

T
1025

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

86788 -



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
BIOFARMACIA**

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE UNA
FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE CISPLATINO”**

**COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**PRESENTA
ALFONSO TORO CÓRDOVA
MATRÍCULA 208180814**

**COMITÉ TUTORAL
TUTOR: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
ASESOR: M. EN C. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ MÉNDEZ
ASESOR: DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ**

NOVIEMBRE, 2010



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
BIOFARMACIA**

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE UNA
FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE CISPLATINO”**

**COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**PRESENTA
ALFONSO TORO CÓRDOVA
MATRÍCULA 208180814**

**COMITÉ TUTORAL
TUTOR: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
ASESOR: M. EN C. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ MÉNDEZ
ASESOR: DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ**

NOVIEMBRE, 2010

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE UNA
FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE CISPLATINO**

Vo. Bo. COMITÉ TUTORAL

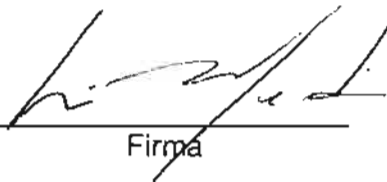
Tutor: Dra. Patricia García López


Firma

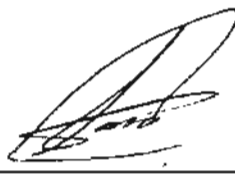
Asesor: M. en C. Norma Angélica Noguez Méndez


Firma

Asesor: Dr. Luis Alberto Medina Velázquez


Firma

Alumno: Q.F.B. Alfonso Toro Córdova
Matrícula 208180814


Firma

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE UNA
FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE CISPLATINO**

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Presidente: Dra. María Josefa Bernad Bernad


Firma

Vocal: Dr. Gabriel Marcelín Jiménez


Firma

Secretario: M. en C. Norma Angélica Noguez Méndez


Firma

RESUMEN

En el presente trabajo se muestran los resultados de la elaboración y caracterización farmacocinética de un nanosistema liposomal pegilado de cisplatino en ratas. La formulación desarrollada presentó eficiencias de encapsulación de cisplatino de alrededor del 30%, con lo que se logró obtener una concentración de encapsulación del fármaco similar a la de la formulación convencional. Las características fisicoquímicas, como el tamaño de partícula, potencial zeta y concentración de fosfolípidos le confieren a la formulación una estabilidad química aceptable y la hacen segura para su administración en animales de experimentación.

Con esta formulación se logró mejorar la farmacocinética del cisplatino, el cual se distingue por una distribución alta en tejidos, una biodisponibilidad baja y una rápida eliminación. Al ser encapsulado el cisplatino en liposomas, su volumen de distribución disminuyó a la mitad y la depuración se hizo 75 veces más lenta; esto se refleja en un aumento de casi 70 veces en el área bajo la curva que indica un aumento de la biodisponibilidad del fármaco y una disminución de su eliminación.

A pesar de una mayor permanencia del cisplatino en circulación, no se observó ninguna modificación significativa en los principales marcadores bioquímicos utilizados para evaluar toxicidad renal. Esto indica que la formulación liposomal logró prevenir la nefrotoxicidad producida por el cisplatino cuando se administra de manera convencional.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) y sus profesores, por la formación académica y profesional proporcionada durante la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico proporcionado mediante la beca otorgada con número de Registro 257448, la cual me permitió desarrollar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-Salud por el apoyo del proyecto No. 44386.

Al Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por la beca con clave IN108610-2, otorgada para la conclusión del trabajo de tesis.

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

Este trabajo fue premiado con el reconocimiento "Santiago Maza" al mejor trabajo libre del área de Biofarmacia, presentado en el XLII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas celebrado en la Ciudad de Cancún Quintana Roo, México del 18 al 22 de Octubre de 2009. Además, se presentará en el 15° Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud que tendrá lugar del 27 al 30 de Octubre del 2010 en Acapulco, Guerrero.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios:

Porque ha estado conmigo en cada paso que doy, dándome la fé y la fortaleza para salir adelante en los momentos difíciles, por enseñarme el camino correcto y por darme la vida y la salud para terminar este trabajo.

A mi familia:

A mis padres por darme la vida, por su amor y apoyo incondicional en todos los momentos. Por enseñarme con su ejemplo a ser perseverante y luchar por conseguir mis metas. Este trabajo es para ustedes porque son los frutos de la formación y la carrera que me dieron.

A mis hermanas por su gran cariño, por creer en mí, por los ánimos recibidos para terminar la maestría y porque fueron un ejemplo de superación para mí.

A mis tíos(as) y primos (as) por todas las bendiciones y palabras de aliento recibidas.

A mis amigos:

A Vanessa, Mareva, Susy, Stephania, Alejandro, Alberto e Irvin por darme su amistad y por todos los buenos momentos durante la maestría.

A todo el clan de los laboratorios de Farmacología y Física Médica: Edith, Mariana, Yuri, Natalí, Vicky, Liz, Josefina, Itzel, Kharla, Maria José, Julio, Carlos, Carlos Jr., Héctor, Alfredo, Arnulfo e Iván; por sus consejos y su ayuda, por las risas y por todos esos momentos que hicieron más amena mi estancia en el Instituto.

A mis tutores y asesores:

A mi tutora la Dra. Patricia García López por la enseñanza, la paciencia y la confianza otorgada y por el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

A mis asesores la M. en C. Norma Angélica Noguez Méndez y el Dr. Luis Alberto Medina por todos los conocimientos transmitidos, por el gran apoyo y los consejos otorgados.

A la Dra. Jazmín Marlen Perez Rojas por el apoyo en la realización de las farmacocinéticas y las pruebas de daño renal.

A la Dra. Elena Arechaga Ocampo, el M. en C. Enrique Pérez Cárdenas y el Biol. Rafael Jurado León por los comentarios y las observaciones realizadas al trabajo y los conocimientos transmitidos.

A los miembros del jurado:

Gracias por el tiempo, la dedicación y sus aportaciones para mejorar éste trabajo.

El éxito es algo más parecido a un viaje que a un lugar de destino. Lo mejor es saborear el trayecto.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Marco Teórico	6
3.1. Cáncer.....	6
3.2. Tratamiento del cáncer.....	7
3.2.1. Cirugía.....	7
3.2.2. Radioterapia.....	7
3.2.3. Quimioterapia.....	8
3.2.3.1. Toxicidad quimioterapéutica.....	9
3.3. Conceptos generales de farmacocinética.....	10
3.3.1. Parámetros farmacocinéticos.....	11
3.3.2. Factores que modifican la farmacocinética.....	13
3.3.3. Modificación de la farmacocinética en cáncer.....	17
3.4. Liposomas.....	18
3.4.1. Clasificación.....	19
3.4.2. Métodos de preparación.....	20
3.4.3. Biodistribución.....	21
3.4.3.1. Liposomas de circulación prolongada.....	22
3.4.4. Liberación del fármaco.....	23
3.4.5. Toxicidad.....	24
3.5. Monografía del cisplatino.....	25
3.5.1. Estructura química.....	25
3.5.2. Propiedades fisicoquímicas.....	25
3.5.3. Mecanismo de acción.....	26
3.5.4. Aplicaciones y posología.....	26
3.5.5. Farmacocinética.....	27
3.5.6. Toxicidad.....	28
3.5.7. Resistencia.....	28
4. Planteamiento del problema	29
5. Hipótesis	29

6. Objetivos	30
6.1. Objetivo general.....	30
6.2. Objetivos específicos.....	30
7. Materiales y métodos	31
7.1. Reactivos.....	31
7.2. Animales.....	31
7.3. Elaboración de liposomas cargados con cisplatino.....	31
7.3.1. Método de hidratación de lípidos.....	32
7.3.2. Método de evaporación de fase reversa.....	33
7.4. Caracterización fisicoquímica de los liposomas.....	34
7.4.1. Medición de tamaño de partícula.....	34
7.4.2. Medición de potencial de membrana (potencial zeta)....	34
7.4.3. Cuantificación de fosfolípidos.....	35
7.4.4. Cuantificación de fármaco encapsulado.....	36
7.4.4.1. Preparación de las muestras.....	36
7.4.4.2. Condiciones cromatográficas.....	36
7.4.4.3. Validación.....	36
7.5. Farmacocinética de cisplatino liposomal.....	37
7.5.1. Determinación de cisplatino en muestras plasmáticas...	38
7.5.2. Análisis farmacocinético.....	38
7.6. Evaluación de daño renal.....	38
7.7. Análisis Estadístico.....	39
8. Resultados y discusión	40
9. Conclusiones	53
10. Perspectivas	54
11. Referencias bibliográficas	55
12. Anexos	65

ÍNDICE DE ESQUEMAS

1. Farmacocinética de doxorubicina libre vs doxorubicina liposomal.....	4
2. Estructuras químicas de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.....	5
3. Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos para cada sexo durante 2008 en México.....	6
4. Aplicaciones de la farmacocinética en el desarrollo de fármacos.....	10
5. Curva de concentración plasmática vs tiempo tras la administración oral de un fármaco.....	11
6. Composición básica de un liposoma convencional.....	18
7. Sistemas de clasificación de liposomas.....	20
8. Estructura de polietilenglicol (PEG) conjugado con diestearoilfosfatidiletanolamina.....	23
9. Acumulación preferencial de liposomas en un tumor.....	24
10. Mecanismo de acción de cisplatino.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Cromatogramas típicos de la validación del método de HPLC.....	45
2. Curva de calibración de cisplatino.....	46
3. Curva de concentración plasmática vs tiempo de cisplatino convencional y cisplatino liposomal.....	47
4. Valores basales y post-tratamiento de creatinina plasmática y depuración de creatinina.....	50
5. Valores basales y post-tratamiento de urea y BUN plasmáticos.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

1. Formulaciones liposomales de fármacos en el mercado y en investigación clínica hasta el 2006.....	2
2. Fármacos antineoplásicos más utilizados en la clínica.....	9
3. Caracterización fisicoquímica de liposomas de cisplatino preparados.....	43
4. Parámetros de la validación del método analítico.....	46
5. Prueba de estabilidad de cisplatino en muestras plasmáticas.....	47
6. Parámetros farmacocinéticos de cisplatino liposomal.....	48

ABREVIATURAS

- ABC = Área Bajo la Curva.
ADN = Ácido desoxirribonucleico
ARN = Ácido ribonucleico
BUN = Nitrógeno uréico en plasma
Cl = Depuración
 C_{max} = Concentración máxima
 Cp^0 = Concentración plasmática a tiempo cero
DDTC = Dietilditiocarbamato sódico
FDA = Food and Drug Administration of the United States of America
HDL = Lipoproteínas de alta densidad
HSPC = Fosfatidilcolina de Soya Hidrogenada
INEGI = Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
 k_e = Constante de eliminación
LDL = Lipoproteínas de baja densidad
LUV = Liposomas unilaminares grandes
MLV = Liposomas multilaminares
mPEG₂₀₀₀-DSPE = Diestearoil-fosfatidiletanolamina conjugado con polietilenglicol
MVV = Liposomas multivesiculares
PEG = Polietilenglicol
SRE = Sistema Reticuloendotelial
SUV = Liposomas unilaminares pequeños
 $t_{1/2}$ = tiempo de vida media.
 t_{max} = tiempo máximo
WHO = World Health Organization.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la pérdida de los mecanismos de control que gobiernan la proliferación y diferenciación celular. Tales células proliferan excesivamente y forman tumores localizados que comprimen o invaden las estructuras normales adyacentes. Solamente una tercera parte de los pacientes son tratados con cirugía cuando el tumor no ha tenido metástasis. No obstante, la micrometástasis temprana es una característica de las neoplasias malignas, lo que indica que se requerirá de un método sistémico como la quimioterapia para el control efectivo del cáncer.

Los fármacos antineoplásicos idóneos podrían erradicar y causar la muerte de las células cancerosas sin poner en riesgo los tejidos normales; desafortunadamente, hoy en día no se dispone de agentes que reúnan estos criterios y el uso clínico requiere una evaluación de los beneficios frente a su toxicidad para establecer un índice terapéutico favorable. Las dificultades para desarrollar fármacos con las características antes mencionadas han llevado a investigar otros métodos para lograr que los agentes antitumorales se dirijan preferencialmente hacia el tejido tumoral. En este contexto, el diseño y elaboración de vectores de fármacos ofrece la posibilidad de mejorar el transporte y la liberación de los principios activos, depositándolos preferencialmente en el sitio de acción, reduciendo su toxicidad en tejidos y maximizando el efecto terapéutico en el sitio deseado.

Los liposomas han sido investigados como vectores de fármacos desde su descubrimiento en 1965 por Bangham et al. Son estructuras sintéticas de tipo celular formadas por fosfolípidos, que son los bloques de construcción molecular básica de las membranas celulares. En los últimos quince años, numerosas formulaciones liposomales de fármacos han sido desarrolladas y aprobadas para su uso clínico por la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos y por otros organismos de regulación en países europeos. El ejemplo más claro es

el caso de Caelyx[®], una formulación liposomal de doxorubicina utilizada en el tratamiento del cáncer de mama y de ovario metastásicos. En la Tabla 1 se resumen algunos de los fármacos liposomales comerciales o bajo investigación clínica.

Tabla 1.- Formulaciones liposomales aprobadas o bajo investigación clínica hasta el 2006.

Molécula terapéutica	Nombre comercial	Indicaciones
Daunorrubicina	DaunoXome	Sarcoma de Kaposi
Doxorrubicina	Myocet	Cáncer de mama recurrente
Doxorrubicina/Liposomas pegilados	Doxil/Caelyx	Sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario y cáncer de mama recurrente
Anfotericina B	AmBisome	Infecciones por hongos
Citarabina	DepoCyt	Meningitis linfomatosa
Camptotecina	S-CKD602 *	Diversos tipos de cáncer
Vincristina	Marqibo ***	Linfoma no-Hodgkin
Lurtotecan	OSI-211 **	Cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello
Irinotecan	LE-SN38 *	Cáncer avanzado
Nistatina	Nyotran ***	Antifúngico tópico
Ácido <i>trans</i> -retinóico	Atragen **	Leucemia promielocítica aguda, linfoma no-Hodgkin, carcinoma de células renales, sarcoma de Kaposi
Cisplatino	Lipoplatin TM *** SPI-077 **	Diversos tipo de cáncer Cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón
Annamicina	Annamycin **	Tumores resistentes a doxorubicina
Paclitaxel	MBT-0206 *	Cáncer de mama, antiangiogénico
Paclitaxel	LEP-ETU *	Cáncer de mama, pulmón y ovario
Mitoxantrona	LEM-ETU *	Leucemia, cáncer de mama, estómago, hígado y ovario

* Formulaciones en estudios de fase clínica 1, ** Formulaciones en estudios de fase clínica 2, *** Formulaciones en estudios de fase clínica 3 (Immordino, 2006).

2. ANTECEDENTES

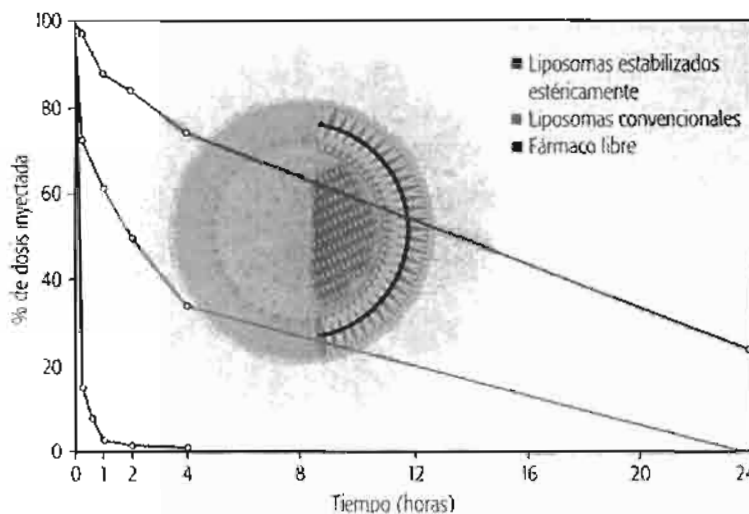
La utilización de liposomas como sistemas de transporte de fármacos ha cobrado gran interés por la versatilidad de estos sistemas. La posibilidad de encapsular tanto moléculas hidrosolubles como liposolubles los han hecho ideales para transportar simultáneamente dos o más fármacos, proteínas, inhibidores selectivos y radionúclidos entre otros.

Se ha demostrado que la farmacocinética del fármaco encapsulado en formulaciones liposomales es totalmente distinta a la del fármaco convencional. En el caso particular de un tumor, los liposomas son capaces de acumularse en el tejido tumoral por las características fisiológicas que éste presenta, lo cual se refleja en una mayor eficacia de los antineoplásicos encapsulados. Un ejemplo de lo anterior es el caso de la encapsulación de doxorubicina, un agente citotóxico utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer incluido el cáncer de mama metastásico; desafortunadamente, la doxorubicina convencional presenta con frecuencia cardiotoxicidad. Cuando se administra la doxorubicina encapsulada en liposomas la concentración del fármaco en el tejido tumoral aumenta de manera significativa mientras que la concentración en el tejido cardíaco disminuye, reduciendo así los efectos tóxicos (Yokoe, 2008).

La mayoría de los agentes antineoplásicos administrados por vía intravenosa presentan un volumen de distribución amplio, el resultado es un índice terapéutico pequeño por la gran posibilidad de causar toxicidad en tejido sano (Uhumwangho, 2005).

Mediante la encapsulación de los fármacos en liposomas el volumen de distribución se reduce significativamente y su concentración plasmática se incrementa, ya que los liposomas no se unen a proteínas plasmáticas. Lo anterior da como resultado una mayor permanencia del fármaco en circulación y por lo tanto una mejor biodisponibilidad del mismo.

El mejor ejemplo de formulaciones liposomales en oncología es Caelyx[®], una formulación comercial de doxorubicina liposomal pegilada, la cual ha demostrado tener una tiempo de vida media ($t_{1/2}$) 4 a 5 veces mayor que la doxorubicina convencional o no encapsulada; asimismo la depuración (Cl) disminuye hasta 560 veces y el área bajo la curva (ABC) aumenta entre 250 y 600 veces con respecto a la doxorubicina convencional a la misma dosis (Drummond, 1999). La modificación en la farmacocinética de la doxorubicina se muestra en el esquema 1.

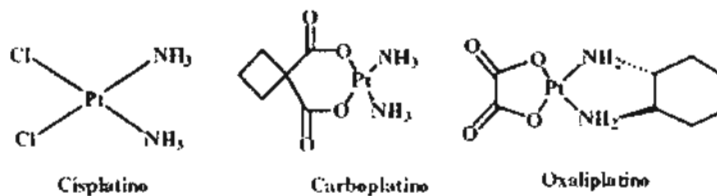


Esquema 1. Farmacocinética comparativa de doxorubicina libre (morado), doxorubicina encapsulada en liposomas convencionales (azul) y doxorubicina encapsulada en liposomas pegilados (Specialty Care, CAELYX[®] Número 4; 2009)

Por otra parte, el cisplatino es uno de los fármacos más eficaces para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Boulikas, 2007), siendo la quimioterapia de primera línea en algunos casos; sin embargo su alta toxicidad en tejido sano, particularmente su nefrotoxicidad, ha sido un problema de gran importancia en la clínica.

Diversos estudios se han enfocado en disminuir la toxicidad de este compuesto. El desarrollo de nuevos análogos de platino, modificando los grupos salientes (Cl) por otros menos lábiles ha buscado disminuir la toxicidad. El carboplatino es un análogo de platino de segunda generación con menor toxicidad

a nivel renal, sin embargo se ha demostrado que ocasiona una resistencia cruzada con el cisplatino. El oxaliplatino, un compuesto de tercera generación, ha sido aprobado para el tratamiento del cáncer colorrectal; aunque presenta un espectro de actividad, mecanismo de acción y resistencia que son diferentes al del cisplatino y carboplatino (Wang, 2007). En el Esquema 2 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.



Esquema 2. Estructuras químicas del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. El carboplatino presenta un grupo ciclobutanodicarboxilato que reemplaza los grupos cloruro. El oxaliplatino presenta un grupo diaminociclohexano como sustituyente de los dos grupos amino (Wang, 2007).

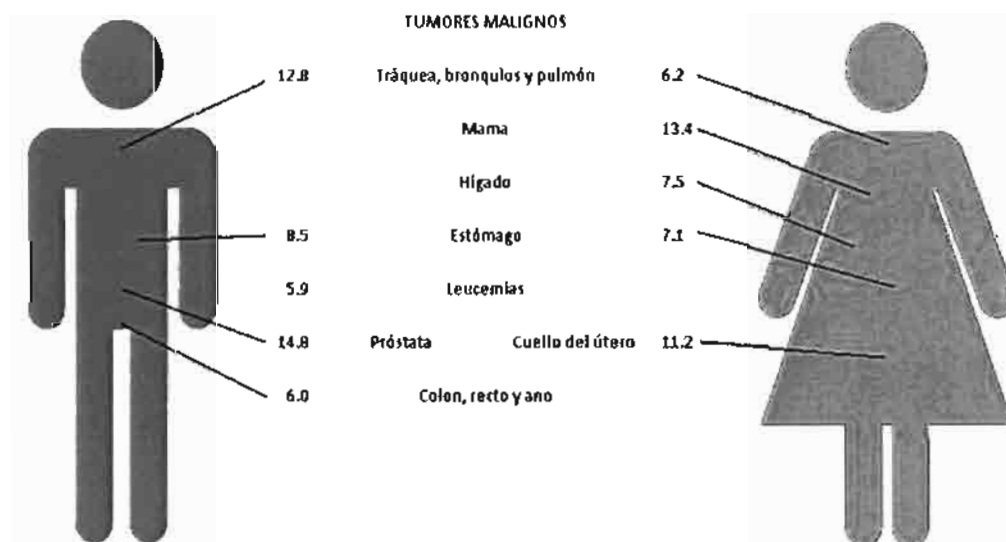
Además del desarrollo de estos análogos, otra estrategia para disminuir la toxicidad sistémica del cisplatino es la encapsulación en un sistema liposomal. No existe actualmente ninguna formulación liposomal de cisplatino en el mercado aunque hay diversos grupos de investigación trabajando en ello. Por lo tanto, la finalidad de este trabajo fue elaborar una formulación liposomal de cisplatino propia capaz de modificar la farmacocinética del principio activo y reducir la toxicidad presentada por la formulación convencional.

Los resultados aquí presentados son el logro del trabajo conjunto realizado por el Laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y del Laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. CÁNCER

El cáncer constituye un grupo de enfermedades crónico degenerativas que se define como la proliferación anormal y descontrolada de las células de un tejido u órgano; también se le conoce como neoplasia (del griego “nuevo crecimiento”). Estas células pueden proliferar hasta formar masas denominadas tumores. La mayoría de las neoplasias malignas muestran capacidad para invadir estructuras vecinas y la capacidad para diseminarse a través del sistema linfático y la sangre hacia otros órganos. El cáncer en la actualidad es una de las primeras causas de mortalidad y representa un serio problema de salud pública. A nivel mundial se estimaron 12.4 millones de casos de cáncer en 2008 y 7.6 millones de muertes a causa de esta enfermedad en el mismo año (WHO, 2008). En el ámbito nacional, para el 2008 el cáncer representó la tercera causa de muerte en las mujeres con 34,204 defunciones, y la tercera también en los hombres con 32,842 muertes. Los principales tipos de cáncer en ambos sexos se resumen en el Esquema 3.



Esquema 3. Distribución porcentual de las defunciones por los principales tipos de tumores malignos para cada sexo durante 2008 en México (INEGI, 2010).

El problema con más prevalencia en el tratamiento del cáncer es la recidiva y la metástasis de las células cancerosas tras el tratamiento estándar con cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. Este problema se agrava por la presencia de quimiorresistencia de los tumores, la toxicidad de los regímenes de quimioterapia actuales y la ineficiencia de los tratamientos especialmente en los estadios avanzados de la enfermedad.

3.2. TRATAMIENTO DEL CÁNCER

El tratamiento del cáncer depende principalmente del tipo de tumor del que se trate. En la clínica, el grado y el estadio del tumor son factores importantes que influyen en la elección de un tratamiento. El sistema más utilizado para determinar el grado de la enfermedad es el TNM, establecido por la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC), el cual está basado en la extensión del tumor primario (T), la ausencia o presencia de metástasis en nódulos linfáticos (N) y la ausencia o presencia de metástasis distantes (M).

3.2.1. CIRUGÍA

La cirugía es el tratamiento de elección en estadios tempranos del cáncer. Tiene como objetivo principal el remover el tumor primario y todas sus extensiones en una sola operación. Antes de optar por la cirugía es necesario hacer una evaluación pre-operativa del paciente y analizar los riesgos y beneficios de la cirugía.

3.2.2. RADIOTERAPIA

Este tipo de tratamiento se basa en la interacción del tumor con la radiación ionizante, la cual causa el daño y la muerte de las células tumorales. La radioterapia es ampliamente utilizada en estadios intermedios y avanzados de la enfermedad (IB o IIA hasta IVB) y a menudo se utiliza en combinación con la

cirugía y la quimioterapia, por ejemplo en el tratamiento del cáncer de mama en estadios tempranos.

3.2.3. QUIMIOTERAPIA

Los procesos de metástasis muchas veces colocan a la enfermedad fuera del alcance de la extirpación quirúrgica o de la ablación local por medio de radioterapia, siendo necesaria la quimioterapia, la cual se define como la aplicación de fármacos citotóxicos que tienen como función el impedir la reproducción de las células cancerosas. La quimioterapia se puede emplear de diversas maneras en el tratamiento del cáncer.

Quimioterapia adyuvante: Se utiliza en pacientes que siguen teniendo un gran riesgo de recidiva después de la extirpación del tumor primario y en los que se han eliminado todos los signos de cáncer mediante la cirugía o se han tratado de manera concluyente con las radiaciones.

Quimioterapia neoadyuvante: El tratamiento está dirigido a la posibilidad de que exista una enfermedad sistémica en pacientes con un proceso aparentemente localizado. En este caso su administración tiene lugar antes de realizar la intervención quirúrgica.

Tratamiento de la enfermedad avanzada y metastásica: Se utiliza cuando han fracasado los métodos locales o para el tratamiento de pacientes que presentan reincidencias y metástasis de los tumores.

Poliquimioterapia: La administración simultánea de varios fármacos antineoplásicos. Es comúnmente utilizada para evitar la aparición de tumores resistentes de algún fármaco en particular.

Actualmente existen más de 100 agentes que se utilizan como fármacos antineoplásicos y muchos más que aún se están investigando. La Organización Mundial de la Salud (WHO), en el World Cancer Report del 2008, reportó los principales agentes quimioterapéuticos utilizados en la clínica para el tratamiento de esta enfermedad, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Fármacos antineoplásicos más comunes en el uso clínico. (WHO, 2008).

Agentes Alquilantes	Antibióticos citotóxicos	Antimetabolitos y terapia relacionada	Alcaloides de la vinca y etopósido	Otros
Ciclofosfamida	Bleomicina	Citarabina	Vinblastina	Asparaginasa
Clorambucilo	Doxorrubicina	Fluorouracilo	Vincristina	Cisplatino y otros análogos de platino
	Dactinomicina	Mercaptopurina	Etopósido	Dacarbazina
	Daunorrubicina	Metotrexato		Procarbazina
		Folinato de calcio		

3.2.3.1. TOXICIDAD QUIMIOTERAPÉUTICA

Uno de los principales problemas que presentan la mayoría de los fármacos antineoplásicos es su poca o nula especificidad hacia las células tumorales. Debido a esto, el efecto citotóxico no solo afecta a las células cancerosas sino también a las células normales, especialmente a las que tienen una tasa de proliferación rápida, afectando tejidos como la médula ósea, tracto gastrointestinal y folículos pilosos (WHO, 2008).

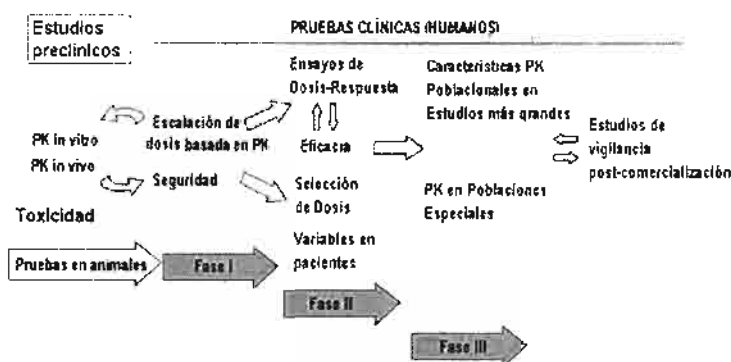
Además, los fármacos suelen causar toxicidad en órganos relacionados con su metabolismo y eliminación. Por ejemplo, las antraciclinas se acumulan en el tejido cardíaco causando toxicidad en este órgano; el metotrexato y la ciclofosfamida pueden causar fibrosis pulmonar y varios fármacos, como los análogos de platino y los alcaloides de la vinca, causan toxicidad en los riñones debido a que su eliminación es principalmente por esta vía.

Por esta razón, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas capaces de disminuir los efectos adversos y potenciar el efecto farmacológico ha sido motivo de muchas investigaciones en los últimos años.

3.3. CONCEPTOS GENERALES DE FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética se define como el estudio del curso temporal de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco. Un principio fundamental de la farmacocinética es que existe una relación entre la respuesta farmacológica o tóxica a un fármaco, y la concentración de éste en su sitio de acción. Generalmente no es posible hacer la cuantificación directa en los sitios de acción, sin embargo, es posible realizarla en sangre o plasma ya que es un sitio de fácil acceso. En casi todos los casos la concentración de fármaco en la circulación sanguínea tiene una relación directa con la concentración en su sitio de acción (Goodman & Gilman, 2005).

Los datos proporcionados por esta ciencia permiten modelar, analizar y controlar las concentraciones plasmáticas de los fármacos y, por lo tanto, poder predecir la respuesta farmacológica que éste tendrá (Rowland, 1995). En años recientes se ha utilizado extensamente esta información durante las diferentes fases del desarrollo de fármacos como se muestra en el Esquema 4.

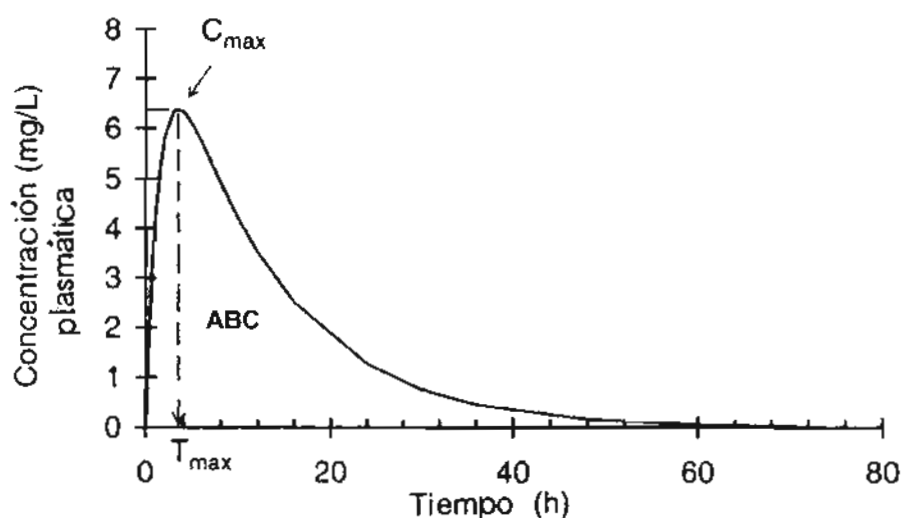


Esquema 4. Aplicación de la farmacocinética (PK) en las distintas fases del desarrollo de fármacos.

Otras aplicaciones importantes de la farmacocinética son el diseño y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia de medicamentos y la selección de dosis y vías de administración correctas en poblaciones especiales o patologías específicas (DiPiro, 2005).

3.3.1. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

La farmacocinética se vale de diversos parámetros para explicar los procesos que presenta el fármaco en el organismo. Entre los principales se pueden mencionar el volumen de distribución (V_d), área bajo la curva (ABC), la concentración y tiempo máximos (C_{max} y t_{max}), el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), y la depuración (Cl). Algunos de estos parámetros pueden observarse en el siguiente esquema.



Esquema 5. Curva de concentración plasmática vs tiempo tras la administración oral de un fármaco. Se muestran la concentración máxima (C_{max}), el tiempo máximo (t_{max}) y el área bajo la curva (ABC). (Bauer, 2008).

Volumen de distribución (V_d)

El V_d es el volumen aparente en el cual se distribuye la dosis total del fármaco administrado. Es un marcador del grado de distribución del fármaco en el organismo. Un valor grande en el volumen de distribución indica que el fármaco se distribuye ampliamente en los tejidos. Inversamente, un volumen de distribución pequeño indica una distribución delimitada al volumen plasmático. El volumen de distribución es útil para estimar las concentraciones plasmáticas cuando se administra una cantidad conocida de algún fármaco, o inversamente, estimar la dosis requerida para alcanzar una concentración deseada en plasma (Rowland, 1995) según la siguiente fórmula:

$$V_d = \text{Dosis} / C_p^0 \quad \text{Donde:}$$

C_p^0 = Concentración plasmática máxima a tiempo cero.

Biodisponibilidad y Área bajo la curva (ABC)

La biodisponibilidad se define como la fracción de fármaco inalterado que llega a la circulación sistémica. Para los compuestos que siguen una farmacocinética lineal, la biodisponibilidad generalmente se mide con el parámetro de ABC, la cual se determina matemáticamente cuando se grafican las concentraciones plasmáticas con respecto al tiempo. El ABC es un parámetro muy importante en los estudios de bioequivalencia, los cuales son un requisito para la elaboración de medicamentos genéricos, el desarrollo de nuevos fármacos, cambios o desarrollo de las formulaciones o cuando se modifica el sitio o el método de elaboración (DiPiro, 2005).

Concentración máxima (C_{max}) y tiempo máximo (t_{max})

Son valores que indican la concentración máxima alcanzada en circulación sanguínea y el tiempo necesario para llegar a esta concentración. Para las diferentes vías de administración extravascular, son especialmente útiles ya que representan una aproximación de la velocidad con la que el fármaco es absorbido.

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y constante de eliminación (k_e)

Son parámetros que se relacionan con la velocidad de eliminación del fármaco. La vida media de eliminación se define como el tiempo en que tarda la concentración sérica del fármaco en decaer a la mitad. El inverso de este valor se conoce como constante de eliminación. La vida media y la constante de eliminación son consideradas como parámetros dependientes ya que sus valores dependen de la depuración y del volumen de distribución del fármaco. Un cambio en estos dos parámetros modificará los valores del tiempo de vida media y la constante de eliminación (Bauer, 2008).

Depuración (Cl)

La depuración se define como el volumen de plasma o sangre que queda completamente libre de fármaco por unidad de tiempo. Para la mayor parte de los fármacos, la depuración es constante en el intervalo de concentraciones plasmáticas encontradas en situaciones clínicas, es decir, la eliminación no es saturable y la velocidad de eliminación del fármaco es directamente proporcional a la concentración. Esto se conoce como eliminación de primer orden. Cuando la depuración es de primer orden, puede determinarse calculando el ABC usando la siguiente fórmula:

$$ABC = \text{Dosis} / Cl$$

Los fármacos pueden ser eliminados del organismo por mecanismos, vías y órganos diferentes incluyendo metabolismo hepático y excreción biliar y renal. La depuración total es la suma de todos estos mecanismos de eliminación (DiPiro, 2005).

$$Cl_t = Cl_r + Cl_m + Cl_{otra}$$

Donde:

Cl_T = Depuración total

Cl_r = Depuración renal

Cl_m = Depuración metabólica

Cl_{otra} = Otros tipos de depuración

3.3.2. FACTORES QUE MODIFICAN LA FARMACOCINÉTICA

Absorción

La absorción se define como el paso del fármaco desde el sitio de administración hasta la circulación general y está condicionada por la vía de administración, la naturaleza química del fármaco y factores fisiológicos como el pH, vaciado gástrico y motilidad gastrointestinal y la vascularización del sitio de absorción. Cualquier alteración de estas condiciones fisiológicas puede modificar el grado de absorción.

Distribución

Una vez que el fármaco alcanza la circulación, se distribuye continuamente en los tejidos y órganos hasta alcanzar un equilibrio entre las velocidades de entrada y salida de fármaco. El V_d es el parámetro que describe el grado de distribución de un fármaco.

Los factores que pueden modificar esta distribución son:

- Naturaleza química del fármaco: La liposolubilidad condiciona el paso de fármaco a través de las membranas biológicas.
- Características del tejido u órgano: Para la mayoría de los fármacos la distribución en los órganos depende en gran medida del riego sanguíneo y del volumen de éstos. Además de lo anterior, existen en el organismo ciertas barreras fisiológicas que condicionan la llegada del fármaco a algunos sitios. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica limita la entrada de los fármacos al sistema nervioso central, especialmente de fármacos altamente ionizados o de gran peso molecular.
- Patologías: En ciertas enfermedades el riego sanguíneo el pH y/o la fisiología de ciertos órganos se ve alterado, condicionando la entrada de fármaco.
- Grado de unión del fármaco a proteínas: Uno de los principales factores que alteran la distribución es la unión a los tejidos o proteínas. Solamente la fracción del fármaco que no está unida a proteínas es la que puede ejercer un efecto farmacológico y la que puede difundirse fuera del plasma; sin embargo, la unión a proteínas plasmáticas casi siempre es rápidamente reversible por lo que la fracción unida se considera una reserva móvil del fármaco (Bauer, 2008).

Los fármacos ácidos se unen predominantemente con la albúmina, y los alcalinos con la α -glucoproteína ácida. Las concentraciones de estas proteínas pueden verse modificadas en ciertas enfermedades o patologías (DiPiro, 2005). Entre los factores que modifican la unión a proteínas están la presencia de otros

fármacos que compitan por esa unión y la modificación en la concentración de estas proteínas.

Eliminación

Los fármacos son eliminados del organismo por dos mecanismos principales: el metabolismo y la excreción. El metabolismo se define como la biotransformación química de los fármacos en moléculas (metabolitos) generalmente inactivas y con mayor hidrosolubilidad, facilitando así su excreción del organismo. El hígado es el principal órgano responsable de la actividad metabólica. Las reacciones de biotransformación pueden clasificarse en dos tipos:

- Reacciones de Fase I: Consisten en la introducción o exposición de un grupo funcional en la molécula del fármaco para inactivarlo y hacerlo más hidrosoluble. Las reacciones más comunes son las de oxidación, reducción e hidrólisis.
- Reacciones de Fase II: Estas reacciones culminan en la formación de un enlace covalente entre un grupo funcional de la molécula de fármaco y una molécula endógena como ácido glucurónico, sulfato, glutatión, acetato o aminoácidos. Los compuestos formados suelen ser rápidamente excretados en orina y heces.

Los procesos de metabolismo pueden ser afectados por factores genéticos, ambientales y fisiológicos como:

- Edad: El funcionamiento de los sistemas enzimáticos es muy diferente en los extremos de la edad. Las poblaciones más afectadas generalmente son los neonatos y los ancianos, los cuales presentan una actividad metabólica menor.
- Hábitos sociales: El consumo de alcohol y tabaco pueden incrementar el metabolismo hepático de algunos fármacos por la inducción de algunas enzimas.
- Patologías: Las enfermedades que afectan al hígado y/o modifican el riego sanguíneo afectan directamente la actividad enzimática.

- Genética: Los polimorfismos genéticos existentes en la población se ven reflejados en una variabilidad de cada persona para metabolizar los fármacos.
- Interacciones medicamentosas: Existen compuestos que pueden inhibir o incrementar la actividad de enzimas específicas, necesarias para el metabolismo de otros fármacos, modificando la velocidad con la que éstos se eliminan.

La excreción es el proceso por el cual los fármacos son eliminados de los tejidos y de la circulación ya sea en su forma inalterada o como metabolitos. Los órganos más importantes para la excreción son los riñones, aunque la excreción también puede llevarse a cabo por heces, bilis, sudor, aire expirado, leche materna y líquido seminal entre otros (DiPiro, 2005). La eliminación por vía renal comprende tres procesos: filtración glomerular, secreción tubular activa y reabsorción tubular pasiva.

Solamente las moléculas de bajo peso molecular pueden ser eliminadas por filtración, por lo que la fracción de fármaco unido a proteínas, de pesos moleculares altos, no se eliminan por este mecanismo. La secreción activa se lleva predominantemente en el túbulo proximal y es la encargada de facilitar la excreción del resto del fármaco. Aunque este transporte es activo carece de especificidad y, por lo tanto, moléculas que sean transportadas por el mismo sistema pueden presentar competitividad. Por último, las formas no ionizadas de los fármacos pueden experimentar reabsorción pasiva a lo largo de toda la nefrona asociada a la reabsorción del agua filtrada en el glomérulo (Rowland, 1995). La fracción no ionizada puede variar si el pH urinario cambia.

3.3.3. MODIFICACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA EN CÁNCER

Los tumores sólidos son estructuras parecidas a órganos pero más heterogéneas y complejas. La matriz extracelular de tumor difiere notablemente en cantidad y en composición con respecto a un tejido sano. Esta estructura y composición contribuyen a una presión intersticial elevada, lo que dificulta la penetración de los fármacos hacia el tejido.

La respuesta farmacológica del tumor es también influenciada directa e indirectamente por la vasculatura ya que los fármacos alcanzan el sitio de acción por vía sistémica. Los vasos sanguíneos de los tumores se caracterizan por una mayor dilatación, mayor cantidad de ramificaciones y por carecer de una organización. Además, el endotelio vascular presenta fenestraciones, una membrana basal discontinua, un flujo sanguíneo desorganizado y variable y la compresión de los vasos sanguíneos por las mismas células tumorales. Todo esto incrementa la resistencia al flujo sanguíneo y provoca una distribución de sangre anormal. Como resultado de la disminución de nutrientes, es común encontrar regiones en el tejido tumoral que presenten hipoxia y acidez y una actividad metabólica diferente. La llegada de fármaco a estos sitios se reduce debido a este microambiente tumoral (Trédan, 2007).

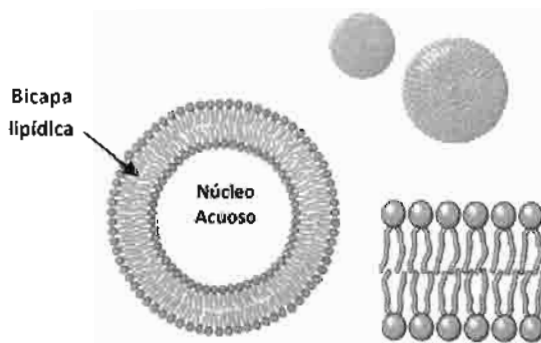
Los fármacos convencionales utilizados en oncología están lejos de ser ideales, particularmente por su dificultad para acumularse de manera selectiva en el tejido tumoral. La mayoría de sus efectos adversos, asociados a la alta distribución en tejidos sanos, limitan las dosis que pueden ser administradas a los pacientes.

Es por lo anterior, que muchas investigaciones actuales están enfocadas en lograr que la distribución de los fármacos antineoplásicos sea más selectiva por el tejido tumoral y menor en los tejidos normales para lograr así aumentar la eficacia y disminuir los severos efectos adversos que éstos presentan.

En este contexto, mediante la nanotecnología se han podido desarrollar nanosistemas capaces de funcionar como transportadores de moléculas terapéuticas. Estos sistemas generalmente resultan de la incorporación física del fármaco dentro de partículas tales como micro y nanoesferas, micelas poliméricas, micelas inversas, eritrocitos, niosomas y liposomas. De la amplia gama que existe, las nanopartículas y los liposomas han sido los más estudiados (Sinha, 2006).

3.4. LIPOSOMAS

Los liposomas se desarrollaron en los años sesenta por Bangham et al. Fueron definidas como vesículas esféricas de tamaño nanométrico que se forman cuando los fosfolípidos u otros lípidos anfipáticos similares son hidratados o expuestos a un ambiente acuoso (Uhumwangho, 2005). Se componen de un núcleo acuoso contenido dentro de una o más bicapas de fosfolípidos naturales o sintéticos como se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 6. Composición básica de un liposoma convencional. Las cabezas polares de fosfato de los fosfolípidos interactúan con el medio acuoso dentro y fuera del liposoma mientras que las cadenas hidrofóbicas interactúan entre ellas (imagen tomada de www.encyclopediasalud.com).

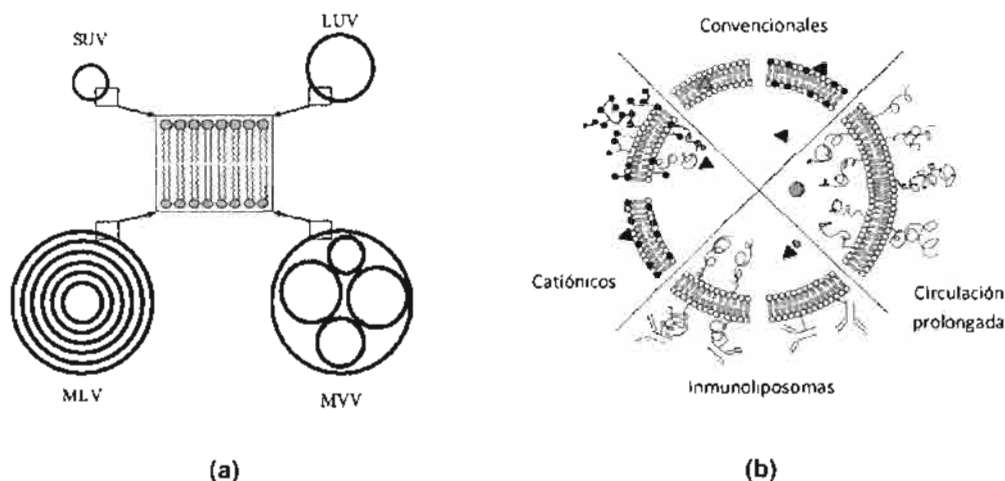
Una de las principales ventajas de estos sistemas con respecto a otros vectores es que pueden transportar tanto fármacos lipofílicos como hidrofílicos debido a la naturaleza anfipática de su membrana (Castro, 1999). Los fármacos muy liposolubles son transportados casi completamente en la bicapa lipídica, mientras que los fármacos hidrosolubles se encapsulan dentro del núcleo acuoso.

Otra ventaja muy importante es que al estar compuestos de fosfolípidos asemejan la composición de la membrana celular, lo que los hace biocompatibles y presentan una muy baja inmunogenicidad (Immordino, 2006).

3.4.1. CLASIFICACIÓN

Los liposomas pueden ser clasificados por el número de bicapas lipídicas que presenten y por su tamaño final como se muestra en el Esquema 7-a. Los liposomas unilaminares (LUV y SUV) presentan una sola bicapa y su tamaño varía entre 50 y 250nm, contienen un núcleo acuoso grande y son preferentemente usados para transportar fármacos hidrosolubles. Los liposomas multilaminares (MLV y MVV) presentan varias bicapas y tienen diámetros de 1 a 5 micras. El alto contenido de lípidos favorece el transporte de fármacos liposolubles. Otro sistema de clasificación es en función del grado de modificación realizada teniendo como base los liposomas tradicionales como se muestra en el Esquema 7-b. Teniendo en cuenta este criterio se pueden clasificar en:

- a) Liposomas convencionales
- b) Liposomas de circulación prolongada: También llamados liposomas *stealth*. Presentan compuestos unidos en la membrana, generalmente polímeros hidrofílicos como polietilenglicol (PEG), que permiten retrasar su eliminación del torrente sanguíneo.
- c) Inmunoliposomas: Contienen anticuerpos unidos en la superficie, adquiriendo mayor especificidad y favoreciendo su acumulación en tejidos u órganos específicos.
- d) Liposomas catiónicos: Su membrana está compuesta por fosfolípidos con cargas positivas. Son especialmente favorables para el transporte de material genético (ADN y ARN).



Esquema 7. Sistemas de clasificación de liposomas. a) Por el número de bicapas lipídicas se clasifican en vesículas unilaminares pequeñas (SUV), vesículas unilaminares grandes (LUV) y vesículas multilaminares (MLV y MVV). b) Por su funcionalidad pueden clasificarse en liposomas convencionales, liposomas de circulación prolongada, inmunoliposomas y liposomas catiónicos.

3.4.2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN

a) Método convencional (hidratación de lípidos)

Fue descrito por primera vez por Bangham et al en 1965 para obtener MLV's. En el procedimiento los fosfolípidos son disueltos en un medio orgánico y depositados como una película delgada en el fondo de un recipiente mediante evaporación del solvente a presión reducida. Posteriormente los lípidos son hidratados con una solución acuosa del fármaco, formándose la estructura liposomal (Palma, 2004).

b) Método por solubilización y remoción de detergente

Este método es utilizado para producir liposomas del tipo LUV. El procedimiento involucra la solubilización de los lípidos en una solución acuosa de un detergente y el fármaco a encapsular. Posteriormente el detergente se retira por diálisis o por cromatografía en columna formándose liposomas unilaminares de entre 80 y 200nm. Este método ha sido conveniente para la encapsulación de proteínas de importancia biomédica.

c) Método de evaporación de fase reversa

Consiste en la adición rápida de una solución acuosa del fármaco a una solución orgánica de los fosfolípidos, con sonicación simultánea. La emulsión formada es transformada en un gel por evaporación del solvente orgánico. El gel formado se somete a agitación vigorosa para transformarlo en un fluido. Con este método se logran obtener vesículas unilaminares de tamaños entre 0.1 y 1.0 micras (Szoka, 1978).

Técnicas de homogenización de tamaño:

a) Método por sonicación

Consiste en la sonicación de los liposomas obtenidos con el método convencional. El propósito de la sonicación es la obtención de liposomas unilaminares y de menor tamaño.

b) Método por extrusión

La extrusión es otro método para transformar liposomas multilaminares a unilaminares. Consiste en pasar las vesículas de manera repetida por filtros de policarbonato de tamaño de poro muy pequeño (0.05 - 0.5 micras) con presiones altas (hasta 600-800psi). Además de disminuir el tamaño, la extrusión garantiza una distribución de tamaño homogénea.

3.4.3. BIODISTRIBUCIÓN

Administrados de manera intravenosa, los liposomas convencionales son reconocidos rápidamente por el sistema retículo-endotelial (SRE) y removidos de la circulación, acumulándose principalmente en órganos como hígado y bazo (Uhumwangho, 2005). Esto suele ser un problema para la administración de los liposomas cuando los fármacos no van dirigidos contra este sistema. El primer paso para el reconocimiento por el SRE es la opsonización, es decir, la unión de proteínas séricas a la superficie del liposoma (inmunoglobulinas, fibronectina, b-2-

glicoproteína, proteína C reactiva y b-2-macroglobulina entre otras). Una vez unidas, las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos) son capaces de reconocer al liposoma retirándolo de la circulación sanguínea.

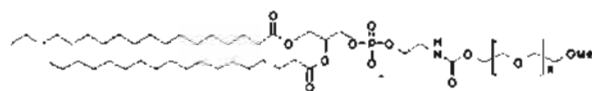
Además de lo anterior, los liposomas pueden interactuar con las lipoproteínas HDL y LDL del plasma. Esto ocasiona una desestabilización de la membrana y la rápida liberación del principio activo encapsulado en el plasma.

Las propiedades fisicoquímicas de los liposomas tales como la carga neta superficial, tamaño, fluidez y compactación de la bicapa lipídica influyen notablemente en su estabilidad y en el tipo de proteínas que se unan a ellos. Damen et al (2005) demostraron que la introducción de colesterol en la membrana del liposoma causaba una compactación y una mayor rigidez en ella, reduciendo la transferencia de los fosfolípidos a las HDL. Senior (1982) encontró que los liposomas elaborados con fosfolípidos con cadenas saturadas son más estables que los que contienen fosfolípidos insaturados.

En general, los liposomas de mayor tamaño son eliminados de la circulación más rápidamente que los liposomas pequeños. Asimismo los liposomas que presentan carga superficial ya sea positiva o negativa, son eliminados más rápido que los liposomas con carga neutra (Alexis, 2008).

3.4.3.1. LIPOSOMAS DE CIRCULACIÓN PROLONGADA (STEALTH)

Una de las estrategias más exitosas para retardar la eliminación de los liposomas de la circulación consiste en modificar la membrana para hacerla más hidrofílica mediante la unión de polímeros como el polietilenglicol (PEG). Estos últimos también son llamados liposomas *stealth* o estabilizados estéricamente (Moghimi, 2003). El PEG ha sido incorporado en la membrana liposomal de diferentes maneras pero la más utilizada es mediante su unión a alguno de los fosfolípidos que compone la bicapa como se ilustra en el Esquema 8.



DSPE-PEG

Esquema 8. Polietilenglicol (PEG) conjugado con diestearoil-fosfatidiletanolamina.

El PEG es biocompatible, soluble en medios acuosos y orgánicos, carece de toxicidad, presenta una muy baja inmunogenicidad y tiene una cinética de eliminación muy buena. Además, su peso molecular puede ser controlado para propósitos específicos y es más barato y más fácil de conjugar con los lípidos (Immordino, 2006).

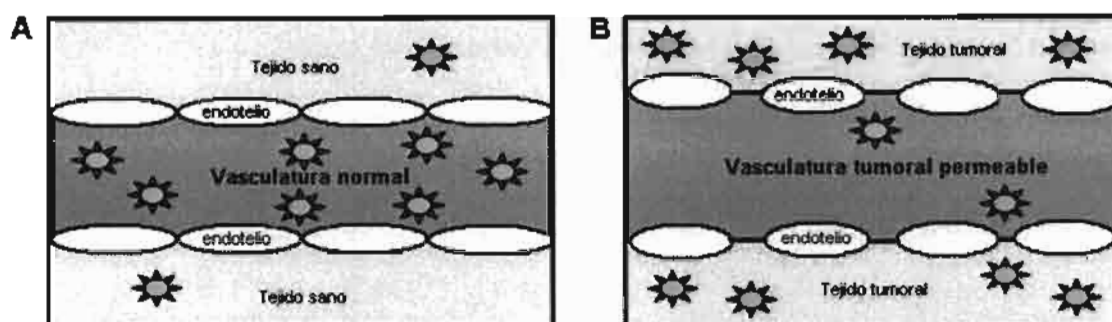
El mecanismo por el cual el tiempo de circulación de los liposomas se alarga cuando se une PEG a la membrana ha sido muy discutido. El concepto básico es que un polímero hidrofílico como el PEG causa un impedimento estérico, ocupando el espacio adyacente a la superficie del liposoma. Por consecuencia, el acceso y la unión de las opsoninas plasmáticas se ve dificultado y por lo tanto las interacciones con los macrófagos se ve inhibida (Lasic, 1996).

3.4.4. LIBERACIÓN DEL FÁRMACO

Los liposomas protegen a los fármacos de su degradación en el organismo ya que los fosfolípidos no son susceptibles a la degradación enzimática. Al permanecer en circulación por un tiempo considerablemente largo, los liposomas son capaces de acumularse de manera pasiva en tejidos y órganos específicos.

La rápida vascularización necesaria para la sobrevivencia de un tejido tumoral ocasiona que los vasos sanguíneos formados tengan una estructura defectuosa y permeable. La presencia de un endotelio vascular discontinuo facilita la extravasación de los liposomas hacia el espacio intersticial, fenómeno que en tejidos sanos, donde las células del endotelio vascular están compactadas, no se

presenta. Aunado a lo anterior, la falta de drenaje linfático en el tejido tumoral favorece la acumulación en este sitio (Esquema 9).



Esquema 9. Acumulación preferencial de liposomas en un tumor. **A**, La compactación de las células endoteliales en un tejido normal previene la extravasación de las partículas. **B**, La vasculatura del tejido tumoral presenta una permeabilidad aumentada lo que facilita el paso de los liposomas y su acumulación en el espacio intersticial.

Una vez en el espacio intersticial, el fármaco entra a las células por diferentes mecanismos entre los cuales se han propuesto difusión simple, fusión de la membrana liposomal con la membrana celular o por endocitosis de los liposomas (Torchilin, 2005).

3.4.5. TOXICIDAD

Los liposomas no son considerados tóxicos a menos que se administren en dosis extremadamente altas y de manera repetida, en las cuales se han visto efectos adversos principalmente en el sistema retículo endotelial (SRE) como hepatomegalia, esplenomegalia y granulomas. Algunos estudios han demostrado que aumentando las dosis de fosfolípidos puede llegar a depletar la concentración plasmática de diversas proteínas. Aunque no se han identificado estas proteínas ni su significancia biológica, puede esperarse que este cambio ocasione alteraciones en la homeostasis (Drummond, 1999).

En el presente trabajo se planteó la encapsulación de cisplatino en liposomas pegilados, a continuación se describe brevemente este fármaco.

3.5. MONOGRAFÍA DEL CISPLATINO

El cisplatino o cis-diaminodicloro-platino(II) fue sintetizado por primera vez por M. Peyrone en 1847 y formó parte de la teoría de coordinación de Alfred Werner en 1893. Fue hasta 1965 que Barnett Rosenberg et al. descubrieron la actividad citotóxica al estar trabajando con electrodos de platino en cultivos de *E. coli*. Tres años más tarde y después de realizar extensos estudios en cepas bacterianas el compuesto fue probado en animales obteniéndose resultados exitosos; en 1971 se realizaron los primeros estudios en pacientes y finalmente es aprobado en 1978 por la FDA para su uso clínico (Kelland, 2007). Actualmente el cisplatino es uno de los agentes antitumorales más usado y más efectivo en el tratamiento de neoplasias epiteliales tales como pulmón, cabeza y cuello, ovario, vejiga, testículo y cérvico-uterino.

3.5.1. ESTRUCTURA QUIMICA

La molécula se compone de un átomo central de platino unido a dos grupos amino y dos grupos cloruro dispuestos en configuración *cis*. Se ha demostrado que el trans-diaminodicloro-platino (II) carece de actividad citotóxica.

3.5.2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

El cisplatino es un polvo cristalino fino de un color amarillo anaranjado. Su peso molecular es de 300.97g/mol. Es poco soluble en agua, moderadamente soluble en dimetilformamida y prácticamente insoluble en alcohol. Se descompone con ennegrecimiento a 270°C y se conserva en envases cerrados herméticamente y protegidos de la luz.

3.5.3. MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción de cisplatino aún no está completamente elucidado pero se cree que principalmente se lleva a cabo mediante reacciones de hidrólisis en donde los grupos cloruro son reemplazados por moléculas de agua, dando a la molécula una carga positiva. Las moléculas hidratadas son las especies activas que interactúan con la molécula de ADN en el núcleo, inhibiendo la replicación, transcripción y otras funciones nucleares deteniendo la proliferación celular y por ende el crecimiento del tumor (Boulikas, 2003).

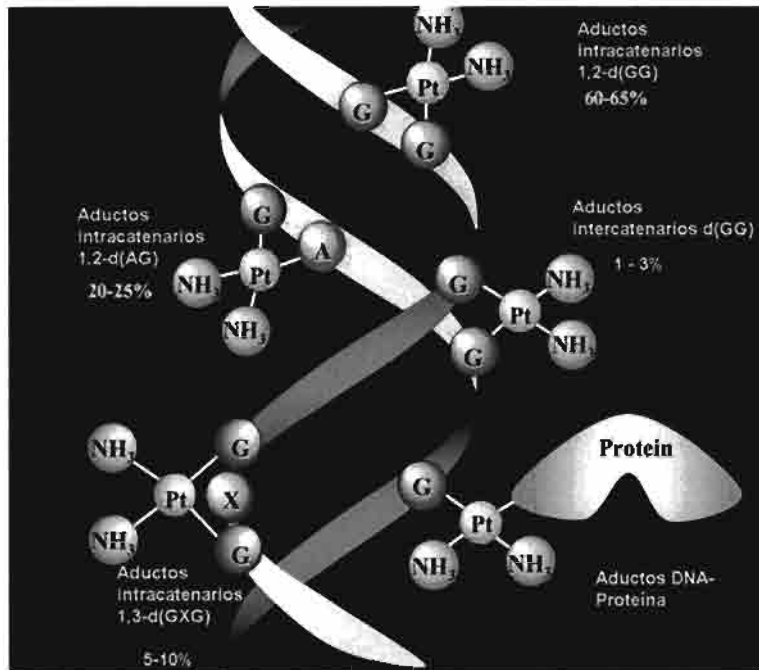
El cisplatino reacciona con los sitios nucleofílicos del ADN formando aductos y entrecruzamientos en su estructura. Los productos principales son los entrecruzamientos entre las dos cadenas del ADN o bien en puntos adyacentes dentro de una misma cadena; además puede formar monoaductos conservando un grupo reactivo libre para interactuar con otra molécula y también puede formar monoaductos al estar unido a otra proteína o molécula pequeña, tal como el glutatión. En el Esquema 10 se resumen las posibles formas de interacción del cisplatino con el ADN.

3.5.4. APLICACIONES Y POSOLOGÍA

Se emplea en casi todas las clases de tumores sólidos y linfomas. La FDA lo ha aprobado contra los cánceres de testículo y ovario y para el carcinoma de células de transición.

Se puede administrar de una sola vez en infusión i.v. o diariamente en infusión i.v. durante varios días cada ciclo. Las dosis repartidas en días se toleran mejor. La dosis total por ciclo oscila entre 80 y 160mg/m². También se puede emplear la infusión continua (Abeloff, 2005).

Para el tratamiento de cáncer de ovario se utilizan dosis de 100-200mg/m² de cisplatino por vía intraperitoneal.



Esquema 10. Mecanismo de acción de cisplatino. Se muestran los principales tipos de interacciones entre el cisplatino y el ADN (Boulíkas, 2007).

3.5.5. FARMACOCINÉTICA

El cisplatino tiene una mala biodisponibilidad por vía oral por lo que casi siempre se administra por vía intravenosa. Después de la administración i.v. el cisplatino se distribuye rápidamente en los tejidos ($t_{1/2}$ inferior a 1h); después de este lapso disminuyen las concentraciones del fármaco lentamente ($t_{1/2}$ de 60-90h) por su retención en los tejidos.

Más del 90% del cisplatino en la sangre está ligado en forma covalente a proteínas plasmáticas. En riñones, hígado, intestino y testículos, se detectan concentraciones altas de cisplatino, pero es poca su penetración en sistema

nervioso central. Su principal vía de eliminación es por los riñones y es mínima su excreción por bilis e intestinos.

3.5.6. TOXICIDAD

El uso clínico continuo del cisplatino se ha visto impedido por la severa toxicidad que presenta, principalmente a nivel renal, gastrointestinal, neurológico y ótico (Zamboni, 2004). El cisplatino también ha presentado mielosupresión leve o moderada y son frecuentes las perturbaciones electrolíticas.

La nefrotoxicidad se ha disminuido en los últimos años mediante la hidratación y diuresis de los pacientes. La ototoxicidad, sin embargo no se disminuye con estas técnicas. Se presenta generalmente con tinnitus y pérdida de la audición en la gama de altas frecuencias, tiende a ser más frecuente y grave con dosis repetidas y puede ser más intensa en niños.

3.5.7. RESISTENCIA

Además del ADN, moléculas pequeñas como aminoácidos, péptidos y proteínas como las metalotioneínas y el glutatión están muy involucradas en el metabolismo del cisplatino. Todos los complejos de platino tienen una gran afinidad hacia el residuo de cisteína del glutatión (Boulikas, 2003).

Las células cancerosas poseen diferentes niveles de glutatión y de metalotioneína los cuales disminuyen la concentración de las especies de platino a nivel intra e intercelular, previniendo así que se unan al ADN. En algunas líneas celulares se han encontrado elevados niveles de glutatión desarrollados como mecanismo de resistencia a este tipo de compuestos.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un grave problema de salud pública a nivel mundial, especialmente para los países en desarrollo, debido a la gran incidencia de casos y las pocas opciones terapéuticas disponibles para la mayor parte de los pacientes. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar el tratamiento y la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad es muy importante.

El cisplatino es un fármaco muy eficaz en el tratamiento de diversos tipos de neoplasias. Sin embargo, su falta de especificidad ocasiona severos efectos tóxicos en tejido sano, principalmente a nivel renal. Esta toxicidad se ha intentado reducir mediante distintos métodos, uno de los más prometedores es la encapsulación del cisplatino en vectores como nanocápsulas y liposomas.

Hasta ahora no se cuenta con ninguna formulación liposomal de cisplatino disponible comercialmente, pero los estudios en fases preclínica y clínica de algunas formulaciones han mostrado resultados prometedores. En este contexto, en el presente trabajo se planteó desarrollar una formulación liposomal de cisplatino que pueda utilizarse en un futuro como alternativa terapéutica en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México.

5. HIPOTESIS

La administración de una formulación liposomal de cisplatino en ratas Wistar mejorará la biodisponibilidad del fármaco y disminuirá la toxicidad renal, en comparación con la administración de la formulación convencional de cisplatino.

6. OBJETIVOS

6.1. GENERAL:

Elaborar una formulación liposomal de cis-diaminodicloroplatino (II) y evaluar la farmacocinética plasmática así como el daño renal producido tras la administración en ratas Wistar sanas; comparándola con la formulación convencional.

6.2. ESPECÍFICOS:

1. Elaborar y caracterizar fisicoquímicamente la formulación liposomal.
2. Estandarizar y validar un método de cuantificación de cisplatino a partir de muestras liposomales y/o muestras plasmáticas.
3. Evaluar los principales parámetros farmacocinéticos de la formulación tras la administración intravenosa en animales de experimentación y comparar éstos con los de la formulación convencional.
4. Determinar la nefrotoxicidad de la formulación liposomal y convencional de cisplatino.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. REACTIVOS

El cisplatino, cloruro de níquel, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro férrico, tiocianato de amonio, heparina y dietilditiocarbamato sódico fueron obtenidos de Sigma-Aldrich®. El isoflurano utilizado como anestésico se obtuvo de Baker®. Los lípidos HSPC y colesterol se obtuvieron de Northern Lipids Inc. y el mPEG₂₀₀₀-DSPE se obtuvo de Avanti® Polar Lipids Inc.

Los solventes acetonitrilo y metanol de grado cromatográfico fueron obtenidos de J.T. Baker® y Fermont® respectivamente. El cloroformo utilizado fue de grado reactivo y se obtuvo de HYCEL de México S.A. El agua de alta calidad empleada para la cromatografía y la preparación de soluciones se obtuvo a partir de un sistema Milli-Q Reagent Water (Millipore®).

7.2. ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar machos de un peso entre 200-300 g proporcionadas por el Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) de la Ciudad de México.

El protocolo para el manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos por el National Institute of Health (NIH) y fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cancerología.

7.3. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS CON CISPLATINO

Se probaron dos métodos diferentes para la encapsulación de cisplatino en liposomas, los cuales fueron el método de hidratación de lípidos y el método de evaporación de fase reversa.

7.3.1. Método de rehidratación de lípidos

Los liposomas se componen de HSPC, Colesterol, mPEG-DSPE y α -tocoferol. La proporción fármaco-fosfolípidos utilizada fue de 1:8.

Se pesan los lípidos y se disuelven en cloroformo. La solución se coloca en un rotavapor (Heidolph[®]) a 140 rpm y el solvente orgánico se evapora a 40 °C por 30 min. Posteriormente el matraz se coloca dentro de un desecador con llave de vacío durante 5 h. Para formar los liposomas, los lípidos se hidratan durante 30 min con una solución de 3 mg/mL de cisplatino con 500 mM de NH₄SO₄ en PBS manteniendo en agitación a 140rpm. Posteriormente se agrega una solución de cisplatino de 3.5 mg/mL en PBS y se mantiene en agitación otros 30 min.

El fármaco no encapsulado se elimina por medio de diálisis durante 72 h utilizando una membrana con un tamaño de poro de 3,500 Da (Spectra/Por[®] 3). Se usa PBS con 300 mM de sacarosa como medio de diálisis en proporción 20:1 (v/v) con respecto al volumen de liposomas y cambiando el medio cada 24 h.

Los liposomas se diluyen al doble, se colocan en un baño sonicador (MRC International) por 5 min a 40 °C y se extruyen por filtros de policarbonato de 400 nm (2 veces), 200 nm (2 veces) y 100 nm (4 veces) a 65°C. Al terminar la extrusión se realiza una diálisis más durante 72 h para eliminar el fármaco liberado durante el proceso.

De esta metodología se probó una variante, la cual consistió en cambiar el PBS por solución salina inyectable como disolvente del cisplatino.

7.3.2. Método de evaporación de fase reversa

Los liposomas se componen de HSPC, Colesterol y mPEG₂₀₀₀DSPE. La proporción fármaco-fosfolípidos utilizada para éste método fue de 1:12.

Los lípidos se pesan y se disuelven en una mezcla de cloroformo-metanol. Por otra parte, se prepara una solución sobresaturada de cisplatino en agua destilada estéril y se mantiene a 65 °C con agitación magnética. Se mezclan las dos soluciones y se agitan para formar una emulsión, se transfiere la mezcla a un rotavapor y los solventes orgánicos se evaporan a 65°C y 140rpm durante 1h.

Los liposomas se dejan enfriar a temperatura ambiente, se diluyen al doble y se realiza una diálisis durante 4h con agitación a temperatura ambiente. El medio de diálisis utilizado es NaCl 0.9% en proporción 20:1 (v/v) con respecto al volumen de liposomas.

Finalmente, se realiza una extrusión por filtros de policarbonato de 400nm (2 veces), 200nm (2 veces) y 100nm (4 veces) y se realiza una diálisis más durante 4 h para eliminar el fármaco liberado durante la extrusión.

De esta técnica se probaron dos variantes durante la mezcla de las soluciones:

- a) Agregando lentamente, por goteo, la solución de lípidos a la solución de cisplatino
- b) Agregando por goteo la solución de cisplatino a la solución de lípidos.

Además se probó una tercera variante sustituyendo el proceso de extrusión por una sonicación:

- c) Se gotea la solución de lípidos a la solución de cisplatino y se somete la mezcla a sonicación durante el proceso de evaporación de los solventes orgánicos. No se realiza el proceso de extrusión.

7.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS LIPOSOMAS

7.4.1. Medición del tamaño de partícula

Se lleva a cabo mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz a 90° con un Zeta Sizer (90Plus, Brookhaven Instruments Corporation®).

Para la lectura del estándar se lavan dos veces las celdas con una solución de KCl 10mM previamente filtrada; se llenan con 2mL de la misma solución y se colocan 5 µL de estándar de microsferas de 90nm (Duke Scientific®), se homogeniza y se coloca en el equipo. El tamaño de partícula del estándar deberá ser entre 92 ± 3.7 nm. La lectura de las muestras se realiza de la misma manera, colocando 5µL de la muestra en lugar del estándar.

Los parámetros utilizados para las lecturas son: temperatura de 25 °C, viscosidad de 0.890cP, índice de refracción de 1.33, un ángulo de 90° y una longitud de onda de 657nm.

7.4.2. Medición del potencial de membrana (potencial zeta)

El estándar se disuelve en 5mL de una solución de KCl 1mM previamente filtrada hasta observar una coloración tenue. La celda se lava dos veces con esta solución y se llena con 1.8mL de la misma. Se introduce el electrodo en la celda cuidando que no quede ninguna burbuja, se conecta el electrodo al equipo (90Plus, Brookhaven Instruments Corporation®) y se realiza la lectura. El estándar debe dar una lectura de -53 ± 4 mV.

Para la lectura de las muestras las celdas se lavan 2 veces con KCl 1mM, se llenan con 1.8mL de la misma y se agregan 10 μ L de liposomas. Se coloca el electrodo y se realiza la medición de la misma manera que el estándar.

Los parámetros para la medición son: temperatura de 25°C, pH de 7.4, concentración de 1mg/mL, constante dieléctrica de 78.54 y el tamaño de partícula correspondiente a cada muestra.

7.4.3. Cuantificación de fosfolípidos

La determinación de fosfolípidos se basa en el método colorimétrico de Stewart, el cual permite medir concentraciones en un rango de 0.01 a 0.1mg.

Para la curva patrón de fosfolípidos se prepara una solución stock de 2mg/mL de HSPC en cloroformo. A partir de esta solución se prepara un stock de 0.2 mg/mL de HSPC (dilución 1:10). De esta última solución se toman volúmenes de 0 a 300 μ L para preparar una curva patrón de 0.02 – 0.08 mg/mL.

Se agitan los tubos durante 1min y se centrifugan a 3,000rpm/3min a 4°C. Se remueve la fase acuosa y la fase clorofórmica se lee a una longitud de onda de 488nm en un espectrofotómetro (DU®530, Beckman Coulter™).

Para las muestras se prepara una dilución 1:10 y se toman 20 μ L los cuales se agitan en vórtex por 1 min para favorecer la ruptura de los liposomas. Se lleva a sequedad total con nitrógeno gaseoso y se agregan otros 15 μ L de agua desionizada. Se repite el proceso de secado, se resuspenden los lípidos en 750 μ L de cloroformo y se agita en vórtex por 2min.

Se agregan 750 μ L de ferrotiocianato de amonio, se agita en vórtex por 1min y se centrifuga a 3000rpm/3min/4°C. La fase acuosa es retirada y de la fase

clorofórmica se toman aproximadamente 700µL los cuales se depositan en la celda de cuarzo para realizar la lectura.

7.4.4. Cuantificación de fármaco encapsulado

7.4.4.1. Preparación de las muestras

Las muestras de liposomas (100µL) se extraen con acetonitrilo y se centrifugan a 10,000rpm por 10min a 4°C. El sobrenadante se lleva a sequedad bajo corriente de N₂. El residuo se resuspende con solución salina inyectable y se agrega el estándar interno (NiCl₂). Se adiciona dietilditioicarbamato sódico (DDTC) al 10% y la mezcla se incuba a 37°C en un termomezclador (Eppendorf®). Posteriormente el cisplatino se extrae con cloroformo y se centrifugan a 10,000rpm por 10min a 4°C. Finalmente, la fase clorofórmica se inyectan en el equipo cromatográfico.

7.4.4.2. Condiciones cromatográficas

El equipo cromatográfico consiste de una bomba Modelo 650E (Waters™) con detector de luz UV 486 (Waters™). Se utiliza una columna de fase reversa Symmetry® C18 (3.9x150mm) de 5µm de tamaño de partícula (Waters™). La fase móvil utilizada es Agua-Metanol-Acetonitrilo (31:31:38) a un flujo de 1.6mL/min. La detección se realiza a 254nm y el volumen de inyección es de 20µL.

7.4.4.3. Validación

El método de extracción fue validado utilizando los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-1998. Los criterios evaluados fueron la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, porcentaje de recobro, limite de cuantificación y estabilidad.

Las curvas de calibración de cisplatino utilizadas abarcan un rango de 0 a 10µg/mL y se construyen graficando la relación de la altura del pico de cisplatino entre la altura del pico del estándar interno (NiCl₂) en función de la concentración de cisplatino.

7.5. FARMACOCINÉTICA DE CISPLATINO LIPOSOMAL

Doce horas antes del estudio se retira el alimento y se mantiene el agua *ad libitum*. El día del estudio los animales son anestesiados mediante un equipo de anestesia para roedores VAPOMATIC™. La arteria caudal y la vena yugular son canuladas utilizando tubo de poliestireno PE10 y PE50 (Stoelting Co.).

Los animales se dividen en dos grupos con una *n*=6 en cada uno; al primer grupo se le administra una dosis de 6mg/kg de cisplatino en solución salina inyectable, mientras que el segundo grupo recibe una dosis equivalente de cisplatino liposomal. La administración se realiza por vía i.v. a través de la vena yugular. Los animales son inmovilizados en cilindros de acrílico y se procede a tomar muestras sanguíneas (300µL) a los 0, 5, 15 y 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48h a través de la arteria caudal.

Las muestras de sangre se colectan en microtubos de 1.5mL (COSTAR®) heparinizados y se centrifugan a 10,000rpm por 10min a 4°C para separar el plasma. Los plasmas obtenidos se almacenan a -70°C hasta su análisis.

Para el grupo de cisplatino convencional se obtienen muestras de plasma ultrafiltrado mediante la centrifugación del plasma a 10,000rpm durante 40min a 4°C utilizando filtros de 30kDa (VIVASPIN®).

7.5.1. Determinación de cisplatino en muestras plasmáticas

Se realiza por cromatografía de líquidos de alta resolución, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

7.5.2. Análisis farmacocinético

Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados usando el software WINONLIN Professional V.2. Se utilizó un modelo de dos compartimentos para ajustar los datos. Se determinaron los siguientes parámetros: área bajo la curva (ABC), Concentración máxima al tiempo cero (C_{p0}), depuración total (Cl), volumen de distribución (V_d) y las vidas medias de distribución y eliminación ($t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$).

7.6. EVALUACIÓN DE DAÑO RENAL

Se obtienen muestras sanguíneas de los animales por el plexo retroorbital a las 0 y 24h después de la administración de los tratamientos, se centrifugan a 10,000rpm por 10min a 4°C para separar el plasma y se almacenan a -70°C hasta su análisis. De estas muestras se cuantifican la creatinina, urea y nitrógeno uréico en plasma (BUN).

Además de lo anterior se recolectan las orinas de los animales a las 0 y 24h después del tratamiento. Se mide el volumen total de orina recolectado, se centrifuga a 3,000rpm por 5min a 4°C y se toman alícuotas de 1ml las cuales se almacenan a -70°C hasta su análisis. De estas muestras se determina la creatinina excretada. Para el cálculo de la depuración de creatinina (Cl_{cr}) se utiliza la siguiente fórmula:

$$Cl_{cr} = (Cr_{orina} * FU) / Cr_{ser}$$

Donde:

Cr_{orina} = Conc. de creatinina en orina

F.U. = Flujo urinario (mL/h)

Cr_{ser} = Conc. de creatinina en plasma \

7.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una prueba de *t* de Student con el objetivo de determinar las posibles diferencias en los parámetros farmacocinéticos entre los dos grupos de animales de experimentación.

Para los datos de daño renal se utilizó una prueba de Mann-Whitney para determinar diferencias estadísticas entre los dos grupos de experimentación a las 0 y 24h después del tratamiento.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS CON CISPLATINO

8.1.1. Método de hidratación de lípidos

Se prepararon dos lotes de liposomas utilizando la técnica de hidratación de lípidos. El primer lote se preparó utilizando PBS con sacarosa como disolvente del cisplatino, mientras que para el segundo lote se utilizó solución salina como disolvente. Las concentraciones de cisplatino obtenidas en los lotes 1 y 2 fueron de 5.4 y 16.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. La diferencia de concentración entre estos dos lotes se pudiera explicar por el cambio de solvente ya que éste pudiera estar influyendo en la cantidad de fármaco que puede encapsularse en el compartimento acuoso del liposoma.

Las bajas concentraciones de cisplatino obtenidas con este método pueden deberse al tipo de liposomas formados. La técnica de hidratación de lípidos favorece la producción de vesículas multilaminares (MLV) las cuales contienen un volumen relativamente pequeño de compartimento acuoso en comparación con los liposomas unilaminares (Torchilin, 2003).

Además de lo anterior, es posible que durante el proceso de extrusión se esté liberando cierta cantidad de cisplatino encapsulado ya que se reduce aun más el espacio del compartimento acuoso.

Con las concentraciones obtenidas por este método no fue posible realizar los estudios de farmacocinética plasmática, ya que la cantidad encapsulada no fue suficiente para administrar las dosis correspondientes, por lo que se decidió realizar la técnica de evaporación de fase reversa para lograr una mayor concentración del fármaco encapsulado.

8.1.2. Método de evaporación de fase reversa

Los lotes 3, 4 y 5 fueron preparados mediante la técnica de evaporación de fase reversa, basándose en la técnica reportada por Mai et al. (2009). Con esta técnica se mejoró la encapsulación de cisplatino, lográndose concentraciones iniciales de entre 200 y 600 µg/mL. Sin embargo se observó que después de realizar el proceso de extrusión la concentración disminuye entre un 70-90% en todos los casos. Estos resultados son distintos a lo reportado por Carvalho et al. (2007) en donde la extrusión no modifica la eficiencia de encapsulación inicial del cisplatino. Sin embargo, en diversos estudios se han reportado pérdidas de lípidos durante este proceso de hasta un 15%, lo que podría significar una disminución en el número de liposomas formados y por lo tanto una pérdida del fármaco encapsulado (Torchilin, 2003).

Una posible explicación para la pérdida de cisplatino pudiera ser la ruptura mecánica de los liposomas durante su paso por el equipo de extrusión. En este caso la presión y la temperatura utilizadas son factores muy importantes que deben ser controlados durante el proceso.

La temperatura utilizada generalmente es de 5 a 10°C por arriba de la temperatura de transición de los fosfolípidos. En el caso particular del cisplatino es igualmente importante mantener la temperatura controlada ya que por su baja solubilidad generalmente se trabaja con soluciones sobresaturadas y cualquier cambio en la temperatura puede ocasionar la precipitación del fármaco.

La presión es igualmente importante ya que si se aplican presiones muy altas se puede ocasionar precisamente la ruptura de los liposomas y la pérdida de lípidos en el proceso.

Para evitar la pérdida del cisplatino en el proceso de extrusión se prepararon tres lotes más (lotes 6, 7 y 8) modificando la técnica de elaboración.

Esta modificación consistió en sonicar los liposomas durante la evaporación de los solventes orgánicos y omitir el proceso de extrusión.

En estos tres últimos lotes de liposomas se logró una mejor encapsulación del cisplatino, obteniendo concentraciones finales de 0.9 a 1.4 mg/mL. A pesar de que no se realizó la extrusión, el tamaño de partícula de estos lotes no aumentó de manera significativa, manteniéndose entre los 100 y 150nm.

Las concentraciones de estos últimos liposomas fueron adecuadas para poder realizar los estudios de farmacocinética en animales de experimentación. En la Tabla 3 se resumen las concentraciones y las eficiencias de encapsulación de los lotes preparados.

8.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS LIPOSOMAS

Para los lotes 1,2 y 3, los cuales presentaron concentraciones iniciales bajas de cisplatino, no se realizó la caracterización fisicoquímica de los mismos, debido a que con dichas concentraciones no era posible realizar el estudio farmacocinético. Para los lotes 4 y 5 se midió el tamaño de partícula antes y después del proceso de extrusión con la finalidad de establecer la influencia del tamaño del liposoma sobre el porcentaje encapsulado; sin embargo, como las concentraciones finales de cisplatino también resultaron bajas no se completó la caracterización de estos lotes. En los lotes 6, 7 y 8, en los cuales la concentración encapsulada fue adecuada para llevar a cabo los estudios de farmacocinética, se realizó la caracterización fisicoquímica completa; los resultados se resumen en la Tabla 3.

8.2.1. Tamaño de partícula

Los lotes sometidos al proceso de extrusión presentaron tamaños de partícula finales entre 110 y 120nm con una distribución homogénea. Por otro

lado, los liposomas que se homogenizaron por sonicación en lugar de la extrusión presentaron tamaños de partícula muy similares de entre 130 y 150nm.

Extensas investigaciones han demostrado que un tamaño entre 100-200nm favorece la acumulación de los liposomas en el tejido tumoral y la internalización en las células tumorales (Ramachandran, 2006). De igual manera se prolonga el tiempo de permanencia en circulación ya que el reconocimiento por las células fagocíticas disminuye (Li, 2008).

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de liposomas de cisplatino. Se muestran los valores de concentración de cisplatino, eficiencia de encapsulación (%EE), tamaño de partícula, índice de polidispersión (IP), potencial zeta y concentración de fosfolípidos.

Lote	Conc. Cisplatino (µg/mL)	%EE	Tamaño de partícula (nm)	IP	Potencial Zeta	Conc. Fosfolípidos (mg/mL)
1	16.8	0.51	-	-	-	-
2	5.4	0.16	-	-	-	-
3	76.75	1.87	-	-	-	-
4	88.35	2.15	117.5	0.045 (unimodal)	-	-
5	29.7	0.72	115.3	0.028 (bimodal)	-	-
6	1,192.5 ± 185.5 *	29.08 ± 3.69 *	144.3 ± 6.9 *	0.122 ± 0.03 *	-39.86 ± 5.85 *	25.39 ± 4.06 *
7						
8						

* Valores promedio ± E.E. de las determinaciones de los lotes 6, 7 y 8.

8.2.2. Potencial de membrana (potencial zeta)

El potencial zeta se determina como una medida de estabilidad de las suspensiones coloidales. Las partículas microscópicas como los liposomas presentan una carga eléctrica superficial. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostáticas entre las partículas vecinas. Si la carga es lo suficientemente elevada, las partículas permanecen dispersas y en suspensión. Por el contrario, si estas cargas disminuyen las partículas tienen más posibilidades de colisionar, fusionarse y/o aglomerarse.

En el caso de los liposomas preparados, se lograron obtener valores de potencial zeta entre -30 y -50mV lo que indica que las suspensiones obtenidas presentan una estabilidad aceptable para este tipo de formulaciones (Zetasizer Nano Series User Manual, Malvern Instruments®).

8.2.3. Cuantificación de fosfolípidos

Si bien la composición de los liposomas les confiere la propiedad de ser biocompatibles y biodegradables, la concentración de fosfolípidos en estas formulaciones es una de las determinaciones fundamentales y uno de los parámetros más importantes en su caracterización química.

Working et al. (1998) encontraron que los niveles séricos de colesterol se elevan considerablemente en simios, tras la administración de altas dosis de lípidos ya sea en liposomas con principio activo como en liposomas placebo. Además del aumento de colesterol sérico, en este mismo estudio se encontraron ligeros efectos tóxicos a nivel hematológico y gastrointestinal.

Las dosis altas de lípidos pueden influenciar el tiempo de permanencia en circulación de los liposomas. Los mecanismos y sistemas por los cuales los liposomas son eliminados son saturables. La disminución en la capacidad fagocítica de los macrófagos del sistema retículo-endotelial o la saturación de las opsoninas plasmáticas son los dos posibles mecanismos principales por los cuales la eliminación se ve retrasada (Drummond, 1999).

Las concentraciones de fosfolípidos obtenidas en los lotes de liposomas preparados son del rango de los 20 a 30 mg/mL. Considerando que el volumen sanguíneo de una rata Wistar sana es alrededor del 7-8% de su peso corporal (Lee, 1985), podemos esperar que con las dosis administradas se genere un aumento de 1 a 2 mg/dL en la concentración de fosfolípidos en plasma y un aumento similar en las concentraciones plasmáticas de colesterol. Consideramos

que este aumento no es significativo como para provocar alguna toxicidad ya que el organismo es capaz de revertir este aumento para regresar a los valores basales tras la administración de la formulación. Lo anterior se reflejó en la ausencia aparente de toxicidad en los animales tratados.

8.2.4. Cuantificación de cisplatino

Las concentraciones de cisplatino en los liposomas elaborados se han resumido en la Tabla 3.

8.2.4.1. Validación del método cromatográfico para la cuantificación de cisplatino a partir de muestras liposomales y/o plasmáticas.

El cisplatino presentó un tiempo de retención de 5.2min y el estándar interno (NiCl_2) de 6.7min. El método cromatográfico demuestra una buena selectividad para la determinación de cisplatino, ya que no se presentan picos de interferencia a ninguno de estos tiempos como puede observarse en la Figura 1.

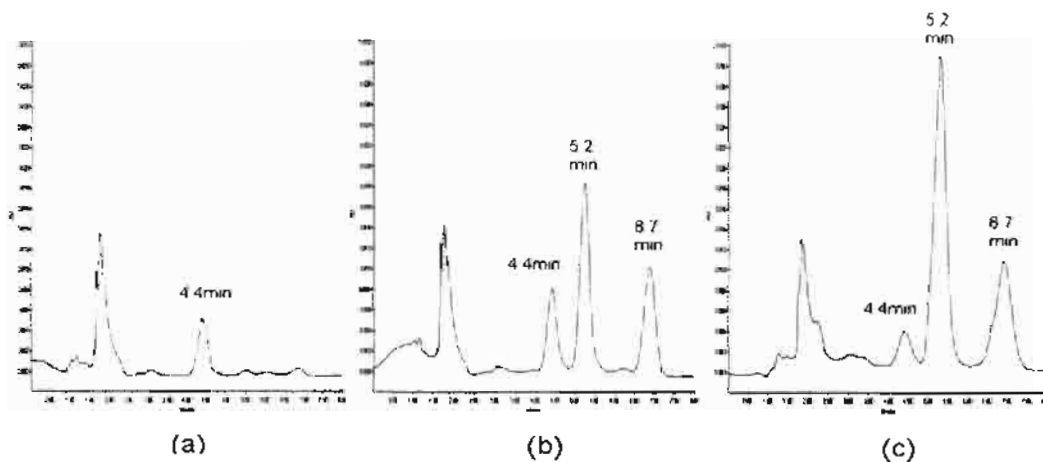


Figura 1. Cromatogramas típicos obtenidos después de la inyección al sistema cromatográfico de (a) muestra de plasma blanco. (b) estándar de cisplatino de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (c) Cisplatino obtenido de una muestra plasmática de rata a las 24 h después de la administración de 6mg/kg de cisplatino liposomal.

Además, el método resultó ser lineal, preciso y exacto en el rango de concentración de 0 a 10 µg/mL. Los parámetros principales de la validación se resumen en las Tabla 4 y 5.

Tabla 4. Parámetros de validación del método analítico.

PARÁMETRO	VALOR	ESPECIFICACIONES
Linealidad (r^2)	$r^2 = 0.9982$	-
	$m = 0.4365$	-
	$b = 0.0192$	-
Precisión Intra-día (C.V.)		
2 µg/mL	12.9%	< 15%
4 µg/mL	7%	< 15%
8 µg/mL	2.1%	< 15%
Precisión inter-día (C.V.)		
2 µg/mL	6.2%	< 15%
4 µg/mL	3.8%	< 15%
8 µg/mL	5.6%	< 15%
Exactitud (Concentración)		
2 µg/mL	2.09 µg/mL	1.7 – 2.3 µg/mL
4 µg/mL	4.04 µg/mL	3.4 – 4.6 µg/mL
8 µg/mL	7.79 µg/mL	6.8 – 9.2 µg/mL
Porcentaje de recobro	94.6 ± 11.39%	-
Limite de cuantificación (C.V.)		
0.5 µg/mL	17.29 %	< 20%

Especificaciones según la NOM-177-SSA1-2008

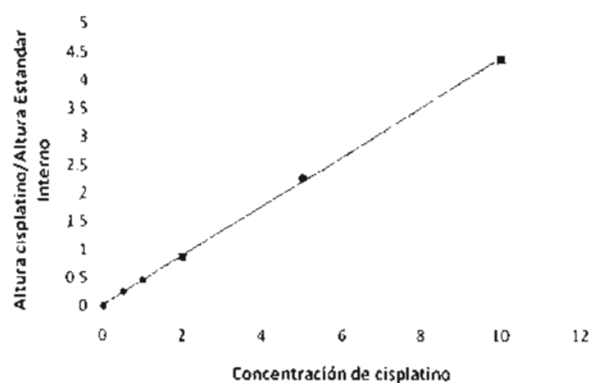


Figura 2. Curva de calibración de cisplatino. Los valores representan el promedio de cinco repeticiones ± E.E.

Tabla 5. Prueba de estabilidad de muestras plasmáticas. Los valores representan la altura del pico de cisplatino entre la altura del estándar interno.

CONCENTRACIÓN	RELACIÓN DE ALTURAS			
	FRESCO	1 DÍA	1 SEMANA	1 MES
1 µg/mL	0.4569	0.4980	0.4598	0.4535
5 µg/mL	2.3496	2.2790	2.0848	2.1787
10 µg/mL	4.2921	4.1943	4.7255	4.5240

8.3. FARMACOCINÉTICA DE CISPLATINO LIPOSOMAL

Las curvas de concentración plasmática de cisplatino vs tiempo obtenidas tras la administración de los tratamientos se muestran en la Figura 3. Las concentraciones plasmáticas de cisplatino convencional caen rápidamente durante las primeras dos horas después de las cuales es apenas detectable; estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Abeloff, 2005; Wang S, 2003; Wang X, 2007). Por el contrario, en el grupo de cisplatino liposomal las concentraciones plasmáticas caen lentamente y de manera sostenida, encontrándose valores altos incluso 48h después de la administración.

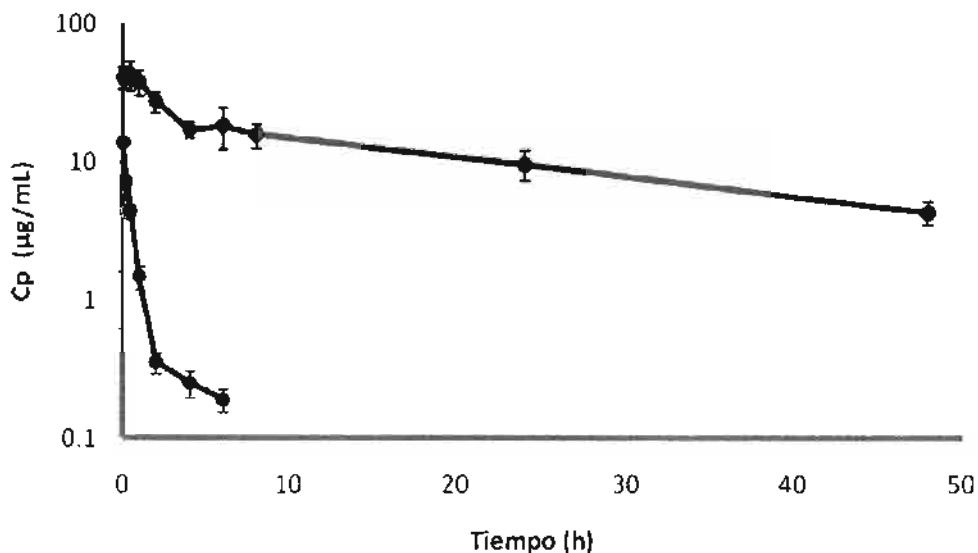


Figura 3. Curvas de concentración plasmática de cisplatino vs tiempo obtenidas tras la administración i.v. de 6mg/kg de cisplatino convencional (rojo) y cisplatino liposomal (verde). Cada punto representa el promedio ± EE de seis animales.

Los parámetros farmacocinéticos se ven modificados de manera significativa (Tabla 6). El V_d disminuye prácticamente a la mitad con la formulación liposomal lo cual nos indica que la distribución del cisplatino en los tejidos es menor que con el cisplatino libre y que mayor cantidad de fármaco está siendo retenida en el plasma. Con estos resultados podríamos esperar que la formulación presentara una menor toxicidad en tejidos sanos y una mayor acumulación en tejido tumoral.

La Cl disminuyó casi 80 veces y el $t_{1/2}$ aumenta entre 3 y 4 veces. Estos resultados nos permiten proponer que el recubrimiento de los liposomas con PEG confiere una protección adecuada contra el reconocimiento del sistema reticuloendotelial y por lo tanto, retrasa en gran medida la remoción de los liposomas de la circulación sanguínea.

A pesar de que la eliminación del cisplatino se vuelva más lenta, podríamos esperar que el fármaco que permanece en circulación no cause toxicidad ya que teóricamente la mayor parte del cisplatino se mantiene encapsulada dentro de los liposomas.

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de las dos formulaciones analizadas. Los datos corresponden al promedio de 6 experimentos \pm EE. * $P < 0.05$ vs el grupo de cisplatino convencional.

Parámetro	Cisplatino convencional	Cisplatino liposomal
Vd (mL/kg)	311.26 \pm 39.29	154.73 \pm 21.7 *
ABC (μ g-h/mL.kg)	10.46 \pm 2.57	749.42 \pm 136.89 *
t_{1/2α} (h)	0.16 \pm 0.036	1.88 \pm 0.16 *
t_{1/2β} (h)	9.41 \pm 5.46	31.54 \pm 5.97 *
Cp⁰ (μ g/mL)	21.40 \pm 3.59	44.26 \pm 8.38 *
Cl (mL/h)	741.01 \pm 151.25	9.29 \pm 1.47 *

Los resultados anteriores se ven reflejados en un aumento de casi 70 veces en el valor de ABC para la formulación liposomal por lo que la biodisponibilidad del cisplatino se está mejorando en gran medida.

Como se mencionó anteriormente, una de las limitantes del cisplatino es su baja biodisponibilidad, ya que se distribuye rápidamente en los tejidos y su alta unión a proteínas plasmáticas hace que la fracción disponible de fármaco para ejercer un efecto farmacológico en el tumor sea muy baja. En consecuencia, los tratamientos con cisplatino suelen generar gran toxicidad así como la aparición de resistencia farmacológica en algunos tumores.

El aumento en la biodisponibilidad permite sugerir que la acumulación del cisplatino en el tumor será mayor con la administración de la formulación desarrollada en comparación con el cisplatino no encapsulado ya que los liposomas aprovechan las condiciones fisiológicas de un tumor, mencionadas con anterioridad, para acumularse preferencialmente en ese sitio. Por lo tanto se podría esperar una mayor eficacia así como la disminución en los efectos adversos. Un factor importante a considerar es el hecho de que la mayor parte del cisplatino permanezca dentro del liposoma; si bien los estudios de liberación del fármaco son importantes para predecir con mayor certeza la toxicidad y el efecto farmacológico, la evaluación de estos parámetros nos indica de manera indirecta la permanencia del cisplatino dentro del liposoma. En el presente proyecto se evaluó la disminución de daño renal (ocasionado por la administración de cisplatino convencional, no-liposomal) con la aplicación del cisplatino liposomal.

8.4. DAÑO RENAL

Los valores plasmáticos de creatinina así como la depuración de creatinina son marcadores muy sensibles de daño renal. Al producirse una insuficiencia renal aguda los valores de creatinina en plasma pueden verse aumentados y la depuración de creatinina disminuye. En el caso de la urea y BUN plasmáticos, los valores plasmáticos también se muestran elevados en casos de daño renal.

La administración de cisplatino convencional provocó un aumento significativo de todos los indicadores bioquímicos de daño renal a las 24h después

de su administración. Por el contrario, la administración de cisplatino liposomal no mostró diferencias significativas en ninguno de estos valores (Figuras 4 y 5).

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado en la literatura (Working, 1998; Devarajan, 2004) en donde se ha encontrado una elevación de los niveles de creatinina plasmática y BUN con la administración de cisplatino libre.

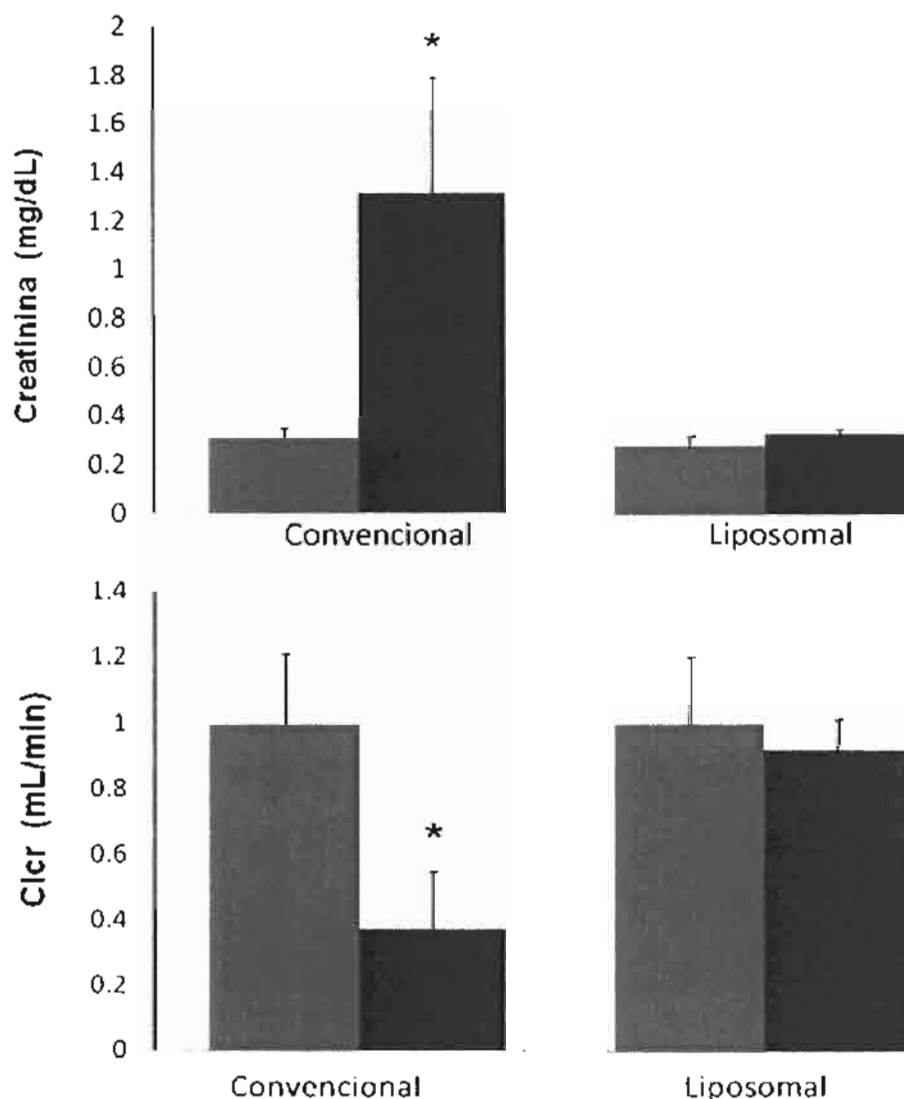


Figura 4. Valores basales (verde) y 24h después de los tratamientos (azul) encontrados para creatinina plasmática y depuración de creatinina, en cada grupo de estudio. Los resultados representan el promedio de 6 experimentos \pm EE. * $P < 0.05$ vs valores basales del mismo grupo.

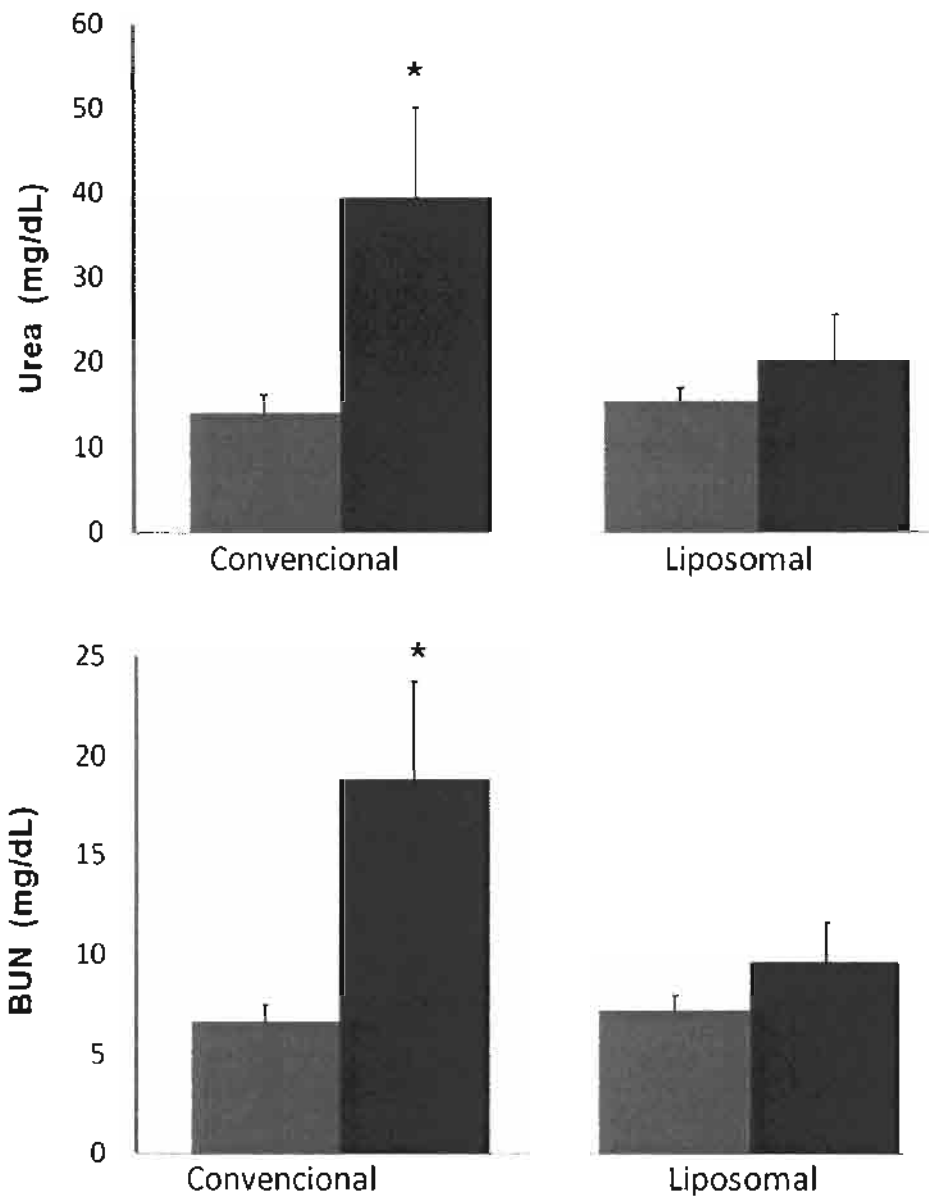


Fig. 5. Valores basales (verde) y a las 24h posteriores al tratamiento (azul) obtenidos para urea y nitrógeno uréico (BUN) en plasma. Los datos representan el promedio de 6 animales \pm EE.

* $P < 0.05$ vs valores basales del mismo grupo.

Estos resultados demuestran que a pesar de que el cisplatino permanece mucho más tiempo en circulación, se lograron prevenir los severos efectos tóxicos a nivel renal que causa el cisplatino libre. Esto posiblemente se deba que el fármaco permanece encapsulado dentro de los liposomas y se evita su interacción con los tejidos sanos. Sin embargo, es necesario comprobar dicha hipótesis en experimentos posteriores.

9. CONCLUSIONES

- Se desarrolló y estandarizó una metodología para la elaboración de una formulación de cisplatino liposomal por evaporación de fase reversa. Con esta metodología se logró encapsular concentraciones de cisplatino similares a la concentración de la formulación convencional.

- La distribución del tamaño de partícula de los liposomas fue homogénea y se obtuvieron tamaños de partícula óptimos, por lo que se espera que los liposomas puedan ser extravasados a través de las fenestraciones que presenta el endotelio vascular de los tumores. Además, el potencial zeta obtenido le confiere a la formulación una estabilidad química aceptable ya que se previene la precipitación y aglomeración de los liposomas. La concentración de fosfolípidos obtenida fue considerada como segura para la administración en animales ya que no se observó ningún efecto tóxico aparente por la administración de esta concentración de fosfolípidos.

- Se logró estandarizar y validar un método de cuantificación de cisplatino por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución a partir de muestras liposomales y muestras plasmáticas. Esta metodología permitió realizar la cuantificación de cisplatino en los estudios farmacocinéticos.

- Con la formulación liposomal se modificaron los parámetros farmacocinéticos del cisplatino de manera que su biodisponibilidad, dada por el área bajo la curva de concentración plasmática vs tiempo, aumentó casi 70 veces. Además se logró reducir su volumen de distribución y su velocidad de eliminación por lo que se espera que el cisplatino presente un mayor tiempo de contacto y una mayor acumulación en el sitio tumoral.

- A pesar de que el cisplatino permanece mucho más tiempo en circulación, se logró prevenir la nefrotoxicidad que causa el cisplatino libre (convencional).

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos permiten continuar con el desarrollo de ésta formulación, realizando pruebas como el perfil de liberación del cisplatino, así como de eficacia *in vitro* e *in vivo*, pruebas de biodistribución en órganos y en tejido tumoral, entre otras. Además, permiten plantear nuevos proyectos como la elaboración de inmunoliposomas para lograr una terapia de cisplatino aun más selectiva, así como también encapsular radionúclidos que permitan la administración conjunta de quimio-radioterapia entre otros.

11. REFERENCIAS

- Abeloff MD, Armitage JO, Kastan MB. (2005) *Oncología Clínica* 3. Ed. Elsevier, 3ª Edición. 500-501.
- Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4):505-515.
- Amidon GL, Lee PI, Topp EM. (2000). *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*. CRC Press. 55-85.
- Andrews PA, Wung WE, Howell SB. (1984). A high performance liquid chromatographic assay with improved selectivity for cisplatin and active platinum (II) complexes in plasma ultrafiltrate. *Analytical Biochemistry*, 143(1):46-56.
- Arnold RD, Mager DE, Slack JE, Straubinger RM. (2005). Effect of repetitive administration of doxorubicin-containing liposomes on plasma pharmacokinetics and drug biodistribution in a rat brain tumor model. *Clinical Cancer Research*, 11(24):8856-8865.
- Banker GS, Rhodes CT. (1996). *Modern Pharmaceutics (drugs and the pharmaceutical sciences)*. Marcel Dekker, 3rd Edition. 75-119.
- Bao A, Goins B, Negrete G, Phillips WT. (2004). Direct ^{99m}Tc labeling of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for pharmacokinetic and non-invasive imaging studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(2):419-425.

- Basu S, Harfouche R, Soni S, Chimote G, Mashelkar RA, Sengupta S. (2009). Nanoparticle-mediated targeting of MAPK signaling predisposes tumor to chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19):7957-7961.
- Bauer L. (2008). *Applied Clinical Pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical, 2nd Edition. 3-47.
- Bosch ME, Sanchez AJ, Rojas FS, Ojeda CB. (2008). Analytical methodologies for the determination of cisplatin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(3):451-459.
- Boulikas T, Vougiouka M. (2003). Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncology Reports*, 10(6):1663-1682.
- Boulikas T. (2007). Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, LipoplatinTM. LipoplatinTM as a chemotherapy and antiangiogenesis drug. *Cancer Therapy*, 5:349-376.
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. (2005). Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Professional, 11th Edition. Chapter 1.
- Burger KN, Staffhorst RW, de Vijlder HC, Velinova MJ, Bomans PH, Frederik PM, de Kruijff B. (2002). Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high toxicity. *Nature Medicine*, 8(1):81-84.
- Carvahlo Junior AD, Vieira FP, Melo VJ, Lopes MT, Silveira JN, Ramaldes GA, Garnier-Suillerot A, Pereira-Maia EC, Oliveira MC. (2007). Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(8):1149-1157.

- Castro EA. (1999). Las drogas liposomales. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 23(89):625-634.
- Craig CR, Stitzel RE. (2003). *Modern Pharmacology with Clinical Applications*. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 6th Edition. 20-72.
- Devarajan P, Tarabishi R, Mishra J, Ma Q, Kourvetaris A, Vougiouka M, Boulikas T. (2004). Low renal toxicity of lipoplatin compared to cisplatin in animals. *Anticancer Research*, 24(4):2193-2200.
- Dipiro JT, Spruill WJ, Wade WE, Blouin RA, Pruemmer JM. (2005). *Concepts in Clinical Pharmacokinetics*. American Society of Health-System Pharmacists®. 4th Edition. 1-42, 87-128.
- Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews*, 51(4):691-743.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). (2004). SSA México, 8^a Edición. Tomo I. 939.
- Glavas-Dodov M, Fredro-Kumbaradzi E, Goracinova K, Simonoska M, Calis S, Trajkovic-Jolevska S, Hincal AA. (2005). The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics*, 291(1-2):79-86.
- Govantes Betes J, Lorenzo Velázquez P, Govantes Estes C. (2006). *Manual NORMON*. Laboratorios NORMON SA, 8^a Edición. 337-353, 483-488, 505.

- Hamelers IH, de Kroon AI. (2007). Nanocapsules: a novel lipid formulation platform for platinum-based anti-cancer drugs. *Journal of Liposome Research*, 17(3-4):183-189.
- Immordino ML, Brusa P, Rocco F, Arpicco S, Ceruti M, Cattel L. (2004). Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs. *Journal of Controlled Release*, 100(3):331-346.
- Immordino ML, Dosio F, Cattel L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, 1(3):297-315.
- Jacobs SS, Fox E, Dennie C, Morgan LB, McCully CL, Balis FM. (2005). Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin in nonhuman primates. *Clinical Cancer Research*, 11(4):1669-1674.
- Kalaria DR, Sharma G, Beniwal V, Ravi Kumar MN. (2009). Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: in vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats. *Pharmaceutical Research*, 26(3):492-501.
- Kalra AV, Campbell RB. (2006). Development of 5-FU and doxorubicin-loaded cationic liposomes against human pancreatic cancer: implications for tumor vascular targeting. *Pharmaceutical Research*, 23(12):2809-2817.
- Kaminskis LM, Kelly BD, McLeod VM, Boyd BJ, Krippner GY, Williams ED, Porter CJ. (2009). Pharmacokinetics and tumor disposition of PEGylated, methotrexate conjugated poly-l-lysine dendrimers. *Molecular Pharmaceutics*, 6(4):1190-1204.

- Katzung BG. (2005). *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Manual Moderno, 9ª Edición. 45-74.
- Kelland L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8):573-584.
- Lammers T, Subr V, Ulbrich K, Peschke P, Huber PE, Hennink WE, Storm G. (2009). Simultaneous delivery of doxorubicin and gemcitabine to tumors in vivo using prototypic polymeric drug carriers. *Biomaterials*, 30(20):3466-3475.
- Lasic DD. (1996). Liposomes. *Science & Medicine*, 3(3):34-43.
- Lee HB, Blafox MD. (1985). Blood volume in the rat. *Journal of Nuclear Medicine*, 25:72-76.
- Li SD, Huang L. (2008). Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4):496-504.
- Lim J, Guo Y, Rostollan CL, Stanfield J, Hsieh JT, Sun X, Simanek EE. (2008). The role of the size and number of polyethylene glycol chains in the biodistribution and tumor localization of triazine dendrimers. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4):540-547.
- Lopez-Flores A, Jurado R, Garcia-Lopez P. (2005). A high-performance liquid chromatographic assay for determination of cisplatin in plasma, cancer cell, and tumor samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 52(3):366-372.

- Mai J, Song S, Rui M, Liu D, Ding Q, Peng J, Xu Y. (2009). A synthetic peptide mediated active targeting of cisplatin liposomes to Tie2 expressing cells. *Journal of Controlled Release*, 139(3):174-181.
- Marik J, Tartis MS, Zhang H, Fung JY, Kheirloomoom A, Sutcliffe JL, Ferrara KW. (2007). Long-circulating liposomes radiolabeled with [¹⁸F]fluorodipalmitin ([¹⁸F]FDP). *Nuclear Medicine and Biology*, 34(2):165-171.
- Meléndez Zajgla J, Maldonado Lagunas V. (1998). Cisplatino: avances recientes en el estudio de su mecanismo de acción. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, 44(1):28-34.
- Moghimi SM, Szebeni J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein binding properties. *Progress in Lipid Research*, 42(6):463-478.
- Morillo Zárate LE, Ruiz Morales A. (2004). Epidemiología clínica: investigación clínica aplicada. Ed. Médica Panamericana, 2ª Edición. 142-161, 488-507.
- Norma Oficial Mexicana NOM 177-SSA-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial de la Federación, 7 de Mayo de 1999.
- Palma SD, Allemanni DA. (2004). Liposomas: aspectos farmacotécnicos y perspectivas terapéuticas. *Nuestra Farmacia*, 38:38-42.
- Parkins DA, Lashmar UT. (2000). The formulation of biopharmaceutical products. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(4):129-147.

- Pecile A, Rescigno A, North Atlantic Treaty Organization. Scientific Affairs Division. (1988). Pharmacokinetics: mathematical and statistical approaches to metabolism and distribution of chemical and drugs. Plenum Press. 1-26.
- Peleg-Shulman T, Gibson D, Cohen R, Abra R, Barenholz Y. (2001). Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1510(1-2):278-291.
- Perez-Soler R, Francis K, Al-Baker S, Pilkiewicz F, Khokhar R. (1994). Preparation and characterization of liposomes containing a lipophilic cisplatin derivative for clinical use. *Journal of Microencapsulation*, 11(1):41-54.
- Ramachandran S, Quist AP, Kumar S, Lal R. (2006). Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir*, 22(19):8156-8162.
- Reddy LH, Murthy RS. (2004). Pharmacokinetics and biodistribution studies of doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques. *Biomedical Papers*, 148(2):161-166.
- Rowland M, Tozer TN. (1995). Clinical Pharmacokinetics Concepts and Applications. Lippincot Williams & Wilkins, 3rd Edition. 1-31, 119-181.
- Sadowitz PD, Hubbard BA, Dabrowiak JC, Goodisman J, Tacka KA, Aktas MK, Cunningham MJ, Dubowy RL, Souid AK. (2002). Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(2):183-190.

- Sapro P, Allen TM. (2002). Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Research*, 62(24):7190-7194.
- Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. (2006). Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8):1909-1917.
- Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. (2005). The Laboratory Rat. Ed. Elsevier, 2nd Edition. 133-134.
- Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(9):4194-4198.
- Thrivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM. (2002). Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat. *Brain Research Protocols*, 10(2):84-94.
- Tian J, Pang X, Yu K, Liu L, Zhou J. (2008). Preparation, characterization and *in vivo* distribution of solid lipid nanoparticles loaded with cisplatin. *Pharmazie*, 63(8):593-597.
- Torchilin VP. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4:145-160.
- Torchilin VP, Weissig V. (2003). Liposomes. Oxford University Press, 2nd Edition. 4-10, 22-23.

- Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19): 1441-54.
- Uhumwangho MU and Okor RS. (2005). Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *Journal of Medicine and Biomedical Research*, 4(1):9-21.
- Wang S, Mi JB, Li YZ, Chang WB, Ci YX, Zhao MZ, Zhao YK, Xu G. (2003). Pharmacokinetics and tissue distribution of iv injection of polyphase liposome-encapsulated cisplatin (KM-1) in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(6):589-592.
- Wang X, Au-Yeung SC, Ho YP. (2007). Pharmacokinetics and tissue distribution of novel traditional Chinese medicine-platinum anticancer agents in rats. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(6):909-917.
- Working PK, Newman MS, Sullivan T, Brunner M, Podell M, Sahenk Z, Turner N. (1998). Comparative intravenous toxicity of cisplatin solution and cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes in cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences*, 46(1):155-165.
- Yokoe J, Sakuragi S, Yamamoto K, Teragaki T, Ogawara K, Higaki K, Katayama N, Kai T, Sato M, Kimura T. (2008). Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1-2):28-34.
- Zamboni WC, Gervais AC, Egorin MJ, Schellens JH, Hamburger DR, Delauter BJ, Grim A, Zuhowski EG, Joseph E, Pluim D, Potter DM, Eiseman JL. (2002). Inter- and intratumoral disposition of platinum in solid tumors after administration of cisplatin. *Clinical Cancer Research*, 8(9):2992-2999.

- Zamboni WC, Gervais AC, Egorin MJ, Schellens JH, Zuhowski EG, Pluim D, Joseph E, Hamburger DR, Working PK, Colbern G, Tonda ME, Potter DM, Eiseman JL. (2004). Systemic and tumor disposition of platinum after administration of cisplatin or STEALTH liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103) in a preclinical tumor model of melanoma. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 53(4):329-336.
- Zara GP, Cavalli R, Fundaro A, Bargoni A, Caputo O, Gasco MR. (1999). Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). *Pharmacology Research*, 40(3):281-286.
- Zetasizer Nano Series User Manual (2004). Malvern Instruments Ltd, (<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20Manual.pdf>).

12. ANEXOS

Anexo 1. Prueba de endotoxinas bacterianas realizada a los liposomas antes de su administración en ratas.

LABORATORIOS DE ESPECIALIDADES INMUNOLÓGICAS, S.A. DE C.V.

INFORME No 11946-049

México D.F. a 18 de Mayo de 2010

DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELAZQUEZ
INVESTIGADOR ASOCIADO GRUPO DE DOSIMETRÍA Y FÍSICA MÉDICA
INSITUTO DE FÍSICA DE LA UNAM
Apartado Postal 20-164 Col.

C.P. 01000 México, D.F.

PRESENTE.

INFORME DE RESULTADOS

Me permito hacer de su conocimiento los siguientes resultados y la metodología usada.

PRODUCTO:	LIPOSOMAS CISPLATINO (LIPOSOMAS CISPLATINO) Materia Prima
No. LOTE:	2
DESCRIPCIÓN:	Tubo conteniendo aproximadamente 500 µL de una solución de aspecto lechoso
FECHA DE RECEPCIÓN:	11 - Mayo - 2010
PRUEBA:	Endotoxinas bacterianas (LAL)
FECHA ANÁLISIS:	17 - Mayo - 2010
METODOLOGÍA:	De acuerdo a FEUM 9a. edición, 2008, Vol. I MGA 0316, pág. 321 - 325
RESULTADO:	Menor a 12,5 UE/mL

Sin más por el momento, quedo a sus órdenes para cualquier aclaración.

ATENTAMENTE

DR. TEHODZIT FLORES BELLO

M. en C. Juan Padierma Olivares
Responsable Sanitario 26-JUNIO-2008

Los resultados se refieren únicamente a las muestras analizadas.
Este informe es válido en el momento de ser emitido y puede ser necesario realizar aclaraciones por escrito.

Página 1 de 1

Avenida Gran Canal Sin Número Locales 3 y 4 Ampliación Casas Alemán Delegación Gustavo A. Madero Distrito Federal 07580
Tel.: 57-53-26-96 Fax: 57-53-29-04 www.le.com.mx

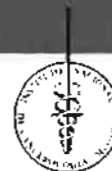
Anexo 2. Poster, constancia y reconocimientos de la presentación del trabajo en el XLII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas.

CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE UN NANOSISTEMA LIPOSOMAL DE CISPLATINO



Toro Córdova Alfonso^{1,2}, Medina Luis Alberto³, Noguez Méndez Norma Angélica¹
López Rodríguez Victoria⁴, García López Patricia²

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco; ²Laboratorio de Farmacología, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCAN-UNAM; ³Instituto de Física, UNAM; ⁴Laboratorio de Física Médica, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCAN-UNAM



Introducción

El *Cisplatino* es un antineoplásico ampliamente utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer y se considera uno de los fármacos más eficaces. Su principal inconveniente es su alto grado de toxicidad en tejidos sanos, principalmente a nivel renal y neurológico. Potenciar el efecto farmacológico sin incrementar sus efectos secundarios ha sido motivo de estudio de varias investigaciones en los últimos años. La encapsulación de fármacos antineoplásicos en nanosistemas liposomales ha demostrado que es posible reducir los efectos secundarios en tejidos sanos mientras se maximiza el efecto terapéutico en el sitio deseado.

Objetivos

Estandarizar y validar un método por CLAR para la determinación de cisplatino liposomal en muestras plasmáticas. Determinar los principales parámetros farmacocinéticos de la formulación liposomal de cisplatino desarrollada en el INCAN en ratas Sprague-Dawley.

Metodología

- Farmacocinética de cisplatino liposomal

- Canulación yugular y caudal
- Administración tratamiento vía i.v.
- Muestreo sanguíneo durante 24 h.



- Determinación de cisplatino liposomal en muestras plasmáticas

- 1.- Precipitación con Acetonitrilo
- 2.- Derivatización con DDTC
- 3.- Extracción con cloroformo

Resultados

El método analítico fue lineal ($r^2 = 0.9989$) en el rango de concentraciones de 0.5-10 μ g/mL. Los coeficientes de variabilidad intra-día e inter-día fueron de 4.5 y 9.7 respectivamente y el porcentaje de recobro fue del 94.6 \pm 11.39%. Las muestras plasmáticas almacenadas a -70°C permanecieron estables hasta por lo menos un mes.



Conclusiones

El método analítico descrito resultó adecuado para la cuantificación de cisplatino liposomal en muestras plasmáticas. La BD del cisplatino aumenta al administrar el fármaco encapsulado en liposomas comparada con la obtenida administrando el fármaco convencional.

Tabla 1.- Condiciones cromatográficas utilizadas

Columna	SymmetryC-18
Fase Móvil (Agua:Metanol: Acetonitrilo)	31:31:38
Longitud de onda de detección	254nm
Temperatura	23°C
Velocidad de flujo	1.6mL/min



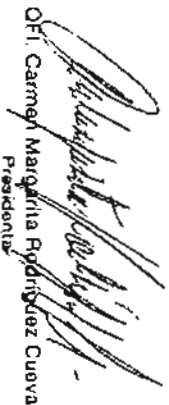
La Asociación
Farmacéutica Mexicana A.C.
otorga la presente

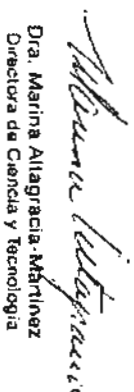


Constancia

a: **QFB. ALFONSO TORO CÓRDOVA**

Por su asistencia al XLII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas
celebrado del 18 al 22 de octubre de 2009 en la Ciudad de Cancún Quintana Roo, México.


OFI. Carmen Margarita Rodríguez Cuerva
Presidencial


Dra. Marina Allagracia-Martínez
Directora de Ciencia y Tecnología



La Asociación
Farmacéutica Mexicana A.C.
otorga el presente



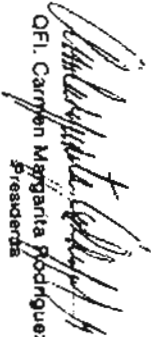
Reconocimiento

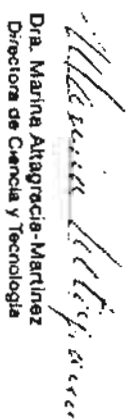
SANTIAGO MAZA

a: Alfonso Toro Córdova

Al mejor trabajo libre del área: "BIOFARMACIA"
Caracterización farmacocinética de un
nanosistema liposomal de cisplatino

En el XLII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas
celebrado del 18 al 22 de octubre de 2009,
en la Ciudad de Cancún Quintana Roo, México.


Ofelia Carmen Margarita Rodríguez Cueva
Presidenta


Dra. Marina Atagracía-Martínez
Directora de Ciencia y Tecnología



La Asociación
Farmacéutica Mexicana A.C.
otorga el presente



Reconocimiento

a: Toro Córdova Alfonso, Medina Luis Alberto, Noguez Méndez Norma Angélica,
López Rodríguez Victoria, García López Patricia

Por su presentación del trabajo libre titulado:
Caracterización farmacocinética de un nanosistema liposomal de cisplatino

en el XLII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas
celebrado del 18 al 22 de octubre de 2009,
en la Ciudad de Cancún, Quintana Roo, México.

Of. Carreras Margarita Rodríguez Cuava
Presidenta

Dra. Marina Altagracia-Martínez
Directora de Ciencia y Tecnología