



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Evaluación de la eficacia de una formulación liposomal de
cisplatino en xenotransplantes de cáncer
Cervicouterino

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

LAURA MONDRAGÓN FUENTES

DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación de la eficacia de una formulación liposomal de cisplatino en xenotransplantes de cáncer cérvico uterino

Que presenta la pasante: Laura Mondragón Fuentes
Con número de cuenta: 410004148 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Agosto de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL *	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buítrón	
SECRETARIO	Dr. Luis Alberto Medina Velázquez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Lidia Rangel Trujano	
2do. SUPLENTE	Dra. Berenice Gómez Zaleta	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/lac

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM, Instituto Nacional de Cancerología, México D.F. Bajo la asesoría del Dr. Luis Alberto Medina Velázquez y contando con el apoyo económico del proyecto de investigación 154557 “Liposomas como vectores de transporte y liberación de fármacos y radionúclidos con potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer”.

DEDICADO A:

A mis padres **Alicia y José Luis** por creer en mí, apoyarme y principalmente por amarme a pesar de mis defectos, por enseñarme a salir adelante a pesar de las adversidades porque Dios aprieta pero no ahorca dirían ustedes.

A mis hermanos **Ernesto y José Luis** por el cariño, las bromas, las risas, los consejos y por estar siempre cerca de mí.

A mis sobrinos **Manuel, Leo, Renata y Guillermo** por ser esos lindos angelitos en mi vida que siempre tienen una sonrisa para ofrecerme pase lo que pase.

A mis primos **Fabián y Claudia** por ser mis amigos más fieles y acompañarme durante este viaje.

A mi tíos **Felipe y Esperanza** por apoyarme y ser parte de mi inseparable familia

A mis cuñadas **Teresa y Melissa** por hacerme reír y ser mis cómplices en muchas ocasiones.

A mi abuela **Nachita** porque la vida me permitió estar a tu lado, siempre tan amorosa, paciente e incondicional y sé que desde el cielo me estás diciendo “Aplauso, Aplauso..”

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por ponerme en el camino correcto porque solo él sabe porque suceden las cosas.

A la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO** y a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por brindarme la oportunidad de hacer mi sueño realidad.

Al **Dr. Luis Alberto Medina Velázquez** por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por sus enseñanzas, su paciencia y su apoyo para realizar mi trabajo.

A la **Dra. Patricia García López** por abrirme las puertas de su laboratorio, porque siempre tuvo disposición para ayudarme, escucharme y darme la oportunidad de aprender.

A **Rafael Jurado**, a la **Dra. Jazmín Pérez Rojas** y al **M. en C. Enrique Pérez**, por su disposición para enseñarme y ayudarme.

A **Efren** por su compañía y por empujarme a dar el primer paso.

A mis amigos **Guido, Michel, Mauricio y Coco** por los buenos ratos, las risas, la compañía, su amistad incondicional y por ser parte de mi familia en la facultad.

A los compañeros de laboratorio **Alfonso, Héctor, Erick, Karla, Josefina, Itzel, Mario, Vanessa** por su apoyo en el laboratorio.

A **Fabricio** por encontrarte en el camino, me protegiste, me enseñaste, me acompañaste y me escuchaste cuando lo necesitaba. Siempre te estaré agradecida.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	1
1.- RESUMEN	2
2.- INTRODUCCIÓN	3
3.- MARCO TEÓRICO	4
3.1. CÁNCER	4
3.2. Cáncer cervicouterino	5
3.3. Tratamiento para cáncer cervicouterino	7
3.3.1.- Quirúrgico	7
3.3.2.- Radioterapia	7
3.3.3.- Quimioterapia	8
3.4. CISPLATINO	8
3.4.1. Mecanismo de acción	9
3.4.2. Toxicidad	10
3.5. LIPOSOMAS	11
3.5.1. Acumulación en tumor	13
3.5.2. Efectos adversos	13
3.6. TÉCNICAS DE IMAGEN MOLECULAR	14
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
5.- JUSTIFICACIÓN	15
6.- HIPÓTESIS	16
7.- OBJETIVOS	16
7.1 Objetivo general	16
7.2 Objetivo específicos	16

8.- MATERIALES Y MÉTODOS	17
8.1 ANIMALES	17
8.2 ENSAYO DE TOXICIDAD SISTÉMICA, RENAL Y HEPÁTICA	17
8.3 EVALUACIÓN TERAPÉUTICA	18
8.3.1 Líneas celulares	18
8.3.2 Generación de xenotransplantes	18
8.3.3 Tratamiento y grupos control	19
8.3.4 Medición del volumen tumoral	20
8.3.5 Medición de la actividad metabólica	20
8.4 CINÉTICA INTRATUMORAL	20
8.4.1 Cuantificación de cisplatino en tejido	21
8.4.2 Reactivos y solventes	21
8.4.3 Preparación de muestras	21
8.4.4 Condiciones cromatográficas	22
8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
9.- RESULTADOS	23
9.1 ENSAYO DE TOXICIDAD	23
9.1.1 Toxicidad sistémica por pérdida de peso	23
9.1.2 Evaluación del daño Renal	24
9.1.3 Evaluación del daño hepático	24
9.2 EVALUACIÓN TERAPÉUTICA	25
9.2.1 Eficacia del tratamiento liposomal	25
9.2.2 Toxicidad sistémica por pérdida de peso	27
9.2.3 Seguimiento de la actividad metabólica	28
9.3 CINÉTICA	29
10.- DISCUSIÓN	31
11.- CONCLUSIONES	39
12.- PERSPECTIVAS	39
13.- BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Fig. 1 Porcentaje de morbilidad en México por cáncer	4
Fig. 2 Tasas crudas de mortalidad en México por CaCu	5
Fig. 3 Tipos de histerectomía para cáncer de cérvix	7
Fig. 4 Estructura molecular del <i>cis</i> -diaminocloroplatino (II)	8
Fig. 5 Formación de aductos por cisplatino	9
Fig. 6 Mecanismo de acción citotóxico del cisplatino	9
Fig. 7 Toxicidad del tratamiento con cisplatino	10
Fig. 8 Estructura general de los liposomas	11
Fig. 9 Acumulación de liposomas en tumores	13
Fig.10 Seguimiento del peso corporal en ratones <i>Balb/c</i>	23
Fig.11 Pruebas de función renal	24
Fig.12 Pruebas de función hepática	24
Fig.13 Seguimiento del volumen tumoral	25
Fig.14 Volumen tumoral final	26
Fig.15 Comparación de tumores	26
Fig.16 Seguimiento del peso corporal en ratones atímicos	27
Fig. 17 Imágenes moleculares	28
Fig. 18 Volumen de interés (VOI)	28
Fig. 19 Cinética hepática	29
Fig. 20 Cinética renal	30
Fig. 21 Cinética intratumoral	30
Cuadro 1 Estadificación del cáncer de cérvix	6
Cuadro 2 Esquema de administración para ensayo de toxicidad	17
Cuadro 3 Esquema de administración para la evaluación de eficacia	19
Cuadro 4 Grupos experimentales para el estudio de cinética tumoral	21

Abreviaturas

OMS Organización Mundial de la Salud

UICC Unión Internacional Contra el Cáncer

INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

SPPS Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud

CaCu Cáncer cervicouterino

UEC Unión escamocolumnar

CIN Neoplasia cervical intraepitelial

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos.

FIGO: Federación internacional de ginecología y obstetricia.

CT: Tomografía computarizada

PET: Tomografía por emisión de positrones

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

NCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán

I.P.: Intraperitoneal

¹⁸F-FDG: Fluorodesoxiglucosa

SER: Sistema retículo endotelial

PPE: Eritrodisestesia palmar plantar

ALT: Alaninaaminotransferasa

AST: Aspartatoaminotransferasa

EPR: Efecto de permeabilidad y retención mejorada.

1. RESUMEN

El cáncer cervicouterino ocupa la segunda causa de morbilidad en México del total de casos por cáncer (INEGI 2011); el tratamiento incluye, cirugía, radioterapia o quimioterapia, siendo el estándar de oro la quimioradioterapia basada en cisplatino; no obstante su uso en mayores cantidades está impedido debido a los severos daños que puede ocasionar en riñones, nervios periféricos y médula ósea, además el 90% del cisplatino en la sangre se une de forma covalente a proteínas plasmáticas, por tanto, solo un pequeño porcentaje de la dosis total administrada se encuentra disponible para realizar su efecto antineoplásico (Corden *et al.* 1985). Como alternativa se estudia la posibilidad de administrarlo mediante acarreadores liposomales, con el fin de mejorar la biodisponibilidad de este antineoplásico para mejorar su eficacia y disminuir los efectos adversos que presenta.

En este sentido en el presente trabajo se realizó ensayos de toxicidad de una formulación liposomal desarrollada en el INCan, mediante el seguimiento del peso corporal tras la administración del tratamiento en ratones *Balb/c*; se obtuvo plasma para determinar daño hepático mediante la cuantificación de enzimas ALT y AST así como función renal midiendo los niveles de creatinina urea. Una vez que no se observó toxicidad asociada se evaluó la eficacia de la formulación mediante el seguimiento del volumen tumoral y actividad metabólica utilizando PET/CT durante 8 semanas en ratones *nu/nu* xenotransplantados con células HeLa. Finalmente, se realizó un estudio de la cinética intratumoral, hepática y renal de cisplatino convencional y liposomal en ratones atómicos. Los resultados mostraron diferencia estadísticamente significativa en cuanto al volumen tumoral y actividad metabólica entre el tratamiento convencional y el liposomal sin mostrar toxicidad sistémica; en la cinética tumoral se observó que la cantidad de cisplatino que llega al tumor es mayor y se sostiene por un mayor tiempo con la formulación liposomal que con el cisplatino convencional. Estos resultados sugieren una mayor eficacia con la formulación liposomal que con la quimioterapia convencional, además de una disminución en la toxicidad y una selectividad preferencial por la zona tumoral.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una distorsión del comportamiento de la célula causado por numerosas mutaciones en los genes y anomalías en la producción de las proteínas, caracterizado por la pérdida de los mecanismos de control que gobiernan la proliferación y diferenciación celular (Abeloff *et al.* 2005); es la tercera causa de muerte en México y la presencia de tumores malignos en el cuello del útero, es el segundo tipo de cáncer con mayor prevalencia.

En los últimos 20 años ha habido una serie de avances incluyendo la vacunación preventiva, la quimio-radioterapia y el tratamiento de quimioterapia neoadyuvante; sin embargo, el tratamiento estándar sigue siendo la quimio-radioterapia basada en cisplatino, sobre todo para los pacientes inoperables o que presentan recurrencia de la enfermedad (Santos, 2002).

El *cis*-diaminocloroplatino (II) es un complejo inorgánico hidrosoluble que contiene un núcleo cuadrado que contiene dos átomos de cloro y dos moléculas de amonio en posición *cis*, penetra a las células por difusión, la hidrólisis del cloruro es responsable de la forma activa del fármaco, que actúa sobre los ácidos nucleicos formando uniones entrecruzadas intra e intercatenarias (Banker & Rhodes, 1996); sin embargo su uso en mayores cantidades está impedido, debido a los severos daños que puede ocasionar en riñones, nervios periféricos, médula ósea y vías gastrointestinales principalmente, otra desventaja es su baja especificidad ya que solo alrededor del 1% de la dosis administrada alcanza el sitio blanco y el resto es distribuido en otros órganos; presenta también una baja biodisponibilidad, debido a que la mayor parte de este fármaco es degradado o se une a proteínas que lo inactivan (Bauer, 2008). Como alternativa se estudia la posibilidad de administrarlo mediante acarreadores, como los liposomas, que permiten transportar el principio activo de manera que mayores concentraciones de éste lleguen a su sitio blanco, logrando que la distribución de este antineoplásico 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 este presenta (Devarajan *et al.*, 2004).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Cáncer

El cáncer es un conjunto heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación anormal de células de origen mono o policlonal, que sufren la pérdida de la apoptosis. La proliferación excesiva ocasiona la penetración en tejidos adyacentes, la compresión de estructuras vecinas y la migración a otros lugares donde mantienen su capacidad de crecer y proliferar (Florez, 1997).

La OMS señala que en el 2008 fallecieron 7.6 millones de personas por esta enfermedad, lo que representa aproximadamente un 13% del total de fallecimientos y estima que para el 2030 la mortalidad por cáncer aumentará a 13.1 millones (WHO, 2013). En México, según la UICC, el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos. (SPPS, 2013); los tumores malignos que padece la población mexicana difieren según el sexo, para los hombres las tres principales causas de morbilidad por cáncer se deben a neoplasias en órganos digestivos, órganos genitales y órganos hematopoyéticos; mientras que para las mujeres, principalmente el cáncer de mama, neoplasias en órganos genitales y de órganos digestivos provocan el mayor número de muertes Fig. 1.

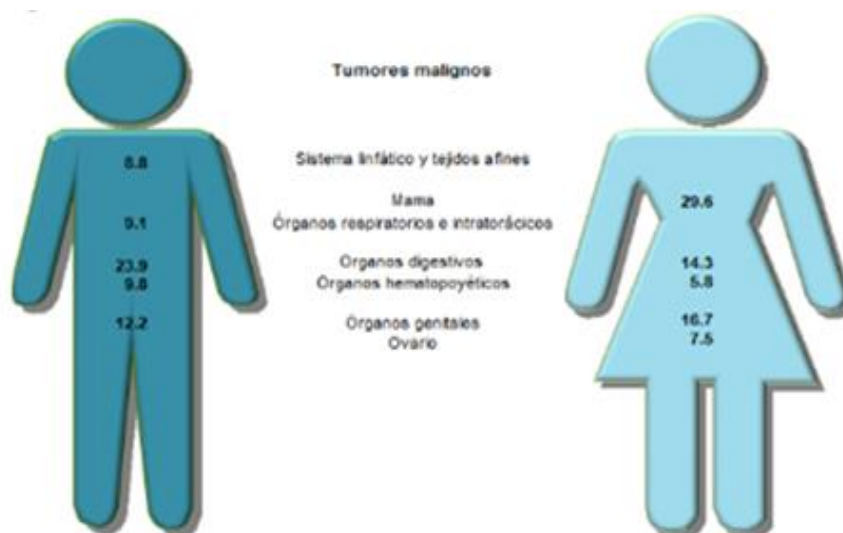


Figura 1. Porcentaje de morbilidad hospitalaria en México por principales tumores malignos según el sexo, para hombres el primer lugar lo ocupa el cáncer de órganos digestivos y para mujeres el cáncer de mama (INEGI, 2011).

3.2. Cáncer cervico uterino

El cáncer cervicouterino continúa siendo un problema importante de salud pública en el mundo, principalmente en los países en desarrollo. En México, ocupa la segunda causa de morbilidad con un 16.7% del total de casos por cáncer Fig. 2.



Figura 2. Tasas crudas de mortalidad en México por cada 100 000 mujeres. Distrito Federal, Chihuahua y Nayarit tuvieron las tasas más altas de morbilidad; mientras que en Guerrero, Tlaxcala y Estado de México se presentan las más bajas (UICC, 2014).

El principal factor de riesgo del cáncer cervicouterino es el virus del papiloma humano (VPH) ya que su ADN se ha encontrado en el 99.7% del total de diagnósticos por CaCu, no obstante, es importante reconocer que solo ciertos subtipos genéticos del VPH (principalmente 16 y 18) están asociados más estrechamente con este tipo de cáncer; otros factores asociados son: el consumo de tabaco, la inmunosupresión, la multiparidad y el número de parejas sexuales. (Hakama & Louhivuori, 1998)

El cérvix uterino presenta lesiones asintomáticas mucho antes de la aparición del cáncer, estas reciben el nombre de neoplasia cervical intraepitelial (NIC), las cuales consisten en la desorganización del epitelio exocervical y con los años evolucionan hasta transformarse en carcinoma.

Los NIC tienen tres grados distintivos, basados en el espesor de la invasión por parte de las células escamosas (Agorastos *et al.*, 2005):

- **NIC1:** Es el tipo de menor riesgo, representa sólo una displasia leve, se caracteriza por estar desarrollado en 1/3 del epitelio cervical.
- **NIC2:** Representan una displasia moderada, confinada a los 2/3 del epitelio cervical.
- **NIC3:** En este tipo de lesión la displasia es severa y cubre más de los 2/3 de todo el epitelio cervical, esta lesión es considerada como un carcinoma *in situ*.

La estadificación del cáncer de cérvix por parte de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) se basa únicamente en hallazgos quirúrgicos e histopatológicos, la cual se muestra a continuación:

Cuadro 1: Estadificación del cáncer de cérvix según la FIGO, dividido del nivel 1 al 4 y subdividido en A y B según el grado de afectación del cérvix (Pecorelli *et al.*, 2009).

FIGO	Descripción
I	Tumor limitado al cérvix
IA	Carcinoma invasivo identificado microscópicamente
IA1	Infiltración estromal de hasta 3 mm de profundidad y 7 mm de extensión horizontal
IA2	Infiltración estromal entre 3 y 5 mm de profundidad y 7 mm de extensión horizontal
IB1	Tumor clínicamente visible menor a 4 cm
IB2	Tumor clínicamente visible mayor a 4 cm
II	Tumor que se extiende fuera del cérvix y a la parte superior de la vagina
IIA	Sin infiltración del parametrio
IIB	Con infiltración del parametrio
III	Tumor que afecta la pared pélvica, al tercio inferior de la vagina o ambos.
IIIA	Afectación del tercio inferior de la vagina
IIIB	Extensión a la pared pélvica, hidronefrosis o ambos
IVA	Tumor que afecta a la vejiga, el recto o con metástasis a distancia.
IVB	Metástasis a distancia

3.3. Tratamiento para cáncer cervico uterino

Las opciones de tratamiento dependen de los siguientes aspectos, el estadio del cáncer, el tamaño tumoral y la edad del paciente, sin embargo, se utilizan tres tipos de tratamiento estándar.

3.3.1 Quirúrgico

En los estadios clínicos tempranos el tratamiento ideal es el quirúrgico, el cual puede variar según el daño, desde la conización cervical, en donde solo se extrae una porción de tejido en forma de cono del cuello y el canal uterino, hasta la histerectomía Fig. 3.

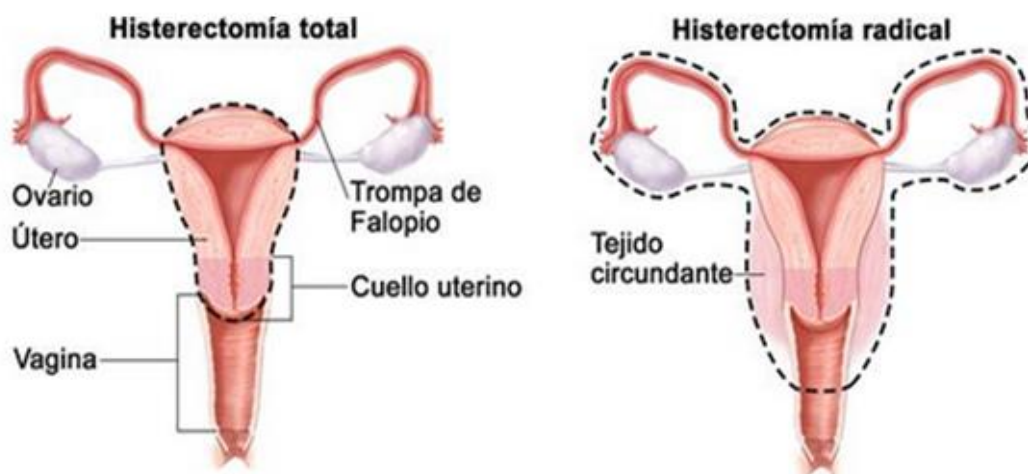


Figura 3. Tipos de histerectomía para cáncer de cérvix, en una histerectomía total, se extirpan el útero y cuello uterino, mientras que en la radical se extirpa además ambos ovarios, ambas trompas de Falopio y el tejido circundante (NCI, 2014)

3.3.2. Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento para el cáncer que utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que crezcan. Hay dos tipos de radioterapia, la externa (teleterapia), que utiliza una máquina que genera y dirige estos rayos al sitio tumoral y la interna (braquiterapia), que utiliza una sustancia radioactiva sellada en agujas, semillas, cables o catéteres que se colocan directamente en el tumor o cerca del mismo (Baskar *et al.*, 2012).

El tratamiento con radioterapia en etapas tempranas tiene el mismo porcentaje de curación que la cirugía, pero con mayor morbilidad tanto a nivel vesical como intestinal, siendo la pérdida de la función ovárica el efecto secundario más importante en aquellas pacientes premenopáusicas (Nakano *et al*, 2010).

3.3.2. 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 forma en que se administra la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado. Actualmente los fármacos aprobados por la FDA para cáncer de cérvix son: cisplatino, bleomicina, clorhidrato de topotecan y gemcitabina, siendo cisplatino el fármaco de primera elección en este tipo de cáncer (Markman, 2013).

3.4. Cisplatino

La molécula de cisplatino o *cis*-diaminocloroplatino (II), fue sintetizada en 1844 por Michele Peyrone en Turín, Italia y fue hasta 1892, en Zurich, Suiza, cuando Alfred Werner determinó su estructura molecular, la cual se compone de un átomo central de platino unido a dos grupos amino y dos moléculas de cloro dispuestos en configuración *cis* (Fig. 4). La actividad antineoplásica del cisplatino se reportó por primera vez en 1965 en la Universidad de Michigan por Barnett Rosenberg, sin embargo no fue sino hasta abril de 1971 cuando se trató el primer paciente en Texas y finalmente el fármaco fue aprobado en 1978 por la FDA para su uso clínico (Kelland, 2007).

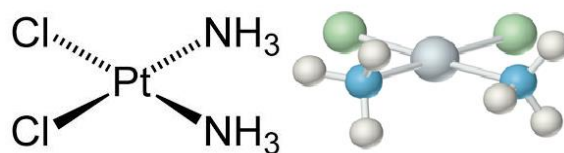


Figura 4. Estructura molecular del *cis*-diaminocloroplatino (II) compuesto por un átomo central de platino unido a dos grupos amino y dos moléculas de cloro dispuestos en configuración *cis* (Gately & Howell, 1993).

3.4.1. Mecanismo de acción del cisplatino

El mecanismo de acción de cisplatino aún no está completamente elucidado, pero se cree que sus efectos citotóxicos están asociados a la formación de complejos entre el cisplatino y el ADN, en donde la molécula de cisplatino se hidroliza reemplazando sus átomos de cloro por moléculas de agua generando una estructura con carga positiva capaz de reaccionar con el nitrógeno de la posición 7 de la guanina en el DNA, formando tres tipos de lesiones: monoadductos, cruzamientos intracatenarios e intercatenarios (Rose *et al* ,1999) Fig. 5.

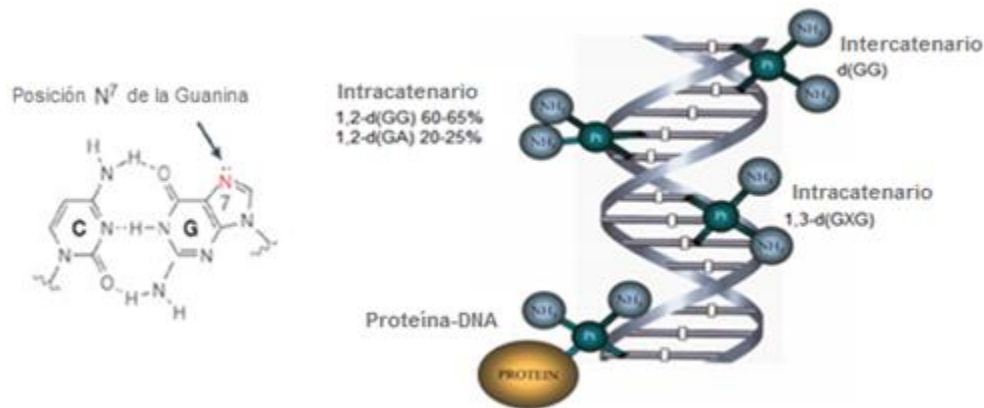


Figura 5. Tipos de lesiones formadas de la unión covalente del cisplatino con las purinas de ADN: monoadductos, cruzamientos intracatenarios y cruzamientos intercatenarios (Tood & Lippard, 2009)

Estas lesiones, provocadas por los entrecruzamientos entre el cisplatino y el DNA, dan paso a la inhibición de la replicación, transcripción y otras funciones nucleares deteniendo la proliferación celular y por ende el crecimiento del tumor (Soukpoé & Desco, 2008) Fig. 6.

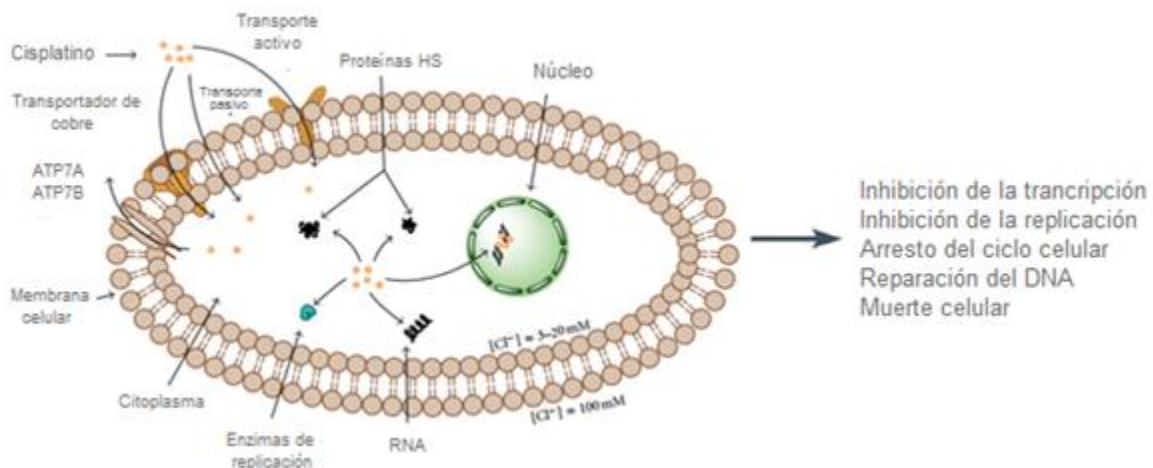


Figura 6. Mecanismo de acción citotóxica del cisplatino derivado de las lesiones irreversibles al DNA e induciendo la inhibición de la transcripción, transcripción y replicación celular (Gómez & Maksimovi, 2012).

3.4.2 Toxicidad del cisplatino

El cisplatino carece de especificidad sobre las células tumorales y afecta tejidos sanos, por lo que su dosificación puede verse limitada debido a las reacciones adversas que puede presentar, que van desde náuseas y vómito hasta efectos secundarios más graves como nefrotoxicidad, producto de la generación de estrés oxidativo en las células de los túbulos renales; ototoxicidad debida a su propensión por inducir destrucción de las células ciliadas y neuronas en el sistema auditivo; y neurotoxicidad inducida por la disminución en la velocidad de conducción nerviosa sensorial; también se ha reportado mielosupresión de leve o moderada (Wang & Lippard, 2005) Fig. 7.

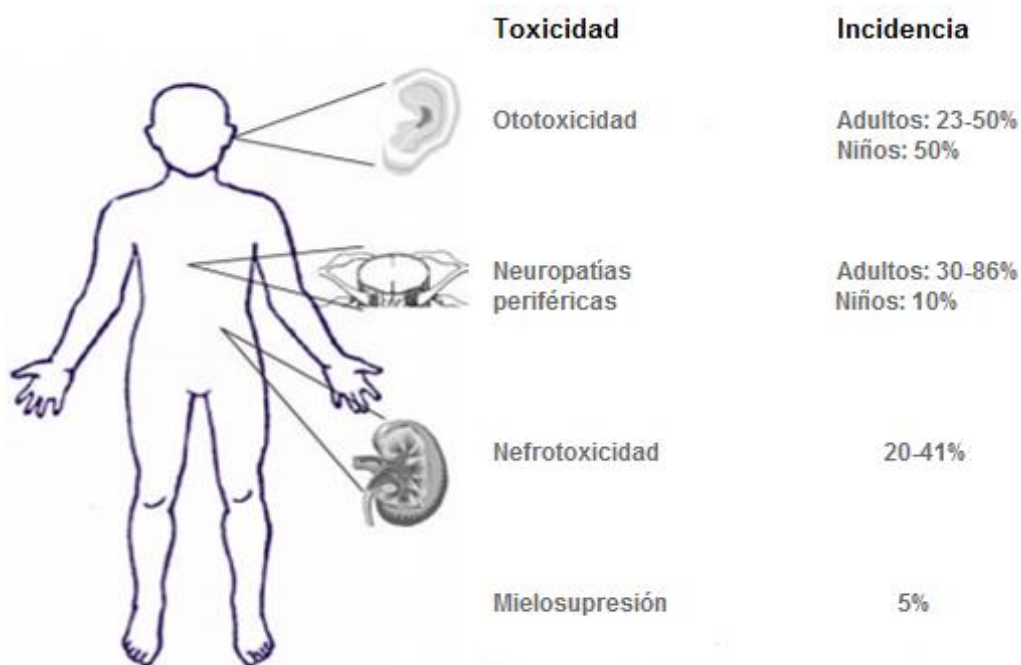


Figura 7. Toxicidad asociada al tratamiento con cisplatino, observándose que en la mayor parte de los casos se presenta nefrotoxicidad y ototoxicidad (Rabikand & Dolan, 2007).

Uno de los principales problemas que presentan la mayoría de los fármacos antineoplásicos, incluyendo el cisplatino, es el daño indiscriminado tanto en tejido canceroso como tejido sano; aunado al pobre comportamiento farmacocinético de este antineoplásico, en donde se observa una velocidad de eliminación elevada, amplio volumen de distribución en tejidos, alta unión a proteínas plasmáticas y por

tanto una baja biodisponibilidad del fármaco, son razones por las cuales su uso en la terapia oncológica está lejos de ser ideal (Meléndez & Maldonado, 1998). Por lo anterior, uno de los principales objetivos en la clínica es incrementar el índice terapéutico de este tipo de antineoplásicos mientras se minimizan los efectos dañinos, para ello, mediante el uso de la nanotecnología se han desarrollado nanovectores capaces de transportar principios activos, ejemplo de ello son los liposomas, resultado de la encapsulación física del fármaco en un sistema coloidal, logrando que el volumen de distribución se reduzca significativamente y su concentración plasmática se incremente, ya que los liposomas evitan la unión a proteínas plasmáticas. Lo anterior da como resultado una mayor permanencia del fármaco en circulación y por lo tanto una mejor biodisponibilidad del mismo (Cheong *et al.*, 2007).

Específicamente en el INCan, se estudia la posibilidad de administrar cisplatino mediante acarreadores liposomales que permitan su transporte y liberación en mayores concentraciones en el sitio blanco, de manera que sea más selectiva por el tejido tumoral y menor en los tejidos normales.

3.5 Liposomas

Los liposomas son definidos como vesículas esféricas de tamaño nanométrico, generalmente de 100 nm de diámetro, en las que se puede transportar millones de moléculas del principio activo (Drummond *et al.*, 1998) Fig. 8. El carácter anfifílico de los lípidos que los componen les proveen atributos únicos que los convierten en vehículos adecuados de fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos.

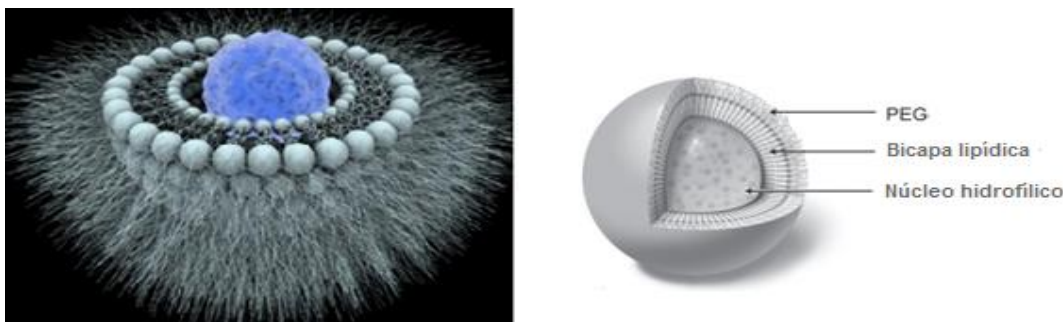


Figura 8. Estructura general de los liposomas, compuestos principalmente por un bicapa lipídica que alberga un núcleo hidrofílico y un recubrimiento pegilado (PEG) (Green & Rose, 2007)

Los liposomas pueden ser clasificados por el número de bicapas lipídicas que presentan y por su tamaño final. En el caso de la formulación de cisplatino liposomal, que previamente ha sido desarrollada y caracterizada por el equipo de trabajo de los laboratorios de Física Médica e Imagen Molecular y Farmacología del INCan (Toro, 2010), se encuentra clasificada como liposomas de circulación prolongada o stealth, debido a que presenta polietilenglicol (PEG) de carácter hidrofílico unido a la superficie de la vesícula, en consecuencia la opsonización de componentes plasmáticos es impedida y la interacción de SRE es inhibida, también se ha propuesto que este tipo de recubrimiento forma un revestimiento de agua en la superficie del liposoma, de esta manera podría pasar inadvertido por el sistema fagocítico mononuclear retrasando su eliminación del torrente sanguíneo (Blume, 1990). También se sabe que el tamaño está estrechamente relacionado ya que tamaños de partícula menores tienen tasas de eliminación más lenta que aquellos con tamaño superior, por tanto tiempos de retención más prolongados en sangre otorgan mayor oportunidad de distribución hacia su sitio blanco incrementando la duración del efecto terapéutico (Yamashita, 2013).

El principal sitio de eliminación de los liposomas es el SRE, particularmente en las células de Kupffer en el hígado y con la unión a macrófagos en el bazo; en menor medida también se puede presentar en médula ósea y nódulos linfáticos, cabe mencionar que el proceso de β -oxidación por parte del hígado también se lleva a cabo para estos sistemas liposomales.

Esta formulación se ha estandarizado mediante el método de evaporación en fase reversa, que consiste en la adición rápida de una solución acuosa del fármaco a una solución orgánica de los fosfolípidos, con sonicación simultánea. Con este método se logran obtener vesículas unilaminares de tamaños entre 0.1 y 1.0 micras de naturaleza neutra (Szoka & Papahadjopoulos, 1978).

3.5.1 Acumulación en tumor

Los liposomas están diseñados para permanecer más tiempo en circulación sanguínea, su acumulación en zonas tumorales está relacionada con las diferencias anatómicas y fisiopatológicas entre el tumor y los tejidos normales; diferencias dadas principalmente con la angiogénesis, proceso imprescindible para el crecimiento del tumor, el cual ocasiona que los nuevos vasos sanguíneos formados entorno a la masa tumoral tengan una estructura defectuosa y permeable (Huang, 2008) Fig. 9. La presencia de un endotelio vascular discontinuo facilita la extravasación de los liposomas hacia el espacio intersticial, fenómeno que en tejidos sanos no se presenta. 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)

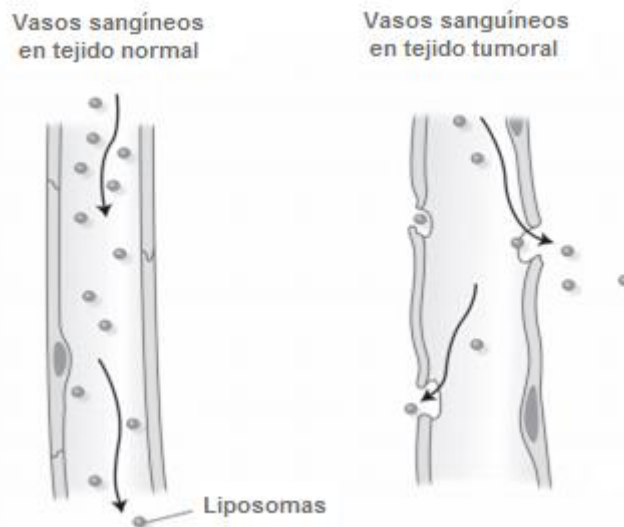


Figura 9. Imperfecciones vasculares de la zona tumoral dadas por vasos sanguíneos irregulares, dilatados, con poros y que presentan fenestraciones de hasta 2 μm (Green & Rose, 2007)

3.5.2 Efectos adversos

Durante la quimioterapia con fármacos liposomales, el efecto secundario que se ha presentado en hasta un 23% de los pacientes es la eritrodisestesia palmar

plantar (PPE) conocido como síndrome mano pie (Moghimi & Patel,1989), principalmente cuando se administran en dosis extremadamente altas y de manera repetida. Este síndrome es caracterizado por enrojecimiento de las palmas y plantas de los pies, hinchazón u hormigueo que incluso puede llegar a formar grietas o despellejamientos en cuadros muy severos; otros efectos adversos menos comunes que se ha observado, han sido relacionados con el sistema retículo endotelial (SER) derivando en cuadros de hepatomegalia o esplenomegalia (Hong, 2001)

3.6 Técnicas de imagen molecular (PET/CT)

Es un estudio que combina Tomografía Computada (CT) con Tomografía por Emisión de Positrones (PET) en una misma imagen su finalidad es producir imágenes que ilustren la función fisiológica y específica de algún proceso molecular; se utiliza para determinar distintos procesos vitales, como el metabolismo de la glucosa, el flujo sanguíneo, la tasa de unión de los complejos receptor-ligando y el intercambio de oxígeno (Schwaiger & Weber, 2002). Con estas imágenes se distinguen los estados funcionales, normales o alterados, de alguna estructura específica, de aquí la importancia de utilizar este tipo de estudios en la evolución de las neoplasias que refleje el proceso dinámico, del cual no pueden obtenerse imágenes que reflejan la actividad corporal, a menos que se realice alguna determinación metabólica y se compare con el resto de las funciones fisiológicas (Coronel & Serna, 2007).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los laboratorios de Física Médica e Imagen Molecular y de Farmacología del INCan se ha desarrollado una formulación de cisplatino liposomal con la cual se logró que el cisplatino permaneciera más tiempo en circulación; además de prevenir la nefrotoxicidad que causa la terapia convencional (Toro, 2010), sin embargo se requiere comprobar la efectividad de este sistema en estudios *in vivo*.

5. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo plantea la evaluación preclínica en un modelo murino de cáncer cervicouterino de la eficacia terapéutica y de toxicidad de la formulación de cisplatino liposomal desarrollada en el INCan, atendiendo a la problemática que existe con muchos fármacos antineoplásicos incluyendo el cisplatino, debido a la alta inespecificidad y baja biodisponibilidad, por lo que es necesario el desarrollo de sistemas que permitan aumentar la selectividad por el tejido tumoral aumentando la eficacia del tratamiento y principalmente reduciendo los efectos tóxicos en tejido sano.

6. HIPÓTESIS

La administración de una formulación liposomal de cisplatino podría mejorar la eficacia en xenotransplantes de cáncer cervicouterino y reducir los efectos tóxicos en comparación con la administración de cisplatino convencional no liposomal.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

Evaluar la eficacia y toxicidad de una formulación liposomal de cisplatino en xenotransplantes de cáncer cervico uterino desarrollados en ratones atímicos, con la finalidad de determinar su efecto sobre el crecimiento tumoral.

7.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el daño renal, hepático y pérdida de peso, en ratones *Balb/c*, de la formulación de cisplatino liposomal.
2. Evaluar la eficacia de la formulación de cisplatino liposomal mediante la medición del crecimiento del volumen tumoral y actividad metabólica utilizando técnicas de microPET/CT.
3. Determinar la cinética hepática, renal e intratumoral de cisplatino tras la administración de la formulación liposomal y determinar la cantidad de cisplatino que se concentra en cada tejido.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Animales

Se utilizaron 50 ratones nu/nu hembras, entre 6-8 semanas de edad y 10 ratones *Balb/c* machos, ambos proporcionados por el Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán (INCMNSZ), estos fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos, con agua y alimento *ad libitum*, con un fotoperiodo día/noche 12-12 horas. El protocolo para el manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

8.2. Ensayo de toxicidad sistémica, hepática y renal

Para la evaluación de la toxicidad se utilizaron los ratones *Balb/c*, estos fueron aleatorizados y distribuidos en dos grupos (n=5), el grupo A fue tratado con la terapia convencional, mientras que el grupo B fue administrado con la formulación de cisplatino liposomal, tal como se indica en el cuadro 2.

Cuadro 2. Esquema de tratamiento para evaluar la toxicidad del cisplatino liposomal.

Grupo	Tratamiento	Esquema
A	Cisplatino convencional	Dosis de 3 mg/kg vía I.P, cada semana por 3 semanas.
B	Formulación liposomal de cisplatino	Dosis de 3 mg/kg vía I.P, cada semana por 3 semanas.

Se midió el peso de los grupos una vez por semana; al terminó del tratamiento, los animales fueron anestesiados con isoflurano/oxígeno utilizando una unidad de inhalación para roedores (Bickford®), se tomó muestra de sangre por punción cardiaca, la cual fue recolectada en tubos eppendorf de 1.5mL (LABCON®) heparinizados, se centrifugan a 10,000 rpm por 10min a 4°C para separar el plasma; éste fue almacenado a -20°C. Posteriormente los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical; se removió el hígado y riñón, los cuales fueron almacenados en tubos falcon (CORNING CentriStar®) de 15 mL en formol al 10% (J.T. Baker®). Todas las muestras fueron enviadas a la Facultad de Veterinaria de la UNAM, para su análisis de perfil hepático midiendo los niveles de las enzimas ALT y AST, también cuantificando creatinina sérica y urea, así como el análisis histopatológico de los tejidos.

8.3. Evaluación terapéutica

8.3.1 Líneas celulares

La línea celular de adenocarcinoma de cérvix HeLa (ATCC® CCL-2™) fue obtenida de la American Type Culture Collection; ésta fue cultivada en botellas de 75cm² (CORNING CentriStar®) con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Gibco®) con 10% de suero fetal bovino e incubadas a 37°C con 5% de CO₂, hasta obtener entre un 90-100% de confluencia.

8.3.2. Generación de xenotransplantes

La generación de xenotransplantes se realizó en ratones *nu/nu*, para ello las células se despegaron de las botellas de cultivo con una mezcla de buffer de fosfatos y ácido etilendiaminotetraacético (PBS-EDTA) al 1%, posteriormente se realizaron lavados consecutivos con PBS y centrifugación a 1000 rpm por 10 min; posteriormente se realizó un conteo celular en cámara Neubauer y se inocularon 5 x 10⁶ millones de células HeLa en 100µL de medio blanco por vía subdérmica en el costado izquierdo del ratón.

8.3.3 Tratamiento y grupos control

Para la evaluación de la eficacia de la formulación liposomal de cisplatino, los ratones *nu/nu* xenotransplantados fueron aleatorizados y distribuidos en cuatro grupos (n=5-7) tal como se describe en el cuadro 3. El grupo A no recibió tratamiento; el grupo B recibió únicamente liposomas sin fármaco, en donde la dosis administrada fue equivalente a la cantidad de fosfolípidos presente en los liposomas de cisplatino; el grupo C fue tratado con cisplatino de manera convencional, mientras que el grupo D fue administrado con la formulación de cisplatino liposomal.

Cuadro 3. Grupos experimentales para la evaluación de eficacia terapéutica.

Grupo	Tratamiento	Esquema
A	Control	Sin tratamiento
B	Liposomas blanco	Dosis de 120 mg/kg vía I.P., cada semana por 3 semanas.
C	Cisplatino convencional	Dosis de 3 mg/kg vía I.P, cada semana por 3 semanas.
D	Cisplatino liposomal	Dosis de 3 mg/kg vía I.P, cada semana por 3 semanas.

8.3.4. Medición del volumen tumoral en mm³

Cuando los tumores alcanzaran un volumen de entre 100-150 mm³ se inició el tratamiento correspondiente y se realizó el seguimiento semanal tanto de peso como de volumen tumoral, midiendo con un vernier la longitud mayor y la longitud menor, utilizando la siguiente fórmula (Medina *et al.*, 2008):

Donde:

VT: Volumen del tumor (mm³)

$$VT = D \times d^2 \times \pi / 6$$

D: Diámetro mayor (mm²)

d: Diámetro menor (mm²)

8.3.5. Medición de actividad metabólica tumoral

La actividad metabólica se determinó cuantificando la captación de glucosa de la zona tumoral a partir de la medición del volumen de captación (VOI) (Pérez *et al.*, 2011) obtenido mediante imagen molecular en la primera y última semana del estudio, utilizando un equipo microPET/CT ALBIRA ARS (Oncovisión España) y como radiofármaco fluorodesoxiglucosa (¹⁸F-FDG). Se administraron 100μCi de ¹⁸F-FDG por vía intraperitoneal iniciando la adquisición de imágenes 30 minutos después para permitir su distribución en el organismo; durante el estudio los ratones se mantuvieron anestesiados con isoflurano/oxígeno (3%) mediante una unidad de inhalación para roedores.

8.4 Cinética tumoral

Se utilizaron 30 ratones *nu/nu* previamente xenotransplantados con células HeLa siguiendo el protocolo antes descrito; una vez que los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 200-250 mm³ los ratones fueron distribuidos en dos grupos (Cuadro 4) a los cuales se le administró una dosis de 9 mg/kg del fármaco correspondiente; el grupo A fue tratado con cisplatino convencional, mientras que al grupo B se le administró cisplatino liposomal, ambos grupos fueron sacrificados por punto temporal según el siguiente esquema:

Cuadro 4. Grupos experimentales para el estudio de cinética tumoral.

Grupo	Tratamiento	Tiempo
A	Cisplatino convencional	0, 5, 10,15, 30 min y 2,4,6,24 h.
B	Cisplatino liposomal	0,30 min y 2,4,6,24 h.

Después del sacrificio se colectaron los siguientes órganos: tumor, hígado y riñón, a los cuales se les adiciono 500µL de buffer de lisis que contiene nonidet al 10%, se homogenizaron con un triturador de tejido (Pro scientific®) y se conservaron a -80°C hasta su análisis.

8.4.1. Cuantificación de cisplatino en tejido

La determinación de cisplatino en tejido mediante HPLC, se realizó con base en una metodología estandarizada y validada previamente en el laboratorio de Farmacología del INCan que se describe a continuación (López *et al.*, 2005).

8.4.2 Reactivos y solventes para la cuantificación de cisplatino

Se realizó la preparación previa de soluciones stock de cisplatino y cloruro de níquel 1mg/mL, hidróxido de sodio al 0.1 M y dietilditiocarbamato sódico al 10%, reactivos que fueron obtenidos de Sigma-Aldrich®. El metanol y acetonitrilo de grado cromatográfico fueron obtenidos de Honey Weell®. El cloroformo de grado reactivo se obtuvo de Merck®. 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®).

8.4.3 Extracción y cuantificación de cisplatino en tejido

La curva patrón se preparó en un intervalo de 0 a 2 µg/mL a partir de una solución stock de cisplatino de 10 µg/mL en un volumen final de 100 µL e incluyendo 10 µL del estándar interno NiCl₂ a 20 µg/mL utilizando como matriz tejido tumoral sin tratamiento; las muestras se prepararon en un volumen final de 500 µL tomando

450 μ L del homogenizado previo y adicionando 50 μ L del estándar interno a la misma concentración.

A las muestra de tejido y de la curva patrón se les adicionó acetonitrilo en una proporción 1:1 y se centrifugaron a 15,000 rpm por 15min a 4°C; posteriormente el sobrenadante se llevó a sequedad bajo corriente de N₂. El residuo se resuspendió en solución salina y se adicionó dietilditiocarbamato sódico (DDTC) al 10%; la mezcla se incubó a 37°C en un termomezclador (Eppendorf®). Posteriormente el cisplatino se extrajo con cloroformo y se centrifugó a 10,000rpm por 10min a 4°C. Finalmente, la fase clorofórmica se inyectó en el equipo cromatográfico.

La concentración de cisplatino se determinó mediante el trazado de la relación de la altura del pico de cisplatino y la altura del pico del cloruro de níquel (estándar interno) en función de la concentración de cisplatino.

8.4.4. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de cisplatino

El equipo cromatográfico se compone de una bomba Modelo 650E con detector de luz UV 486 (Waters TM). Se utiliza una columna de fase reversa Symmetry® C18 (3.9x150mm) de 5 μ m de tamaño de partícula (Waters TM); como fase móvil se utiliza agua, metanol y acetonitrilo en una proporción 30:38:32 a un flujo de 1.8 mL/min, la detección se realizó a 254nm con un volumen de inyección de 20 μ L.

8.5 Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza de una vía (ANOVA) utilizando el paquete de análisis estadístico SPSS (Ver. 20), seguido de una prueba pos hoc (Bonferroni) que realiza comparaciones múltiples entre los grupos con un intervalo de confianza de 95% para determinar una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento.

9. Resultados

9.1. Ensayo de toxicidad

9.1.1. Toxicidad sistémica por pérdida de peso

En la Figura 10 se observa el promedio del cambio en el peso corporal de los individuos de cada grupo de tratamiento durante el periodo de evaluación, no se observa pérdida de peso ni diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

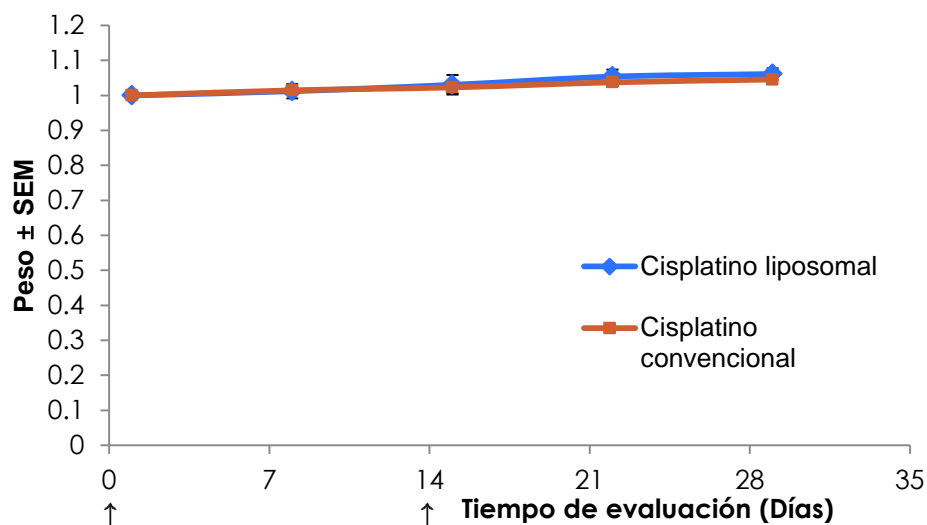


Figura 10: Seguimiento normalizado del peso corporal en ratones *Balb/c* sometidos a diferentes tratamientos, cada punto muestra el promedio ($n=5$) \pm SEM no se observa diferencia estadísticamente significativa ni pérdida de peso en ambos grupos.

9.1.2. Evaluación del daño renal

En la Figura 11, se presenta los resultados de los niveles de urea y creatinina, mostrando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados, sin embargo, la urea en ambos casos mostro resultados similares a los obtenidos por el grupo sin tratamiento, mientras que la creatinina se encontró fuera de los límites establecidos por el grupo control.

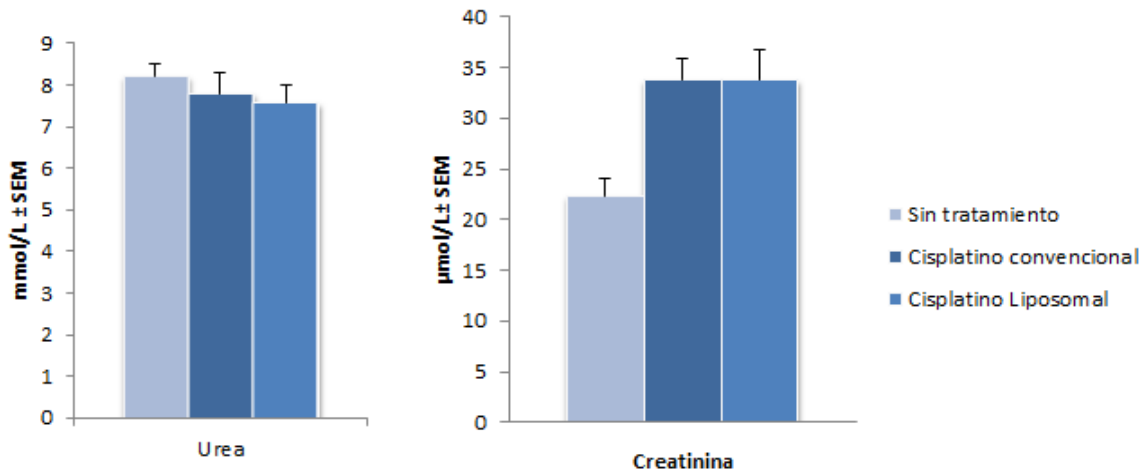


Figura 11: Pruebas de función renal, cuantificación de urea y creatinina en plasma tras el término del tratamiento correspondiente para cada grupo con una $n=5 \pm SEM$. Para ambos grupos tratados se observa alteraciones en la creatinina mientras que la urea permanece similar al grupo control.

9.1.3. Evaluación del daño hepático mediante cuantificación de enzimas

Los resultados que se muestran en la Fig. 12 pertenecen a las pruebas realizadas como marcadores de daño hepático ALT Y AST, para la primera enzima se observa que mientras la terapia liposomal muestra resultados similares al grupo control, en la terapia convencional los resultados se encuentran alterados. En el caso de la enzima AST no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, ni tampoco respecto al grupo sin tratamiento.

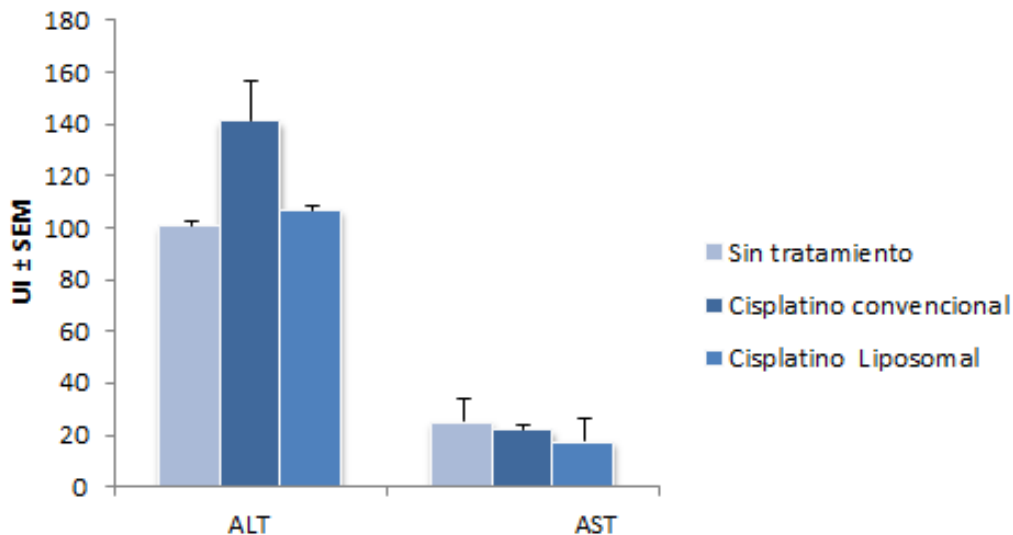


Figura 12: Pruebas de función hepática, cuantificación alaninaaminotransferasa (ALT) y aspartatoaminotransferasa (AST) en plasma tras el término del tratamiento correspondiente para cada grupo con una $n=5 \pm SEM$. Únicamente la enzima ALT se mostró alterada en la terapia convencional mientras que en la terapia liposomal no se observó cambios respecto al grupo sin tratamiento.

9.2. Evaluación terapéutica

9.2.1 Eficacia de cisplatino liposomal

La eficacia terapéutica se muestra en la Fig. 13 observándose que la formulación liposomal de cisplatino presenta una clara disminución de la velocidad del crecimiento tumoral respecto a los demás grupos de tratamiento, diferencia estadísticamente significativa a partir de la cuarta semana. Se puede apreciar que el grupo tratado con liposomas blanco no presenta ninguna diferencia respecto al grupo sin tratamiento y la terapia convencional no tiene un efecto tan sostenido como se muestra en la liposomal, en donde el volumen tumoral aumenta 2.4 veces más su tamaño inicial, no siendo así para los grupos de cisplatino convencional y liposomas blanco/sin tratamiento con un aumento de 4.7 y 8 veces más respectivamente.

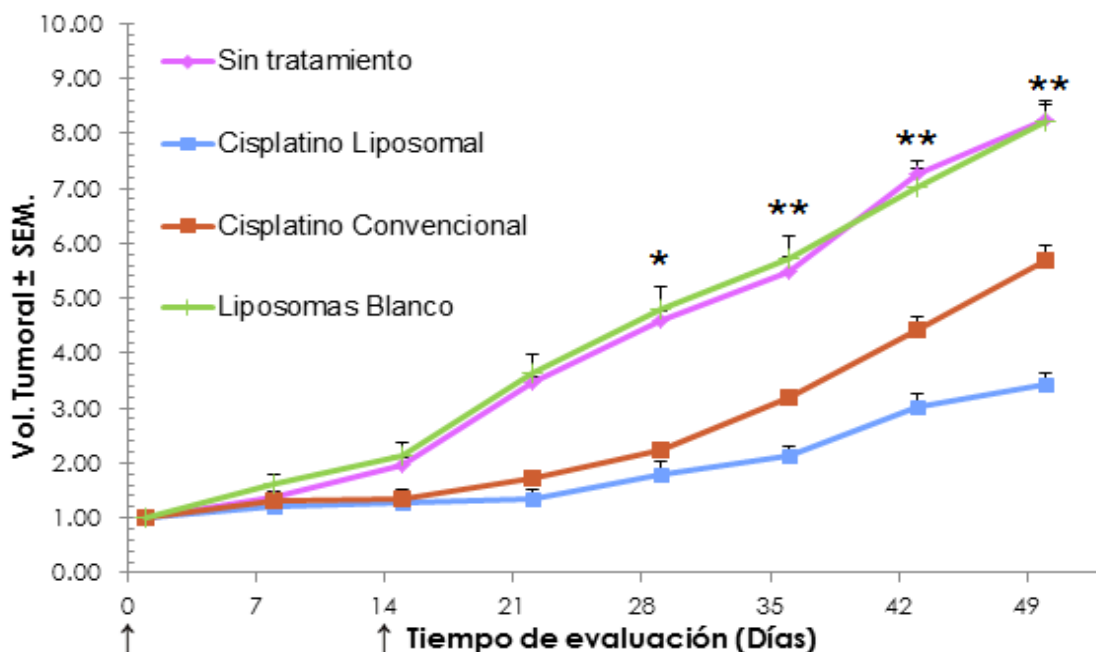


Figura 13: Seguimiento del volumen tumoral normalizado durante siete semanas en ratones atímicos sometidos a diferentes tratamientos cada punto representa el promedio de una $n=5 \pm$ SEM. Se observó claramente la disminución de la velocidad del crecimiento del volumen tumoral en la terapia con cisplatino liposomal respecto a los demás grupos tratados.

*Diferencia estadísticamente significativa entre cisplatino liposomal vs sin tratamiento, liposomas blanco.

**Diferencia estadísticamente significativa entre cisplatino liposomal vs los diferentes tratamientos ($p<0.001$).

Los resultados obtenidos se relacionan con las imágenes mostradas en la Fig. 14, que muestra las imágenes obtenidas al final de los tratamientos correspondientes, al igual que la Fig. 15 en donde se observan los tumores disecados al final de la evaluación, evidenciando claramente la eficacia de la formulación liposomal.

Figura 14: Imágenes finales de cada uno de los tratamientos, se muestra visualmente que en la terapia con cisplatino liposomal se observó un menor volumen en el tamaño tumoral

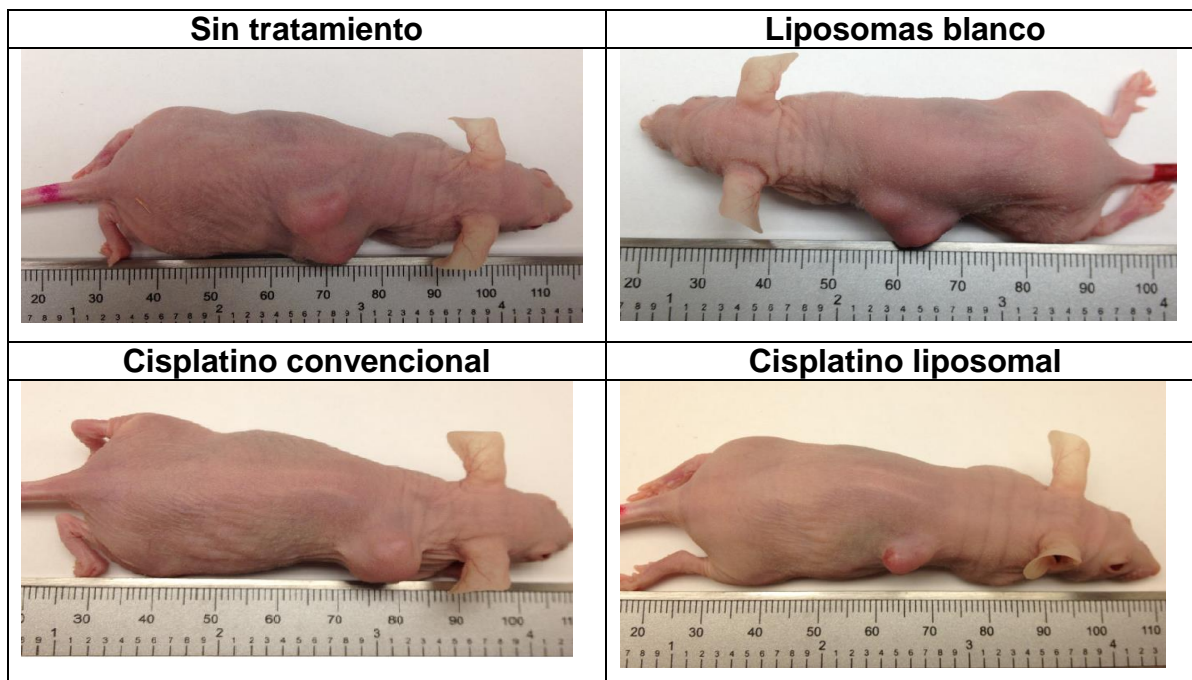


Figura 15: Tumores disecados de cada uno de los tratamientos al final de su evaluación, observándose un menor tamaño del tumor en la terapia con cisplatino liposomal

9.2.2. Toxicidad sistémica en ratones *nu/nu*

La Fig. 16 muestra el seguimiento del peso corporal durante la evaluación del tratamiento, observándose un ligero decremento del peso en el grupo de cisplatino liposomal alrededor de la semana cuatro, no obstante, este no supera el 20% de pérdida del peso corporal inicial, además de no existir diferencia estadísticamente significativa entre los grupos evaluados.

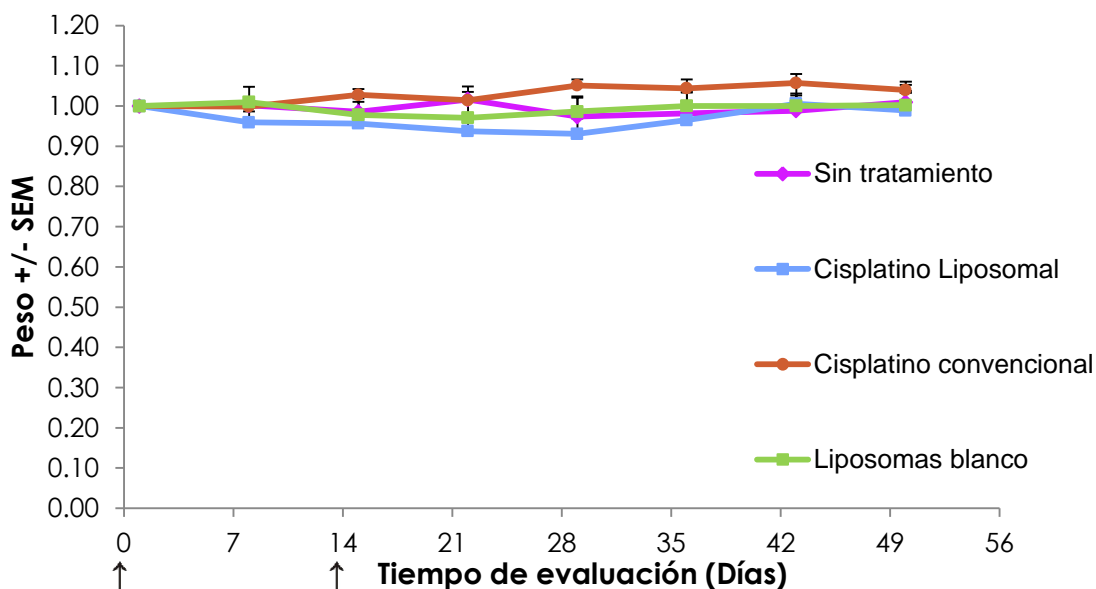


Figura 16: Seguimiento normalizado del peso corporal en ratones atímicos sometidos a diferentes tratamientos, cada punto muestra el promedio ($n=5$) \pm SEM. Las flechas indican el inicio y el fin del tratamiento. No se observa diferencia estadísticamente significativa ni pérdida de peso en los grupos tratados.

9.2.3 Seguimiento de actividad metabólica por imagen molecular

La Fig. 17 muestra el seguimiento de la actividad metabólica tumoral mediante la captación del radiofármaco ^{18}F -FDG, la diferencia de intensidades de color en la zona tumoral en las imágenes refleja una menor o mayor actividad metabólica, observándose un cambio en la actividad al inicio y al final de la evaluación de los tratamientos. A partir de las imágenes moleculares se determinó el volumen de captación (actividad metabólica) del tumor en los tratamientos, representado como VOI (volumen de interés), Fig. 18 mostrando que en la terapia convencional la actividad metabólica del tumor se incrementa cuatro veces a la presentada inicialmente, mientras que en la terapia liposomal presenta únicamente el doble de actividad.

Figura 17: Imágenes moleculares microPET/CT al inicio y final del tratamiento, la zona marcada en el cuadro refleja la actividad metabólica del tumor siendo menor en la terapia liposomal al final del tratamiento.

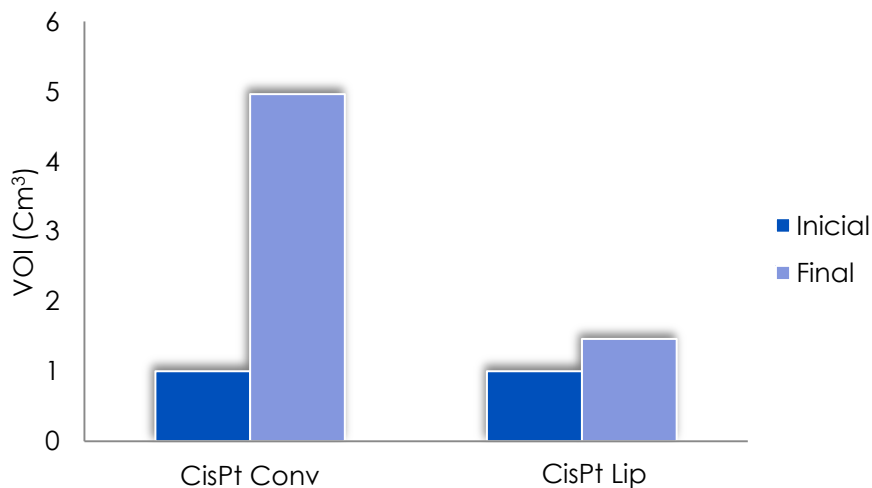
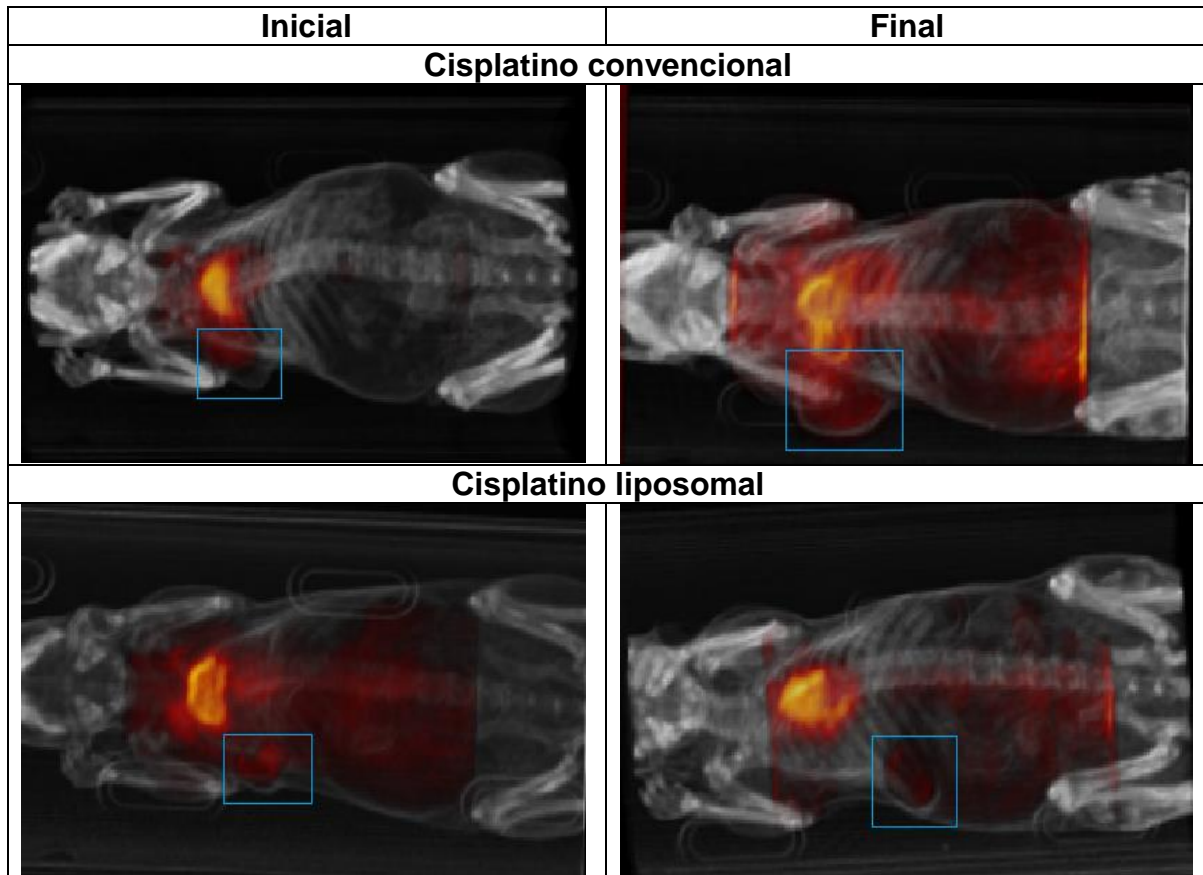


Figura 18: Volumen de interés (VOI) que representa la actividad metabólica de los tratamientos de relevancia en el estudio, siendo cuatro veces menor en la terapia liposomal respecto al tratamiento convencional al final del estudio.

9.3. Cinética en tejidos

9.3.1. Hepática

En la Fig. 19 se muestra la cinética del cisplatino convencional en hígado, presentando una C_{max} de 2.8 μg de cisplatino por gramo de tejido a los 10 minutos tras su administración e inmediatamente después se observa una rápida eliminación durante los primeros 30 min, no siendo así para la terapia con cisplatino liposomal que muestra un aumento constante hasta las 6 h, con una C_{max} de 8.1 $\mu\text{g/g}$ de tejido; posteriormente se observa una eliminación progresiva y lenta, sin embargo, a las 24 h aún existe una concentración de 2.5 $\mu\text{g/g}$ de tejido en este órgano.

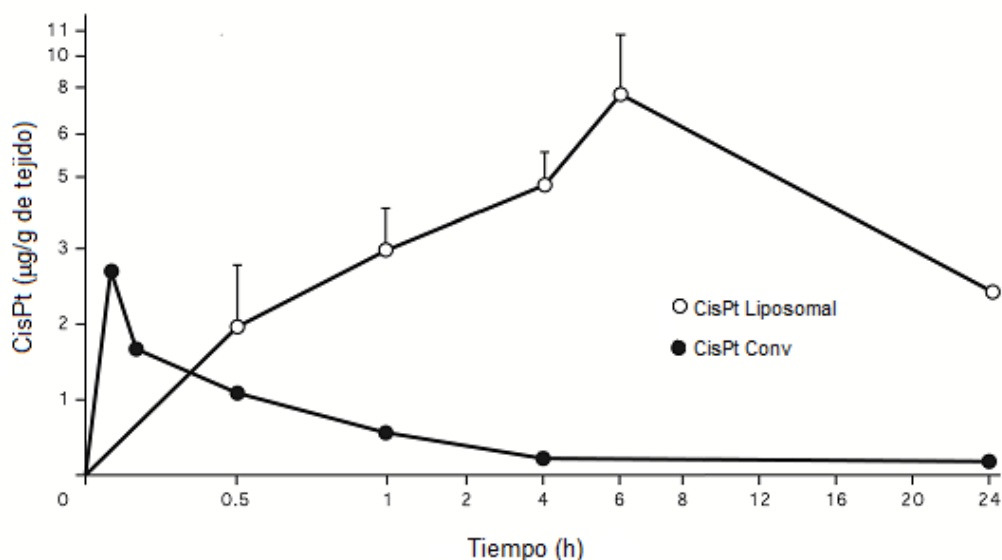


Figura 19. Curva de cuantificación de cisplatino por gramo de tejido hepático tras la administración de 9 mg/kg del fármaco correspondiente a cada grupo, por cada punto se muestra el promedio de una $n=2 \pm \text{SEM}$, se observó gran captación de cisplatino en este órganos en el terapia liposomal.

9.3.2. Renal

En la Fig. 20 se muestra la cinética en riñón del cisplatino al ser administrado de manera convencional. Se observa una C_{max} de 11.43 $\mu\text{g/g}$ de tejido a los 5 min de su administración, eliminándose más de mitad de la concentración rápidamente en los primeros 15 minutos, mientras que cuando es administrado de manera liposomal la C_{max} se presenta a las 4 h siendo de 7.2 $\mu\text{g/g}$ de tejido seguido de una eliminación gradual.

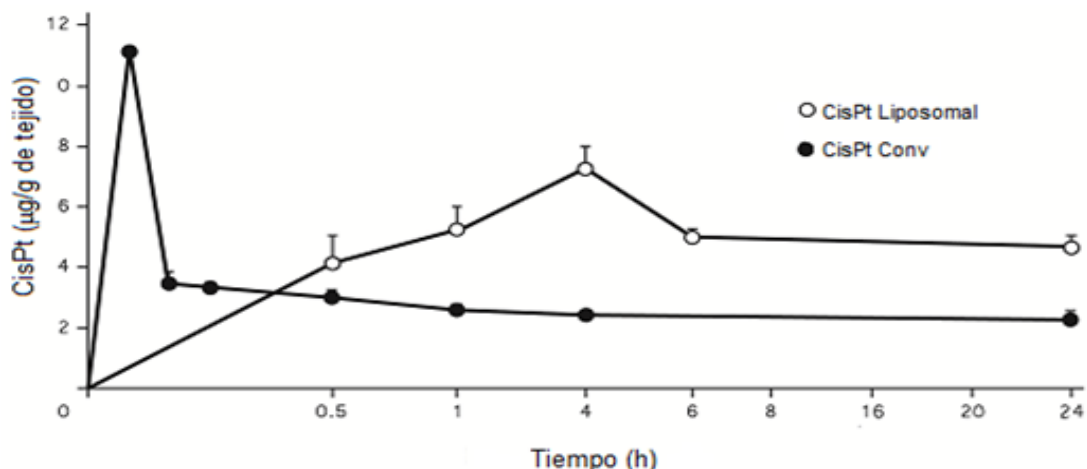


Figura 20. Curva de cuantificación de cisplatino por gramo de tejido renal tras la administración de 9 mg/kg del fármaco correspondiente a cada grupo, por cada punto se muestra el promedio de una $n=2 \pm SEM$, se observó una disminución en la C_{max} alcanzada en la terapia liposomal respecto a la convencional.

9.3.3. Intratumoral

En la Fig. 21 la administración del fármaco convencional presenta su concentración máxima (C_{max}) de 0.8 µg de cisplatino por gramo de tejido tumoral a los 10 minutos tras su administración e inmediatamente después se elimina, mientras que la terapia liposomal muestra un aumento constante hasta las 6 h donde se observa su C_{max} , de 1.6 µg/g de tejido, posteriormente se observa su disminución lenta y sostenida de hasta 24 h en el sitio tumoral.

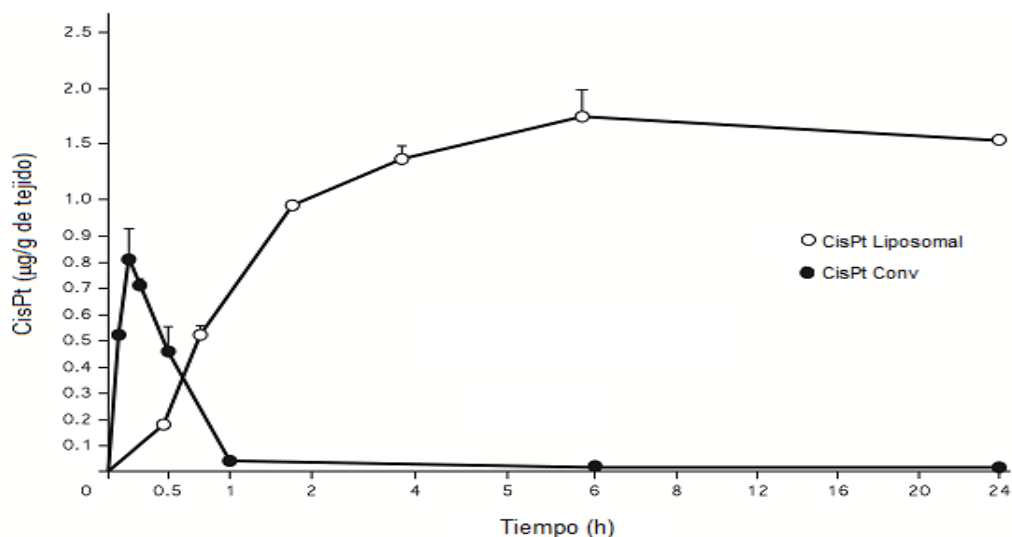


Figura 21: Curva de cuantificación de cisplatino por gramo de tumor tras la administración de 9 mg/kg del fármaco correspondiente a cada grupo, por cada punto se muestra el promedio de una $n=2 \pm SEM$. Se observó una acumulación progresiva del cisplatino en la terapia liposomal mientras que en la terapia convencional se eliminó rápidamente.

10. Discusión de resultados

En nuestro país el cáncer de cérvix es considerado un problema de salud pública y frecuentemente se encuentra en estadios avanzados al momento del diagnóstico.

A pesar de los programas de detección establecidos para enfermedad preinvasora, se continúan realizando diagnósticos tardíos, y por lo tanto los tratamientos como cirugía, radioterapia o quimioterapia basada en cisplatino son poco oportunos y muchas veces solo de tipo paliativo. Esto origina un mal pronóstico y una menor sobrevida en la paciente. Esta problemática ha sido abordada por el laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular del INCan, desarrollando una formulación liposomal que encapsule el cisplatino, obteniendo resultados prometedores (Toro, 2010).

Siguiendo esta línea de investigación, además de la necesidad de poner a prueba nuevos agentes que mejoren la respuesta terapéutica respecto a la terapia convencional. El presente trabajo planteó investigar la toxicidad, eficacia y especificidad de la terapia liposomal respecto a la terapia convencional en xenotransplantes de cáncer cervicouterino.

Como primera etapa del trabajo se evaluó la toxicidad sistémica de la formulación en ratones Balb/c, mediante el seguimiento del peso corporal, parámetro elegido por su practicidad y accesibilidad además ser el menos invasivo según el acta de bioética para el trabajo con animales de experimentación de la OPS/OMS.

Los resultados obtenidos en esta evaluación, observados en la Fig.10, sugieren que no hubo toxicidad sistémica demostrable puesto que todos los animales ganaron peso dentro del rango fisiológico para su especie, además no existió muerte de ningún animal o pérdida de peso mayor al 20%.

Estudios previos en ratas Wistar, realizados en el INCan (Toro, 2010), demuestran que los valores de urea y creatinina en plasma, marcadores que señalan

insuficiencia renal progresiva cuando existe una retención en sangre de estas moléculas, solo se ven alterados a las 24 horas cuando se administra la terapia convencional, sin embargo, cuando la evaluación se realizó por un periodo más prolongado no se observa diferencia estadísticamente significativa entre las terapias. En el caso de la urea, los resultados obtenidos para ambos tratamientos es similar a los obtenidos en el grupo sin tratamiento (Fig. 11), sin embargo la reabsorción tubular de este marcador es sumamente dependiente de otros factores como la dieta e hidratación del individuo (Fernández & Serrano, 1985) por lo cual el uso de este parámetro es limitado y ha sido remplazado por la cuantificación de creatinina debido a que este es el mejor indicador de la función renal, pues aumenta cuando hay lesiones glomerulares y no se ve afectado por la dieta u otros factores (Michielsen & Schepper, 1972); por otra parte, los resultados de creatinina obtenidos en ambos grupos de tratamiento se observaron alterados en comparación con el grupo control (Fig. 11), en la caso de tratamiento convencional estos resultados ya han sido demostrado por distintos autores que señalan que el mayor acumulo de cisplatino en el riñón se produce en la zona corticomedular y afecta principalmente la sección tubular proximal y las nefronas mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)(Starha *et al.*, 20014), sin embargo se esperaba que la terapia liposomal disminuyera este daño asociado al fármaco cuando este se encapsulara en vesículas liposomales de aproximadamente 100 nm disminuyendo la velocidad de eliminación del fármaco, no obstante cabe señalar que en las terapias liposomales como es el caso de la formulación de doxorubicina liposomal que se encuentra actualmente en el mercado como terapia alternativa a la doxorubicina convencional, el tratamiento se administra en menor dosis bajo un esquema de tratamiento diferente al fármaco libre (40 mg/m² cada 4 semanas vs 60-90mg/m² cada 3 semanas) gracias a que la característica de los sistemas liposomales es permanecer más tiempo en circulación (Lee *et al.*, 2010); por lo tanto estos resultados obtenidos podrían sugerir que el problema está asociado al esquema de tratamiento y no a que la terapia liposomal no disminuya esta toxicidad, sin embargo, este desequilibrio en la función renal si podría desencadenar un aumento en la toxicidad con la

repetición de sucesivos ciclos del fármaco, por lo cual sería recomendable realizar más estudios encaminados a esclarecer dicho proceso, tomando muestras sanguíneas durante la evaluación del tratamiento en diferentes tiempos y no de punto final.

Paralelo a la evaluación de daño renal, también se evaluaron los niveles de las enzimas ALT y AST en plasma (Fig. 12) como marcadores de daño hepático, ya que el hígado también es un órgano que presenta gran captación de cisplatino en la terapia convencional y es la ruta de metabolización de los liposomas mediante *B*-oxidación (Yuan *et al.*, 2008). Estas enzimas se encuentran en gran medida concentradas en el citoplasma y las mitocondrias de los hepatocitos en el hígado, de tal manera que cuando este órgano está dañado, las células liberan estas enzimas al torrente sanguíneo (King & Perry, 2001). Para la terapia liposomal ambas enzimas se encontraron similares a los resultados mostrados por el grupo sin tratamiento lo que sugiere que la encapsulación del fármaco posiblemente evite su interacción con este órgano, mientras que en la terapia convencional solo la enzima ALT mostró valores alterados a lo reportado por el grupo control, este es el segundo órgano que presenta mayor captación de cisplatino de manera convencional después del riñón y dado que esta enzima no es específica de hígado sino de otros órganos riñones y musculo este aumento podría estar asociado al daño que previamente se observó en las pruebas de función renal, no obstante es necesario comprobar dicha hipótesis en estudios posteriores.

Al no observarse daño significativo a partir de los parámetros evaluados en órganos de interés, se prosigió con la evaluación de la eficacia del tratamiento liposomal con respecto a la convencional (Fig. 13); obteniéndose una clara disminución de la velocidad del crecimiento tumoral con la formulación liposomal. Con el cisplatino convencional (no liposomal) se ha reportado su rápida eliminación además de una menor acción ejercida en la zona tumoral, atribuible a que más del 90% de la dosis administrada se queda unido a las proteínas plasmáticas (Daye & Miller, 1981). En la terapia liposomal el efecto se sostiene por

un tiempo mucho más prolongado, dado por el aumento de biodisponibilidad en sangre al disminuir el reconocimiento y eliminación por parte del sistema retículo endotelial; esto como resultado del recubrimiento de PEG que presenta los liposomas.

Resultados similares a estos han sido reportados por Sadzuko & Hirotsu en 1998, quien describe que el pegilado conduce a una disminución tres veces menor en la captación de los liposomas por parte del sistema retículo endotelial, un aumento mucho mayor del ABC y un aumento en la captación del fármaco aproximadamente tres veces mayor en la zona tumoral, esto como resultado de aprovechar las condiciones fisiológicas de esta zona. Ya en el tumor el cisplatino ejerce su efecto citotóxico debido a la formación de puentes irreversibles con el DNA mejorando los resultados obtenidos en la terapia con cisplatino libre y dando lugar a una mayor eficacia tumoral (Owens, 2006). Cabe señalar que esta mayor eficacia es resultado no solo del pegilado, sino también de propiedades fisicoquímicas tales como el tamaño de partícula, la carga y la hidrofobicidad del liposoma, parámetros que determinan las interacciones que puedan tener los liposomas con los diferentes componentes biológicos, incluyendo proteínas séricas como IgG y otras opsoninas, que tienen altas afinidades a la superficie hidrófoba de las partículas acelerando el proceso de reconocimiento por parte de los macrófagos e impactando directamente en un mayor o menor biodisponibilidad del tratamiento (Hobbs *et al.*, 1998).

Los resultados también mostraron que el vehículo en el cual se administra el cisplatino (liposomas blanco) no ejerce ningún efecto terapéutico, pues se observó que el crecimiento tumoral es similar al grupo sin tratamiento, sugiriendo que el resultado obtenido por la formulación liposomal es totalmente adjudicado al cisplatino encapsulado en los liposomas.

Estos resultados se corroboran con las imágenes de tumores en la Fig. 14 y 15 en donde claramente se muestra de manera visual los resultados obtenidos al final y durante el proceso de evaluación de la formulación.

De manera adicional la eficacia de la formulación también fue evaluada mediante imagen molecular (Fig. 17 y 18), observando resultados similares a los obtenidos con la medición del volumen tumoral, lo que indica una correlación entre lo observado y su actividad metabólica.

En cuanto al seguimiento del peso durante esta evaluación (Fig. 16) se observaron variaciones en el peso según los diferentes tratamientos, encontrándose dentro del rango aceptado para esta especie; además no existió pérdida de peso mayor al 20% en los animales, lo que sugeriría, según Morton y Griffings, como el grado más alto basado en la pérdida de peso en ratones como indicativo de toxicidad sistémica y de un daño irreparable. Cabe mencionar que cierta población del grupo tratados con liposomas de cisplatino, presentaron una menor sobrevivencia, muriendo antes de terminar el seguimiento; esta situación puede ser debida a diversos factores, entre los cuales podría destacarse la propia predisposición de la especie, al ser inmunosuprimidos; cabe mencionar que no se observó este problema en el ensayo de toxicidad en ratones *balb/c*. Se discute si el problema podría estar ligado al esquema de tratamiento involucrado, siendo éste demasiado agresivo (dosis muy alta) para los ratones *nu/nu*, resultando en una acumulación progresiva del cisplatino en órganos de interés donde se generó una alta toxicidad. Por estos resultados la última parte de este trabajo, se encaminó a evaluar y cuantificar el cisplatino acumulado en el hígado y riñón, así como en la zona tumoral, como resultado de la larga permanencia de esta molécula en el torrente circulatorio, en la mayor permeabilidad que presentan los vasos sanguíneos tumorales y el menor drenaje linfático del tumor (Kukowska & Cao, 2005).

Los resultados mostraron una gran acumulación de cisplatino en hígado al ser administrado mediante acarreadores liposomales en comparación con el cisplatino libre (Fig. 19), si bien la principal vía de metabolismo de los liposomas es este órgano, hay otros factores que pueden estar influenciando este proceso, otros autores (Bertrand & Leroux, 2012) han descrito que la propia fisiología del hígado podría interferir con la biodisponibilidad de los sistemas liposomales ya que de manera natural existen fenestraciones de 100-150 nm en los sinusoides hepáticos que pudieran estar causando este acúmulo, además dentro de los capilares sinusoidales, las células de Kupffer son responsables de la actividad fagocítica del hígado en donde mientras más grande sea el tamaño de la partícula más fácil será el reconocimiento de ésta por parte de estas células; otro factor que cabe mencionar es que la tasa de aclaramiento dependerá de la cantidad de lípido en los liposomas.

Por otro lado es bien sabido que la principal vía de eliminación del cisplatino convencional es el riñón (Staffhorst *et al.*, 2008), de tal manera que como se muestra en la Fig. 20 comienza a presentarse una acumulación inmediata del fármaco en este órgano tras su administración, no siendo así cuando éste se encuentra encapsulado observándose una acumulación lenta y progresiva de por lo menos la mitad de lo que se encontró en la terapia convencional, lo que indicaría que el fármaco está permaneciendo por mucho más tiempo disponible en circulación para realizar su efecto, como resultado en la Fig. 21 se muestra que la concentración intratumoral de cisplatino que alcanza su sitio blanco en la formulación liposomal no solo es el doble de lo que llega a la zona tumoral en comparación al cisplatino convencional, si no que claramente se observa que se acumula y permanece constante incluso 24h después de su administración.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo que muchos autores han descrito como el efecto de permeabilidad y retención mejorada (Maeda *et al.*, 2009), el cual aprovecha la arquitectura vascular fisiopatológica del tumor y la inflamación producida en este tejido, con lo que se podría explicar porque se da una mayor acumulación de los sistemas liposomales en la zona tumoral, este fenómeno es

consecuencia de las características que implica el microambiente tumoral ya que cuando la neoplasia alcanza un tamaño de 2 a 3 mm, comienza la inducción del proceso de angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento (Krasneci *et al.*, 2003). La neovasculatura resultante difiere ampliamente de la de un tejido sano, los vasos sanguíneos son irregulares, dilatados, con poros o defectuosos, y las células endoteliales están desorganizadas, presentando grandes fenestraciones de hasta 2 μm de diámetro dependiendo el tipo de tumor (Matsumura & Maeda, 1986). Además, la presión intersticial es mayor en el centro del tejido canceroso que en la periferia del tumor, debido a que los tumores carecen de un sistema linfático bien definido (Heldin *et al.*, 2004), de esta forma los sistemas liposomales pueden acceder al espacio intersticial permaneciendo retenidos más tiempo en su interior que en un tejido normal.

Otro proceso relacionado con este efecto es la inflamación que se produce como resultado del proceso de proliferación incontrolado de las células, en donde, varios mediadores vasculares tales como la bradiquinina, óxido nítrico y prostaglandinas inducen un aumento en la permeabilidad vascular (Opanasopit *et al.*, 2001). Adicionalmente, el volumen de flujo de sangre en el tejido tumoral es marcadamente diferente que en el tejido normal, en el tejido tumoral la dirección de flujo de sangre puede cambiar abruptamente, el flujo puede detenerse o iniciar de forma errática; como resultado del aumento del flujo sanguíneo más el aumento de la permeabilidad vascular se incrementa el paso de líquido desde los vasos hacia el tejido, facilitando la extravasación de partículas de hasta 300 nm (Terada *et al.*, 1991).

En conjunto esta serie de fenómenos descritos dan lugar al efecto “EPR”, el cual prácticamente se basa en la combinación de capilares porosos y el deficiente drenaje linfático de la zona tumoral podría explicar que los liposomas atraviesen estos canales presentes en los capilares, llegando al espacio intersticial y quedando retenidas en el tumor concordando con los resultados obtenidos en la cinética intratumoral realizada.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la formulación liposomal evaluada puede representar una nueva alternativa para el tratamiento del CaCu aprovechando la fisiopatología de la zona tumoral incrementando el efecto terapéutico y disminuyendo los efectos adversos, sin embargo, es necesario comprobar esta hipótesis en estudios posteriores con la finalidad de que en un futuro sirva como una opción en la terapia clínica.

11. Conclusión

La formulación liposomal de cisplatino no mostró daño elevado en cuanto a función renal y hepática en ratones balb/c, además mostró una mejora en la eficacia del tratamiento con cisplatino en xenotransplantes de cáncer cervicouterino, disminuyendo la velocidad de crecimiento tumoral debido a una mayor retención del cisplatino en la zona tumoral cuando se encuentra encapsulado en este tipo de partículas. Se observó una disminución en la velocidad de eliminación del riñón, sin embargo se observó una alta acumulación de cisplatino en el hígado lo cual podría evitarse aplicando un esquema de tratamiento diferente.

12. Perspectivas

Para dilucidar una posible acción tóxica asociada a la terapia liposomal, es necesario evaluar la captación de cisplatino en otros órganos que pudieran estar comprometidos en la biodistribución de la formulación y proponer nuevos esquemas de tratamiento sin comprometer la eficacia de la terapia.

13. Bibliografía

- Abeloff, Armitage, Kastan. (2005) *Oncología Clínica* 3. Ed. Elsevier, 3ªEdición. 500-501.
- Agorastos T., Dinas K., Lloveras S., Boint H., Kornegay J.R. (2005) Human papillomavirus testing for primary screening in women at low risk of developing cervical cancer. *Gynecologic oncology*, 96(3): 714-720.
- Banker GS, Rhodes CT. (1996). *Modern Pharmaceutics (drugs and the pharmaceutical sciences)*. Marcel Dekker, 3ªEdición. 75-119.
- Baskar R., Yeo R.,Yeoh K. (2012) *Cancer and Radiation therapy: Current advances and future directions*. *Int. J. Med.*, 9(3):193-199
- Bauer L. (2008). *Applied Clinical Pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical, 2nd Edition. 3-47.
- Bertrand Nicolas, Leroux Jean-Christophe. (2012) *The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective*. *Journal of Controlled Release* 161: 152–16
- Cheong I., Huang X., Thornton K., Días LA. (2007) Targeting cancer whit bugs and liposomes: ready, aim, fire. *Cancer Research* 67: 9605- 0608
- Corden BJ, Fine RL, Ozols RF, Collins JM. (1985) *Clinical pharmacology of high-dose cisplatin*. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 14: 38-41.
- Coronel O., Serna J. (2007) *Tomografía por emisión de positrones*. *Med Int Mex*, 23(4):293-301

- Daye M, Miller P. (1981) *Renal excretion distributions and metabolism of cisplatin in rats*. *Kidney Int.* 19:198.
- 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.
- Drummond D., Meyer O, Hong K, Kirpotin D, Papahadjopoulos D. (1999). *Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors*. *Pharmacological Reviews*, 51(4):691-743.
- Fernández F., Serrano R. (1985) *Nefrotoxicidad del Cisplatino*. *Nefrología Mex*, 5(1):6-9.
- Florez Jesús. (1997) *Farmacología humana* Ed Masson S.A., España.1019-1021.
- Gately D., Howell S. (1993) *Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review*. *J Cancer* 67, 1171–1176.
- Gomez S., Maksimovi D. (2012) *On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy*. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 14, 10-13.
- Green A., Rose P. *Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer* *international Journal of Nanomedicine*, 1(3) 229–239.
- Hakama M, Louhivuori K. (1988) *A screening programme for cervical cancer that worked*. *Cancer Surv*,7(3):403-416.
- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. (2004) *High interstitial fluid pressure an obstacle in cancer therapy*. *Nat. Rev. Cancer.* 4: 806-813.

- Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK. (1998) *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 4607-46
- Hong R. (2001) *Phase I and pharmacokinetic study of a stable, polyethylene-glycolated liposomal doxorubicin in patients with solid tumors: the relation between pharmacokinetic property and toxicity*. Cancer, 91(9): 1826–1833.
- Huang L. (2008). *Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles*. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4):496-504.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2011) *Estadística a propósito del día mundial del cáncer*. Recuperado el 05/03/14 de <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
- Kelland L. (2007) *Mechanism-related circumvention of cis-diamminedichloro platinum(II) acquired resistance using two pairs of human ovarian carcinoma cell lines by ammine/amine platinum(IV) dicarboxylates*. Cancer Res. 52 3857–3864.
- Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M. (2003) *Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels*. Int. J. Cancer. 105: 561-567.
- Kukowska JF, Candido KA, Cao Z. (2005) *Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer*. Cancer Res. 65: 5317-5324.

- Lee B., Hoang H., Fonge R. (2010) *In vivo distribution of polymeric nanoparticles at the whole-body, tumor, and cellular levels*, Pharm. Res. 27: 2343–2355
- 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, 52:366- 372
- Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. (2009) *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 71: 409-419.
- Markman M., (2013) Chemoradiation in the management of cervix cancer: current status and future directions. Oncology, 84: 246-250.
- Matsumura Y, Maeda H. (1986) *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumor tropic accumulation of proteins and antitumor agent SMANCS*. Cancer Res. 46: 6387–6392.
- Medina LA., Herrera B., García P., Jurado R. (2008) *Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research., 27:57
- Meléndez J., Maldonado V. (1998). *Cisplatino: avances recientes en el estudio de su mecanismo de acción*. Revista del Instituto Nacional de Cancerología, 44(1):28-34.
- Michielsen P., Schepper J. (1972) *Renal diseases due to drug*. Excerpta Med., Amsterdam, 261.

- Moghimi S., Patel H. (1989) *Diferencial properties of organ specific serum opsonins for liver and spleen macrophages*, Biochim. Biophys. 379–384.
- Nakano T., Ishikawa H., Suzuki Y. (2010) *Current Advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer*. J. Radiat. Res., 51:1–8
- National Cancer Institute. (2014) *Aspectos generales de las opciones de tratamiento para el cáncer de cérvix*. Recuperado el 25/04/2013 de <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/cuellouterino/Patient/page4>
- Organización mundial de la salud. (2013) *Datos y cifras a nivel mundial de cáncer*. Recuperado el 02/03/14 de <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- Opanasopit, Y. Higuchi S. Kawakami F. Yamashita M. Nishikawa M. (2001) *Involvement of serum mannan binding proteins and mannose receptors in uptake of mannosylated liposomes by macrophages*, Biochim. Biophys. Acta 1511. 134–145.
- Owens D. (2006) *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*, Int. J. Pharm. 307: 93–102.
- Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. (2009) *Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix*. Int J Gynaecol Obstet.,105(2):107-108
- Pérez B., Vega I., Medina L. (2011) *Volume of interest assessment of oncologic response using ¹⁸F-FDG PET/CT: A phantom study*. J. Nucl. Med. Technol. Vol. 39 (1): 14-18.
- Perry M. (2001) *Hepatotoxicity of chemotherapy*. Oncologist; 6:162.

- Rabikand C., Dolan E. (2007) *Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents*. *Cancer Treat Rev.*, 33(1): 9–23.
- Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen TJ, Deppe G, Maiman M., Clarke-Pearson D. (1999) *Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer*. *N Engl J Med*. 340:1144-1153.
- Sadzuka Y., Hirotsu S. (1998) *Effect of liposomalization on the antitumor activity, side effects and tissue distribution of CPT-11*, *Cancer Lett*. 199–106
- Santos F. (2002) *Ototoxicidad por cisplatino*, *Medicina Universitaria*, 4(17), 230-236.
- Schwaiger M, Weber W. (2002) *Functional imaging: from anatomy to molecular imaging*. *Medica Mundi*, 46(1):2-10
- Soukpo K, Desco C. (2008) *DNA Interaction with Novel Antitumor Estradio-Platinum(II) Hybrid Molecule: A Comparative Study with Cisplatin Drug*. *DNA and cell biology* 27(2): 101-107.
- Staffhorst Rutger, Erkelens Caroline, Hamelers Irene. (2008) *Antitumor activity and biodistribution of cisplatin nanocapsules in nude mice bearing human ovaria carcinoma xenografts*. *Anti-Cancer Drugs*. 19:721–727
- Starha P, Hošek J, Vančo J, Dvořák Z, Suchý P Jr, Popa I, Pražanová G, Trávníček Z. (2014) *Pharmacological and molecular effects of platinum(II) complexes*. *PLoS One* 9:90-94.

- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. (2013) *Estadística de cáncer en México*. Recuperado el 02/03/14 de www.dged.salud.gob.mx/contenidos/
- Szoka F., 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
- Terada M., Maruyama A. Mori S. Bhadra M.T. (1991) *Proteins and peptides bound to long-circulating liposomes*, Biochim. Biophys. Acta 1070. 246–252.
- Tood C., Lippard J. (2009) *Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds*. Metallomics 1; 1(4): 280–291.
- Torchilin V. (2005) *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nature, 4(2): 145-160.
- Toro A. (2010) *Elaboración y caracterización farmacocinética de una formulación liposomal de cisplatino*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
- Union for International Cancer Control (2014) *World Cancer Day*. Recuperado el 9 de enero de 2014, de: <http://www.worldcancerday.org/>
- Wang D, Lippard SJ. (2005) *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. Nat Rev Drug Discov, 4(4):307–20.
- Yuan J, Chao Y, Lee W, Li C. (2008) *Chemotherapy with etoposide, doxorubicin, cisplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin for patients with advanced hepatocellular carcinoma*. Med Oncol. 25:201-6.