

Visualización de liposomas por resonancia magnética: una oportunidad para mejorar las terapias liposomales antitumorales

Visualization of liposomes by magnetic resonance imaging: an opportunity to improve antitumoral liposome therapies

MSc. Darel Martínez Bedoya

Centro de Inmunología Molecular (CIM). La Habana, Cuba.

RESUMEN

La liberación controlada de fármacos en el sitio del tumor y el desarrollo de técnicas no invasivas de monitoreo constituyen 2 de los principales retos que enfrentan las terapias antitumorales en la actualidad. En este trabajo se analizan algunas de las potencialidades del uso de liposomas como vehículos para el transporte de drogas hasta los tumores, especialmente de las variantes direccionadas a antígenos tumorales mediante el acoplamiento de anticuerpos (inmunoliposomas). Estas vesículas pueden a su vez ser utilizadas en combinación con el uso de imágenes de resonancia magnética, una de las técnicas de imagenología más utilizadas y de mayores potencialidades en la visualización a nivel molecular. El uso conjunto de estas 2 tecnologías permite controlar la cantidad de fármaco administrado, así como predecir la eficacia del tratamiento y monitorear la progresión de este.

Palabras clave: resonancia magnética, liposomas, cáncer, inmunoliposomas, agentes de contraste con gadolinio.

ABSTRACT

Controlled release of drugs at the tumor site and the development of non-invasive monitoring techniques are two of the main challenges currently facing antitumoral therapies. The paper analyzes some of the potential uses of liposomes as vehicles for the transport of drugs to the tumors, particularly directionalized variants to

tumor antigens through antibody coupling (immunoliposomes). These vesicles may also be used in combination with magnetic resonance, one of the most widely used imaging techniques, and one exhibiting great visualization potential at molecular level. Joint use of these two techniques makes it possible to control the amount of drug administered, as well as predict the efficacy of the treatment and monitor its progress.

Key words: magnetic resonance, liposomes, cancer, immunoliposomes, gadolinium contrast agents.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento eficaz del cáncer exige que los medicamentos lleguen a las células tumorales en concentraciones citotóxicas. Para lograrlo, la manera más extendida es la administración sistémica de estos fármacos, lo que produce diversos efectos secundarios significativos. La liberación de las drogas puede verse limitada por características del microambiente del tumor, como la perfusión,¹ hipoxia² y la elevación de la presión del líquido intersticial.³ Un segundo reto es la limitación de los métodos actuales de seguimiento de los medicamentos a la toma de muestras de plasma sistémico y/o la biopsia del tejido seleccionado. Para mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer se requiere desarrollar técnicas no invasivas de seguimiento a la par que métodos para superar las limitaciones de la entrega de las drogas al tumor. Los métodos no invasivos de monitoreo farmacológico se pueden dividir en 2 categorías: directos e indirectos. En los primeros, un agente marcado se une a la molécula de interés, mientras en los segundos el agente marcado actúa como un sustituto de la molécula de interés o como un indicador del efecto de esta. Estas 2 categorías se pueden dividir en aplicaciones clínicas y preclínicas, con las principales técnicas ópticas disponibles principalmente para la preclínica.² Las diferentes técnicas utilizadas, como las tomografías computadorizadas y la resonancia magnética (RM), tienen ventajas y desventajas relacionadas con la resolución espacial y temporal, la sensibilidad, el costo, la disponibilidad y la dificultad de producir el agente marcado.⁴ Existen 2 vías para aumentar la cantidad de droga liberada al tumor: modificarlas para incrementar su acumulación o la modificación de la fisiología del tumor para reducir su resistencia a la acumulación del fármaco. Del mismo modo, para direccionalizar la droga al tumor se pueden dirigir los fármacos mediante anticuerpos, aptámeros o péptidos que reconozcan específicamente epítomos sobreexpresados en los tumores. Estas modificaciones, aunque potencialmente eficaces al ser específicas, requieren la sobreexpresión de estos epítomos (para prevenir la toxicidad contra el tejido normal) y además, poseer la capacidad para desarrollar los agentes específicos dirigidos a los blancos. Otra variante se basa en cambiar el tamaño de la droga y/o añadirla a un vehículo que la transporte a fin de que tenga una propensión a acumularse en el sitio del tumor en función del tamaño. Estos vehículos dirigidos vienen en forma de liposomas, nanopartículas y polimerosomas y tienen el efecto de encapsulación y/o internalización de los fármacos terapéuticos. Todos ellos permiten la acumulación en el tumor basados en el aumento de la permeabilidad y el efecto de retención de la microvasculatura tumoral.¹ De estas tecnologías, los liposomas son los más maduros para aplicaciones clínicas.

IMÁGENES POR RESONANCIA MAGNÉTICA (IRM)

La obtención de imágenes moleculares es un área relativamente nueva en el diagnóstico por imagen. Se puede definir como la caracterización y medición *in vivo* de los procesos biológicos al nivel celular y subcelular.⁵ Las IRM se logran mediante una combinación de imágenes y la orientación activa de un agente de contraste a marcadores específicos de una enfermedad. Las IRM son una modalidad de imagen no invasiva de gran alcance, capaz de generar imágenes de alta resolución con excelente contraste de tejidos blandos; la imagen molecular mejora la precisión diagnóstica a través de la visualización de los procesos o componentes que causan la enfermedad.⁶ Las técnicas más utilizadas para el diagnóstico por imagen molecular han sido los métodos nucleares⁷ y la resonancia magnética.⁸ En los últimos tiempos también se han aplicado el ultrasonido⁹ y técnicas ópticas.¹⁰ Cada modalidad tiene sus ventajas y desventajas, sin embargo, entre los enfoques anteriores solo las IRM combinan las ventajas de la alta resolución espacial con la capacidad de extraer información fisiológica y anatómica.⁶

Agentes de contraste en resonancia magnética

Los agentes de contraste se utilizan en las imágenes para aumentar la diferencia de señal entre el área de interés y el fondo. Mediante cambios en la intensidad local de la señal permiten mejorar la de por sí excepcional sensibilidad de contraste de tejidos blandos de la RM.¹¹ Existen 2 clases principales para IRM: complejos paramagnéticos, principalmente quelatos de Mn^{2+} , Mn^{3+} y Gd^{3+} (los más usados), y las partículas de óxido de hierro superparamagnético. Los primeros afectan directamente a los protones del agua en sus cercanías y son altamente dependientes del flujo de agua local. Por el contrario, los agentes superparamagnéticos afectan el campo magnético independientemente de su entorno y por lo tanto, su influencia en términos de contraste se extiende mucho más allá de su entorno inmediato.¹² Sin embargo, estos agentes para RM se ven limitados por su falta de especificidad. La focalización de los mismos a distintas moléculas asociadas con la patología permite hacer un diagnóstico más específico con las IRM y ofrecen la posibilidad de caracterizar la enfermedad a nivel molecular *in vivo*. Los agentes con Gd actualmente en el mercado requieren una concentración en el tejido en el orden de los 10^{-7} mol/g para obtener suficiente contraste en la imagen resultante.¹³ Los biomarcadores moleculares difícilmente expresen cantidades tan altas *in vivo* ya que típicamente los receptores están presentes en concentraciones de 10^{-9} a 10^{-13} mol/g.¹⁴ Se necesita una estrategia de amplificación para superar estos problemas de sensibilidad. Una solución es el uso de nanopartículas que posean una gran capacidad de carga de los agentes de contraste, aumentando así la intensidad de la señal detectada.¹⁵

Uso de técnicas con IRM para localizar, visualizar y caracterizar los tumores

Las imágenes anatómicas de RM ayudan a definir las fronteras de los tumores sólidos, con una excelente resolución y contraste, por lo que permiten distinguir y clasificar los tejidos saludables de los enfermos.¹⁶ También, la espectroscopia por RM se puede utilizar para evaluar el pH y la actividad metabólica del tumor.¹⁷ Los

avances recientes en imágenes de difusión ponderada de todo el cuerpo resultan prometedores para el diagnóstico de lesiones a lo largo de todo el cuerpo, así como para la evaluación de metástasis de ganglios linfáticos, con una resolución espacial superior y una sensibilidad y especificidad que rivalizan con imágenes de tomografía de emisión de positrones.¹⁸ Además, los parámetros hemodinámicos, tales como el volumen de sangre fraccionada, la permeabilidad vascular, la perfusión sanguínea del tumor y el drenaje linfático, pueden ser evaluados utilizando IRM de contraste mejorado.¹⁹ Los avances recientes en imageología molecular -el campo que tiene como objetivo visualizar los procesos de forma no invasiva en el nivel molecular y celular- han ampliado el uso de las IRM en oncología.¹⁹ Los sofisticados agentes de contraste que han sido desarrollados, equipados con ligandos dirigidos a marcadores específicos de la angiogénesis, permiten la visualización no invasiva *in vivo* de la actividad angiogénica en el tumor. Una variedad de agentes de contraste unidos a Gd, óxido de hierro o F han sido desarrollados para este propósito, los cuales comprenden desde agentes de bajo peso molecular hasta nanopartículas de diferente tamaño y composición.²⁰

LIPOSOMAS

Características y métodos de obtención

Los liposomas se definen como estructuras esféricas, autoensambladas, formadas por una o más bicapas lipídicas concéntricas que contienen una fase acuosa en el interior y entre las bicapas.²¹ Poseen tamaños entre 50 y 400 nm que se pueden seleccionar durante su producción, y en general son recubiertos con polietilenglicol, para limitar su acumulación en el sistema retículo endotelial y extender su tiempo de circulación.²² Se subdividen en vesículas multilamelares (que constan de varias bicapas concéntricas), grandes vesículas unilamelares y pequeñas vesículas unilaminares de diámetro menor de 150 nm. En las últimas décadas, los liposomas se estudiaron ampliamente como portadores de fármacos para el tratamiento del cáncer.²³ El centro acuoso es adecuado para transportar fármacos solubles en agua, mientras que las capas unilamelares y multilaminares son propicias para las drogas no solubles en agua. La posibilidad de seleccionar su tamaño y el diseño de la capa lipídica para ser sensibles al entorno fisiológico del tumor (como temperatura y pH) los hace un atractivo vehículo de entrega de drogas. Los liposomas con un tamaño menor a 400 nm se acumulan naturalmente en los tumores,²⁴ aunque esta propiedad puede ser mejorada.²⁵ Luego de la acumulación pasiva en los sitios de interés, se logra desestabilizar la membrana y liberar el contenido del liposoma mediante el uso de lípidos sensibles al medio ácido del tumor²⁶ o a temperaturas elevadas.²⁷⁻²⁹ Los liposomas termosensibles constituyen una tecnología más madura, con una liberación rápida mejorada y una aplicabilidad directa en el tratamiento de tumores. Al exponerse al calor la mezcla homogénea de lípidos de membrana se torna heterogénea, en los límites entre las diferentes fases lipídicas la membrana resulta permeable y ocurre salida de la droga siguiendo su gradiente de concentración.²⁷

Farmacocinética de los liposomas

La farmacocinética de los liposomas depende de sus características físico-químicas, tales como la carga de la superficie, el tamaño, el empaque de los lípidos de membrana, la estabilización estérica, la dosis y la vía de administración.³⁰ En general, los grandes liposomas son eliminados de la circulación de la sangre más rápidamente que los más pequeños.³¹ La unión de opsoninas a los liposomas depende del tamaño de los liposomas y, en consecuencia, la absorción de los liposomas por el retículo endotelial en el hígado es dependiente del tamaño.³² Los fosfolípidos utilizados afectan al tiempo de vida en la circulación de los liposomas mediante la alteración de la fluidez de la membrana, lo que es muy probablemente causado por aumento de la unión de proteínas a los dominios hidrofóbicos expuestos por defectos de empaquetamiento de la fase gel de las membranas.³³

Focalización de los liposomas a células o tejidos

El uso de liposomas dirigidos se sugirió para aumentar la acumulación de los liposomas en los tejidos deseados. Esto implica la unión de ligandos a los liposomas que conduzcan a la unión específica a las células diana que se desea.

Inmunoliposomas

El término inmunoliposomas fue acuñado para describir un liposoma conjugado con un anticuerpo o partes de un anticuerpo.³⁴ Los inmunoliposomas parecen tener potencial inmunogénico, lo que se ha atribuido a la región constante de la inmunoglobulina.³⁵ El uso de anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados o fragmentos de anticuerpos puede reducir o minimizar la respuesta inmunológica del anfitrión contra el anticuerpo o fragmento terapéutico.³⁶ Distintos tipos de uniones pueden ser utilizadas para fijar anticuerpos, ya sea moléculas enteras o fragmentos, a los liposomas para crear inmunoliposomas. Los anticuerpos pueden unirse con los lípidos, tales como fosfatidiletanolamina, ya sea antes o después de la formación de los liposomas en función de la estrategia utilizada en concreto. Las uniones formadas se dividen en 2 categorías principales: no-covalentes y covalentes.³⁷

Agentes de contraste de IRM usados en liposomas. El gadolinio

En el desarrollo de agentes de contraste dirigidos para RM de imagen molecular, los iones paramagnéticos o superparamagnéticos tienen que ser dirigidos en cantidades suficientes al blanco deseado en tejidos específicos. Existen 3 métodos principales que han sido explorados:

1. Gd encapsulado en el espacio acuoso del liposoma: inicialmente, las propiedades de contraste de las IRM se introdujeron en liposomas encerrando agentes de contraste de bajo peso molecular basados en Gd y Mn en el interior acuoso.²⁹ Los agentes paramagnéticos como MnCl₂, Gd-DTPA, Mn-DTPA y los agentes de contraste macromoleculares como Mn²⁺ unidos a proteínas plasmáticas pueden ser encapsulados en liposomas.³⁸ Los resultados han sido mayormente infructuosos debido a la pobre eficiencia de encapsulación, escasa estabilidad, toxicidad y pobre

relajación. Los agentes de contraste de este tipo se han utilizado con éxito para mejorar la detección de tumores en el hígado de las ratas con metástasis hepáticas.³⁹

2. Gd incorporado en la bicapa lipídica: un enfoque alternativo lo constituye incluir a las entidades de Gd en la bicapa liposomal. El Gd-DTPA puede estar vinculado con 2 cadenas de ácidos grasos para formar una molécula anfifílica que puede ser incorporada en la bicapa lipídica de los liposomas, con lo que el Gd pasa a ser una parte integral de la superficie del liposoma.⁴⁰ Liposomas que incorporan Gd también presentan menos riesgo de fuga de metales potencialmente tóxicos en el cuerpo.²³ En ratones se detectó la utilización eficaz de lesiones neointimales mediante la incorporación de liposomas con Gd en la bicapa lipídica.⁴¹

3. Gd transportado en el exterior de los liposomas a través de polímeros anfifílicospolimerizables (PPA): estas moléculas son capaces de enlazar múltiples iones de gadolinio y pueden ser incorporadas en la estructura del liposoma mediante la unión a una molécula anfifílica, tal como la N-glutaril-fosfatidiletanolamina. En contraste con las moléculas anfifílicas que contienen Gd que se describe en la sección anterior, los PPA llevan Gd en el exterior de los liposomas. Los PPA consisten en una cadena principal hidrofílica con varios grupos laterales quelantes capaces de unir muchos átomos de Gd y un grupo terminal hidrofóbico que ancla la molécula a la membrana del liposoma.²³ Un ejemplo interesante de la aplicación de nanopartículas de PPA *in vivo* es la IRM de los componentes del sistema linfático con nanotransportadores cargados con Gd (investigación de metástasis en los ganglios linfáticos). Varios investigadores han estudiado los liposomas y micelas como vesículas de entrega al sistema linfático, con este método también se han direccionalizado con éxito hacia los tumores. Inmunoliposomas que contienen Gd-PPA, que llevan el anticuerpo monoclonal 2C5, entregan *in vitro* una cantidad elevada de Gd a la superficie de diversas células de cáncer en comparación con liposomas sin el anticuerpo o liposomas modificados con anticuerpos no específicos.⁴² En un estudio separado, utilizando modelos de cáncer de ratón, estos inmunoliposomas permiten obtener *in vivo* imágenes de tumores de forma rápida y específica.⁴³

Obstáculos para el uso de inmunoliposomas para IRM en tumores

Los inmunoliposomas constituyen un campo prometedor en la entrega de fármacos y material de contraste a los tumores. Sin embargo, los principales retos por delante antes de que esta promesa se pueda transformar en mejores resultados clínicos incluyen la sensibilidad y la especificidad de destino. La primera puede ser mejorada mediante la maximización de la carga útil de Gd, mientras la segunda puede ser alcanzada a través de la identificación de los antígenos y receptores blancos apropiados y el posterior desarrollo de moléculas dirigidas contra los mismos, como anticuerpos. En 2002 Park indicó que inmunoliposomas anti-p185HER2 cargados con doxorubicina (Dx) son marcadamente citotóxicos, específicamente contra las células tumorales que sobreexpresan p185HER2 *in vitro*, lo que mostró que son un vehículo terapéutico prometedor para el tratamiento de tumores humanos.⁴⁴ Un liposoma pegilado con Dx encapsulada y unido a un fragmento de anticuerpo monoclonal llamado GAH, mostró una actividad citotóxica superior contra varias células humanas de cáncer de estómago en comparación con la Dx o liposomas pegilados con Dx incorporada, unidos a cualquier fragmento de anticuerpo no específico.⁴⁵ La inmunogenicidad de los inmunoliposomas es un problema, ya que aumenta su eliminación de la circulación. Los inmunoliposomas preparados con las moléculas de IgG completa se han mostrado propensos a una

mayor tasa de aclaramiento comparados con los liposomas no direccionalizados o a aquellos que utilizan fragmentos de anticuerpos tales como Fab o scFvs.³³ Además, los anticuerpos humanos o humanizados son preferibles respecto a las secuencias de proteínas xenogénicas que pueden resultar inmunogénicas en humanos. Alcanzar el tamaño óptimo de los liposomas representa otro reto. Pequeños liposomas tienen un mayor tiempo de vida en la circulación y un mayor tiempo de acceso a los tumores. Sin embargo, por debajo de un cierto tamaño, se sugiere que sea de 80 nm, cualquier ventaja se pierde puesto que los liposomas de tamaño diminuto se eliminan más rápidamente del tumor. Tamaños de liposomas entre 100 y 120 nm parecen ser óptimos para la acumulación en los tumores sólidos.³³

Las IRM como técnica de visualización no invasiva de liposomas

Aunque la distribución liposomal se ha logrado seguir con el marcaje de los liposomas con Tc-99m,⁴⁶ la naturaleza física de los liposomas los hace atractivos para su uso en RM. Debido a su capacidad de encapsular contenido acuoso, se les puede fácilmente añadir un agente de contraste de IRM.^{29,47} Esta combinación tiene una ventaja sobre las técnicas de imagen anterior, debido a que la membrana lipídica es relativamente impermeable al agua a temperaturas normotérmicas. A medida que el liposoma entra en una región donde la hipertermia se aplica, su membrana se vuelve permeable, liberando Gd y permitiendo la entrada de agua, lo que proporciona el contraste adecuado de la imagen.²⁹ Frich utilizó la ablación con láser de un tumor con liposomas sensibles al calor previamente tratados que contenían Gd-DTPA.⁴⁷ Ellos fueron capaces de correlacionar el radio de mejora de la imagen con el radio del tejido extirpado. En consecuencia, el uso de liposomas visualizables en conjunto con la ablación fue capaz de dar respuesta no invasiva en tiempo real sobre el progreso de la ablación.

Visualización y cuantificación de la liberación del contenido liposomal

La combinación de un liposoma termosensible con Mn²⁺ y un agente de quimioterapia -Dx- ha demostrado que es posible visualizar tanto liposomas intactos como la liberación de su contenido en dependencia de la temperatura, utilizando Mn²⁺ como agente de contraste de IRM.²⁸ Los trabajos posteriores en animales demostraron que también se podía visualizar la acumulación incrementada a causa de la hipertermia con liposomas no sensibles a la temperatura, así como la liberación inducida por la hipertermia con liposomas sensibles al calor.²⁸ Utilizando la función de la temperatura de relajación de los liposomas, el conocimiento de la distribución de la temperatura dentro del tumor, y el índice de carga de la Dx dentro del liposoma, se pudo realizar una medición de la concentración de la Dx píxel por píxel.⁴⁸ Estas mediciones de IRM se compararon con la autofluorescencia de la Dx en cortes histológicos tomados al final del experimento y en muestras de tejido de una cohorte experimental independiente, usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las mediciones directas se corrigieron a las de las IRM y se demostró que existe una relación lineal entre la concentración de Dx medida usando IRM y fluorescencia o HPLC.⁴⁸

Las IRM como herramienta para mejorar las terapias basadas en liposomas

La extensión lógica de cuantificar la administración de fármacos por la tecnología liposomal, es el monitoreo de la entrega selectiva del contenido liposomal, por la variación en la secuencia de la aplicación de la hipertermia y la administración de los liposomas, factores que influyen en la distribución de los contenidos de los liposomas. *Viglianti* calentó el tumor a un estado de equilibrio antes de la administración de liposomas; esto fue repetido por *Ponce* y se demostró una distribución periférica de la Dx como resultado de la liberación del contenido una vez que los liposomas entraron en el tumor caliente.^{28,48,49} En estudios adicionales, los liposomas se inyectaron antes de calentar de manera que la acumulación se produjo en el centro del tumor cuando la sonda comenzó a calentarse. En una cohorte adicional de eficacia, la dosis de infusión de liposomas se dividió, con el 50 % administrada antes de calentar y el 5 % administrada cuando el tumor alcanza un estado estable, lo que produjo una distribución uniforme de la Dx.⁴⁹ Este trabajo mostró que la distribución periférica tuvo la mejor eficacia, a pesar de que se lograron niveles equivalentes de Dx en el tumor.⁴⁹ Este aumento de la eficacia se atribuye a la direccionalización a la neovasculatura del tumor, donde su eliminación conlleva a la muerte por hambre de las partes internas del tumor.⁴⁹ Esta fue la primera demostración de que la distribución espacial de fármacos afecta su eficacia y de que la RM puede usarse para predecir el resultado.

Las futuras aplicaciones de las terapias dirigidas

Una de las aplicaciones más prometedoras de las terapias dirigidas es la combinación con las terapias de intervención. En la actualidad, la ablación por radiofrecuencia ha dado resultados efectivos en el tratamiento de los tumores, pero sin margen de mejora. El centro del volumen de tratamiento (que incluye el tumor) alcanza temperaturas que matan a las células directamente.⁵⁰ Sin embargo, a medida que la distancia aumenta radialmente desde la sonda de radiofrecuencia, la temperatura disminuye. Es en esta región, donde las células permanecen viables, incluso a pesar de la intención clínica de inducir la muerte celular con el tratamiento aplicado. *Ahmed* y otros, han utilizado la combinación de la ablación por radiofrecuencia y la quimioterapia en los modelos preclínicos, que demuestran que la adición de la quimioterapia ayuda a la eficacia del tratamiento,⁵⁰ concretamente, el tratamiento de esta región no ablacionada, ya que la adición de la quimioterapia causa una región más grande de necrosis por coagulación de lo que se logra con calor solamente.⁵⁰ El uso de liposomas como vehículo de entrega de medicamentos que contienen no solo un fármaco terapéutico, sino también un medio de contraste, nos permite controlar el progreso del tratamiento de ablación por radiofrecuencia, medir la cantidad de fármaco administrado a la zona tratada y potencialmente predecir cuán eficaz será el tratamiento mediante la direccionalización de la droga a las regiones que se beneficiarían por la variación de la ubicación de la hipertermia.^{28,47-49}

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(5):335-44.

2. Sorg BS, Moeller BJ, Donovan O, Cao Y, Dewhirst MW. Hyperspectral imaging of hemoglobin saturation in tumor microvasculature and tumor hypoxia development. *J Biomed Opt.* 2005; 10(4):44004.
3. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell.* 2007; 11(1):83-95.
4. Webb A. Introduction to biomedical imaging. NJ: Hoboken; 2003.
5. Allport JR, Weissleder R. In vivo imaging of gene and cell therapies. *Exp Hematol.* 2001; 29(11):1237-46.
6. Lanza GM, Lamerichs R, Caruthers S, Wickline SA. Molecular imaging in MR with targeted paramagnetic nanoparticles. *Medicamundi.* 2003; 47(1):10-6.
7. Phelps ME. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med.* 2000; 41(4):661-81.
8. Weissleder R, Simonova M, Bogdanova A, Bredow S, Enochs WS, Bogdanov A, Jr. MR imaging and scintigraphy of gene expression through melanin induction. *Radiology.* 1997; 204(2):425-9.
9. Liang HD, Blomley MJK. The role of ultrasound in molecular imaging. *Br J Radiol.* 2003; 76(S2):140-50.
10. Baeten J, Haller J, Shih H, Ntziachristos V. In vivo investigation of breast cancer progression by use of an internal control. *Neoplasia.* 2009; 11(3):220-7.
11. Sipkins DA, Gijbels K, Tropper FD, Bednarski M, Li KC, Steinman L. ICAM-1 expression in autoimmune encephalitis visualized using magnetic resonance imaging. *J Neuroimmunol.* 2000; 104(1):1-9.
12. Lanza GM, Winter PM, Caruthers SD, Morawski AM, Schmieder AH, Crowder KC, et al. Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles. *J Nucl Cardiol.* 2004; 11(6):733-43.
13. Gupta H, Weissleder R. Targeted contrast agents in MR imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 1996; 4(1):171-84.
14. Strijkers GJ, Hak S, Kok MB, Springer CS, Jr., Nicolay K. Three-compartment T1 relaxation model for intracellular paramagnetic contrast agents. *Magn Reson Med.* 2009; 61(5):1049-58.
15. Glogard C, Stensrud G, Hovland R, Fossheim SL, Klaveness J. Liposomes as carriers of amphiphilic gadolinium chelates: the effect of membrane composition on incorporation efficacy and in vitro relaxivity. *Int J Pharm.* 2002; 233(1-2):131-40.
16. De Schepper AM, Bloem JL. Soft tissue tumors: grading, staging, and tissue-specific diagnosis. *Top Magn Reson Imaging.* 2007; 18(6):431-44.
17. He Q, Xu RZ, Shkarin P, Pizzorno G, Lee-French CH, Rothman DL, et al. Magnetic resonance spectroscopic imaging of tumor metabolic markers for cancer

diagnosis, metabolic phenotyping, and characterization of tumor microenvironment. *Dis Markers*. 2003;19(2-3):69-94.

18. Kwee TC, Takahara T, Ochiai R, Nievelstein RA, Luijten PR. Diffusion-weighted whole-body imaging with background body signal suppression (DWIBS): features and potential applications in oncology. *Eur Radiol*. 2008;18(9):1937-52.

19. Kiessling F, Morgenstern B, Zhang C. Contrast agents and applications to assess tumor angiogenesis in vivo by magnetic resonance imaging. *Curr Med Chem*. 2007;14(1):77-91.

20. Kiessling F, Huppert J, Zhang C, Jayapaul J, Zwick S, Woenne EC, et al. RGD-labeled USPIO inhibits adhesion and endocytotic activity of alpha v beta3-integrin-expressing glioma cells and only accumulates in the vascular tumor compartment. *Radiology*. 2009;253(2):462-9.

21. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):145-60.

22. Huang SK, Stauffer PR, Hong K, Guo JW, Phillips TL, Huang A, et al. Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res*. 1994;54(8):2186-91.

23. Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J*. 2007;9(2):E128-47.

24. Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer Res*. 2000;60(16):4440-5.

25. Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Res*. 2001;61(7):3027-32.

26. Lokling KE, Skurtveit R, Bjornerud A, Fossheim SL. Novel pH-sensitive paramagnetic liposomes with improved MR properties. *Magn Reson Med*. 2004;51(4):688-96.

27. Needham D, Anyarambhatla G, Kong G, Dewhirst MW. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res*. 2000;60(5):1197-201.

28. Viglianti BL, Abraham SA, Michelich CR, Yarmolenko PS, MacFall JR, Bally MB, et al. In vivo monitoring of tissue pharmacokinetics of liposome/drug using MRI: illustration of targeted delivery. *Magn Reson Med*. 2004;51(6):1153-62.

29. Fossheim SL, Il'yasov KA, Hennig J, Bjornerud A. Thermosensitive paramagnetic liposomes for temperature control during MR imaging-guided hyperthermia: in vitro feasibility studies. *Acad Radiol*. 2000;7(12):1107-15.

30. Barenholz Y. Relevancy of drug loading to liposomal formulation therapeutic efficacy. *J Liposome Res*. 2003;13(1):1-8.

31. Senior J, Gregoriadis G. Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Lett*. 1982;145(1):109-14.

32. Harashima H, Sakata K, Funato K, Kiwada H. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm Res.* 1994;11(3):402-6.
33. Drummond DC, Noble CO, Hayes ME, Park JW, Kirpotin DB. Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development. *J Pharm Sci.* 2008;97(11):4696-740.
34. Siwak DR, Tari AM, Lopez-Berestein G. The potential of drug-carrying immunoliposomes as anticancer agents. Commentary re: J. W. Park et al., Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy due to targeted delivery. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1172-81. *Clin Cancer Res.* 2002;8(4):955-6.
35. Harding JA, Engbers CM, Newman MS, Goldstein NI, Zalipsky S. Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1327(2):181-92.
36. Winter G, Harris WJ. Humanized antibodies. *Immunol Today.* 1993;14(6):243-6.
37. Pan H, Han L, Chen W, Yao M, Lu W. Targeting to tumor necrotic regions with biotinylated antibody and streptavidin modified liposomes. *J Control Release.* 2008;125(3):228-35.
38. Navon G, Panigel R, Valensin G. Liposomes containing paramagnetic macromolecules as MRI contrast agents. *Magn Reson Med.* 1986;3(6):876-80.
39. Unger EC, Winokur T, MacDougall P, Rosenblum J, Clair M, Gatenby R, et al. Hepatic metastases: liposomal Gd-DTPA-enhanced MR imaging. *Radiology.* 1989;171(1):81-5.
40. Kamaly N, Kalber T, Ahmad A, Oliver MH, So PW, Herlihy AH, et al. Bimodal paramagnetic and fluorescent liposomes for cellular and tumor magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem.* 2008;19(1):118-29.
41. Mulder WJ, Douma K, Koning GA, van Zandvoort MA, Lutgens E, Daemen MJ, et al. Liposome-enhanced MRI of neointimal lesions in the ApoE-KO mouse. *Magn Reson Med.* 2006;55(5):1170-4.
42. Erdogan S, Roby A, Sawant R, Hurley J, Torchilin VP. Gadolinium-loaded polychelating polymer-containing cancer cell-specific immunoliposomes. *J Liposome Res.* 2006;16(1):45-55.
43. Erdogan S, Medarova ZO, Roby A, Moore A, Torchilin VP. Enhanced tumor MR imaging with gadolinium-loaded polychelating polymer-containing tumor-targeted liposomes. *J Magn Reson Imaging.* 2008;27(3):574-80.
44. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, et al. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res.* 2002;8(4):1172-81.
45. Matsumura Y, Gotoh M, Muro K, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, et al. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(3):517-25.

46. Matteucci ML, Anyarambhatla G, Rosner G, Azuma C, Fisher PE, Dewhirst MW, et al. Hyperthermia increases accumulation of technetium-99m-labeled liposomes in feline sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2000;6(9):3748-55.
47. Frich L, Bjornerud A, Fossheim S, Tillung T, Gladhaug I. Experimental application of thermosensitive paramagnetic liposomes for monitoring magnetic resonance imaging guided thermal ablation. *Magn Reson Med.* 2004;52(6):1302-9.
48. Viglianti BL, Ponce AM, Michelich CR, Yu D, Abraham SA, Sanders L, et al. Chemodosimetry of in vivo tumor liposomal drug concentration using MRI. *Magn Reson Med.* 2006;56(5):1011-8.
49. Ponce AM, Viglianti BL, Yu D, Yarmolenko PS, Michelich CR, Woo J, et al. Magnetic resonance imaging of temperature-sensitive liposome release: drug dose painting and antitumor effects. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(1):53-63.
50. Ahmed M, Goldberg SN. Combination radiofrequency thermal ablation and adjuvant IV liposomal doxorubicin increases tissue coagulation and intratumoural drug accumulation. *Int J Hyperthermia.* 2004;20(7):781-802.

Recibido: 15 de septiembre del 2012.

Aprobado: 12 de octubre del 2012.

MSc. *Darel Martínez Bedoya*. Centro de Inmunología Molecular (CIM). La Habana, Cuba. Calle 216 y Ave. 15, Siboney, Playa. La Habana, Cuba. Teléf. 214-3162