 mg/mL) del estándar BIZR3 (Brookhaven Instruments, Estados Unidos), se colocó el electrodo y se leyó la muestra. La lectura del estándar debe ser de -53 ± 4 mV.

9.3.3. *Cuantificación de fosfolípidos.*

Se realizó la cuantificación de fosfolípidos con una modificación del método publicado por Stewart **(80)**. Se tomaron 10 μ L de muestra y se llevaron a 100 μ L con agua desionizada, seguido de agitación en vortex por un minuto. Se tomaron 20 μ L de la dilución anterior y se llevaron a sequedad. Se añadieron 15 μ L de agua desionizada, se agitó 1 minuto en vórtex y se repite el proceso de secado. Una vez secas las muestras fueron resuspendidas en 750 μ L de cloroformo y se agitó en vórtex por 2 minutos. Se agregaron 750 μ L de ferrotiocianato de amonio, se agitaron en vórtex 1 minuto y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos a una temperatura de 4°C (Centrifuge 5702 R, Eppendorf Estados Unidos). La fase acuosa fue retirada y de la fase orgánica se tomaron aproximadamente 700 μ L que se depositaron en la celda de cuarzo y se leyó a 488 nm en un espectrofotómetro (DU 530 Beckman Coulter, Estados Unidos).

Para la preparación del ferrotiocianato de amonio (NH_4FeSCN) se disolvieron 27.03 g de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Alemania) y 30.4 g de tiocianato de amonio (NH_4SCN) (Sigma-Aldrich, Alemania) en 1 L de agua desionizada. La solución se guardó en un frasco ámbar.



9.3.4. Cuantificación de cisplatino.

Se utilizó la metodología de extracción de cisplatino liposomal previamente publicada en el laboratorio **(25, 81)** con algunas modificaciones, las cuales se describen brevemente: Se preparó una dilución 1:100 de la muestra de liposomas. Se tomaron 100 μL y se mezclaron con 400 μL de acetonitrilo; se agitó en vórtex y se centrifugó durante 10 minutos a una temperatura de 4°C y 10,000 rpm (Zentrifugen Mikro 22R Hettich, Alemania). Se tomaron 400 μL del sobrenadante y se pasaron a un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL. Las muestras fueron secadas a una temperatura de 40°C y bajo corriente de N_2 . Una vez secas, las muestras fueron resuspendidas en 100 μL de solución salina, se agitaron en un vórtex y se agregaron 10 μL de NiCl_2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 10 μL de DDTc al 10% en NaOH 0.1 M. Las muestras fueron agitadas e incubadas durante 30 minutos a 37°C y 500 rpm en una placa de calentamiento con agitación (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se agregaron 100 μL de cloroformo, se agitaron 3 minutos en vórtex y se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm a 4°C . Se tomó una alícuota de 50 μL de la fase orgánica y se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se llevó a sequedad bajo corriente de N_2 y temperatura ambiente. Se adicionaron 50 μL de acetonitrilo y se agitó vigorosamente durante 5 minutos. Se inyectaron 20 μL de la muestra al cromatógrafo.

La cuantificación de cisplatino se realizó por HPLC en un equipo Waters 650E (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) con un inyector con loop de 20 μL (Rheodyne, Cotati, CA, Estados Unidos) y un detector UV/Vis 486. Las condiciones cromatográficas fueron:

Columna: Symmetry C-18 (4.6 X150 mm) 5 μm

Flujo: 1.8 mL/min

Temperatura: 23°C

Fase móvil: Agua/MeOH/Acetonitrilo (27:45:28)

Volumen de inyección: 20 μL



T_R cisplatino: 3.02 min

T_R NiCl₂: 4.01 min

Tiempo de corrida: 7 min

Longitud de onda: 254 nm

Con los datos de concentración de cisplatino y fosfolípidos fueron calculados la eficiencia de encapsulación (EE) y la eficiencia de carga (EC) usando las siguientes relaciones:

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de CDDP encapsulado (mg)}}{\text{Cantidad inicial de CDDP (mg)}} \times 100$$

$$EC (\%) = \frac{\text{Concentración de CDDP encapsulado } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\text{Concentración de lípidos } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \times 100$$

9.4. Radiomarcado de liposomas.

Se adicionaron 10 μL de 8-hidroxiquinoleina (70 mM) en etanol a un tubo que contenía [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ en un volumen aproximado de 10 μL con una actividad aproximada de 0.1-0.3 mCi, se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 μL de los liposomas previamente elaborados, y se dejan incubando a una temperatura de 40° C por 60 min. Después se purificaron y concentraron los liposomas radiomarcados por ultrafiltración utilizando filtros Amicon de 3 K (Merk Millipore, Estados Unidos) de 0.5 mL, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos (Mini Spin, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), adicionando 100 μL de solución amortiguadora de HEPES para filtrar el ¹⁷⁷Lu no encapsulado. La eficiencia de radiomarcado se determinó utilizando un activímetro (Deluxe Isotope Calibrator II, Nuclear Associates, Estados Unidos) midiendo la actividad inicial y la actividad asociada a los liposomas

Una vez purificados los liposomas radiomarcados, se toma una muestra de 2 μL y se deposita en un extremo de una placa de ITLC previamente activada a 100°C y



conservada en un ambiente seco por 24 h. Se hace el corrimiento cromatográfico utilizando solución salina isotónica como fase móvil. Una vez realizada la elución de la fase móvil por la placa, esta se deja secar y se corta por la mitad y ambas partes son medidas en un contador de centelleo (Model 2200 Scale Ratemeter, Ludlum, Estados Unidos). Se espera que la mayor actividad se encuentre en la parte inferior de la placa (Bottom) que en la superior (Top), por lo que el cálculo de la pureza radioquímica queda determinado por:

$$\text{Pureza radioquímica (\%)} = \frac{\text{cpm Bottom}}{\text{cpm Top} + \text{cpm Bottom}} \times 100$$

9.5. Estabilidad *in vitro* en suero humano.

La estabilidad *in vitro* se llevó a cabo tanto en disolución salina al 0.9% como en suero humano a los cuales se adicionaron 0.2 mCi de liposomas o inmunoliposomas radiomarcados con la técnica descrita anteriormente. Para la estabilidad en suero, las muestras se mantuvieron en incubación a una temperatura de 37°C durante todo el estudio. Se tomaron muestras de 20 µL a las 0, 0.5, 1, 3, 6, 18 y 24 horas y se depositaron en un extremo de una placa de ITLC. Se hace el corrimiento cromatográfico utilizando disolución salina isotónica como fase móvil. Una vez realizada la elución de la fase móvil por la placa, esta se deja secar y se corta por la mitad y ambas partes son medidas en un contador de centelleo (Model 2200 Scale Ratemeter, Ludlum, Estados Unidos). Se espera que la mayor actividad se encuentre en la parte inferior de la placa (Bottom) que en la superior (Top), por lo que el cálculo de la estabilidad *in vitro* queda determinado por:

$$\text{Estabilidad en liposomas (\%)} = \frac{\text{cpm Bottom}}{\text{cpm Top} + \text{cpm Bottom}} \times 100$$



9.6. *Diseño experimental de Plackett-Burman.*

9.6.1. *Diagrama de Ishikawa.*

Una de las herramientas que se utilizan comúnmente dentro de la gestión de riesgos en la industria farmacéutica y que es útil para la identificación de los atributos críticos de calidad, formulación y proceso, es el diagrama de espina de pescado o diagrama de Ishikawa (75). El diagrama de Ishikawa para la elaboración de inmunoliposomas radiomarcados en el laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular se muestra en la **Figura 14**.

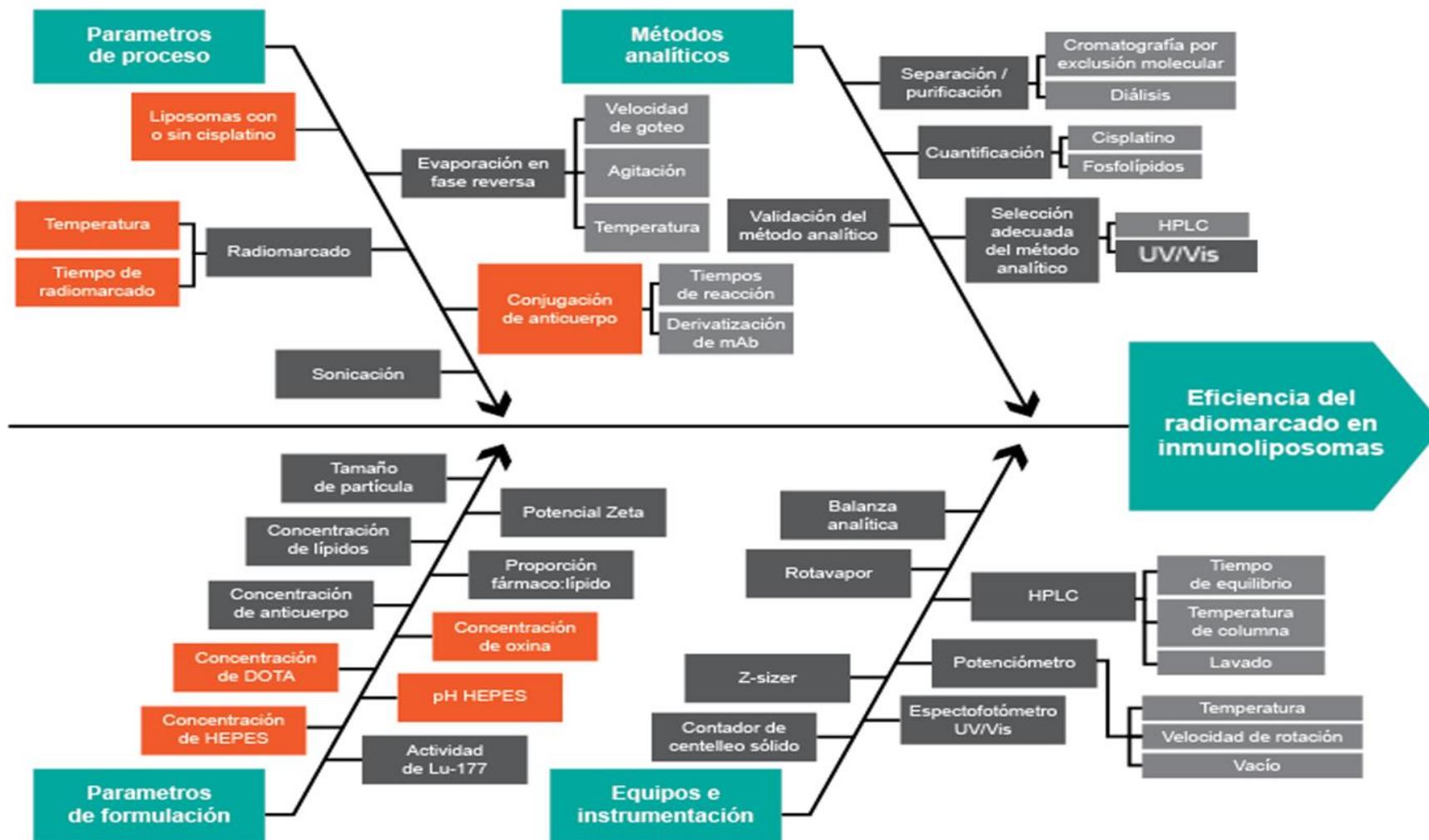


Figura 14. Diagrama de Ishikawa para la elaboración de Inmunoliposomas cargados con cisplatino y radiomarcados con ^{177}Lu . En este diagrama se encuentran marcados en rojo las variables elegidas a estudiar por diseño de experimentos.



Para este estudio se identificaron 8 variables que pueden ser significantes en la elaboración de inmunoliposomas radiomarcados, y estos son:

- 1) Liposomas con o sin cisplatino
- 2) La temperatura de incubación
- 3) El tiempo de incubación del radiomarcado
- 4) Conjugación del mAb
- 5) Concentración de oxina
- 6) Concentración de DOTA
- 7) pH de la solución amortiguadora de HEPES
- 8) Concentración de HEPES

9.6.2. Matriz experimental de Plackett-Burman.

Una matriz experimental de Plackett-Burman (PB) es un diseño factorial altamente fraccionado que nos permite estudiar varios factores con el mínimo de corridas experimentales y con ello, obtener la mayor información de nuestro espacio de diseño. Este diseño nos permite examinar hasta un máximo de $f = N - 1$ factores en N experimentos, donde N es un múltiplo de 4 ($N = 8, 12, 16, 20, \dots$). Cuando N excede el número de factores reales a estudiar, las columnas restantes del diseño experimental de PB se definen como factores dummy, en donde un cambio entre los niveles -1 y +1 no tienen un significado fisicoquímico **(76)**. Con base en las variables de estudio identificadas con el diagrama de Ishikawa, se asignaron los valores altos (+1) y bajos (-1), quedando de esta forma en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Niveles de las variables de estudio.

<i>Variable</i>	<i>Nivel bajo (-1)</i>	<i>Nivel alto (+1)</i>	<i>Unidades</i>
Concentración DOTA	10	20	mM
Concentración 8HQ	60	70	mM
Concentración buffer HEPES	5	15	mM
pH buffer HEPES	6	8	na
Temperatura de radiomarcado	30	40	°C
Tiempo radiomarcado	30	60	min
Presencia de cisplatino	Ausencia	Presencia	na
Presencia de anticuerpo	Ausencia	Presencia	na



En el presente trabajo se diseñó una matriz de Plackett-Burman para 8 factores, la cual fue generada y posteriormente analizada utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia), siendo la eficiencia de radiomarcado la respuesta a ser analizada. La matriz generada se muestra en la **Tabla 2**. Las corridas experimentales fueron ejecutadas de manera aleatoria.

Tabla 2. Matriz experimental de Plackett-Burman.

Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8
Conjugación de anticuerpo	[DOTA] (mM)	[8HQ] (mM)	[HEPES] (mM)	pH HEPES	Temperatura (°C)	Tiempo radiomarcado (min)	Presencia de cisplatino
1	1	-1	1	1	1	-1	-1
-1	1	1	-1	1	1	1	-1
1	-1	1	1	-1	1	1	1
-1	1	-1	1	1	-1	1	1
-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

9.7. Estudios de viabilidad celular.

9.7.1. Cultivos celulares.

Fueron cultivadas las líneas celulares de carcinoma cervicouterino HeLa y Ca Ski, la línea celular de carcinoma epidermoide vulvar A-431 y la línea celular normal de fibroblasto de pulmón MRC-5. Se utilizó como control positivo a la línea celular A431 debido a la sobreexpresión del receptor EGFR, como control negativo a la línea celular normal de fibroblasto de pulmón MRC-5 ya que presenta niveles basales de dicho receptor, las líneas celulares de estudio fueron HeLa y Ca Ski. Se cultivaron



en el medio DMEM-F12 con 100 unidades/mL de estreptomina/penicilina y suplementados con suero fetal bovino al 10%. Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ para su proliferación.

9.7.2. Curvas de viabilidad celular del [¹⁷⁷Lu]LuCl₃.

Para los ensayos de citotoxicidad del radionúclido libre, fueron sembradas un número determinado de células en placas de 24 pozos: 1000 células/pozo para HeLa y 2000 células/pozo para A431, Ca Ski y MRC-5. Se dejaron acondicionar por un tiempo de 24 h antes del ensayo. Se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco que contenía diferentes actividades de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃, expresado comúnmente como MBq/mL (**82**) (0.01-10.0 MBq/mL). Después de 5 días de incubación se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con una disolución amortiguadora de fosfatos (PBS; NaCl 139.9 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KCl 2.68 mM y KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 7.4) seguido de una solución de formaldehído al 10% en PBS, esto con el fin de fijar las células. Posteriormente se retiró el formaldehído y se adicionaron 500 µL de cristal violeta a cada pozo. Se dejaron incubando a temperatura ambiente por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el cristal violeta y se realizaron 2 lavados con PBS y se adicionó 1 mL de ácido acético al 33% y se agitó a 150 rpm durante 15 minutos. Se transfirieron 100 µL a una placa 96 pozos y se determinó la absorbancia (Abs) a 570 nm en un equipo lector de placas para ELISA (Multiskan Fc, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El porcentaje de células que sobrevivieron se calculó con la siguiente expresión:

$$Viabilidad (\%) = \frac{Abs_{células\ tratadas}}{Abs_{células\ control}} \times 100$$

La actividad inhibitoria 50 (AI₅₀) se define como la actividad del radionúclido que es necesaria para alcanzar el 50% de la inhibición de la replicación celular en estudios *in vitro* y fue calculada usando el software Sigma Plot V10 (Systat Software Inc, SJ, California). Se tomaron fotografías de las células utilizando una cámara Canon EOS REBEL T3i, con un aumento de 10X con un filtro color verde.



9.7.3. Evaluación del sistema inmunoliposomal radiomarcado.

Para la evaluación del sistema inmunoliposomal radiomarcado, se utilizaron las 4 líneas celulares y el tratamiento descrito previamente. Con base en los resultados de AI_{50} obtenidos del ensayo de citotoxicidad del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$, se probaron distintas actividades de IL's radiomarcados y cargados con cisplatino para Caski y MRC-5 (0.15 MBq/mL y 0.3 MBq/mL $AI_{12.5}$ y AI_{25} respectivamente) y para A431 y HeLa (0.3 MBq/mL y 0.6 MBq/mL $AI_{12.5}$ y AI_{25} respectivamente). Este tratamiento se comparó con IL's blanco sin radiomarcado e IL's cargados con cisplatino sin radiomarcado, con un tiempo de incubación de 5 días. También se compararon distintos tiempos de incubación (3 h, 24 h y 5 días) del sistema inmunoliposomal cargado con cisplatino y radiomarcado. Se corrió un control con SSI. Se determinó el porcentaje de células que sobrevivieron con la misma expresión utilizada en el ensayo previo.

9.8. Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza simple (ANOVA) y una prueba *pos hoc* de Bonferroni para encontrar diferencias entre grupos con un nivel de significancia de $p < 0.05$ (Statgraphics Technologies Inc., The Plains, Virginia).



10. RESULTADOS.

10.1. *Caracterización fisicoquímica de los lotes de liposomas e IL's para el diseño experimental de Plackett-Burman.*

Se obtuvieron 12 lotes de liposomas/inmunoliposomas de acuerdo con la matriz de Plackett-Burman (**Tabla 2**). Los resultados de la caracterización fisicoquímica se enlistan en la **Tabla 3**. Los tamaños de partícula, expresado como radio hidrodinámico, fueron de 141.57 ± 7.58 nm, 146.70 ± 24.77 nm, 118.70 ± 5.60 nm y 136.30 ± 31.55 nm con un índice de polidispersión de 0.215, 0.195, 0.217 y 0.204 para Liposomas blanco, ILs blanco, Liposomas-CDDP e IIs-CDDP, respectivamente.

El potencial zeta (ζ) fue de -39.55 ± 1.65 mV, -37.26 ± 5.10 mV, -34.35 ± 6.66 mV, -41.10 ± 3.00 mV para Liposomas blanco, ILs blanco, Liposomas-CDDP e IIs-CDDP, respectivamente. La concentración de fosfolípidos se mantuvo entre 34 - 35 mg/mL para todos los lotes.

La concentración de cisplatino fue de 818.91 ± 17.86 μ g/mL para liposomas y 942.80 ± 142.46 μ g/mL para ILs. La eficiencia de encapsulación (%EE) fue de 9.57% para liposomas y 11.52% para ILs con una eficiencia de carga (%EC) de 2.38% y 2.72%, respectivamente; ambos valores se encuentran dentro del intervalo que reportan Minematsu y colaboradores (**1**).

Tabla 3. Caracterización Fisicoquímica de lotes de liposomas e IL's para el diseño experimental de Plackett-Burman. Los valores se expresan como el promedio \pm DE (n=3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Liposomas blanco	ILs Blanco	Liposomas CDDP	ILs CDDP
Tamaño de partícula (nm)	141.57 ± 7.58	146.70 ± 24.77	118.70 ± 5.60	136.30 ± 31.55
Potencial ζ (mV)	-39.55 ± 1.65	-37.26 ± 5.10	-34.35 ± 6.66	-41.10 ± 3.00
[Fosfolípidos] (mg/mL)	34.59 ± 1.15	35.16 ± 0.43	34.35 ± 0.56	34.76 ± 1.17
[Cisplatino] (μ g/mL)			818.91 ± 17.86	942.80 ± 142.46
%EE			9.57 ± 1.34	11.52 ± 1.42
%EC			2.38 ± 0.04	2.72 ± 0.41



10.2. Determinación de la influencia de las 8 variables en la eficiencia de radiomarcado.

10.2.1. Gráfico de Pareto para los efectos.

El gráfico de Pareto muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de importancia. La longitud horizontal de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido por su error estándar. El incremento a lo largo de la línea vertical se utiliza para indicar las variables de relevancia que determinan un efecto estadísticamente significativo. Cualquier barra que se extienda más allá de la línea (azul) corresponde a efectos que son estadísticamente significativos con un 95.0% de nivel de confianza **(78)**. La **figura 15** muestra el gráfico de Pareto para los efectos principales de las 8 variables seleccionadas para realizar el diseño experimental de Plackett-Burman.

En nuestro caso, cuatro variables resultaron ser estadísticamente significativas ($p < 0.05$, $n=2$): la temperatura utilizada durante el radiomarcado ($p=0.0004$), la presencia de anticuerpo ($p=0.0052$), el tiempo de radiomarcado ($p=0.0398$) y el pH de la solución amortiguadora HEPES ($p=0.0485$).

Las concentraciones de DOTA, de la solución amortiguadora HEPES y de oxina, así como la presencia del cisplatino no juegan un papel importante en cuanto a la eficiencia de radiomarcado para este sistema inmunoliposomal.

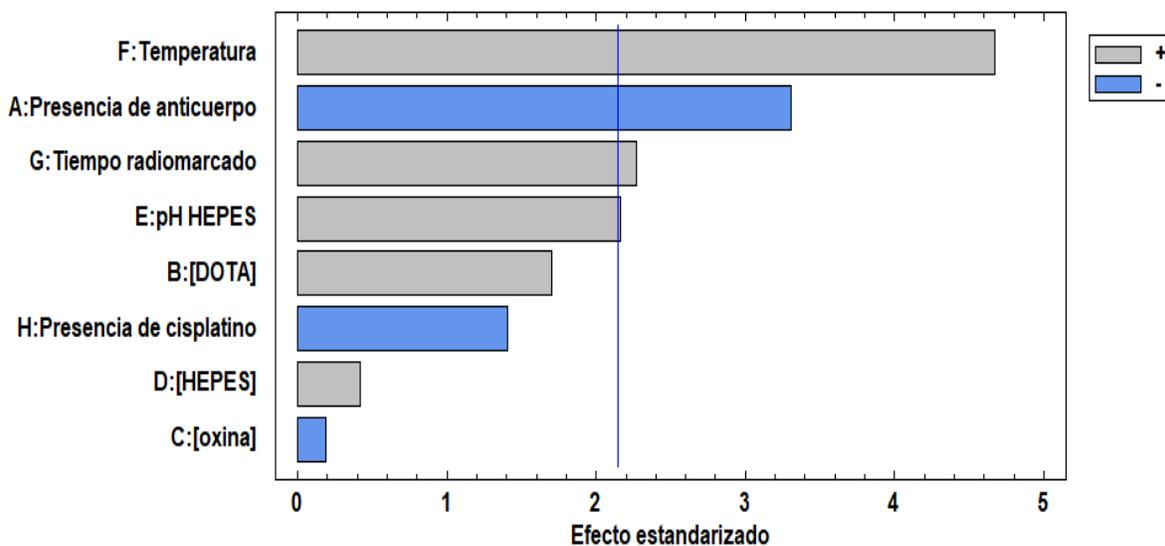


Figura 15. Gráfico de Pareto para las 8 variables evaluadas. La línea (azul) vertical indica el umbral para una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.05$, $n=2$). El color de las barras indica el efecto de las variables en la eficiencia de radiomarcado, siendo el (+) la presencia o incremento y el (-) ausencia o disminución.

10.2.2. *Coefficientes de regresión del modelo experimental.*

Después de realizar las 12 corridas experimentales y obtener los datos de la eficiencia de radiomarcado, lo siguiente es la determinación de los coeficientes de regresión, utilizando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia). Los coeficientes pueden ser utilizados para la predicción de la respuesta, mediante una ecuación lineal múltiple, los cuales se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Coeficientes de regresión del diseño experimental de PB para la eficiencia de radiomarcado.

<i>Coeficiente</i>	<i>Estimado</i>
Constante (b)	-77.960
A: Presencia de anticuerpo	-7.046
B: [DOTA]	0.728
C: [oxina]	-0.081
D: [HEPES]	0.177
E: pH HEPES	4.541
F: Temperatura	1.994
G: Tiempo radiomarcado	0.318
H: Presencia de cisplatino	-3.084



Por lo tanto, la ecuación que predice el comportamiento de este diseño experimental queda de la siguiente forma:

$$\%Eficiencia = -77.96 - 7.046A + 0.728B - 0.081C + 0.177D + 4.541E + 1.994F + 0.318G - 3.084H$$

El valor de R^2 de este modelo matemático es de 0.772, es decir que explica un 77.2% de la variabilidad de la eficiencia, lo cual es un valor bastante aceptable como predictor de la respuesta en nuestro modelo experimental ($R^2 > 0.5$).

10.3. Eficiencia de radiomarcado y pureza radioquímica.

De acuerdo con los resultados del diseño experimental de Plackett-Burman, se encontró que uno de los factores que más afecta la eficiencia de radiomarcado es la temperatura, por ello, se realizaron radiomarcajes de liposomas/inmunoliposomas a las temperaturas de 50°C y 55°C, durante 1h de incubación. La comparación de los distintos sistemas liposomales a distintas temperaturas de radiomarcado se muestran en la **Figura 16**. Se observa que al aumentar la temperatura hasta 50°C hay un aumento estadísticamente significativo de la eficiencia de radiomarcado en todos los sistemas liposomales. No hay diferencias significativas entre los 50°C y los 55°C.

La eficiencia de radiomarcado para liposomas blanco fue de 86.85% \pm 0.50%, para inmunoliposomas blanco fue de 35.50% \pm 1.13% y para inmunoliposomas cargados con cisplatino fue de 42.51% \pm 0.57%. La pureza radioquímica de los lotes analizados se encuentra por encima del 90%, por lo que se considera que es un sistema radioquímicamente puro y es apto para el uso en los futuros experimentos.

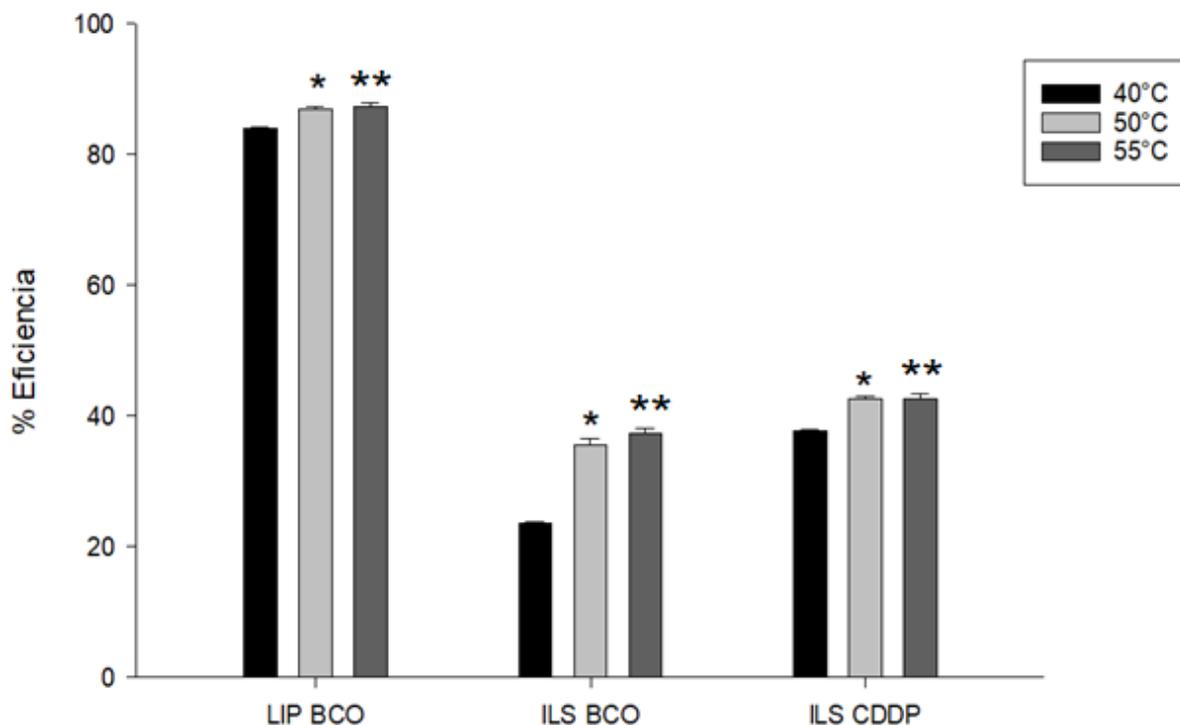


Figura 16. Eficiencia de radiomarcado de liposomas/inmunoliposomas. Se muestran los resultados expresados como el % Eficiencia junto con las barras de error que representan la Desviación Estándar ($n=2$ repeticiones, $p<0.05$). El (*) y el (**) indican la diferencia significativa con respecto a la temperatura de 40°C.

10.4. Estabilidad *in vitro* del radiomarcado.

Los resultados estabilidad para liposomas blanco, inmunoliposomas blanco e inmunoliposomas cargados con cisplatino se muestran en la **Figura 17**. En esta figura, puede observarse que hay una disminución entre un 2 y 4% de la actividad inicial del radionúclido a las 3 h del estudio, y hasta un 5% después de las 24 h. Los liposomas e inmunoliposomas mostraron un comportamiento similar tanto en SSI como en suero humano (37°C) al no encontrar diferencias estadísticamente significativas.

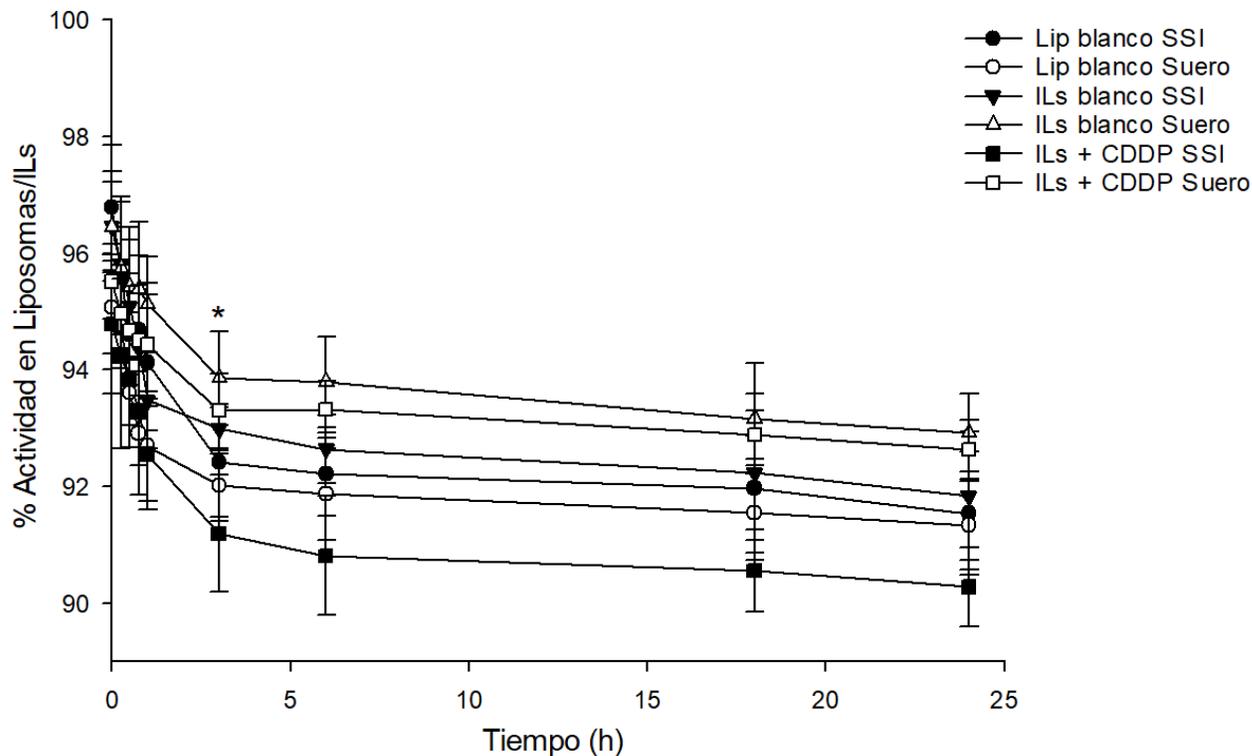


Figura 17. Estabilidad del radiomarcado en donde cada punto es una medición a distintos tiempos de muestreo. Se expresan como % de actividad dentro del sistema liposomal durante las 24 h de estudio. El gráfico muestra el promedio del porcentaje y las barras de error representan la Desviación Estándar ($n=3$, $p<0.05$). El * indica la diferencia estadística significativa con respecto a la actividad inicial.

10.5. Viabilidad celular del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$.

La viabilidad celular se determinó en términos de la actividad inhibitoria al 50% (AI_{50}). En la **Figura 18** se muestran fotografías representativas de las distintas líneas celulares cuando son expuestas a diferentes actividades de radionúclido, y se comparan contra un control que no fue expuesto al material radioactivo (SSI). Con las imágenes se puede apreciar que hay una disminución gradual en la población de células conforme aumenta la actividad de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$.

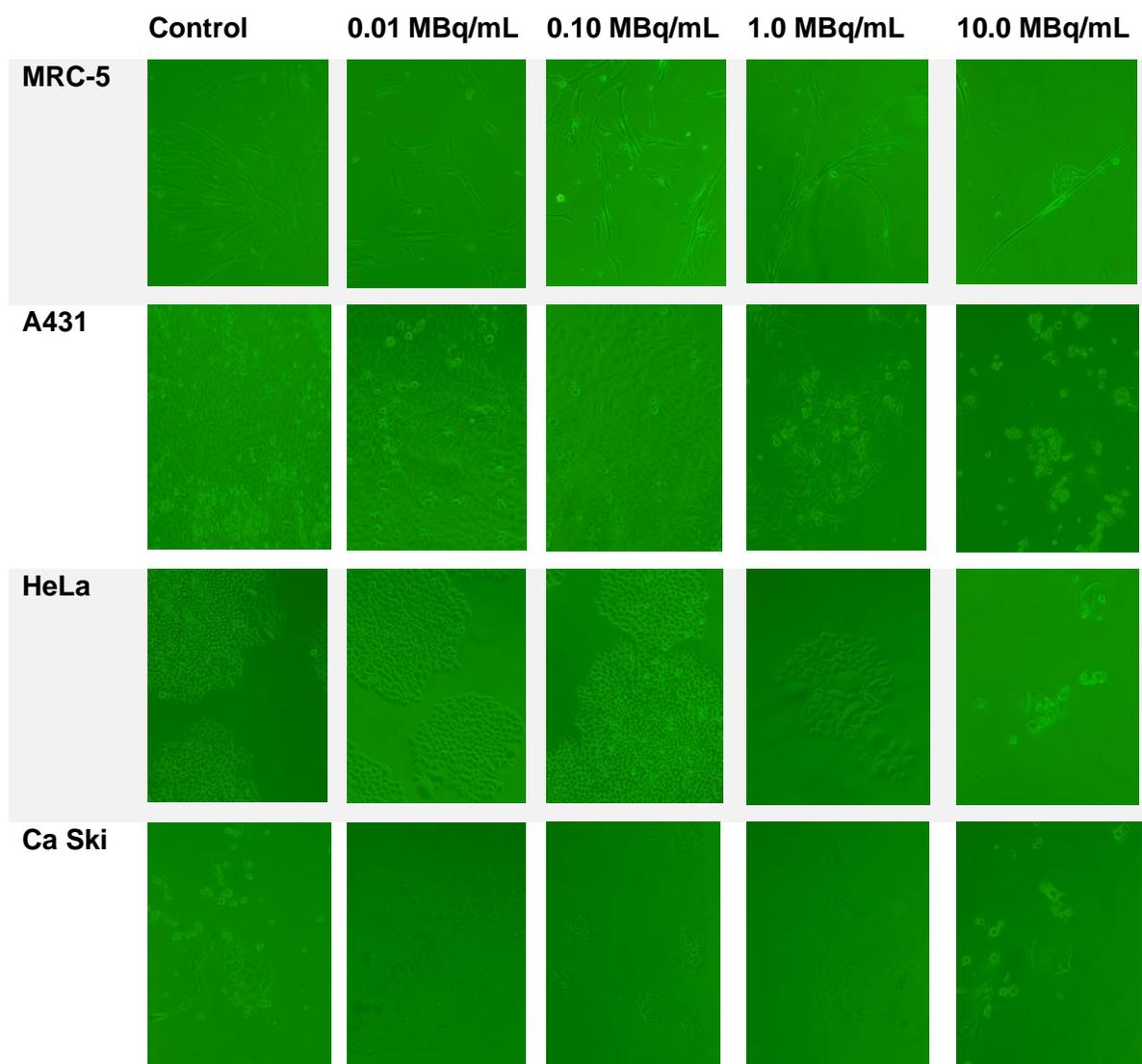


Figura 18. Fotografías representativas de las líneas celulares al exponerse al radionúclido, obtenidas con un microscopio óptico invertido. De izquierda a derecha el control de células sin tratamiento seguido de la actividad creciente de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$. De arriba hacia abajo las líneas celulares MRC-5, A431, HeLa y Ca Ski.

En la **Figura 19**, se muestra el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la actividad por mililitro (MBq/mL) de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ para cada línea celular. Los valores calculados de AI_{50} para las distintas líneas celulares fueron: 1.38 MBq/mL para MRC-5, 1.92 MBq/mL para A431, 1.81 MBq/mL para HeLa y 1.49 MBq/mL para Ca Ski.

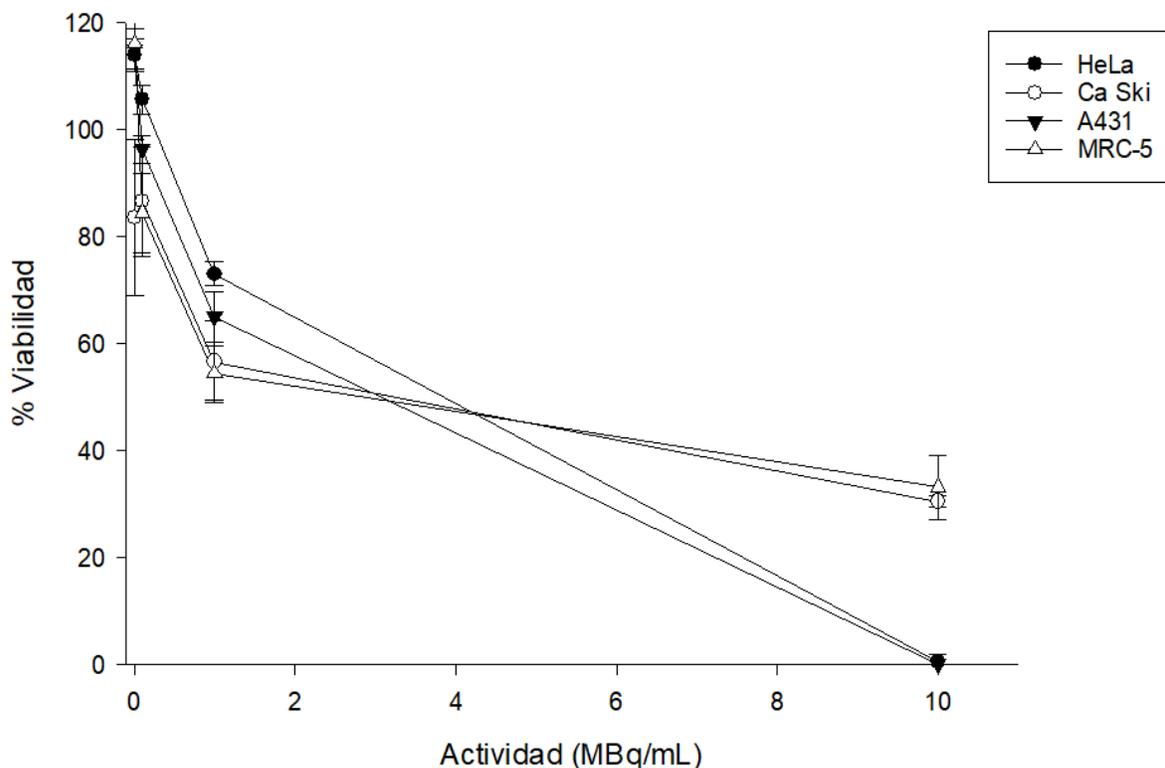


Figura 19. Citotoxicidad de las diferentes líneas celulares expuestas al $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ durante 5 días. Cada punto representa el % de viabilidad celular a las distintas actividades del radionúclido para las distintas líneas celulares y las barras de error representan la Desviación Estándar (n=3).

10.6. Evaluación del sistema inmunoliposomal radiomarcado con $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$.

La evaluación de los distintos tratamientos en las líneas celulares y el tratamiento con IL's radiomarcados a distintos tiempos se muestran en las **Figuras 20 y 21** respectivamente, en donde se muestra el % de viabilidad con respecto a cada tratamiento. No se presentan los datos obtenidos con la $\text{AI}_{12.5}$, debido a que no presentaron diferencia significativa con respecto a la AI_{25} .

En la comparación con distintos tratamientos con incubación de 5 días y una AI_{25} , se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control con SSI (no mostrado en las Figuras) y los IL's cargados con cisplatino en las líneas celulares MRC-5 y HeLa y los IL's radiomarcados y cargados con cisplatino para la



línea celular MRC-5. En los demás grupos no se observaron diferencias significativas.

Con respecto a la comparación de los IL's radiomarcados y cargados con cisplatino, se observan diferencias estadísticamente significativas a partir de las 24 h de incubación en la línea celular MRC-5. No se observan diferencias significativas en otras líneas celulares.

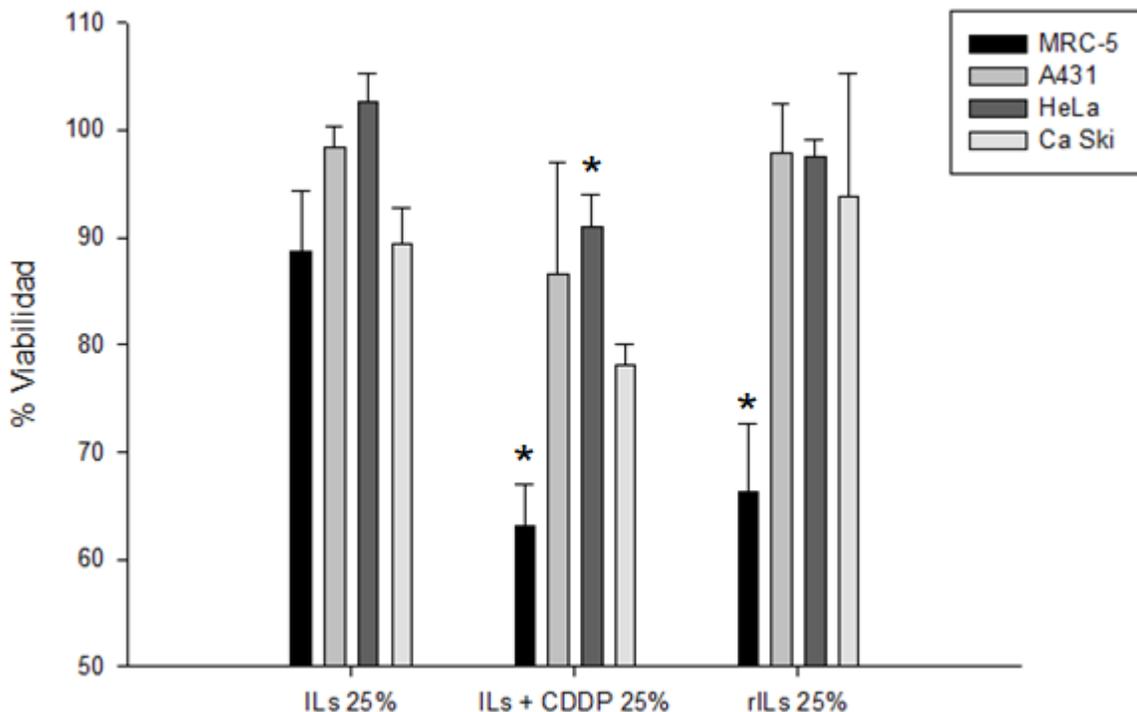


Figura 20. Porcentaje de viabilidad celular donde se comparan 3 distintos tratamientos incubados durante 5 días: IL's blanco, IL's con cisplatino y rIL's con cisplatino. El (*) indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al control con SSI (datos no mostrados) y las barras de error representan la Desviación Estándar ($n=3$, $p<0.05$).

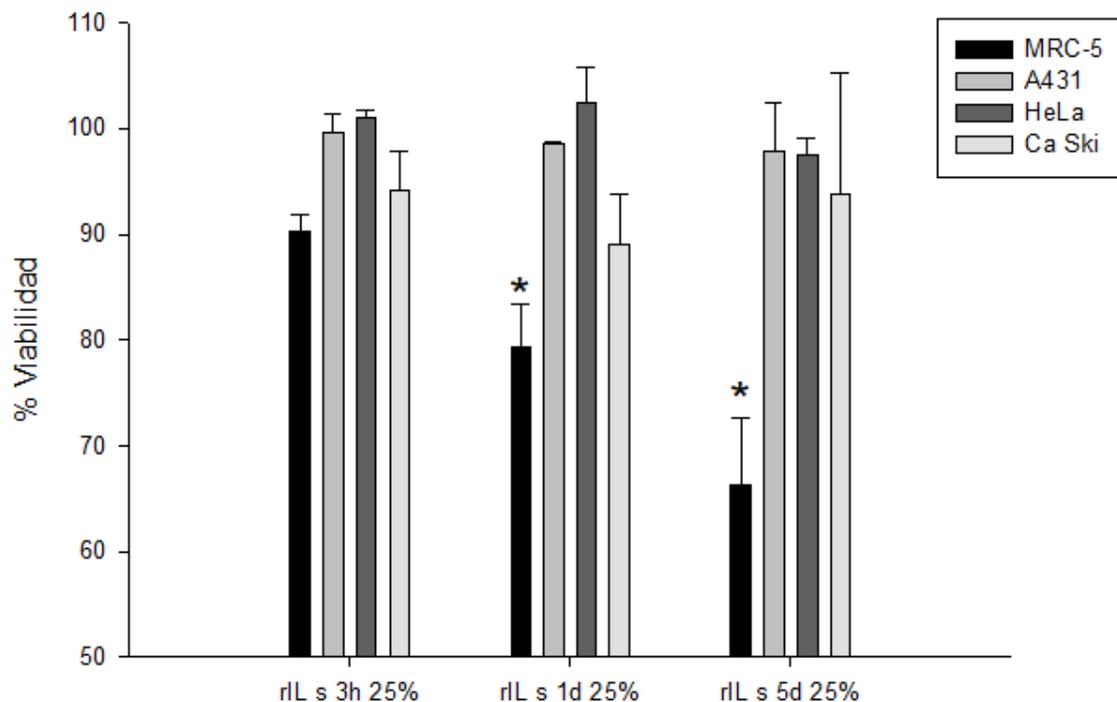


Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular donde se comparan los IL's radiomarcados y cargados con cisplatino a distintos tiempos de incubación (3 h, 24h, y 5 días). El (*) indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al control con SSI (datos no mostrados) y las barras de error representan la Desviación Estándar ($n=3$, $p<0.05$).

11.DISCUSIÓN.

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial debido a una alta prevalencia de algunos factores de riesgo asociados con la enfermedad. Para el año 2030 se espera que la mortalidad por cáncer en la región de Latinoamérica aumente hasta 2.1 millones (11, 16). La terapia convencional para esta enfermedad incluye la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, sin embargo, la incidencia de efectos adversos en distintos órganos afecta considerablemente la calidad de vida de los pacientes (22). El cisplatino es un agente de quimioterapia utilizado para tratar varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer cervicouterino. A pesar de ser un agente citotóxico efectivo contra las células cancerosas (reduciendo la mortalidad hasta en un 30-50%), presenta varias desventajas como toxicidad renal, neurotoxicidad y rápida eliminación del organismo. También se han publicado efectos gastrointestinales y leucocitopenia (24, 26, 83).



Una estrategia para disminuir los efectos adversos del cisplatino, así como mejorar sus propiedades farmacocinéticas y aumentar la estabilidad del fármaco es utilizar nuevas formas de liberación, encapsulándolo en liposomas, ya que estos pueden modificar la farmacocinética y biodistribución del cisplatino **(1, 84)**. Aunque estos sistemas de liberación de fármacos pueden aumentar la concentración del cisplatino en el sitio tumoral, siguen siendo inespecíficos, por lo que se han propuesto sistemas que sean específicos únicamente a las células cancerosas, como es el caso de los inmunoliposomas **(4, 8, 47)**.

Los resultados de este trabajo muestran que el tamaño de partícula (radio hidrodinámico) se encuentra en el intervalo de los 118-150 nm. Dicho tamaño permite que las vesículas puedan ingresar al interior del tumor aprovechando las fenestraciones de la vasculatura tumoral por el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR). Al controlar el tamaño de partícula de los liposomas se puede liberar eficientemente un fármaco en el sitio tumoral y protegerlo de los procesos metabólicos que pueden eliminarlo del organismo prematuramente **(84, 85)**. El potencial zeta (ζ) de los liposomas elaborados para el presente estudio se encuentra en el intervalo de -41.10 mV a -34.35 mV. Este parámetro permite determinar de forma indirecta la carga neta de la superficie de los liposomas y su capacidad de permanecer suspendidos y que no se floculen, agreguen o precipiten. Un valor absoluto que se encuentre cercano a los 30 mV muestra un balance entre las fuerzas de repulsión entre partículas de la misma clase y las de atracción que ejercen sus contraiones en el medio, por lo que los liposomas/inmunoliposomas elaborados en el presente trabajo se encuentran por encima del valor óptimo para evitar una inestabilidad en el sistema **(86-89)**.

La concentración de fosfolípidos fue determinada mediante un método colorimétrico de Stewart modificado **(80)**. El resultado para todos los lotes elaborados se mantuvo entre 34-35 mg/mL, manteniendo un valor cercano al 90% de eficiencia en la formación vesículas. La concentración de cisplatino fue determinada utilizando un método cromatográfico, cuyos valores fueron 818.91 ± 17.86 $\mu\text{g/mL}$ para liposomas y 942.80 ± 142.46 $\mu\text{g/mL}$ para ILs, dichos valores se encuentran muy cercanos a



las concentraciones indicadas en formulaciones de cisplatino convencional. La eficiencia de encapsulación (%EE) fue de 9.57% para liposomas y 11.52% para ILs con una eficiencia de carga (%EC) de 2.38% y 2.72%, respectivamente; dichos resultados concuerdan con los obtenidos por diversos autores **(1, 81)**.

Para la elección de los factores principales que pudieran influir en el radiomarcado de un sistema liposomal e inmunoliposomal, los cuales se eligieron con base en un análisis de riesgo que fue llevado a cabo mediante un diagrama de Ishikawa, en donde se colocaron los diversos factores que potencialmente pueden influir en la eficiencia de radiomarcado **(75)**. Para el diseño experimental de Plackett-Burman, varios autores recomiendan el uso de este tipo de diseños al momento de desarrollar nuevas formulaciones de liposomas, ya que, al ser sistemas multivariados hay muchos factores que se encuentran involucrados en el desempeño y eficiencia de la formulación **(78, 90)**. Por esta razón, el diseño de Plackett-Burman es uno de los más utilizados para monitorear un experimento, ya que puede estimar cuales son los efectos principales más significativos, con el menor número de corridas experimentales, que al ser un diseño ortogonal, los efectos principales son independientes, mientras que las interacciones no son importantes en esta etapa del monitoreo del método experimental **(75)**.

Para el análisis de las corridas experimentales que determinan las variables que influyen en la eficiencia del radiomarcado del sistema liposomal/inmunoliposomal, se elaboró un gráfico de Pareto, el cual muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de importancia y la manera en que las variables afectan en la eficiencia de radiomarcado. La **Figura 15** muestra el gráfico de Pareto para los efectos principales de las 8 variables escogidas para realizar el diseño experimental de Plackett-Burman. Los factores que resultaron ser estadísticamente significativos fueron: 1) La temperatura de radiomarcado y el tiempo de incubación; ya que el proceso de coordinación del lutecio con el quelatante lipofílico (oxina) y con el DOTA requiere una cierta temperatura para que se lleve a cabo la reacción. Diversos autores reportan una eficiencia de radiomarcado entre el 70-80% con temperaturas de incubación alrededor de los 50°C y un tiempo total de reacción de 60 minutos



(66, 91-93), de la misma manera influye con el valor del pka de la oxina, cuyo valor reportado a 20°C es 5.017 y a 25°C es 9.812. Por lo tanto, a una mayor temperatura de incubación, la molécula de hidroxiquinolina se encontrará en su forma protonada (94). 2) El pH del amortiguador HEPES, que influye de manera positiva en la eficiencia de radiomarcado. Como se discutió anteriormente, con la temperatura se necesita de un ambiente con un pH adecuado, ya que la oxina requiere estar en su forma protonada antes de entrar al compartimento acuoso del liposoma, induciendo la liberación del radionúclido. Se observa que a mayor pH aumenta la eficiencia de radiomarcado (92, 94). 3) La presencia de anticuerpo influye de manera negativa en la eficiencia de radiomarcado. Esto muy probablemente debido a la presencia de EDTA en el proceso de conjugación del liposoma con el nimotuzumab, el cual pudiera competir con el DOTA para complejar al ^{177}Lu (95, 96).

Con base en los resultados del diseño experimental de Plackett-Burman, se buscó mejorar la eficiencia de radiomarcado aumentando la temperatura de incubación (Figura 16). Se encontró que al aumentar la temperatura a 50°C hay diferencia significativa en comparación con la temperatura de 40°C, pero no hay un aumento significativo a partir de los 55°C, en comparación con la temperatura de 50°C, por lo tanto, se determinó que la temperatura donde se alcanzaba una mayor eficiencia fue a los 50°C. La eficiencia de radiomarcado para liposomas blanco fue >80% y para inmunoliposomas fue de 35-40%. Todos los lotes que fueron radiomarcados, mostraron una pureza radioquímica >90% (66). La técnica de radiomarcado por encapsulación activa que de acuerdo con diversos autores muestra ventajas sobre otras técnicas de radiomarcado como lo son: 1) mayor estabilidad del radionúclido encapsulado, ya que lo protege de la transquelación con proteínas plasmáticas en la circulación sanguínea y 2) mayor eficiencia de radiomarcado (9, 57, 97).

La estabilidad del radiomarcado en todos los sistemas liposomales fue >90% después de 24 h de incubación en suero humano (37°C) o en solución salina isotónica (a temperatura ambiente). A partir de las 3 horas hay diferencias significativas en comparación con la actividad al inicio del estudio y no se encontraron diferencias significativas entre la incubación en suero humano y en SSI.



Los estudios de citotoxicidad del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ se realizaron probando distintas actividades del radionúclido en las 4 líneas celulares. Las imágenes que se muestran en la **Figura 18** son fotografías tomadas después de 5 días de exposición y en ellas se observa que conforme aumenta la actividad del radionúclido, la cantidad de células por campo disminuye, notando que con la actividad más alta de radiación (10 MBq/mL) se observan muy pocas células en comparación con su control con SSI. También cabe notar la morfología de las células tratadas con radiación, las cuales se observan más irregulares o incluso hinchadas. También se observa que los cúmulos de células se hacen menos uniformes y disminuidos en su tamaño, lo que concuerda con varios autores en modelaje computacional de cultivos celulares expuestos a radiación (**82, 98**). Las actividades inhibitorias que fueron calculadas para cada línea celular sirven como referente para estudios próximos en donde se buscará evaluar el efecto que tienen los inmunoliposomas cargados con cisplatino y radiomarcados con ^{177}Lu .

En la evaluación de los distintos tratamientos con IL's en las líneas celulares que se muestran en la **Figura 20**, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a una $\text{AI}_{12.5}$ con respecto al control con SSI (datos no mostrados). Con una AI_{25} , se observan diferencias significativas en los IL's cargados con cisplatino en las líneas celulares MRC-5 y HeLa, y también con los IL's radiomarcados y cargados con cisplatino en la línea MRC-5. Debido a que no se mostraron diferencias significativas en los grupos tratados con IL's radiomarcados en las demás líneas celulares y que la concentración inhibitoria del cisplatino inmunoliposomal, usada en el radiomarcaje, es cercana a la CI_{50} (1-2 μM) publicada en un estudio previo (**99**); puede deberse a que en el proceso de radiomarcaje y purificación de los liposomas, haya existido una fuga de cisplatino de los inmunoliposomas, que al retirar el radionúclido no encapsulado, también se retiró el cisplatino, observando una actividad citotóxica menor en este grupo. Se tiene que hacer la cuantificación de cisplatino después de realizar el radiomarcaje, una vez pasado el tiempo de decaimiento. De igual manera no se observa una tendencia respecto a la afinidad del anticuerpo por las líneas control (MCR-5 y A431) ya que



tienen un comportamiento distinto al que se esperaba. No se evaluó la funcionalidad del anticuerpo, por lo tanto, este estudio se tiene que repetir.

Para la comparación de los IL's radiomarcados y cargados con cisplatino a distintos tiempos de incubación se muestra en la **Figura 21**. Se observaron diferencias estadísticamente significativas a partir de las 24 h de recibir el tratamiento y a los 5 días. Existe una fuerte dependencia del tiempo de incubación para que el tratamiento con los IL's resulte efectivo, por lo que, al retirarles el medio tratado a las células con medio fresco antes de tiempo, estas puedan recuperarse y volver a proliferar.

12. CONCLUSIÓN.

Se logró diseñar una metodología de radiomarcado de liposomas e inmunoliposomas con una eficiencia aceptable mediante el uso del diseño experimental de Plackett-Burman, el cual, permitió identificar los factores más influyentes en la eficiencia de radiomarcado de sistemas liposomales, sin afectar los parámetros fisicoquímicos, la pureza radioquímica ni la estabilidad *in vitro* y que además sirve como antecedente para realizar otros diseños experimentales que permitan perfeccionar la técnica experimental.

Los estudios *in vitro* para evaluar la citotoxicidad del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ en líneas celulares permitieron determinar los valores de la actividad inhibitoria 50. Para los estudios con inmunoliposomas radiomarcados, no se observaron diferencias significativas con respecto al placebo, por lo que en futuros experimentos se plantea buscar una solución al problema.



13. BIBLIOGRAFIA.

1. Hirai M, Minematsu H, Hiramatsu Y, Kitagawa H, Otani T, Iwashita S, et al. Novel and simple loading procedure of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;391(1-2):274-83.
2. Eloy J, Petrilli R, Trevizan L, Chorilli M. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;159:454-67.
3. Noble G, Stefanick J, Ashley J, Kiziltepe T, Bilgicer B. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends in Biotechnology*. 2014;32(1):32-45.
4. Wang D, Sun Y, Liu Y, Meng F, Lee R. Clinical translation of immunoliposomes for cancer therapy: recent perspectives. *Expert Opinion in Drug Delivery*. 2018;15(9):893-903.
5. Barenholz Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*. 2012;160(2):117-34.
6. Paszko E, Senge MO. Immunoliposomes. *Current Medicinal Chemistry*. 2012;19(31):5239-77.
7. Fathi S, Oyelere A. Liposomal drug delivery systems for targeted cancer therapy: is active targeting the best choice? *Future Medicinal Chemistry*. 2016;8(17):2091-112.
8. Vázquez H, Pérez E, Muñoz S, Izquierdo V, Medina L. Characterization and in vitro evaluation of nimotuzumab conjugated with cisplatin-loaded liposomes. *Journal of Liposome Research*. 2017;27(4):274-82.
9. Petersen A, Hansen A, Gabizon A, Andresen TL. Liposome imaging agents in personalized medicine. *Advances in Drug Delivery Reviews*. 2012;64(13):1417-35.
10. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer México: INFOCANCER; 2018 [citado el 24 de junio de 2020]. Disponible: <http://www.infocancer.org.mx/?c=cancer-cifras&a=estadisticas-2018>.



11. Hernández F, Robaina JI, Pérez NC, González E, González M, Angulo B. Curso electivo para la realización de audiencias sanitarias sobre cáncer por estudiantes de medicina. *Educación Médica*. 2020;21(3):177-86.
12. WHO. Cáncer 2020 [citado el 24 de junio de 2020]. Disponible: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
13. ACS. ¿Qué es el cáncer? 2016 [citado el 24 de junio de 2020]. Disponible: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>.
14. Siegel R, Miller K Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(1):7-30.
15. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford G. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*. 2020;8(2):e180-e90.
16. PAHO. Indicadores básicos 2016 [citado el 26 de junio de 2020]. Disponible: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/31288/IndicadoresBasicos2016-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.8>.
17. GLOBOCAN. Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2020 2018 [citado el 26 junio de 2020]. Disponible: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>.
18. Erdahl W, Chapman C, Taylor R, Pfeiffer D. Effects of pH conditions on Ca²⁺ transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems. *Biophysical Journal*. 1995;69(6):2350-63.
19. Valente E, Mizrahy E, Campos T. Evaluation of hela cell lineage response to β radiation from Holmium-166 embedded in ceramic seeds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2011;54:957-64.
20. CancerResearchUK. Radiotherapy 2018 [citado el 29 de junio de 2020]. Disponible: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/radiotherapy/about>.
21. NIH. Tipos de tratamiento [citado el 26 de junio de 2020]. Disponible: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>.



22. AmericanCancerSociety. Chemotherapy 2020 [citado 29 de junio de 2020]. Disponible: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy.html>.
23. NHS. Chemotherapy 2020 [citado el 29 de junio de 2020]. Disponible: <https://www.nhs.uk/conditions/chemotherapy/>.
24. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncology Reports*. 2003;10(6):1663-82.
25. Lopez A, Jurado R, Garcia P. A high-performance liquid chromatographic assay for determination of cisplatin in plasma, cancer cell, and tumor samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;52(3):366-72.
26. Burger K, Staffhorst R, de Vijlder H, Velinova M, Bomans P, Frederik P, et al. Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity. *Nature Medicine*. 2002;8(1):81-4.
27. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;41:178-95.
28. Vladimir T. Recent Advances With Liposomes As Pharmaceutical Carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;4:145-60.
29. Durgavati Y, Kumar S, Deepak P, Kumari DR. Liposomes for Drug Delivery Systems. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*. 2017;7(4):276-84.
30. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in Biotechnology*. 1995;13(12):527-37.
31. Betageri G, Jenkins S, Parsons D. Preparation of liposomes. *Liposome Drug Delivery Systems: Technomic Publishing Company*; 1993. p. 1-24.
32. Lichtenberg D, Barenholz Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. *Methods of Biochemical Analysis*. 1988;33:337-462.
33. Hermanson G. Chapter 21 - Liposome Conjugates and Derivatives. In: Hermanson GT, editor. *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2013. p. 921-49.



34. Bangham A, Standish M, Watkins J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*. 1965;13(1):238-277.
35. Bangham A. Membrane models with phospholipids. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1968;18(0):29-95.
36. Bangham A. Liposomes: the Babraham connection. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1993;64(1-3):275-85.
37. Gregoriadis G, Ryman B. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochemical Journal*. 1971;124(5):58p.
38. Gregoriadis G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Letters*. 1973;36(3):292-6.
39. Sharma A, Sharma U. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997;154(2):123-40.
40. Ulrich A. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*. 2002;22(2):129-50.
41. Grit M, Crommelin D. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1993;64(1):3-18.
42. Olusanya T, Haj Ahmad R, Ibegbu M, Smith J, Elkordy A. Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules*. 2018;23:907.
43. Singh R, Gangadharappa H, Mruthunjaya K. Phospholipids: Unique carriers for drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017;39:166-79.
44. Gabizon A, Chisin R, Amselem S, Druckmann S, Cohen R, Goren D, et al. Pharmacokinetic and imaging studies in patients receiving a formulation of liposome-associated adriamycin. *British Journal of Cancer*. 1991;64(6):1125-32.
45. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, et al. Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes. *Cancer Research*. 1994;54(4):987.



46. Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, Capriotti AL, Palchetti S, et al. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale*. 2014;6(5):2782-92.
47. Merino M, Zalba S, Garrido M. Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives. *Journal of Controlled Release*. 2018;275:162-76.
48. Yin H, Liao L, Fang J, editors. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting : The Concept , Application and Prospect 2014.
49. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*. 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
50. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*. 2000;65(1):271-84.
51. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011;63(3):131-5.
52. Alasvand N, Urbanska A, Rahmati M, Saeidifar M, Gungor-Ozkerim P, Sefat F, et al. Chapter 13 - Therapeutic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drugs. In: Grumezescu AM, editor. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*: Elsevier; 2017. p. 245-59.
53. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods in Molecular Biology*. 2010;624:25-37.
54. Martin M, López-Tarruella S. Emerging Therapeutic Options for HER2-Positive Breast Cancer. *American Society Clinical Oncology Educ Book*. 2016;35:e64-70.
55. Miller K, Cortes J, Hurvitz S, Krop I, Tripathy D, Verma S, et al. HERMIONE: a randomized Phase 2 trial of MM-302 plus trastuzumab versus chemotherapy of physician's choice plus trastuzumab in patients with previously treated, anthracycline-naïve, HER2-positive, locally advanced/metastatic breast cancer. *BMC Cancer*. 2016;16:352.



56. van der Meel R, Vehmeijer LJC, Kok RJ, Storm G, van Gaal EVB. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: Current status. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(10):1284-98.
57. van der Geest T, Laverman P, Metselaar JM, Storm G, Boerman OC. Radionuclide imaging of liposomal drug delivery. *Expert Opinion in Drug Delivery*. 2016;13(9):1231-42.
58. Laverman P, Boerman OC, Storm G. Radiolabeling of liposomes for scintigraphic imaging. *Methods in Enzymology*. 2003;373:234-48.
59. Srivatsan A, Chen X. Recent advances in nanoparticle-based nuclear imaging of cancers. *Advanced Cancer Research*. 2014;124:83-129.
60. Man F, Gawne P, T.M. de Rosales R. Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:134-60.
61. Petersen AL, Binderup T, Rasmussen P, Henriksen J, Elema D, Kjær A, et al. ⁶⁴Cu loaded liposomes as positron emission tomography imaging agents. *Biomaterials*. 2011;32(9):2334-41.
62. Reed P, Sidney Fleischer L. [56] Ionophores. *Methods in Enzymology*. Volume 55: Academic Press; 1979. p. 435-54.
63. Proffitt R, Williams L, Presant C, Tin G, Uliana J, Gamble R, et al. Tumor-imaging potential of liposomes loaded with In-111-NTA: biodistribution in mice. *Journal of Nuclear Medicine*. 1983;24(1):45-51.
64. Henriksen G, Schoultz B, Michaelsen T, Bruland O, Larsen R. Sterically stabilized liposomes as a carrier for alpha-emitting radium and actinium radionuclides. *Nuclear Medicine Biology*. 2004;31(4):441-9.
65. Banerjee S, Pillai M, Knapp F. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chemistry Reviews*. 2015;115(8):2934-74.
66. Wang H, Yu H, Lu Y, Heish N, Tseng Y, Huang K, et al. Internal radiotherapy and dosimetric study for ¹¹¹In/¹⁷⁷Lu-pegylated liposomes conjugates in tumor-bearing mice. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 2006;569(2):533-7.



67. Das T, Banerjee S. Theranostic Applications of Lutetium-177 in Radionuclide Therapy. *Current Radiopharmaceuticals*. 2016;9(1):94-101.
68. Watanabe S, Hashimoto K, Ishioka NS. Lutetium-177 complexation of DOTA and DTPA in the presence of competing metals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2015;303(2):1519-21.
69. Hermanson GT. Chapter 12 - Isotopic Labeling Techniques. In: Hermanson GT, editor. *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2013. p. 507-34.
70. Byegård J, Skarnemark G, Skålberg M. The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 1999;241(2):281-90.
71. Cacheris W, Nickle S, Sherry A. Thermodynamic study of lanthanide complexes of 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid. *Inorganic Chemistry*. 1987;26(6):958-60.
72. Viola N, Doyle R. The coordination chemistry of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (H4DOTA): Structural overview and analyses on structure–stability relationships. *Coordination Chemistry Reviews*. 2009;253(13):1906-25.
73. Henrich U, Kopka K. Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12(3).
74. Alina P, Marcela A, Cristina B, Iulia R, Ioan T, Cecilia C. Pharmaceutical Development of Liposomes Using the QbD Approach. In: IntechOpen, editor. *Liposomes-Advances and Perspectives: Catala Angel*; 2019.
75. Jain A, Hurkat P, Jain S. Development of liposomes using formulation by design: Basics to recent advances. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2019;224:104764.
76. Dejaegher B, Heyden Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;56(2):141-58.



77. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, et al. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1998;42(1):3-40.
78. Loukas Y. A Plackett–Burnam screening design directs the efficient formulation of multicomponent DRV liposomes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001;26(2):255-63.
79. Szoka F, Jr., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy Sciences U S A*. 1978;75(9):4194-8.
80. Stewart J. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1980;104(1):10-4.
81. Toro A, Ledezma F, Mondragon L, Jurado R, Medina L, Pérez-Rojas J, et al. Determination of Liposomal Cisplatin by High-Performance Liquid Chromatography and Its Application in Pharmacokinetic Studies. *Journal of chromatographic science*. 2016;54(6):1016-21.
82. Tamborino G, De Saint-Hubert M, Struelens L, Seoane D, Ruigrok E, Aerts A, et al. Cellular dosimetry of [(177)Lu]Lu-DOTA-[Tyr(3)]octreotate radionuclide therapy: the impact of modeling assumptions on the correlation with in vitro cytotoxicity. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Physics*. 2020;7(1):8.
83. Ikushima H, Osaki K, Furutani S, Yamashita K, Kawanaka T, Kishida Y, et al. Chemoradiation therapy for cervical cancer: Toxicity of concurrent weekly cisplatin. *Radiation Medicine*. 2006;24(2):115-21.
84. Jung J, Jeong SY, Park SS, Shin SH, Ju EJ, Choi J, et al. A cisplatin-incorporated liposome that targets the epidermal growth factor receptor enhances radiotherapeutic efficacy without nephrotoxicity. *International Journal of Oncology*. 2015;46(3):1268-74.
85. Essam Eldin N, Elnahas H, Mahdy MA, Ishida T. Liposomal pemetrexed: formulation, characterization and in vitro cytotoxicity studies for effective management of malignant pleural mesothelioma. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2015;38(3):461-9.



86. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12.
87. Zhou X, Wang J, Wu J, Yang X, Yung BC, Lee LJ, et al. Preparation and evaluation of a novel liposomal formulation of cisplatin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;66:90-5.
88. Chibowski E, Szczeń A. Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme. *Adsorption*. 2016;22.
89. Soema PC, Willems G-J, Jiskoot W, Amorij J-P, Kersten GF. Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;94:427-35.
90. El-Refai H, Amin MA, Sallam LA, Salem HA, editors. Application of multi-factorial experimental designs for optimization of biotin Production by a *Rhizopus nigricans* strain2010.
91. Subramanian S, Das T, Chakraborty S, Sarma HD, Banerjee S, Samuel G, et al. Preparation of ¹⁷⁷Lu-labeled oxine in lipiodol as a possible agent for therapy of hepatocellular carcinoma: a preliminary animal study. *Cancer biotherapy & radiopharmaceutics*. 2010;25(5):539-43.
92. Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug design, development and therapy*. 2013;7:1157-78.
93. Edmonds S, Volpe A, Shmeeda H, Parente-Pereira AC, Radia R, Bagaña-Torres J, et al. Exploiting the Metal-Chelating Properties of the Drug Cargo for In Vivo Positron Emission Tomography Imaging of Liposomal Nanomedicines. *ACS Nano*. 2016;10(11):10294-307.
94. Andersen A. Final amended report on the safety assessment of oxyquinoline and oxyquinoline sulfate as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 2006;25 Suppl 1:1-9.
95. Li WP, Ma DS, Higginbotham C, Hoffman T, Ketring AR, Cutler CS, et al. Development of an in vitro model for assessing the in vivo stability of lanthanide chelates. *Nuclear Medicine and Biology*. 2001;28(2):145-54.



96. Stimmel JB, Kull FC. Samarium-153 and Lutetium-177 Chelation Properties of Selected Macrocyclic and Acyclic Ligands. *Nuclear Medicine and Biology*. 1998;25(2):117-25.
97. van der Geest T, Laverman P, Gerrits D, Franssen GM, Metselaar JM, Storm G, et al. Comparison of three remote radiolabelling methods for long-circulating liposomes. *Journal of Controlled Release*. 2015;220:239-44.
98. Marcatili S, Pichard A, Courteau A, Ladjohounlou R, Navarro-Teulon I, Repetto-Llamazares A, et al. Realistic multi-cellular dosimetry for (177)Lu-labelled antibodies: model and application. *Physics in Medicine and Biology*. 2016;61(19):6935-52.
99. Gálvez O. Evaluación de citotoxicidad de inmunoliposomas anti-EGFR en células de cáncer cervicouterino. Ciudad Universitaria: UNAM; 2019.