



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

**"PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS  
DE ALTA DENSIDAD COMO TRANSPORTADORES DE  
RODAMINA PARA TERAPIA FOTODINÁMICA"**

**TESIS**

**PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**Presenta**

**Adriana Plata Becerril**

**Dirigida por:**

**Dr. Enrique Morales Ávila**

**Dra. Liliana Aranda Lara**



**Toluca de Lerdo, Estado de México, 2019**

EL PRESENTE PROYECTO SE  
FINANCIÓ CON RECURSOS DEL  
PROYECTO **PRODEP 2018 511-6/18-  
8981** OTORGADA EN EL PERIODO  
2018-2019A POR LA SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA (**SEP**).

*Lo irreal es más poderoso que lo real. Porque nada es tan perfecto como uno lo imagina. Porque solamente duran las ideas intangibles, los conceptos, las creencias y las fantasías. La piedra se resquebraja. La madera se pudre. La gente, en fin, se muere. Pero las cosas tan frágiles como un pensamiento, un sueño, una leyenda pueden continuar para siempre.*

*- Chuck Palahniuk.*

*A mis padres, por cuidar de la pequeña semilla que un día fui, que con amor y dedicación me brindaron las condiciones necesarias para germinar y cuyos valores mantuvieron mis raíces en la tierra y me permitieron crecer firmemente.*

*A mis profesores, que durante años me nutrieron con sus conocimientos y lograron que esta delgada y frágil rama se convirtiera en un tronco grueso y resistente.*

*A mis grandes amigos por darme un rayito de luz en tiempos de oscuridad y que con su apoyo incondicional no permitieron que mis ramas se doblegaran.*

*Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en mí; hoy este árbol florece con la culminación de mis estudios profesionales, siembra un buen y nutrido conocimiento. Esto, es solo el inicio de un largo camino que me queda por recorrer, pero al que podré enfrentarme con valentía.*

### **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Enrique Morales Ávila y a la Dra. Liliana Aranda Lara por la dirección de la presente tesis, por su exigencia, dedicación, crítica y paciencia.

Agradezco a la Dra. Keila Issac Olive por mostrar siempre una buena disposición para ayudarme, por sus consejos y por su apoyo en la realización de experimentos.

Agradezco a todo el equipo del Laboratorio Nacional y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), especialmente a la Dra. Guillermina Ferro Flores por permitirme usar las instalaciones y a la Dra. Blanca E. Ocampo por su apoyo en la utilización de equipos.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Camacho López por el préstamo de las instalaciones del Laboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopia Laser de Pulsos Ultracortos, en la Facultad de Medicina de la UAEMex.

Gracias a la Secretaría de Educación Pública (SEP), por la beca derivada del proyecto Proyecto PRODEP 2018 511-6/18-8981 otorgada de en el periodo 2018-2019.

Y finalmente, agradezco a los revisores de esta tesis por sus constructivos comentarios y a quien se toma el tiempo de leer mi proyecto de tesis, por permitir a mis experiencias, investigaciones y conocimiento, incurrir dentro de su repertorio de información.

## Contenido

1	Abreviaciones .....	9
2	Índice de Figuras.....	11
3	Resumen .....	13
4	Marco teórico.....	15
4.1	Cáncer .....	15
4.2	Nanotecnología.....	15
4.2.1	Aplicaciones de la nanotecnología en la medicina.....	15
4.2.2	Mecanismos de distribución y transporte de nanopartículas.....	16
4.2.3	Uso de nanopartículas como sistema de administración de fármacos para el tratamiento de cáncer .....	19
4.2.4	Nanosistemas de transporte y liberación de fármacos para el tratamiento de cáncer	20
4.3	Nanopartículas lipídicas como transportadores de fármacos .....	23
4.3.1	Lipoproteínas como transportadores de fármacos .....	24
4.4	HDL .....	25
4.4.1	Metabolismo de HDL .....	27
4.4.2	HDL reconstituido como vehículo para la administración de fármacos.....	27
4.5	Terapia fotodinámica .....	29
4.5.1	Fotosensibilizadores en terapia fotodinámica .....	34
4.5.2	Fotosensibilizadores acoplados a nanopartículas .....	37
4.5.3	Rodaminas como fotosensibilizadores.....	39
5	Justificación.....	41
6	Hipótesis.....	43
7	Objetivos .....	44
7.1.	General .....	44
7.2.	Específicos .....	44

---

8	Materiales y métodos .....	45
8.1	Reactivos y preparación de soluciones .....	45
8.2	Instrumentación .....	46
8.3	Material biológico.....	47
9	Metodología.....	48
9.1	Diagrama general del procedimiento .....	48
9.2	Caracterización fisicoquímica de Rodaminas .....	49
9.2.1	Determinación del Coeficiente de partición $P_{o/w}$ de las rodaminas.....	49
	<i>Estimación Teórica del Coeficiente de partición Octanol/ Agua</i> .....	49
9.2.2	Espectrofotometría UV-Vis.....	51
9.2.3	Espectrometría de fluorescencia.....	51
9.3	Determinación de la variabilidad de la señal de fluorescencia .....	52
9.3.1	Determinación por fluorescencia de la estabilidad del ácido fólico a la irradiación con 532 nm y de la no ocurrencia de reacciones entre las rodaminas y el ácido fólico en ausencia de luz. ....	52
9.3.2	Determinación de la ocurrencia de reacciones de trasferencias en la Rodamina 6G, Rodamina 123 y Rodamina B por fluorescencia utilizando ácido fólico como sustrato. 53	
9.4	Preparación de rHDL .....	53
9.5	Caracterización fisicoquímica de rHDL .....	55
9.5.1	UV-Vis .....	55
9.5.2	Dispersión de Luz Dinámica (DLS) .....	55
9.5.3	Espectrometría Infrarroja .....	56
9.6	Caracterización biológica de rHDL .....	56
9.6.1	Evaluación de la captación celular de rHDL-rodaminas y rodaminas por microscopía de fluorescencia .....	56

---

10	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
10.1	Caracterización fisicoquímica de las rodaminas .....	58
10.1.1	Coeficiente de partición de las rodaminas .....	58
10.1.2	Espectrometría UV-Vis de las rodaminas.....	60
10.1.3	Espectros de excitación y emisión de las rodaminas.....	61
10.1.4	Determinación de la variabilidad de la señal de fluorescencia .....	63
10.1.5	Determinación por fluorescencia de la estabilidad del ácido fólico a la irradiación con 532 nm y de la no ocurrencia de reacciones entre las rodaminas y el ácido fólico en ausencia de luz.....	64
10.1.6	Determinación de la ocurrencia de reacciones de trasferencias en la Rodamina 6G, Rodamina 123 y Rodamina B por fluorescencia utilizando ácido fólico como sustrato. 65	
10.2	Preparación de rHDL.....	73
10.3	Caracterización fisicoquímica de rHDL .....	75
10.3.1	UV-vis.....	75
10.3.2	Tamaño de partícula (DLS).....	79
10.3.3	Espectroscopía Infrarroja FT-IR.....	81
10.4	Caracterización biológica.....	83
10.4.1	Microscopía de fluorescencia.....	83
11	Conclusiones.....	90
12	Referencias .....	105

## 1 Abreviaciones

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**Apo:** Apolipoproteína.

**CD:** Ciclodextrinas.

**CETP:** Proteína Transportadora de Ésteres de Colesterol.

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol.

**DDW:** Ing. Agua empobrecida en deuterio.

**DLS:** Dispersión dinámica de luz.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**EPR:** Ing. Efecto de permeabilidad y retención aumentada.

**EYPC:** Ing. Fosfatidilcolina de yema de huevo.

**FC:** Ing. Colesterol libre.

**HDL:** Ing. Lipoproteínas de alta densidad.

**IR:** Infrarrojo.

**LCAT:** Lecitin Colesterol Acil Transferasa

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.

**LED:** Ing. Diodo emisor de luz.

**Log P<sub>o/w</sub>:** Coeficiente de reparto octanol/ agua.

**NP:** Nanopartícula.

**NPs:** Nanopartículas.

**PBS:** Ing. Buffer fosfato salino.

**PDT:** Ing. Terapia fotodinámica.

**PS:** Ing. Fotosensibilizador.

**PSs:** Fotosensibilizadores.

**QSRP:** Relación cuantitativa estructura- actividad.

**RES:** Sistema Reticuloendotelial.

**rHDL:** Ing. Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas.

**rHDL-Rod123:** Lipoproteínas de alta densidad cargadas con rodamina 123.

**rHDL-Rod6G:** Lipoproteínas de alta densidad cargadas con rodamina 6G.

**rHDL-RodB:** Lipoproteínas de alta densidad cargadas con rodamina B.

**Rod 123:** Rodamina 12.

**Rod 6G:** Rodamina 6G.

**Rod B:** Rodamina B.

**ROS:** Ing. Especies Reactivas de Oxígeno.

**SR-BI:** Receptor de Scavenger clase B tipo 1.

**Tc:** Temperatura de transición.

**UV- Vis:** Ultravioleta visible.

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.

## 2 Índice de Figuras

Figura 1 Lipoproteínas como transportadores de fármacos. ....	24
Figura 2 Estructura cuaternaria de apo A-I por difracción de rayos X. ....	26
Figura 3 Proyección de la rueda helicoidal de la hélice $\alpha$ de la apo A-1 .....	26
Figura 4 Diagrama de Jablonsky modificado para explicar los tipos de reacción producidos por PS después de la irradiación con luz a una longitud de onda específica. ....	30
Figura 5 Diagrama de orbitales moleculares de los estados de triplete y singlete del oxígeno. ....	31
Figura 6 Especies reactivas de oxígeno (ROS): .....	32
Figura 7 Dependencia de la longitud de onda y porcentaje de la transmisión de luz en la piel.....	34
Figura 8 Estructura molecular de la porfirina.....	35
Figura 9 Estructuras moleculares de algunos fotosensibilizadores no porfirínicos de segunda generación. ....	36
Figura 10 Estructuras moleculares de los reactivos utilizados. ....	46
Figura 11 Dispositivo para la preparación de rHDL.....	54
Figura 12 Diálisis de rHDL-Rodaminas .....	55
Figura 13 Espectros de absorción UV- Vis de las rodaminas 123, 6G y B .....	60
Figura 14 Espectros normalizados de excitación de: Rod 6G, Rod 123, Rod B y AF. ....	61
Figura 15 Espectros normalizados de emisión de Rodamina 6G, Rodamina 123, Rodamina B y Ácido fólico.....	62
Figura 16 Espectros de emisión de ácido fólico .....	64
Figura 17 Espectros de fluorescencia obtenidos después de la irradiación con 532 nm a diferentes tiempos de de WSI-6G.....	66
Figura 18 Espectros de fluorescencia obtenidos después de la irradiación con 532 nm a diferentes tiempos de de WSI-123.....	68
Figura 19 Espectros de fluorescencia obtenidos después de la irradiación con 532 nm a diferentes tiempos de de WSI-B.....	70
Figura 20 Intensidad de fluorescencia normalizada a 450 nm vs tiempo de irradiación a 532 nm del ácido fólico, utilizando rodaminas como fotosensibilizadores. ....	72
Figura 21 rHDL-Rod 6G .....	73
Figura 22 Espectro de UV-Vis de rHDL vacías. ....	75
Figura 23 Espectro de absorción de rHDL-Rod6G. ....	76
Figura 24 Espectro de absorción de rHDL-Rod B.....	77
Figura 25 Espectro de absorción de rHDL-Rod123. ....	78
Figura 26 Distribución de tamaño de partícula por DLS de rHDL preparadas por el método 2. ....	79
Figura 27 Distribución del tamaño de partícula por DLS de rHDL preparadas por el método 2. ....	80
Figura 28 Espectro IR de rHDL.....	81
Figura 29 Células T-47D tratadas con Rod 123. ....	83
Figura 30 Células T47-D tratadas con rHDL-Rod123.....	84
Figura 31 Células T-47D tratadas con Rod 6G. ....	85

Figura 32 Células T-47D tratadas con rHDL-Rod6G.....	86
Figura 33 Células T-47D tratadas con Rod B. ....	87
Figura 34 Células T-47D tratadas con rHDL- Rod B. ....	88
Figura 35 Curva estándar para la determinación de la rodamina B en la fase acuosa. ....	97
Figura 36 Curva estándar para la determinación de la rodamina B en la fase octanólica....	97
Figura 37 Curva estándar para la determinación de la rodamina 6G en la fase acuosa.....	98
Figura 38 Curva estándar para la determinación de rodamina 6G en la fase octanólica. ....	99
Figura 39 Coeficientes para calcular el coeficiente de partición, según el método átomo fragmento, tomado de: (79). ....	100
Figura 40 Factores de corrección según la posición de sustitución del anillo aromático. .	101
Figura 41 Curva estándar de rodamina 6G.....	102
Figura 42 Curva estándar rodamina B. ....	102

### Índice de tablas

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de la terapia fotodinámica.....	33
Tabla 2 Algunos Fotosensibilizadores de 1ra y 2da generación .....	36
Tabla 3 PSs acoplados a NPs.....	39
Tabla 4 Determinación teórica de Log P, Rod 6G.....	50
Tabla 5 Determinación teórica de Log P, Rod B.....	50
Tabla 6 Determinación teórica de Log P, Rod 123.....	51
Tabla 7 Coeficiente de reparto de las rodaminas.....	58
Tabla 8 Longitudes de onda características de los espectros de excitación, emisión y absorción. ....	62
Tabla 9 Variabilidad de la señal de emisión de fluorescencia a los máximos de emisión...	63
Tabla 10: Diferencias entre los métodos de preparación de rHDL .....	74
Tabla 11 Asignación de las bandas del espectro IR de rHDL.....	82

## **PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD COMO TRANSPORTADORES DE RODAMINA PARA TERAPIA FOTODINÁMICA**

### **3 Resumen**

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), participan en el transporte en reversa del colesterol, mecanismo mediante el cual suministran a las células del colesterol necesario para desempeñar sus funciones vitales.

Las células de cáncer tienen una alta demanda de colesterol y otros nutrientes, por lo que sobreexpresan el receptor SR-B1, encargado de internalizar el colesterol contenido en HDL a la célula. Valiéndose de este principio, se espera una alta afinidad de las células de cáncer por las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) por lo que serían un buen vehículo para el transporte de fármacos.

La terapia fotodinámica (PDT) es un tratamiento emergente contra el cáncer que promete múltiples beneficios. Se basa en la administración de un fotosensibilizador (PS), una sustancia que, al ser irradiada a la longitud de onda adecuada, provoca daño a biomoléculas y muerte celular.

La presente investigación se centra en el desarrollo de un vehículo de administración de rHDL para las rodaminas 123, 6G y B; sustancias con potencial actividad fotosensibilizadora. La capacidad fotosensibilizadora de las rodaminas fue demostrada al irradiar una solución de ácido fólico + rodaminas que resultó en la disminución de la concentración del ácido fólico. Se determinó el coeficiente de partición octanol/agua de las rodaminas antes mencionadas, con el fin de predecir si podrían internalizarse en las nanopartículas de rHDL.

Se prepararon nanopartículas de rHDL vacías a las que se les determinó su espectro de absorción e infrarrojo, así como el tamaño de partícula mediante espectrometría UV-Vis, espectrometría IR y DLS respectivamente. Posteriormente, fueron preparadas NPs de rHDL cargadas con las rodaminas 123, 6G y B de las que se obtuvieron los espectros de absorbancia UV-vis con la finalidad de encontrar las bandas de las rodaminas, que demostraran que se encuentran dentro de las NPs.

Se realizó un ensayo in vitro en el que células de cáncer de la línea celular T-47D fueron administradas con rodaminas: Rod 123, Rod 6G y Rod B y alternativamente otras células fueron administradas con rHDL + rodaminas: rHDL-rod123, rHDL-rod6G y rHDL-rodB, encontrándose cualitativamente mediante microscopía de fluorescencia que las células que fueron administradas con rHDL-rodaminas cargaron una mayor cantidad del PS.

## **4 Marco teórico**

### **4.1 Cáncer**

El cáncer es la proliferación descontrolada de células que comienza como una enfermedad localizada, con capacidad de diseminarse a cualquier órgano. Es generalmente tratado con quimioterapia y/o radioterapia con el objetivo de evitar la proliferación de las células de cáncer e inducir su muerte. Sin embargo, estos tratamientos antineoplásicos no distinguen entre células sanas y las de cáncer, por lo que su uso viene acompañado con una inmensa cantidad de efectos secundarios, que pueden agravar el estado del paciente.

### **4.2 Nanotecnología**

La nanotecnología se define como el control o reestructuración de la materia a niveles atómicos y moleculares en un rango de tamaño de 1 a 100 nm. Abarca la fabricación de nanomateriales y la aplicación de sistemas físicos, químicos y biológicos a escalas que van desde átomos o moléculas individuales hasta dimensiones submicrométricas, así como la integración de las nanoestructuras resultantes en sistemas más grandes (1).

#### **4.2.1 Aplicaciones de la nanotecnología en la medicina**

En los últimos años, han sido ampliamente investigadas las aplicaciones médicas de la nanotecnología en áreas como el diagnóstico molecular, el desarrollo de fármacos y la medicina regenerativa.

El diagnóstico molecular consiste en el uso de nanopartículas en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con alteraciones a nivel molecular o genéticas en sus estadios iniciales. Algunos ejemplos de esto son la utilización de quantum dots para el marcaje celular e identificación de tumores y las nanopartículas de oro para la identificación de secuencias de ácidos nucleicos, ambas son técnicas ampliamente usadas en el diagnóstico de cáncer (2,3).

Una de las aplicaciones de la nanotecnología en el desarrollo de fármacos, es el transporte y liberación de fármacos a través de nanopartículas, con la finalidad de mejorar la eficacia y reducir efectos secundarios derivados del tratamiento, al incrementar la especificidad de los fármacos hacia los órganos y tejidos de interés. Esto es ampliamente investigado para su uso

en el tratamiento contra el cáncer, como la terapia génica, la radioinmunoterapia y la terapia fotodinámica.

La medicina regenerativa se ocupa de la reparación o sustitución de tejidos y órganos enfermos o dañados mediante la aplicación de métodos procedentes de la terapia génica, la terapia celular, la dosificación de sustancias biorregenerativas y la ingeniería de tejidos, estimulando los propios mecanismos regenerativos del cuerpo humano. Las principales aportaciones de la nanotecnología a la medicina regenerativa están relacionadas con la producción de nuevos materiales y sistemas de soporte, la utilización de células madre embrionarias y adultas y la producción de moléculas bioactivas que sirvan como señales de diferenciación celular (3).

#### **4.2.2 Mecanismos de distribución y transporte de nanopartículas**

La membrana plasmática emplea diferentes mecanismos para internalizar sustancias, los cuales se encuentran clasificados en dos categorías: transporte pasivo y transporte activo. El transporte pasivo ocurre a través de un gradiente de concentración mientras que el transporte activo ocurre en contra de un gradiente de concentración y requiere energía.

La endocitosis es un tipo de transporte activo, en el cual ocurre una invaginación de la membrana celular y se forma una vesícula o endosoma para engullir materiales que se encuentran en el medio extracelular. Existen dos tipos de endocitosis: fagocitosis y pinocitosis; la fagocitosis es realizada por células especializadas, como macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas, mientras que la pinocitosis es realizada por todas las células (4).

La fagocitosis “cuando la célula come” es el proceso mediante el cual la célula captura partículas de gran tamaño (por ejemplo, bacterias) y en la pinocitosis “cuando la célula bebe”, la membrana captura una pequeña gota de líquido extracelular que contiene pequeñas partículas disueltas en ella. Estos mecanismos se diferencian por el tamaño de los endosomas que se forman para internalizar las partículas, en la fagocitosis es superior a 250 nm y en la pinocitosis va desde unos cuantos nanómetros hasta cientos (5).

Las NPs son internalizadas a las células por un mecanismo de pinocitosis (6), el cual puede ser subcategorizado en endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas, endocitosis independiente de clatrina y caveolas o macropinocitosis (7).

La endocitosis mediada por clatrininas es un mecanismo por el cual se internalizan moléculas específicas en las células. Durante este proceso, los ligandos en el fluido extracelular se unen a receptores de superficie de la membrana celular, formando un complejo ligando- receptor, el cual se mueve a una región especializada de la membrana rica en clatrina, donde son engullidos por formación de vesículas recubiertas de clatrina; una vez dentro de la célula, los revestimientos de clatrina en el exterior de las vesículas se expulsan antes de fusionarse con los endosomas tempranos (5).

La endocitosis mediada por caveolas es la ruta de internalización celular que involucra invaginaciones de membrana llamadas caveolas. Estas se encuentran en células endoteliales, epiteliales, adipocitos y fibroblastos (8), tienen un tamaño de 50 a 80 nm y están involucradas en la señalización y regulación de las proteínas de membrana, lípidos y ácidos grasos (4,8). Una vez que las caveolas se separan de la membrana plasmática, se fusionan con unos compartimentos celulares llamados caveosomas que existen a pH neutro. Los caveosomas pueden evitar los lisosomas y, por lo tanto, proteger los contenidos de la hidrólisis y la degradación lisosómica (5).

La endocitosis independiente de clatrina y caveolas ocurre en células privadas de clatrina y caveolina. En la macropinocitosis las células capturan grandes volúmenes de fluido extracelular, formando una gran vesícula (0.5-10  $\mu\text{m}$ ) llamado macropinosoma (9).

El tamaño, forma, carga superficial, hidrofiliicidad/ hidrofobicidad y funcionalización superficial afectan directamente la captación celular, la ruta endocítica y la citotoxicidad de las NPs. El tamaño es un factor determinante en la eficiencia de la captación celular y el potencial tóxico de las NPs (10), un tipo de NP puede utilizar múltiples vías de entrada, dependiendo de su tamaño. Las NPs pequeñas, con tamaños de hasta cientos de nanómetros entran a las células vía pino- o macropinocitosis, las NPs en el rango de 250 nm a 3  $\mu\text{M}$  han demostrado ser fagocitadas en estudios in vitro y las NP's de 120 a 150 nm son internalizadas por endocitosis mediada por clatrina o caveolina (11).

Aunque la mayoría de las NPs desarrolladas para la administración de fármacos tiene forma esférica (11), no se sabe exactamente qué forma es internalizada con mayor rendimiento. Algunos estudios han demostrado que las nanopartículas esféricas que entran con mayor facilidad a las células que las de forma de barra o disco (6), mientras que otros estudios muestran una internalización preferencial por las NPs en forma de barra o cilíndrica (12), por lo que se cree que esto depende del tipo de NP.

La membrana plasmática negativamente cargada en su interior, mejora la internalización de NPs positivamente cargadas, las cuales tienen una mayor internalización que las NPs neutras y las cargadas negativamente (11). Sin embargo, la captación de NPs positivamente cargadas podría perturbar la integridad de la membrana y conducir a un incremento en la toxicidad e inducir la muerte celular (13). Las NPs cargadas positivamente son en su mayoría internalizadas por la célula vía macropinocitosis, mientras que el mecanismo para la captación de NPs negativamente cargadas es endocitosis independiente de clatrina y caveolas (14).

Las NPs hidrofóbicas no suelen ser estables y son pobremente dispersadas en fluidos biológicos. Las interacciones hidrofóbicas promueven NPs hidrofóbicas que forman agregados o interactúan con residuos hidrofóbicos de proteínas o péptidos de la sangre para mejorar su dispersión (10).

Después de que las NPs han sido internalizadas por las células, primero encontrarán vesículas intracelulares unidas a la membrana llamadas endosomas tempranos. Los endosomas formados en la membrana plasmática se clasifican en 3 tipos: endosomas tempranos, endosomas tardíos y endosomas de reciclaje (15).

Los endosomas tempranos transportan la carga al destino celular deseado, parte de la carga es reciclada en la membrana plasmática mediante los endosomas de reciclaje. Los endosomas tempranos se transforman en endosomas tardíos mediante un proceso de maduración y diferenciación y los endosomas tardíos se integran con los lisosomas para formar vesículas endolisosomales y las enzimas hidrolíticas contenidas dentro de estas vesículas degradan las NPs atrapadas (5).

Algunas NPs pueden escapar de esta ruta y liberarse en el citoplasma evitando el proceso de degradación lisosomal (16). Otro mecanismo de degradación intracelular que juega un papel importante en el destino intracelular es la autofagia (5); en este proceso, el contenido citoplasmático será rodeado por un fagosoma y llevado a los lisosomas, donde es digerido y reciclado.

#### **4.2.3 Uso de nanopartículas como sistema de administración de fármacos para el tratamiento de cáncer**

Los avances en nanomedicina han permitido el desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de cáncer y se están implementando para resolver varias limitaciones de los sistemas de administración de fármacos convencionales. Los sistemas de administración basados en NPs pueden mejorar la biodistribución, solubilidad en agua, biodisponibilidad, índices terapéuticos y reducir los efectos adversos de la terapia al incrementar la selectividad del fármaco por el tejido tumoral (17).

Idealmente, para que los fármacos contra el cáncer sean efectivos en el tratamiento, primero deben, alcanzar los tejidos tumorales deseados mediante la penetración de barreras en el cuerpo con una pérdida mínima de su volumen o actividad en la circulación sanguínea. Después de alcanzar el tejido tumoral, los fármacos deben tener la capacidad de inhibir selectivamente las células tumorales sin afectar a las células normales con un mecanismo de liberación controlada de la forma activa (18).

Después de la administración, las nanopartículas se distribuyen por el torrente sanguíneo en donde deben permanecer un tiempo considerable antes de alcanzar su objetivo. Para que el fármaco pueda llegar al tejido tumoral, se debe evitar que las nanopartículas interactúen con el sistema fagocítico mononuclear, constituido por macrófagos y células especializadas en fagocitosis y presentación de antígenos (19), por ejemplo, los histiocitos, células de Kupffer, osteoclastos y células de Langerhans, entre otras. Las nanopartículas pueden acceder al tejido tumoral mediante la acumulación pasiva y activa, como se describe a continuación.

##### *Acumulación pasiva*

Las células de cáncer inducen la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) para satisfacer el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor en crecimiento. Los vasos sanguíneos resultantes son irregulares, dilatados, con poros o defectuosos, y las células endoteliales están desorganizadas, presentando grandes fenestraciones que van de los 10 a 800 nm (20,21). Este fenómeno denominado efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, por sus siglas en inglés enhanced permeability and retention effect) es la base para el transporte pasivo de fármacos hasta el tumor (22).

Las NPs llegan al tejido tumoral, se internalizan a través de las fenestras y permanecen ahí por tiempo prolongado debido al escaso drenaje linfático. De esta manera, se pueden conseguir concentraciones del nanosistema en el tumor 10 veces mayores que en el tejido sano (23).

#### *Acumulación activa*

Las células tumorales suelen sobreexpresar receptores de membrana que promueven el crecimiento descontrolado del tumor. Si el nanoacarreador se decora con un ligando que reconozca al receptor, se dirigirá y acumulará preferentemente en el tejido tumoral, en donde deberá liberar su carga terapéutica (20). La internalización generalmente ocurre a través de endocitosis mediada por receptor. Las células de cáncer de rápido crecimiento muestran una alta tasa metabólica y utilizan la glucólisis para obtener energía extra, lo que resulta en un ambiente ácido (24).

#### **4.2.4 Nanosistemas de transporte y liberación de fármacos para el tratamiento de cáncer**

Las nanopartículas aplicadas como sistemas de administración de fármacos se caracterizan por tener un tamaño submicrónico (3-200 nm), son biocompatibles y no tóxicas. Para el desarrollo de nanopartículas se utiliza una variedad de materiales en los que se incluyen: polímeros (nanopartículas poliméricas, micelas o dendrímeros), lípidos (liposomas), virus (nanopartículas virales), e incluso compuestos organometálicos (nanotubos) (17).

Las NPs desempeñan funciones como encapsular fármacos poco solubles, proteger moléculas terapéuticas y modificar la circulación en la sangre y la distribución tisular (25).

Algunos ejemplos de NPs usadas como sistemas de transporte y liberación de fármacos para el tratamiento de cáncer son:

- *Nanopartículas lipídicas*

Las nanopartículas lipídicas son atractivas como sistemas de administración de fármacos hidrofóbicos. Entre sus ventajas están que incrementan la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua y tienen baja toxicidad, ya que usualmente se componen de lípidos fisiológicos, por lo que son adecuadas para aplicaciones *in vivo* (17).

- *Liposomas*

Los liposomas son estructuras coloidales cerradas, autoensambladas y compuestas de bicapas lipídicas con forma esférica en la cual una bicapa lipídica externa rodea un espacio acuoso central (17). Tienen la capacidad de incorporar sustancias lipófilas e hidrófilas y presentan ventajas como propiedades de liberación controlada, afinidad celular, compatibilidad con tejidos, reducción de la toxicidad de los fármacos y mejora en la estabilidad de los mismos (26).

La encapsulación de fármacos lipófilos se puede lograr mediante su interacción hidrófoba con la bicapa de membrana lipídica liposomal, mientras que la encapsulación de fármacos hidrófilos se puede lograr atrapando estos fármacos dentro del interior acuoso (27).

Los liposomas se dirigen pasivamente al tumor a través del efecto de permeabilidad y retención, lo que permite su uso para imagen y terapia de cáncer (28). Los liposomas sensibles al pH están diseñados para ser estables a un pH fisiológico de 7,4, pero se degradan para liberar el fármaco activo en tejidos diana en los que el pH es menor que los valores fisiológicos, como en el entorno ácido de las células tumorales (17).

- *Lipoproteínas*

Las lipoproteínas poseen características favorables para el transporte de agentes terapéuticos y de diagnóstico, que incluyen el transporte selectivo a través de receptores específicos, capacidad de liberación controlada (selectiva para tumores frente a células y tejidos normales), baja inmunogenicidad y elevado tiempo de vida en circulación (29).

- *Micelas*

La región del núcleo hidrófobo sirve como depósito para los fármacos hidrófobos, mientras que la región de la capa hidrófila estabiliza el núcleo hidrófobo y hace que los polímeros sean solubles en agua (29).

- *Proteicas*

Las nanopartículas proteicas ofrecen la posibilidad de incrementar la concentración de fármaco dentro del tumor al facilitar la administración y disminuir los tiempos de infusión. La albúmina tiene varias características únicas que lo convierten en un vehículo particularmente apropiado para la administración de medicamentos específicos en oncología, es un portador natural de moléculas hidrófobas (como vitaminas, hormonas y otros componentes del plasma), con características de unión favorables y no covalentes. La unión de sustancias hidrófobas a la albúmina es reversible y permite el transporte en el cuerpo y la liberación en la superficie celular (30).

- *Hidrogeles*

Los hidrogeles son sistemas compuestos de materiales poliméricos que son capaces de absorber agua y presentan una estructura de malla tridimensional (31) y son utilizados para la administración de fármacos hidrofílicos.

- *Sistemas cristalinos líquidos*

Los sistemas de cristales líquidos liotrópicos tienen atributos tanto de líquidos (porque son fluidos) como de sólidos (ya que presentan una estructura organizada), están formados por surfactantes, son no tóxicos, biodegradables y tienen propiedades bioadhesivas que contribuyen a sus aplicaciones en la administración de fármacos fotosensibilizadores (32).

- *Dendrímeros*

Los dendrímeros son polímeros formados como capas múltiples, llamadas generaciones de polímeros altamente ramificados, alrededor de un núcleo (28). Tienen un diámetro de 1 a 10 nm y sus propiedades como su tamaño monodisperso, la funcionalidad de superficie modificable, la multivalencia (unión simultánea de múltiples ligandos a múltiples

receptores), la solubilidad en agua y la cavidad interna disponible, los hacen atractivos para el suministro de fármacos (17,32).

- *Ciclodextrinas*

Las ciclodextrinas naturales (CD) son oligosacáridos cíclicos obtenidos por acción de la enzima ciclodextrina- $\alpha$ -glicosil transferasa (CGTasa). Se han sintetizado varias CD modificadas para mejorar las estructuras de las CD naturales, haciéndolos adecuados para aplicaciones farmacéuticas. Tienen una forma similar a un cono, por lo tanto, se forma una cavidad interna no polar, permitiendo la formación de complejos de inclusión de fármacos lipófilos (32).

- *Nanopartículas virales*

Se ha desarrollado una variedad de virus, incluidos el virus del mosaico del caupí, el virus del moteado clorótico del caupí, el parvovirus canino y los bacteriófagos para aplicaciones biomédicas que incluyen la administración de fármacos. Una serie de moléculas y péptidos dirigidos pueden mostrarse en una forma biológicamente funcional en su superficie de la cápside utilizando medios químicos o genéticos (17).

- *Nanotubos de carbono*

Los nanotubos de carbono son cilindros de carbono compuestos de anillos de benceno que se han aplicado en biología como sensores para detectar ADN y proteínas, dispositivos de diagnóstico para la discriminación de diferentes proteínas de muestras de suero y portadores para administrar vacunas o proteínas. Los nanotubos de carbono son completamente insolubles en todos los solventes, generando algunos problemas de salud y toxicidad. Sin embargo, la introducción de la modificación química a los nanotubos de carbono puede hacerlos solubles en agua y funcionalizados, de modo que puedan unirse a una amplia variedad de moléculas activas como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y agentes terapéuticos (17).

### **4.3 Nanopartículas lipídicas como transportadores de fármacos**

Las NPs lipídicas se componen principalmente de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol, que son componentes naturales de las membranas biológicas y de las lipoproteínas.

Los sistemas de transporte de fármacos basados en lípidos tienen muchas ventajas, como una mejor biodisponibilidad para fármacos poco solubles, un amplio espectro de administración (oral, dermal e intravenoso) y protección de las moléculas sensibles al ambiente (18).

Los fármacos pueden ser incorporados a estos sistemas mediante diferentes técnicas, como la encapsulación (para moléculas hidrofílicas), la solubilización en fase oleosa (para moléculas lipofílicas), conjugación con un anclaje lipídico (como un fármaco pro derivado de lípidos) o complejación electrostática (para moléculas poli-aniónicas como los ácidos nucleicos), dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas específicas (18).

#### 4.3.1 Lipoproteínas como transportadores de fármacos

Las lipoproteínas son biomoléculas conjugadas, con una parte proteica (apoproteína) y una parte de naturaleza lipídica (colesterol y triglicéridos). Tienen un núcleo interno hidrófobo de ésteres de colesterilo y triglicéridos y una capa externa de colesterol libre, fosfolípidos y apoproteínas. Las características del núcleo, permiten la internalización de fármacos lipídicos mientras que en el exterior pueden conjugarse sustancias hidrófilas para su utilización como sistemas de transporte y distribución [Figura 1] (33).

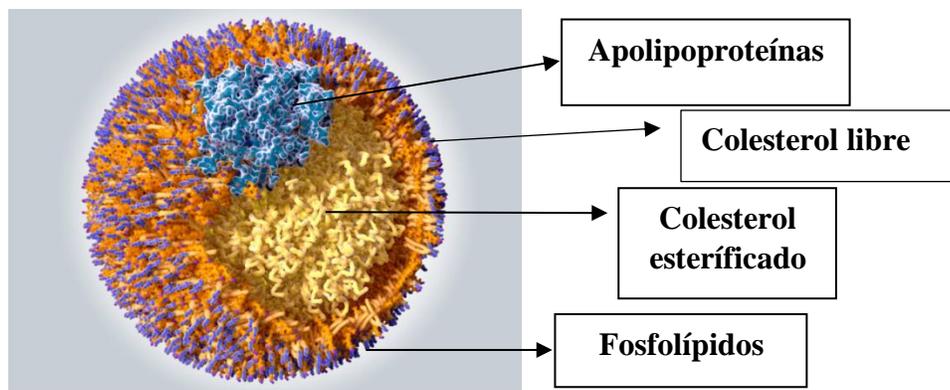


Figura 1 Lipoproteínas como transportadores de fármacos.

Las lipoproteínas presentes naturalmente en el cuerpo humano son los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL); cada una con diferentes funciones en el organismo. Las Lipoproteínas de muy baja densidad VLDL (por sus siglas en inglés *Very low Density lipoproteins*), no han sido estudiadas completamente para propósitos de transporte de fármacos, debido a que tienen vidas medias cortas en circulación 3–5 h, e interactúan con

proteínas, alterando su composición en el núcleo hidrofílico y en el revestimiento anfipático (34).

Las lipoproteínas de baja densidad LDL (por sus siglas en inglés *low density lipoproteins*) son atractivas como vehículo de administración de fármacos para el cáncer, debido a la prevalencia del receptor de LDL en células malignas. Sin embargo, esta lipoproteína es menos favorable para la administración de fármacos debido a que incrementa la expresión de varias líneas celulares anticancerígenas y a la dificultad de purificar la apo B-100 presente en esta lipoproteína (33,34).

Entre las ventajas que presentan las lipoproteínas frente a otras nanopartículas se encuentran que evitan la detección por el sistema fagocítico mononuclear, pueden ser descompuestas y recicladas por las células (19), poseen largos periodos de circulación sanguínea que permiten una entrega sistémica del fármaco sin la necesidad de PEGilación (35) y su tamaño es ideal para penetrar el tejido tumoral.

Las lipoproteínas, especialmente la HDL, parecen tener dos ventajas principales sobre los liposomas como agentes de administración de fármacos: Las lipoproteínas y las formulaciones de lipoproteínas sintéticas, con un tamaño de 10 a 50 nm de diámetro tienden a ser mucho más pequeñas que los liposomas, que miden entre 80 y 200 nm (29), encontrándose en el rango de tamaño correcto para la extravasación en tumores (~400 nm o menos, depende del tipo de tumor) (34).

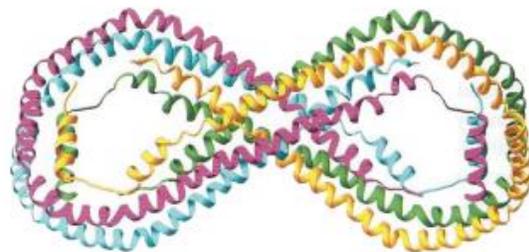
Segundo, tanto la LDL como la HDL interactúan con los receptores de la superficie celular a través de receptores de membrana y, por lo tanto, pueden tener la capacidad de alcanzar objetivos celulares selectivos en función de los niveles de expresión de los receptores específicos. Los liposomas, por otro lado, deben conjugarse con anticuerpos u otros restos de direccionamiento que, con toda probabilidad, complican el proceso de ensamblaje y también dan como resultado costos adicionales de preparación (36).

#### **4.4 HDL**

Las lipoproteínas de alta densidad HDL (por sus siglas en inglés *High density lipoproteins*) participan en el transporte inverso del colesterol, llevando el exceso de colesterol de los tejidos

al hígado para su eliminación. Se componen de fosfolípidos, colesterol y apolipoproteínas, principalmente Apo A-I, así como de Apo A-II y A-IV, Apo C-I, C-II y C-III y apo E (37).

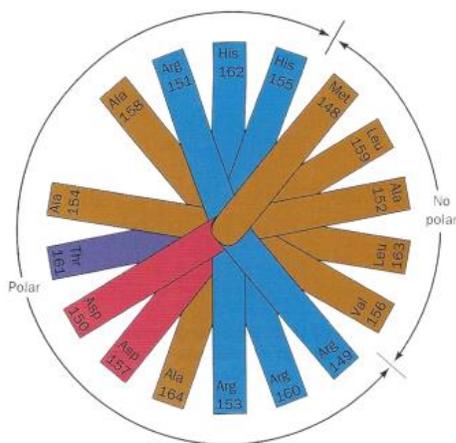
Apo A-I es un polipéptido de 29 kDa y 243 residuos. Presenta en gran parte segmentos de 22 residuos de secuencia similar en tándem. La cadena polipeptídica (a la que le faltan los residuos 1-43) forma una hélice  $\alpha$  pseudocontinua que esta punteada por retorcimientos en los residuos de prolina espaciados casi cada 22 residuos (33,34). Se asocian cuatro monómeros para formar la estructura mostrada en la *figura 2*. El tamaño y la forma elíptica enroscada de este complejo parecen ideales para envolver una partícula de HDL (39). La *figura 3* contiene una representación de rueda helicoidal de una porción de apo-A1 que ilustra la naturaleza anfipática de hélice.



*Figura 2 Estructura cuaternaria de apo A-I por difracción de rayos X.*

Hay una estructura helicoidal estable en el extremo C-terminal de apoA-I el cual es muy hidrofóbo, la región N-terminal también contiene un extremo muy hidrofobo, estas regiones tienen una capacidad significativa de unión a lípidos. la molécula apoA-I libre de lípidos está

organizada en dos dominios estructurales; las partes N-terminal y central forman un paquete de hélices, mientras que las hélices C-terminal forman una estructura separada, menos organizada



*Figura 3 Proyección de la rueda helicoidal de la hélice  $\alpha$  de la apo A-1*

En la representación de una rueda helicoidal de la apo A-1, las posiciones de la rueda helicoidal se proyectan hacia abajo del eje de la hélice encima de un plano, la separación de los residuos polares y no polares en distintos lados de la superficie polar, donde pueden interactuar con los grupos principales aniónicos de los

lípidos de la membrana. Otras hélices de apolipoproteínas tienen distribuciones de polaridad similares (39).

#### **4.4.1 Metabolismo de HDL**

La HDL naciente se sintetiza en el hígado y en el intestino, contiene fosfolípidos, apolipoproteínas y algo de colesterol libre. Se libera hacia la circulación, donde interactúa con las células de los tejidos periféricos que contienen colesterol libre. Apo A-1 activa a la Lecitin Colesterol Acil Transferasa (LCAT) que se encarga de esterificar el colesterol para que pueda internalizarse en la HDL y ésta pasa de ser HDL naciente a HDL<sub>3</sub> (40).

Las HDL<sub>3</sub> tienen tres destinos metabólicos 1) la enzima transportadora de ésteres de colesterol (CETP) estimula la transferencia de ésteres de colesterol desde HDL a VLDL, las cuales se transforman en LDL y son catabolizadas por vía del receptor de LDL también llamado receptor LRP, 2) las partículas de HDL son fuente directa de ésteres de colesterol para la célula por medio de receptores endocíticos de la familia del receptor de LDL o receptores específicos de HDL todavía desconocidos y 3) las HDL entregan colesterol directamente al hígado y los tejidos esteroideogénicos a través del proceso de captación selectiva de colesterol HDL mediado por el receptor SR-BI (41).

El colesterol que llega al hígado tiene un mecanismo de excreción biliar, mientras que otra parte se aprovecha en los tejidos esteroideogénicos, como las gónadas, para la síntesis de hormonas esteroideas (37). Finalmente, cuando hay un incremento en las proteínas ricas en triglicéridos (VLDL), HDL se elimina por un mecanismo en el que intercambia el colesterol esterificado por triglicéridos con las VLDL y es degradada por la Lipasa Hepática de Lipoproteína (40).

#### **4.4.2 HDL reconstituido como vehículo para la administración de fármacos**

Debido a las preocupaciones sobre los agentes infecciosos y la reproducibilidad de muestras de HDL en plasma humano, la mayor parte de la actividad de investigación en los últimos 20 años se ha centrado en el desarrollo y la evaluación de los vehículos derivados de HDL reconstituida (rHDL) para la administración de fármacos (36). La implementación de rHDL como sistema de transporte de fármacos, tiene algunas ventajas sobre otros vehículos basados en nanopartículas. Al ser no tóxicas, puede ser administrada en dosis más altas (42). No se

ha reportado que las formulaciones de rHDL produzcan algún tipo de inmunogenicidad en animales y humanos (29); además, se han realizado estudios para determinar la eficacia y seguridad de algunas formulaciones de rHDL como CER-001, una formulación de nanopartículas miméticas de rHDL demostró no causar reacciones adversas (43) mientras que CSL-112, una formulación de rHDL desarrollada para reducir eventos cardiovasculares en pacientes con síndrome coronario, demostró ser segura y eficaz (44).

Las rHDL al igual que otras nanopartículas, aprovechan el EPR para alcanzar el tejido tumoral y las células de cáncer sobreexpresan el receptor SR-B1, por lo que rHDL mejora la afinidad del fármaco los tumores (47–50), además se ha encontrado que apo A-I tiene un efecto antitumoral por sí mismo (46).

La exposición de Apo A-1 y los lípidos al ambiente externo las hace susceptibles a las células del sistema inmune innato (8) (compuesto por barreras epiteliales, fagocitos, células dendríticas y proteínas plasmáticas) y células del complemento, que constituyen la primera línea de defensa contra agentes externos. Sin embargo, ya que los fosfolípidos (fosfatidilcolina) y Apo A-1 (usados en el ensamblaje de las rHDL) son componentes endógenos de la sangre, no se espera que provoquen una respuesta inmune (51).

Las apolipoproteínas para la preparación de rHDL son purificadas de la sangre o expresadas en diferentes organismos, como *E. coli*, baculovirus, levaduras, plantas o células de ovario de hámster chino (42). Las lipoproteínas en el plasma pueden estar presentes en distintas isoformas y formas precursoras, lo que puede representar un reto en su purificación, mientras que la purificación de apo A-I expresada en bacterias es afectada por la alta afinidad de contaminantes como endotoxinas o proteínas de la célula huésped, son susceptibles a la oxidación, desaminación, truncamiento y agregación cuando se expresan en microorganismos (29).

El desarrollo de rHDL como vehículo para el transporte de fármacos está limitado por la gran cantidad de apo A-I necesaria para su producción, debido a su difícil obtención que implica un costo elevado (45). Una alternativa a la apo A-I recombinante o purificada, para la preparación de nanopartículas de rHDL puede encontrarse en la aplicación de péptidos

miméticos (29,46). Estos péptidos contienen estructuras helicoidales anfipáticas, similares a los haces helicoidales identificados en la apo A-I (46,47).

Los péptidos miméticos de la apo A-I imitan, en su mayor parte, la función de la apo A-I al contribuir al ensamblaje de las lipoproteínas (48) y muestran capacidad de interactuar con el receptor SRB1, lo que les atribuye una función potencial como componentes de nanopartículas terapéuticas (49). Además, tiene propiedades anti aterogénicas que resultan útiles para prevenir enfermedades cardiovasculares (50).

Se ha encontrado que los fármacos incorporados en HDL son de 2.5 a 23 veces más citotóxicos para las células de cáncer que el fármaco libre (51), sin embargo, el uso de lipoproteínas plasmáticas como portadores de fármacos se ha visto limitado por la falta de su composición consistente y el potencial de albergar agentes infecciosos (36).

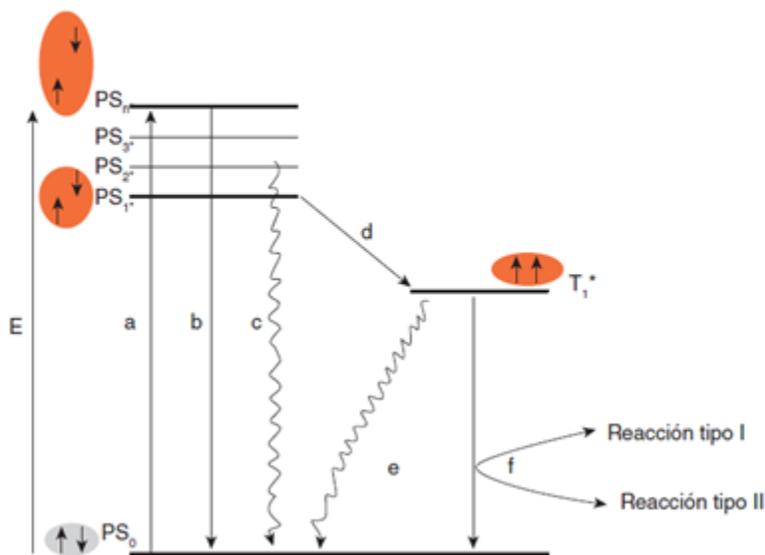
#### **4.5 Terapia fotodinámica**

La terapia fotodinámica (PDT, del inglés *photo dynamic therapy*) es una técnica ampliamente usada para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades (infecciones y afecciones de la piel), es poco invasiva y puede ser utilizada en diferentes órganos y tejidos accesibles a la luz (52).

La PDT se basa en la administración de una sustancia fotosensible, que es estimulada a una longitud de onda apropiada para excitarla y genera radicales libres citotóxicos que inducen daño a biomoléculas (53), como ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos grasos, causando la muerte celular. La sustancia recibe el nombre de fotosensibilizador (PS) y éste es administrado sistemática o directamente sobre el tejido afectado. La PDT requiere tres componentes: un fotosensibilizador, una fuente de luz (lámpara, láser, diodo emisor de luz [LED]), y oxígeno molecular intracelular ( $O_2$ ) (54).

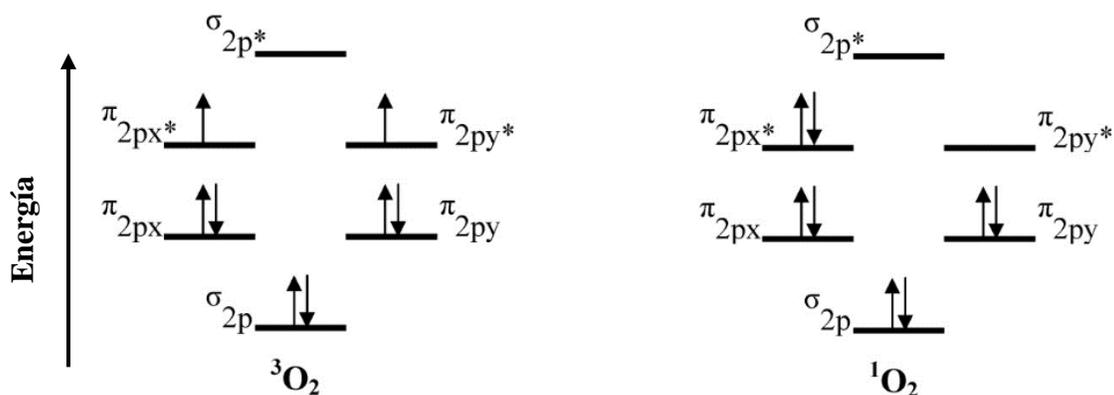
Al ser excitado, el fotosensibilizador cambia a un estado, generando un estado que cede energía a moléculas de oxígeno en estado basal o triplete, que se convierten en oxígeno singlete. El oxígeno singlete y los radicales libres inducen daño tisular y se logra la destrucción selectiva de los tejidos afectados. El mecanismo fotoquímico de la terapia fotodinámica se explica con el diagrama de Jablonski [Figura 4]. Procesos fotofísicos:

absorción (a), fluorescencia (b), conversión interna (c), cruzamiento intersistema (d), fosforescencia (e), formación de especies reactivas de oxígeno (f), reacción del PS en estado triplete ( $T_1^*$ ) con biomoléculas e independiente de oxígeno (g).



*Figura 4 Diagrama de Jablonsky modificado para explicar los tipos de reacción producidos por PS después de la irradiación con luz a una longitud de onda específica.*

El PS se encuentra en su estado singlete o basal ( $PS_0$ ) [Figura 4], al tener dos electrones con espines opuestos en el orbital molecular de baja energía (55). Al absorber luz alcanza un primer estado singlete excitado de vida corta ( $PS_1^*$ ), éste puede regresar a su estado basal al emitir la energía absorbida como fluorescencia (b) o por conversión interna a calor (c) (56).



*Figura 5 Diagrama de orbitales moleculares de los estados de triplete y singlete del oxígeno.*

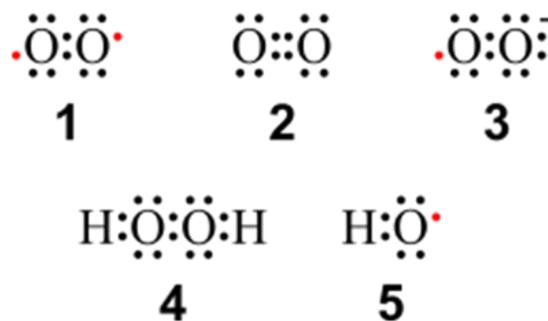
Alternativamente, el PS excitado ( $PS_1^*$ ) puede cambiar a un primer estado excitado de triplete ( $T_1^*$ ) mediante un sistema conocido como cruzamiento intersistema (d), un buen PS alcanza un alto rendimiento a estos estados a la denominada capacidad de *quantum*. El estado  $T_1^*$  debe tener una vida media suficientemente larga para tomar parte en las siguientes tres reacciones químicas (f), porque la acción fotodinámica en su mayoría es mediada por el PS en este estado energético (56). El PS en estado excitado de triplete ( $T_1^*$ ) puede generar tres tipos de reacciones:

Tipo 1: El  $T_1^*$  puede transferir un electrón a un sustrato A (agua o biomolécula) o sustraer un átomo de hidrógeno de un sustrato  $AH_2$  para generar radicales libres peróxidos y superóxidos.

Tipo 2:  $T_1^*$  transfiere la energía directamente al oxígeno molecular en estado basal de triplete ( $^3O_2$ ), presente en el tejido, para formar oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el cual es altamente reactivo y citotóxico, los diagramas de orbitales moleculares de estos estados se muestran en la *Figura 5*.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), [figura 6] tienen un tiempo de vida media corto y actúan cerca de su sitio de generación, por ello el daño celular producido por PDT depende de la localización del PS dentro de la célula (57)

1) Oxígeno triplete, 2) Oxígeno singlete, 3) Radical anión superóxido, 4) Peróxido de hidrógeno 5) Radical hidroxilo.



**Figura 6** Especies reactivas de oxígeno (ROS):

La muerte celular influenciada por PDT puede ocurrir por apoptosis, necrosis o autofagia. Si el PS se localiza dentro del retículo endotelial o en la mitocondria, la muerte celular ocurre por apoptosis, mientras que si el PS se localiza en la membrana plasmática ocurre por necrosis y si se encuentra en el retículo endoplásmico ocurre por autofagia (58).

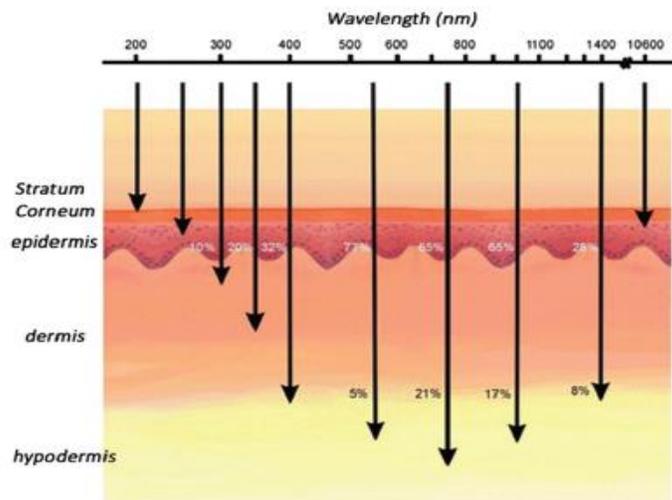
El proceso inmune antitumoral desempeña un papel importante en la citotoxicidad secundaria por PDT, ya que en la región tratada ocurre un proceso inflamatorio en el que se liberan moléculas que estimulan la llegada de células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos que remueven las células tumorales dañadas y presentan proteínas a los linfocitos CD4 cooperadores que activan, a su vez, a los linfocitos CD8 citotóxicos que inducen necrosis y apoptosis (59). La PDT trae numerosas ventajas en comparación con otras modalidades de tratamiento contra el cáncer, pero de igual manera tiene muchas limitaciones que le impiden convertirse en la primera opción terapéutica contra esta enfermedad, en la *tabla 1* se enlistan algunas de estas ventajas y limitaciones.

Un hallazgo frecuente en el cáncer es la oxigenación insuficiente del tejido tumoral o hipoxia, que puede ser resultado del agotamiento del suministro de sangre a través del rápido crecimiento del tumor o mediante el cierre rápido de la vasculatura tumoral y el rápido agotamiento del suministro de oxígeno en la PDT (60). Los tumores con una fracción grande de células hipòxicas no tienen un buen pronóstico en la PDT, sin embargo esto puede mejorar al compensar el efecto de la hipoxia mediante la terapia de hiperoxigenación del tejido (59).

<i>Tabla 1. Ventajas y limitaciones de la terapia fotodinámica.</i>	
<i>Ventajas</i>	<i>Limitaciones</i>
Especificidad hacia el tejido tumoral.	Únicamente en tumores superficiales o que pueden ser irradiados.
Reducción del daño a células sanas.	Incapacidad para tratar tumores sólidos, voluminosos o profundos.
Reducción de los efectos adversos.	No puede ser usado en la enfermedad diseminada.
Menor invasividad que los procedimientos quirúrgicos.	Vida corta del PS dentro del tejido.
Destrucción del tumor y su vasculatura.	Efecto reducido por la ausencia de oxígeno en los tejidos (hipoxia).
Selectividad (sólo el tumor recibe el PS y la luz).	
Bajo costo.	

En la terapia fotodinámica es importante predecir la distribución espacial de la luz en el tejido. La luz se dispersa o se absorbe cuando entra en el tejido, dependiendo del tipo de tejido y de la longitud de onda [Figura 7] (53). Los cromóforos de tejidos endógenos, como la hemoglobina, la mioglobina y los citocromos absorben luz de longitudes de onda inferiores a 700 nm, por lo que los PSs alrededor de esa longitud de onda permiten una penetración más profunda de luz a los tejidos (52).

La eficacia de la PDT se basa en muchos factores (I) la naturaleza química y las propiedades fotofísicas del PS que determinan su toxicidad, la eficiencia de absorción de la luz, el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete, la fotoestabilidad, la concentración celular y la localización en orgánulos (II) fuente de luz, dosis de luz y su suministro in vivo y (III) la heterogeneidad tisular y el microambiente (disponibilidad de oxígeno, vascularización). El aumento de la penetración de la luz en los tejidos objetivo y su distribución espacial son factores críticos para mejorar el resultado clínico de la PDT. La profundidad de penetración de la luz tiene una gran variabilidad, ya que depende de la longitud de onda, la intensidad de la luz y las características ópticas del tejido que determinan su absorción, dispersión y reflexión (53).



*Figura 7 Dependencia de la longitud de onda y porcentaje de la transmisión de luz en la piel.*

#### **4.5.1 Fotosensibilizadores en terapia fotodinámica**

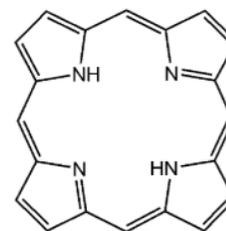
Un fotosensibilizador es aquella sustancia que tras su administración se deposita en el tejido objetivo y al incidir un haz de luz, esta sustancia se activa e interacciona con otras moléculas para generar radicales libres que producen daño y muerte celular (54).

Un fotosensibilizador debe reunir ciertas características para demostrar su eficacia y seguridad, idealmente debe tener una baja toxicidad en animales de experimentación y humanos, debe absorber luz a una longitud de onda cercana al rojo, debe poseer un alto rendimiento cuántico de la formación del estado triplete y este debe tener un tiempo de vida adecuado para interactuar con moléculas de oxígeno en estado basal y generar especies reactivas de oxígeno, debe ser estable e idealmente soluble en solventes acuosos pero debe tener cierto grado de lipofiliidad para acceder a las células blanco y su eliminación del organismo debe ser rápida (55,59).

Muchos fotosensibilizadores que no precisamente cumplen todas las características anteriores han sido aprobados para su uso clínico y muchos otros se encuentran en fase de estudio. La *tabla 2* (59), muestra algunos fotosensibilizadores, su clasificación, indicaciones terapéuticas, estado de aprobación, forma farmacéutica y longitud de onda máxima de excitación.

#### *Primera generación de fotosensibilizadores*

La primera generación de PSs tienen estructuras basadas en la porfirina [*Figura 8*], un ejemplo es el porfímero de sodio que tiene ventajas como la destrucción efectiva del tumor, despreciable toxicidad en un ambiente oscuro y puede ser fácilmente formulado en preparaciones acuosas para su administración intravenosa. Sin embargo, tiene una absorción relativamente baja de luz de la región roja del espectro, por lo que presenta una débil absorción de luz en los tejidos y una baja efectividad del tratamiento (59).

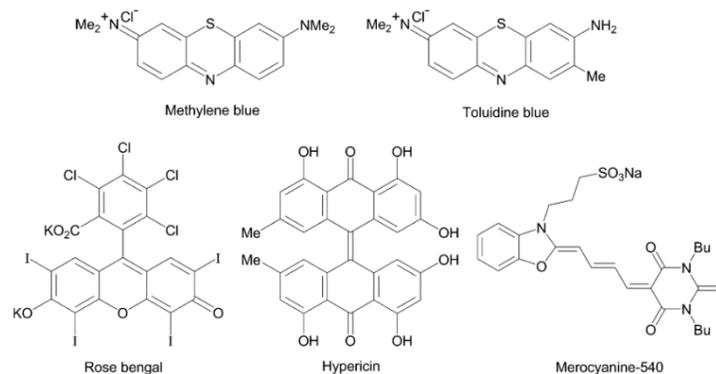


*Figura 8 Estructura molecular de la porfirina*

#### *Segunda generación de fotosensibilizadores*

A este grupo pertenecen los compuestos de la clase de las porfirinas como las clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, entre otros, así como los compuestos no porfirinoides como antraquinonas, fenotiazinas, xantanos, cianinas y curcuminoides [*figura 9*] (54). Su absorción máxima se encuentra por encima de los 630 nm, tienen mayores rendimientos cuánticos de producción de  $^1\text{O}_2$  y hay una mayor concentración de estos en el tejido tumoral que en tejido sano que como consecuencia tienen un mejor efecto antitumoral (59).

Se ha determinado la distribución intracelular de fotosensibilizadores con estructuras diferentes en cultivos celulares. Las características estructurales son: la carga iónica neta, el grado de hidrofobicidad expresada como el logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua y el grado de asimetría de la molécula. Los fotosensibilizadores hidrofóbicos tienen dos cargas negativas o menos, se pueden difundir a través de la membrana plasmática y de ahí pueden trasladarse a otras membranas intracelulares (55).



**Figura 9 Estructuras moleculares de algunos fotosensibilizadores no porfirínicos de segunda generación.**

La fisiología anormal del tumor, como la vasculatura con fugas, pobre drenaje linfático, pH bajo y el incremento de receptores de HDL contribuyen a la selectividad de los fotosensibilizadores (59). La selectividad de los fotosensibilizadores hacia el tumor puede mejorar mediante el uso de sistemas de liberación que transporten el PS desde el sitio de administración al tejido tumoral (61).

**Tabla 2 Algunos Fotosensibilizadores de 1ra y 2da generación**

	Clase	PD	Nombre comercial	Indicaciones	Estado actual	Forma farmacéutica	$\lambda_{\max}$
PS 1ra gen	Hematoporfirina	Porfímero de sodio	Photofrin	Cáncer de pulmón, de esófago, de vejiga, gástrico y cervical.	Aprobado en USA por la FDA y en otros 40 países.	Inyección de dextrosa o NaCl	630 nm
PS 2da gen	Protoporfirinas	Ácido 5-aminolevulínico	Levulan	Queratosis actínica, carcinoma de células basales, tumores de cabeza y cuello	Aprobado en USA y Europa	Crema tópica	635 nm

	Benzoporfirinas	Monoácido derivado de benzoporfirina	Visudyne	Miopía patológica, histoplasmosis	Aprobado en USA, Europa y Canadá	Formulación liposomal	689-693 nm
	Clorinas	Metatetrahidroxiifenilclorina	Foscan	Tumores de cabeza, cuello, próstata y páncreas	Aprobado en la Unión Europea	Etanol/propilenglicol	652 nm
	Ftalocianinas	Ftalocianina de zinc (ZnPc)	CGP55847	Queratosis actínica, cáncer de piel	Ensayos clínicos fase I USA	Formulación liposomal	675 nm

#### 4.5.2 Fotosensibilizadores acoplados a nanopartículas

La nanotecnología ofrece muchas ventajas para optimizar la administración de los PS, mejorando la PDT, donde las NP se pueden emplear como: portadoras de moléculas fotosensibilizantes y esqueletos para fotosensibilizar moléculas (56).

Las nanopartículas tienen numerosas ventajas como sistema de suministro de PSs, como la entrega al sitio del tumor de manera más selectiva, la protección de la degradación enzimática, el control de la liberación del fotosensibilizador que permite una concentración constante y uniforme en las células diana debido a su tamaño submicrónico; biocompatibilidad y reabsorción a través de las vías naturales y fotoestabilidad (62).

Las NPs pueden prevenir la liberación prematura del PS y su inactivación por los componentes del plasma (52) evitando su acumulación inespecífica en tejidos normales y en consecuencia, reduciendo la fotosensibilidad general. Además, otorgan anfifilicidad al PS, esto permite que las nanopartículas viajen sin obstáculos a través del torrente sanguíneo y se localicen en el tumor (63) y se acumulen ahí gracias al EPR. Debido a su gran relación superficie-volumen, podría aumentar la cantidad de PS que se puede administrar a las células blanco (Konan-Kouakou, Boch, Gurny, & Allémann, 2005).

Existen parámetros importantes en el diseño de nanopartículas para su uso como vehículos de transporte de fotosensibilizadores que influyen en la encapsulación eficiente y en la liberación del fotosensibilizador en los tumores. Estos parámetros son: el tamaño y forma de partícula, el tiempo de vida media plasmática, la carga de partícula (potencial Z) y la capacidad activa de orientación celular. Al modificar el tamaño y forma de partícula se reduce su adsorción por proteínas plasmáticas, como la albúmina, y de esta manera puede evitarse el atrapamiento de partículas por el sistema reticuloendotelial (52).

La vida media plasmática de las NP cargadas con PS depende de la extensión del aclaramiento renal y en la captación del RES. La eliminación renal puede ser evitada, fabricando NPs con un diámetro mayor al umbral de filtración renal que es de 15 nm (64,65). El aumento de la vida media plasmática de las NPs aumenta la posibilidad de una mayor acumulación mediada por el efecto EPR dentro del estroma tumoral y resulta en un incremento de la biodisponibilidad del fármaco fotosensibilizador encapsulado dentro del tumor y una mejora en la eficacia de la PDT, al mismo tiempo que se evitan los efectos secundarios en los tejidos sanos (59,66).

La capacidad activa de orientación celular se puede lograr modificando la superficie del nanovehículo cargado de PS con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y ligandos que se unen a receptores específicos que se encuentran aumentados en la superficie de las células cancerosas y así facilitar la internalización celular de la carga útil y mejorar la biodistribución, farmacocinética y focalización de las NPs (66,67).

Algunos ejemplos de PS acoplados a nanopartículas probados en estudios *in vitro* e *in vivo* se muestran en la *Tabla 3* (52).

<i>Tabla 3 PSs acoplados a NPs</i>	
PS	Tipos de NPs acopladas
Derivados de porfirina (ej. Hematoporfirina)	NPs de albúmina sérica humana. NP de sílice. Liposomas
Derivados de clorina (ej. Clorina e6)	NPs de quitosán. NPs de óxido de hierro. NPs poliméricas.
Ftalocianinas (ej. Ftalocianina de zinc II)	Dendrímeros Liposomas LDL NPs

#### 4.5.3 Rodaminas como fotosensibilizadores

Las rodaminas son compuestos orgánicos, con propiedades fluorescentes, generalmente utilizados en investigación como colorantes para marcaje de células y microorganismos, entre otras aplicaciones. Debido a su rigidez molecular, proporcionada por el oxígeno del xanteno, las rodaminas son altamente fluorescentes (68).

Las rodaminas, son agentes con potencial uso para la PDT, debido a su baja toxicidad y rápida eliminación (69); las rodaminas 123, 6G y B no han sido probadas en ensayos clínicos como fotosensibilizadores para PDT, sin embargo; hay datos que permiten anticipar presuntamente que pueden desempeñar esta función, como los que se mencionarán a continuación.

La Rod-123 se caracteriza por ser lipofílica, permeable a membrana y con carga positiva deslocalizada que facilita su acumulación en mitocondria, la cual tiene una carga negativa en la matriz y un alto gradiente potencial a través de la membrana interna (70). Tiene una alta selectividad por las células de cáncer; los elevados potenciales de membrana y mitocondrial de células de cáncer facilitan su absorción y hay una mayor retención de esta en las mitocondrias, a comparación de células normales (71).

Se ha demostrado también que la Rod 123 puede producir un poco de oxígeno singlete (72), tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia es de 0.9 (73) y es un efectivo agente

fototóxico para varias líneas celulares de cáncer (74), por lo que está siendo investigada para el tratamiento de algunos tumores.

La Rod 6G ha demostrado su potencial como fotosensibilizador al producir oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), su rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.95 depende de la concentración de oxígeno triplete  $^3\text{O}_2$  (68,75), además, ha demostrado causar daño al ADN mediante transferencia electrónica. De la Rod B sólo se sabe que tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.50 (68), por lo que se espera una menor actividad fotosensibilizadora que las otras dos rodaminas.

Los compuestos altamente fluorescentes como las rodaminas raramente pueden inducir reacciones fotosensibilizadoras, debido a que su rendimiento de estado triplete es muy bajo; sin embargo, aunque se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual las rodaminas, en presencia de una fuente de luz, pueden causar daño a biomoléculas, se cree que esto ocurre en el estado singlete excitado, en el cual un electrón es cedido de la biomolécula objetivo a la molécula de rodamina excitada (69).

## 5 Justificación

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8.8 millones de defunciones (76) y en México ocupó el tercer lugar de mortalidad. De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en ese año fallecieron un total de 85,201 personas por cáncer de un total de 655,688 defunciones (77). La mortalidad por cáncer en México ha incrementado en las últimas décadas y se espera que su tasa aumente debido al envejecimiento de la población, las principales causas de muerte por cáncer según el número de eventos son: pulmón, próstata, hígado y vías biliares intrahepáticas, mama y gástrico (78).

Debido a la creciente prevalencia de esta enfermedad, es necesario contar con diferentes opciones terapéuticas que sean eficaces, eficientes, asequibles y aceptables que respondan a la demanda de los pacientes.

Los tratamientos convencionales contra el cáncer, como la quimioterapia y la radioterapia, son efectivos para eliminar los tumores y controlar la proliferación de células de cáncer; sin embargo, presentan efectos adversos sistémicos, resultado de que los tratamientos no distinguen entre células sanas y células malignas. Estos efectos adversos suelen presentarse como vértigo, debilidad, vómitos, pérdida de cabello e inmunodeficiencias y ocurren por la pérdida de células funcionales, por ejemplo, los leucocitos que protegen de infecciones y otras enfermedades y los queratinocitos cuya deficiencia ocasiona que el cabello y las uñas se vuelvan débiles y quebradizos.

Por ello la importancia de presentar nuevas alternativas de tratamiento, como la terapia fotodinámica (PDT) que ha emergido como una modalidad de tratamiento no invasiva, específica y económica que contribuye a la calidad de vida de los pacientes. La ventaja de esta es que es selectiva con el tejido tumoral, causando un daño mínimo al tejido adyacente y sin dañar los órganos sanos, debido a que sólo funciona al administrar el fotosensibilizador junto con el láser.

Aún queda mucho por descubrir para mejorar la PDT, se requiere encontrar nuevos fotosensibilizadores que sean eficaces y seguros, así como nuevos vehículos que mejoren la eficiencia del tratamiento.

Una estrategia para mejorar la eficiencia del tratamiento es a través del uso de sistemas transportadores, cuyo fin es incrementar, en el interior de la célula, la concentración de fármacos o en este caso particular de rodamina, un fotosensibilizador capaz de inducir daño celular a través de reacciones de transferencia. Recientemente, las lipoproteínas de alta densidad HDL han mostrado ser eficaces en el transporte de fármacos, por lo que es de interés evaluar su potencial como transportadores de rodamina en células de cáncer positivas a SR-B1 para su aplicación en terapia fotodinámica.

## 6 Hipótesis

- Las rHDL son un sistema adecuado para el transporte de rodaminas al interior de las células que expresan el receptor SR-B1.
- Las rodaminas en el interior de la célula al ser irradiadas son potencialmente capaces de producir reacciones de transferencia de electrones y en consecuencia daño celular.
- Las rHDL cargadas con rodamina podrán ser utilizadas como una alternativa para el tratamiento de cáncer en terapia fotodinámica.

## **7 Objetivos**

### **7.1. General**

- Evaluar el potencial de rHDL como sistema de transporte de rodamina en células de cáncer positivas a SR-B1 para su aplicación en terapia fotodinámica.

### **7.2. Específicos**

- Evaluar la ocurrencia y extensión de reacciones de transferencia de Rodaminas 123, 6G y B en ácido fólico por fluorescencia.
- Estimación del coeficiente de partición octanol/agua de las Rodaminas 123, 6G y B
- Sintetizar nanopartículas de rHDL y encapsular rodamina en ellas.
- Caracterizar químicamente las rHDL cargadas con rodamina (UV-Vis, IR, DLS, microscopía de fluorescencia).
- Evaluar la internalización de rodamina en células de cáncer positivas a SR-B1, como células de cáncer de mama de la línea celular T-47D.

## 8 Materiales y métodos

### 8.1 Reactivos y preparación de soluciones

*Caracterización fisicoquímica y determinación de reacciones de transferencia de las rodaminas*

- Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, R8004) [Figura 11].
- Rodamina 6G (Sigma-Aldrich, R4127) [Figura 11].
- Rodamina B (Sigma-Adrich, R6626) [Figura 11].
- Ácido fólico (Sigma-Aldrich, F8758) [Figura 11].
- Octanol
- Soluciones stock: Todas las soluciones stock de rodamina tenían una concentración de 100  $\mu\text{M}$  respectivamente, y el ácido fólico una concentración de 200  $\mu\text{M}$ .

Soluciones de trabajo:

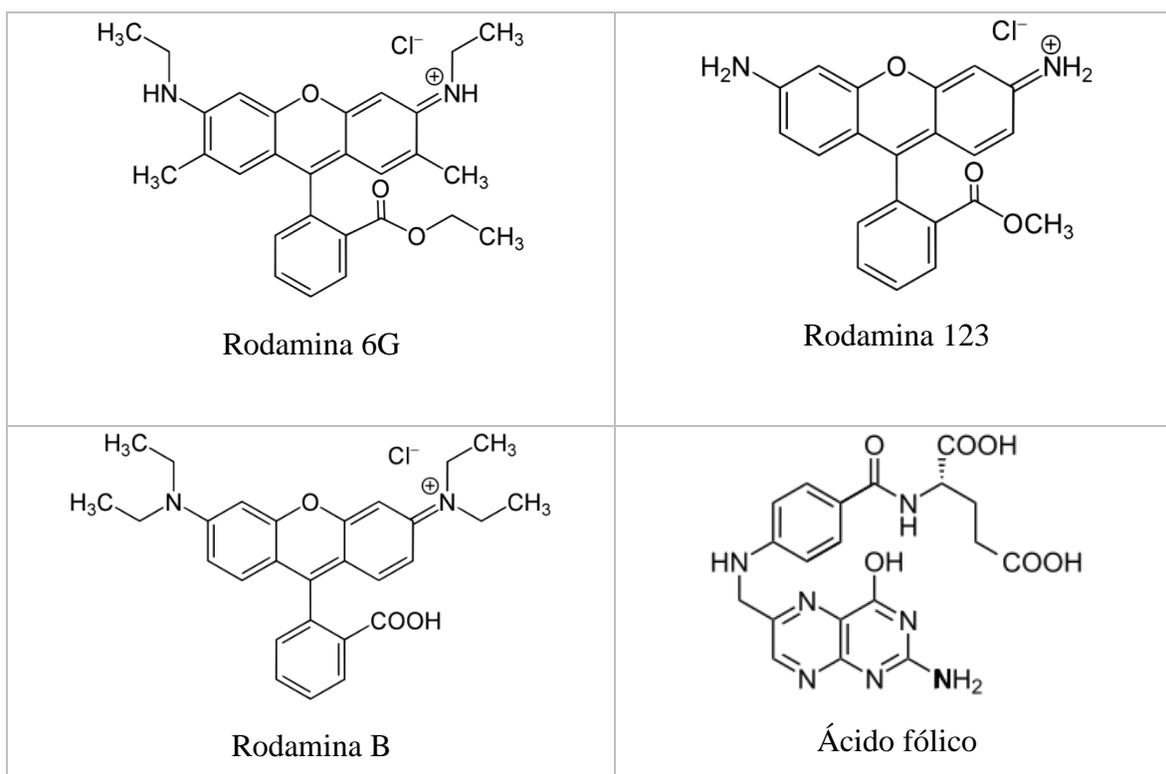
- WS-6G: Rodamina 6G [33  $\mu\text{M}$ ].
- WS-123: Rodamina 123 [33  $\mu\text{M}$ ].
- WS-B: Rodamina B [33  $\mu\text{M}$ ].
- AF: Ácido Fólico [17  $\mu\text{M}$ ].

*Preparación de rHDL:*

- Fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC): 50 mg/ mL. Se preparó en cloroformo y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Colesterol libre (FC): 50 mg/mL. Se preparó en cloroformo y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Éster de colesterol (CE): 20 mg/ mL. Se preparó en cloroformo y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Apo-A1: 1mg.
- Tris- Buffer pH= 8: 10 mM Tris, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA. Se almacenó a  $-4^{\circ}\text{C}$ .
- Rodamina 6G 1 mM: Se preparó en cloroformo y se almacenó a  $-4^{\circ}\text{C}$ .
- Rodamina B 1 mM: Se preparó en cloroformo y se almacenó a  $-4^{\circ}\text{C}$ .
- Rodamina 123 1 mM: Se preparó en cloroformo y se almacenó a  $-4^{\circ}\text{C}$ .
- Desoxicolato de sodio: 100 mg/mL. Se preparó en Tris Buffer y se almacenó a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

*Ensayos in vitro*

- PBS (250 mL): Se preparó disolviendo 2 g de NaCl, 0.05 g de KCl y 0.2775 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, posteriormente se ajustó el pH a 7.4.
- Paraformaldehído: Se disuelven 0.750 g en 25 mL de PBS. Se agrega NaOH gota a gota hasta disolver. Se filtra a 0.22 μm, se enfría y se ajusta el pH a 6.9 con HCl.
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 300 nM en agua desionizada.



*Figura 10 Estructuras moleculares de los reactivos utilizados.*

## 8.2 Instrumentación

- Espectrofluorímetro (Horiba, Fluoromax-3).
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis.
- Láser pulsado Nd:YAG Quantel Qsmart 100.
- IR-FT PerkinElmer System 2000.
- Analizador de tamaño de partícula (DLS) Nanotracs (Nanotracs Wave, modelo MN401, Microtract, FL, EE. UU).

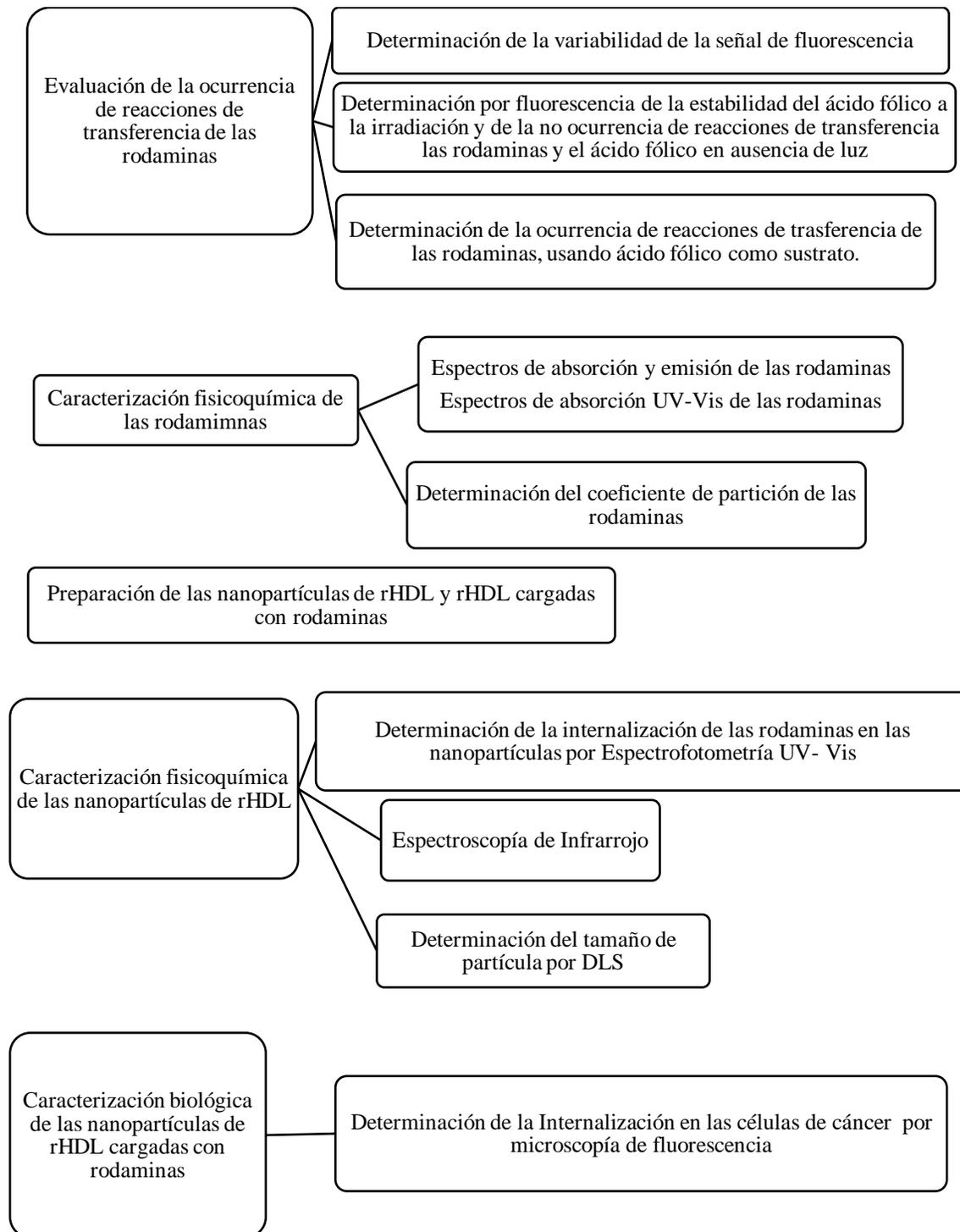
f. Microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse Ti).

### **8.3 Material biológico**

Línea celular: T-47D ATCC (American Type Culture Collection).

## 9 Metodología

### 9.1 Diagrama general del procedimiento



## 9.2 Caracterización fisicoquímica de Rodaminas

### 9.2.1 Determinación del Coeficiente de partición $P_{o/w}$ de las rodaminas.

Para predecir si las rodaminas 6 G, 123 y B se pueden incorporar en las nanopartículas de rHDL y su comportamiento con membranas biológicas, es importante determinar el coeficiente de partición octanol/agua ( $P_{ow}$ ), el cual se determinó teórica y experimentalmente.

#### *Determinación experimental del Coeficiente de partición Octanol/ Agua.*

Se colocaron 4 mL de las soluciones acuosas de rodaminas 6G, B y 123 en tubos de ensayo, y se agregó el mismo volumen de octanol a cada tubo, por triplicado. Se agitaron los tubos hasta obtener una mezcla heterogénea de ambas fases y se mantuvieron en reposo durante 24 horas. Posteriormente, se realizó la lectura de ambas fases en el espectrofotómetro UV- Vis. Para determinar las concentraciones se realizaron curvas patrón con concentraciones conocidas de las rodaminas 123, 6G, y B en agua y octanol [Anexo B1]. Se determinó la concentración de cada rodamina, en ambas fases, mediante regresión lineal, haciendo uso de las curvas estándar y se calculó el coeficiente de partición octanol/agua de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P_{ow} = \log \frac{[\text{octanol}]}{[\text{agua}]}$$

#### *Estimación Teórica del Coeficiente de partición Octanol/ Agua*

Se realizó el cálculo por el método de contribución átomo fragmento, según la relación cuantitativa estructura actividad (QSAR) de las moléculas de rodaminas, [Figura 38, Anexo B2] (79) y la siguiente ecuación:

$$\log P = \sum (f_i n_i) + \sum (c_j n_j) + 0.229$$

Dónde  $\sum (f_i n_i)$  es la sumatoria de  $f_i$  (el coeficiente para cada fragmento o grupo funcional), por  $n_i$  (el número de veces que el fragmento aparece en la molécula),  $c_j n_j$  son el factor de corrección y su frecuencia respectivamente y 0.229 es constante.

## Rodamina 6G

<b>Tabla 4 Determinación teórica de Log P, Rod 6G</b>			
Fragmento	$f_k$	$n_k$	Valor
-CH <sub>3</sub>	0.5473	5	2.7365
-CH <sub>2</sub> -	0.4911	3	1.4733
C <sub>ar</sub>	0.2940	19	5.586
O <sub>ar</sub>	-0.0423	1	-0.0423
ar-C(=O)O-	-0.7121	1	-0.7121
ar-NH-CH <sub>3</sub>	-0.9170	1	-0.9170
=N=	-6.6	1	-6.6
			0.229
Log P=			1.7534

## Rodamina B

<b>Tabla 5 Determinación teórica de Log P, Rod B</b>			
Fragmento	$f_k$	$n_k$	Valor
-CH <sub>3</sub>	0.5473	4	2.1892
-CH <sub>2</sub> -	0.4911	4	1.9644
C <sub>ar</sub>	0.2940	19	5.586
O <sub>ar</sub>	-0.0423	1	-0.0423
ar-C(=O)OH	-0.1186	1	-0.1186
>N<	-6.6	1	-6.6
ar-N<	-0.9170	1	-0.9170
			0.229
		Log P=	2.2907

## Rodamina 123

<b>Tabla 6 Determinación teórica de Log P, Rod 123</b>			
Fragmento	$f_k$	$n_k$	Valor
-CH <sub>3</sub>	0.5473	1	0.5473
C <sub>ar</sub>	0.2940	19	5.586
O <sub>ar</sub>	-0.0423	1	-0.0423
ar-C(=O)O-	-0.7121	1	-0.7121
>N<	-6.6	1	-6.6
ar-NH <sub>2</sub>	-0.9170	1	-0.9170
			0.229
		Log P=	-1.9091

**9.2.2 Espectrofotometría UV-Vis**

Se realizaron soluciones acuosas de las rodaminas Rod 123, Rod 6G y Rod B, se tomaron sus espectros de absorción utilizando un espectrofotómetro UV- vis Thermo Fisher Scientific Genesys 10S y una celda de cuarzo con dos caras transparentes, 1 cm de paso óptico y 3 mL de volumen. Los espectros fueron corridos en un rango de longitudes de onda que van desde los 200 a los 800 nm, con intervalos de 0.5 nm y a velocidad media.

**9.2.3 Espectrometría de fluorescencia**

A las soluciones de compuestos individuales de Rod 123, Rod 6G, Rod B, y AF, además de las mezclas rodaminas/ácido fólico (AF-Rod6G, AF-RodB, AF-Rod123), se les determinó su espectro de excitación, y emisión, utilizando un espectrofluorímetro (Horiba, Fluoromax-3) y una cubeta de cuarzo de 4 caras transparentes, de 1 cm de paso óptico y 3 mL de volumen. Los espectros de excitación se registraron con una resolución de 2 nm, tiempo de integración de 0.5 s y barridos de 0.5 nm. Los espectros de emisión se registraron con una resolución de 2 nm, tiempo de integración de 0.5 s y barridos de 2 nm. Las condiciones de registro de los espectros de excitación y emisión para cada solución se muestran en la *tabla 7*.

**Tabla 7 Condiciones de registro de los espectros de excitación y emisión por fluorescencia.**

	Espectros de excitación		Espectros de emisión	
	$\lambda_{emisión}$	Rango barrido	$\lambda_{excitación}$	Rango barrido
Rod 6G	555 nm	(250-550) nm	350 nm	(370-650) nm
Rod 123	560 nm			
Rod B	580 nm			
AF	450 nm	(250-400) nm		
WS-6G, WS-123, WS-B	-	-		

### 9.3 Estimación del potencial fotosensibilizador de las rodaminas

#### 9.3.1 Determinación de la variabilidad de la señal de fluorescencia

A las soluciones AF-Rod6G, AF-Rod123 y AF-RodB sin irradiar, se le registró 16 veces el espectro de emisión (con excitación 350 nm). Los 16 valores obtenidos a 450 nm (máxima señal de emisión del ácido fólico) con cada solución fueron normalizados con respecto al máximo valor a esa longitud de onda. Lo mismo se hizo con los 16 valores de cada solución de rodamina a la longitud de onda máxima de cada una, 558 nm (Rod 6G), 526 nm (Rod 123), 584 nm (Rod B). A partir del promedio de la señal normalizada y de la desviación estándar de este promedio, se calculó utilizando la ecuación del límite de detección ( $\bar{x} \pm 3SD$ ) el rango de señales que se consideran como variación aleatoria de las señales promedio. Es decir, se considerará que hay cambio en la señal de emisión fluorescente si la señal normalizada obtenida después de la irradiación con el láser está fuera del rango  $(\bar{x} - 3SD) < x < (\bar{x} + 3SD)$ .

#### 9.3.2 Determinación por fluorescencia de la estabilidad del ácido fólico a la irradiación con 532 nm y de la no ocurrencia de reacciones entre las rodaminas y el ácido fólico en ausencia de luz.

La solución de AF fue irradiada durante 60 min con intervalos de 10 min de irradiación con un láser pulsado Nd:YAG a 532 nm, a una frecuencia de 10 Hz y una potencia impartida 3 mW/cm<sup>2</sup>. Al término de cada irradiación se determinó el espectro de emisión de fluorescencia. La longitud de onda de excitación en todos los casos fue 350 nm. Cada experimento se repitió 3 veces.

Paralelamente se tomaron las soluciones WS-123, WS-6G y WS-B sin irradiar y se les registró el espectro de emisión de fluorescencia cada 10 min hasta completar 60 min. La

longitud de onda de excitación en todos los casos fue 350 nm. Cada experimento se repitió 3 veces.

### **9.3.3 Determinación de la ocurrencia de reacciones de transferencias en la Rodamina 6G, Rodamina 123 y Rodamina B por fluorescencia utilizando ácido fólico como sustrato.**

Las soluciones WS-123, WS-6G y WS-B se irradiaron durante 60 min con intervalos de 10 min por irradiación con un láser pulsado Nd-YAG a 532 nm, a una frecuencia de 10 Hz y una potencia impartida  $3 \text{ mW/cm}^2$ . Al término de cada irradiación se determinó el espectro de emisión de fluorescencia. La longitud de onda de excitación en todos los casos fue 350 nm. Cada experimento se repitió 3 veces.

Para el conjunto de espectros de emisión por cada solución WS los valores de fluorescencia a los diferentes tiempos se normalizaron con respecto al máximo de emisión de la señal de rodamina correspondiente al tiempo  $t = 0$  min. De igual manera, se procedió con las señales a 450 nm de los diferentes tiempos. Estas se normalizaron con respecto al tiempo  $t = 0$  min. Dado que el experimento se realizó por triplicado, con los valores normalizados promedios obtenidos de emisión a 450 nm a los diferentes tiempos se construyó una gráfica de Intensidad de fluorescencia vs tiempo.

## **9.4 Preparación de rHDL**

### *Método 1*

Se colocaron 300  $\mu\text{L}$  de EYPC, 7  $\mu\text{L}$  de FC y 7.5  $\mu\text{L}$  de CE en un vial de cristal, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de rodaminas 6G, 123 y B 1 mM, se agitó en vórtex y se calentó a  $30^\circ\text{C}$  de manera horizontal para la evaporación del cloroformo. Se añadió 1 mg de apo A-1, 140  $\mu\text{L}$  de desoxicolato de sodio y suficiente tris buffer para completar 2 mL, se agitó el vial en vortex y se mantuvo en agitación a  $-4^\circ\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente, se realizó la diálisis colocando el contenido del vial en una membrana de celulosa de 14kDa sumergida en agua destilada y manteniéndolo en agitación durante 24 horas.

## Método 2

Se realizaron diluciones 1:5 de las soluciones de EYPC, FC Y CE utilizadas en el método 1. Se colocaron de estas soluciones: 300  $\mu\text{L}$  de EYPC, 7  $\mu\text{L}$  de FC y 7.5  $\mu\text{L}$  de CE diluidas en un matraz de cristal, que se encontraba dentro de un sonicador con agua a una temperatura inferior a 4°C, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de rodaminas (6G, 123 y B) 1 mM y se conectó al vacío para la extracción del cloroformo, como lo muestra la *figura 11*.



*Figura 11 Dispositivo para la preparación de rHDL*

El dispositivo se mantuvo en agitación, con la temperatura constante hasta la evaporación completa del cloroformo, resultando en una película de lípidos adherida a la superficie del matraz.

Después, se incorporó 1 mg de Apo-A1 por goteo, manteniendo el matraz dentro del sonicador a una temperatura inferior a 4°C, se agregaron 140  $\mu\text{L}$  de desoxicolato de sodio y 760  $\mu\text{L}$  de tris buffer y una vez incorporadas las soluciones acuosas, se agitó en vórtex hasta conseguir que los lípidos se desprendieran del matraz y se consiguiera la mezcla de la fase acuosa con los lípidos.

Finalmente, se utilizó una membrana de celulosa de 14 kDa para dializar las NPs y así eliminar el exceso de desoxicolato de sodio y de las rodaminas que no se internalizaron en las NPs así como cualquier otro exceso reactivos [Figura 12].



*Figura 12 Diálisis de rHDL-Rodaminas*

## 9.5 Caracterización fisicoquímica de rHDL

### 9.5.1 UV-Vis

Se tomó el espectro de absorción de las nanopartículas cargadas con rodaminas, rHDL-Rod123, rHDL-Rod6G y rHDL-RodB en el espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis en un rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm, con intervalo de 0.5 nm a velocidad media.

Para la determinación de la concentración de rodaminas en las nanopartículas de rHDL se prepararon diluciones con concentraciones conocidas de rodaminas 6G, B y 123. Se obtuvo el espectro de absorción de cada solución en el espectrofotómetro y se determinó la concentración de rodaminas en las nanopartículas de rHDL, según  $\lambda_{\text{max}}$ , empleando una curva estándar para las rodaminas Rod 6G ( $r^2:0.9995$ ) y Rod B ( $r^2: 0.9998$ ) y usando el coeficiente de extinción molar para Rod 123 ( $\epsilon= 85200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $l=1\text{cm}$ ) [Anexo C].

### 9.5.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El tamaño de partícula (dispersión de luz dinámica, DLS) se midió con el analizador Nanotracs (Nanotracs Wave, modelo MN401, Microtract, FL, EE. UU). Las muestras se analizaron usando agua grado inyectable como diluyente. Todas las mediciones se realizaron con una

longitud de onda de 657 nm a 20 ° C, corriente de 15,79 mA, campo eléctrico de 14,35 V / cm y tiempo de muestreo de 128  $\mu$ s.

### 9.5.3 Espectrometría Infrarroja

Los espectros IR de las muestras deshidratadas se adquirieron a través de un espectrómetro PerkinElmer System 2000 con una plataforma ATR (Pike Technologies), mediante la aplicación de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FT-IR). Resolución 0.4  $\text{cm}^{-1}$ , 40 escaneos y un rango operativo de 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ .

## 9.6 Caracterización biológica de rHDL

*Cultivo celular.* La línea celular T47D se obtuvo de ATCC (American Type Culture Collection) cumpliendo con todas las normas vigentes de bioseguridad para su adquisición. Las células T47D se cultivaron a 37 °C, en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y 100 % de humedad, en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Adrich Co) suplementado con suero fetal bovino al 10%, anfotericina B y antibióticos (estreptomina y penicilina) al 1%.

### 9.6.1 Evaluación de la captación celular de rHDL-rodaminas y rodaminas por microscopía de fluorescencia

Para evaluar la captación celular de los sistemas rHDL-Rod6G, rHDL-Rod123 y rHDL-Rod B por microscopía de fluorescencia, se colocaron 10,000 células de T47D en portaobjetos de cámara y se dejaron incubar por 24 h a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Posterior al tiempo de incubación, se colocaron 45  $\mu$ L de las soluciones rHDL-Rod6G, rHDL-Rod123 y rHDL-RodB y, se incubaron a 37°C durante una hora. Se retiró el medio, se hicieron lavados con PBS 1x y se fijaron las células con paraformaldehído durante 15 min a temperatura ambiente. Las preparaciones se enjuagaron 2 veces con PBS 1x frío. Se agregó el marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol o DAPI (300 nM) y se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Se lavaron nuevamente con PBS 1x frío. Se colocó una gota de medio de montaje a cada portaobjetos, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con barniz transparente. Con fines de comparación también se prepararon portaobjetos con rodaminas Rod 6G, Rod 123 y Rod B (1 mM).

Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse Ti, filtro Texas con tiempo de exposición de 300 ms, ganancia de 3, factor de conversión 2x. Se observaron con el objetivo de 60x, utilizando aceite de inmersión.

## 10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.1 Caracterización fisicoquímica de las rodaminas

#### 10.1.1 Coeficiente de partición de las rodaminas

La *tabla 9* muestra los resultados de la determinación de las rodaminas 6G, 123 y B determinado experimental y teóricamente.

**Tabla 7 Coeficiente de reparto de las rodaminas**

Rodamina	Experimental		Teórico	
	P	Log P	P	Log P
6G	3.5497	0.5502	56.6761	1.7534
B	5.6298	0.7505	195.2989	2.2907
123	1.7316	0.2384	81.1148	1.9091

El coeficiente de partición o coeficiente de reparto es un parámetro fisicoquímico que indica de manera cuantitativa, el grado de hidrofiliidad o hidrofobicidad de una sustancia y permite conocer su tendencia a disolverse en solventes polares o apolares. Los resultados obtenidos experimentalmente y los estimados mediante el modelo QSPR, difieren en gran medida, ambas son estimaciones aproximadas y la variación podría deberse a diversos factores.

En primer lugar, se requiere una mayor cantidad de solventes para realizar la estimación experimental del coeficiente de reparto por el método del frasco de agitación de manera precisa, lo que no fue posible en este experimento, por lo que los resultados obtenidos podrían no ser tan confiables. Por otro lado, la predicción teórica del Log P por el método de relación: estructura- propiedades se trata únicamente de una aproximación meramente teórica y no corresponde al valor real.

Para los objetivos de esta investigación no se considera necesario hacer una determinación precisa de los coeficientes de reparto de las rodaminas, basta con analizar la relación entre sus solubilidades en un solvente polar y otro no polar para predecir su compatibilidad con las NPs de rHDL. Al cuantificarse una mayor proporción de rodaminas en la fase octanólica que en la fase acuosa se puede inferir que son solubles en solventes apolares y serán internalizadas en las rHDL, ya que estas son nanopartículas lipídicas.

La solubilidad en agua (hidrosolubilidad) es el primer requisito para que un fármaco sea transportado a la superficie de la membrana, pero la difusión a través de la misma, con un interior lipídico depende de su liposolubilidad. Por tanto, el grado de difusión de una molécula neutra dependerá, no sólo del gradiente de concentración a cada lado de la membrana, sino también del coeficiente de reparto lípido/ agua del fármaco. En general, coeficientes de reparto altos indican una alta afinidad por la membrana lipídica y una mayor difusión al interior de la misma (80).

El n-octanol es un compuesto orgánico que simula el material lipídico que se encuentra en las membranas celulares de animales y plantas, por lo que el coeficiente de partición en el sistema bifásico octanol- agua es una buena medida de su hidrofobicidad y nos permite inferir cómo se comportará en los fluidos biológicos del organismo y la distribución que presentará esa sustancia en el citosol y las membranas lipídicas de células animales y plantas.

No hay parámetros que establezcan con exactitud si una sustancia es hidrofílica o hidrofóbica de acuerdo con su coeficiente de partición. Sin embargo, si  $P$  es mayor a 1, significa que la concentración del soluto en la fracción octanólica es mayor que en la fracción acuosa y por lo tanto es mayormente hidrofóbico.

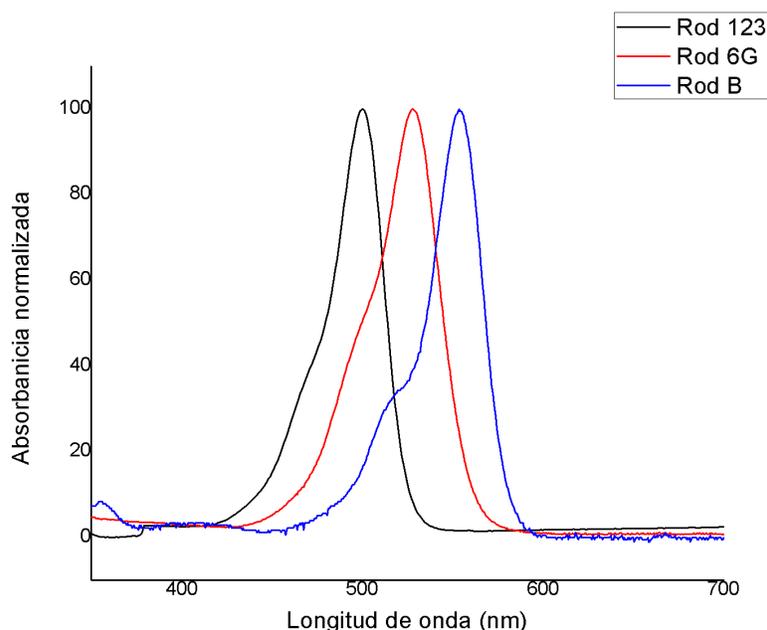
Las sustancias con coeficientes de partición altos ( $P > 10$ ) se consideran muy hidrófobas, mientras que las sustancias con coeficientes de partición bajos ( $P < 10$ ) se consideran relativamente hidrofílicas (81).

Los coeficientes de partición de las rodaminas 123, 6G y B muestran que son compuestos hidrófilos que también presentan un carácter hidrófobo ya que los valores determinados de  $P$  mayores a 1, lo que indica que la concentración de rodamina en la fase octanólica fue mayor que en la fase acuosa.

Se puede considerar que las tres rodaminas tienen un comportamiento anfifílico, debido a que se disuelven totalmente, en agua como en disolventes no polares, como es el octanol y el cloroformo.

Las tres rodaminas tienen coeficientes de partición similares, pero el de la rodamina B es mayor, por lo que se espera que, de las tres rodaminas, una mayor cantidad de esta rodamina entre en las nanopartículas de rHDL.

### 10.1.2 Espectrometría UV-Vis de las rodaminas



*Figura 13 Espectros de absorción UV- Vis de las rodaminas 123, 6G y B*

Los espectros de absorción de las rodaminas Rod-123, Rod-6G y Rod B, están determinados, cada uno, por un sistema simétrico de electrones pi extendido sobre la región del diaminoxantano presente en las 3 moléculas [Figura 10]. De acuerdo con la figura 13, los máximos de absorción de las rodaminas Rod 123, Rod 6G y Rod B se encuentran en longitudes de onda máxima ( $\lambda_{\max}$ ) de 500, 527.7 y 553.5 nm respectivamente, en medio acuoso.

Las bandas de absorción de las rodaminas Rod 123, Rod 6G y Rod B aparecen en la región visible, con longitudes de onda entre los 500 y 554 nm, encontrándose en la región que va desde el verde hasta el amarillo en el espectro de luz visible. Estas bandas se interpretan en términos de excitación  $\pi-\pi^*$ , es decir, la transición electrónica ocurre entre los orbitales pi enlazantes y pi antienlazantes de las moléculas.

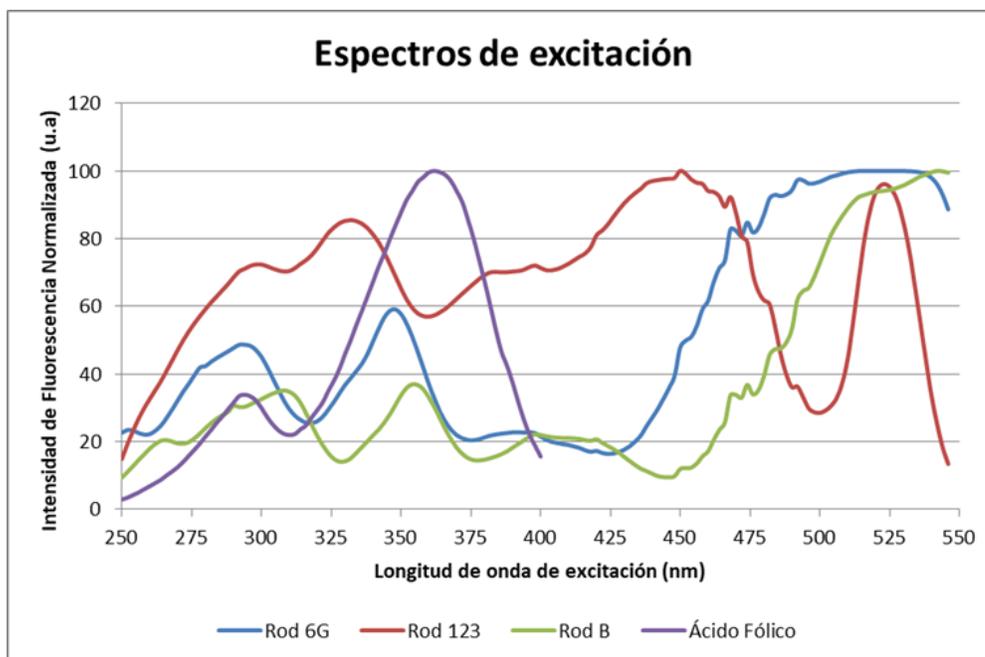
Como se mencionó anteriormente, es deseable que los fotosensibilizadores absorban luz en la región del rojo que se encuentra alrededor de 700 nm, porque las moléculas con grupos cromóforos, como el grupo prostético hemo de la hemoglobina presente en la sangre,

absorben la luz y reducen la intensidad de la luz que penetra en el tejido. Las rodaminas Rod 123, Rod 6G y Rod B no tienen esta característica, pero se ha demostrado que producen reacciones de transferencia de electrones, por un mecanismo que no ha sido estudiado a la perfección (69).

Estas moléculas requieren poca energía para ser excitadas a su estado singlete, ya que se sabe que la energía necesaria para excitar una molécula es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz absorbida y las rodaminas absorben en longitudes de onda relativamente altas, esto podrá ser demostrado en los siguientes experimentos.

### 10.1.3 Espectros de excitación y emisión de las rodaminas.

Los espectros característicos de excitación y emisión registrados de estos compuestos a partir de las soluciones Rod 6G, Rod 123, Rod B y FA se muestran en las *Figuras 14 y 15* respectivamente.



*Figura 14 Espectros normalizados de excitación de: Rod 6G, Rod 123, Rod B y AF.*

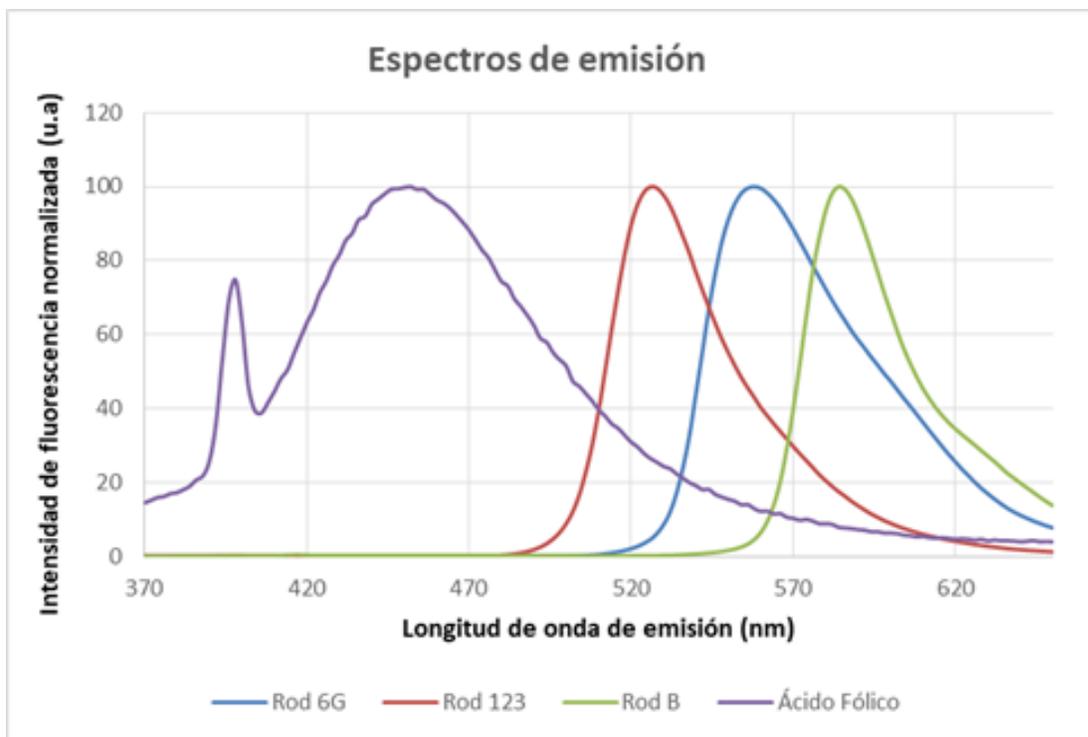


Figura 15 Espectros normalizados de emisión de Rodamina 6G, Rodamina 123, Rodamina B y Ácido fólico

Los parámetros espectrales característicos de cada compuesto, así como el comportamiento de la excitación y emisión de las rodaminas a 532 nm se muestra en la Tabla 9.

<i>Tabla 8 Longitudes de onda características de los espectros de excitación, emisión y absorción.</i>					
Solución	$\lambda_{\max}$ (nm)		EE %* a 532 nm	$\lambda_{\max}$ (nm) Absorción	EA %‡ a 532 nm
	Excitación	Emisión			
Rod6G	524	558	99.9	525	97.1
Rod123	450	526	76.6	499	6.71
RodB	542	584	96.6	555	49.5
Ácido fólico	362	448	No tiene	No tiene	No tiene

\*: EE %: Eficiencia de excitación  
‡: EA %: Eficiencia de absorción

La rodamina 6G, rodamina 123 y rodamina B tienen una excitación correspondiente al 100%, 77% y 97% del máximo de excitación cuando son irradiadas con 532 nm. La tabla 2 muestra que paralelamente al proceso de excitación de las rodaminas hay absorción de la luz durante la irradiación. A 532 nm la rodamina 6G absorbe un 97% de su máxima absorción, la rodamina B un 50% y la rodamina 123 solo absorbe un 7%, por tanto, el proceso de absorción de la luz de las rodaminas compite con el de excitación, pero no en la misma extensión en todas ellas.

El máximo de excitación del ácido fólico se encuentra en 365 nm y el de emisión en 450 nm, por lo que no presenta excitación ni emisión de la luz a 532 nm y no compite con las rodaminas por la luz de 532 nm. Tampoco tiene una elevada absorción de la luz a 532 nm, por lo tanto, desde el punto de vista óptico es una buena molécula modelo para simular el sustrato de una reacción de transferencia al irradiarse con 532 nm pues prácticamente no interactúa con la luz a esa longitud de onda.

## 10.2 Estimación del potencial fotosensibilizador de las rodaminas

### 10.2.1 Determinación de la variabilidad de la señal de fluorescencia

La *tabla 10* muestra la variabilidad de la señal de fluorescencia a las longitudes de ondas correspondientes a los máximos de emisión de las soluciones de rodaminas y de ácido fólico.

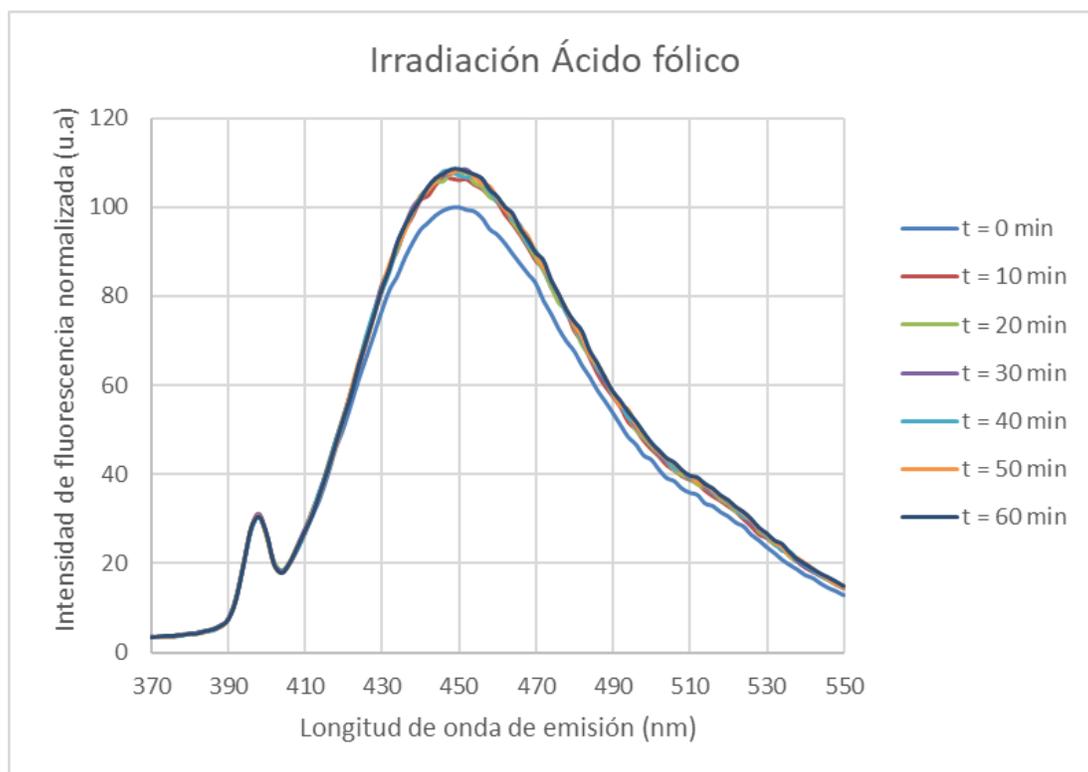
<i>Tabla 9 Variabilidad de la señal de emisión de fluorescencia a los máximos de emisión.</i>							
Solución	$\lambda_{emi}$ (nm)	N	$\bar{X}$ (%)	SD (%)	$(\bar{X} - 3SD)$ (%)	$(\bar{X} + 3SD)$ (%)	Tolerancia $\pm 3SD$ (%)
WSI-6G	558	16	99.5	0.6	97.7	101.3	1.8
WSI-123	526	16	97.0	2.0	91.0	103.0	6
WSI-B	584	16	99.0	1.0	96.0	102.0	3
Ácido fólico	448	48	98.0	1.0	95.0	101.0	3

Una vez irradiadas las soluciones WS-6G, WS-123 y WS-B a diferentes tiempos, y de normalizar los valores de los máximos de emisión correspondiente con respecto al valor del

máximo al tiempo  $t = 0$  min, se considerará que la señal al tiempo  $t = x$  min es diferente de la señal  $t = 0$  min si la misma se encuentra fuera de los límites de tolerancia indicados en la tabla 3.

### 10.2.2 Determinación por fluorescencia de la estabilidad del ácido fólico a la irradiación con 532 nm y de la no ocurrencia de reacciones entre las rodaminas y el ácido fólico en ausencia de luz.

Antes de irradiar las soluciones WS-6G, WS-123 y WS-B era necesario determinar si el ácido fólico era degradado por la irradiación con el láser. La *figura 16* muestra los espectros de emisión de ácido fólico  $17 \mu\text{M}$ , registrados después de la irradiación a diferentes tiempos con un láser pulsado Nd:YAG a 532 nm. Frecuencia de repetición 10 Hz y energía impartida  $3 \text{ mW}/\text{cm}^2$ .



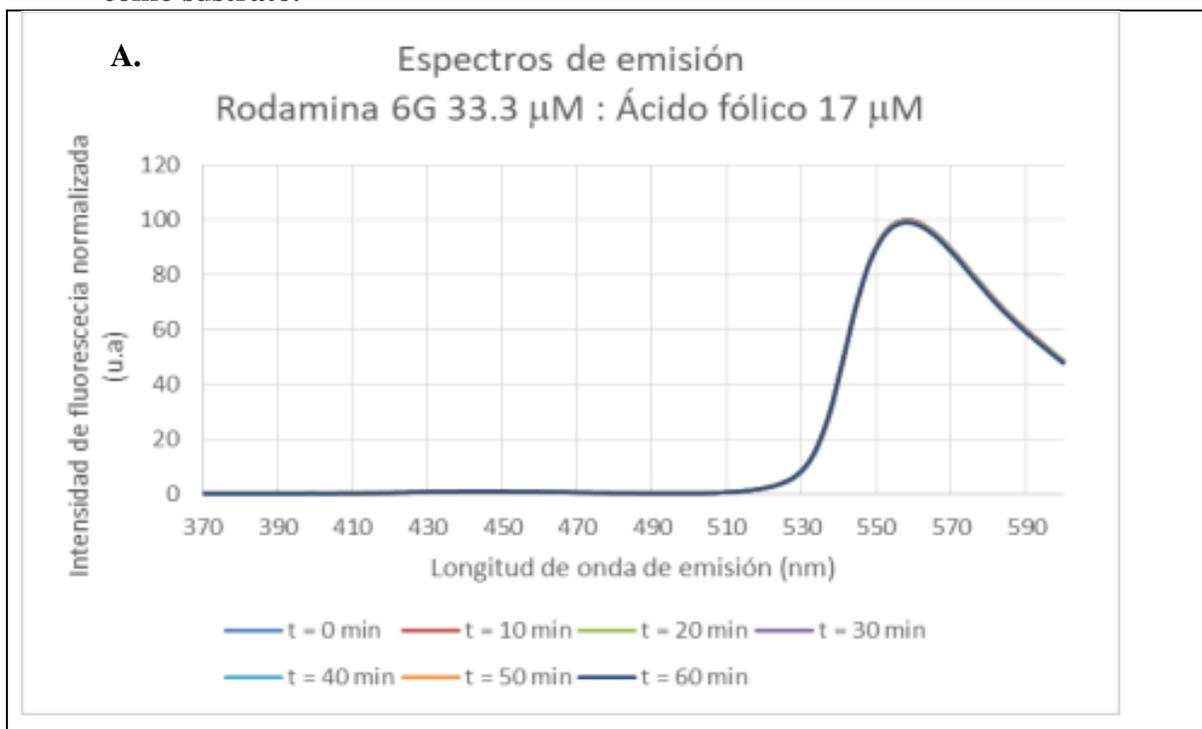
*Figura 16 Espectros de emisión de ácido fólico*

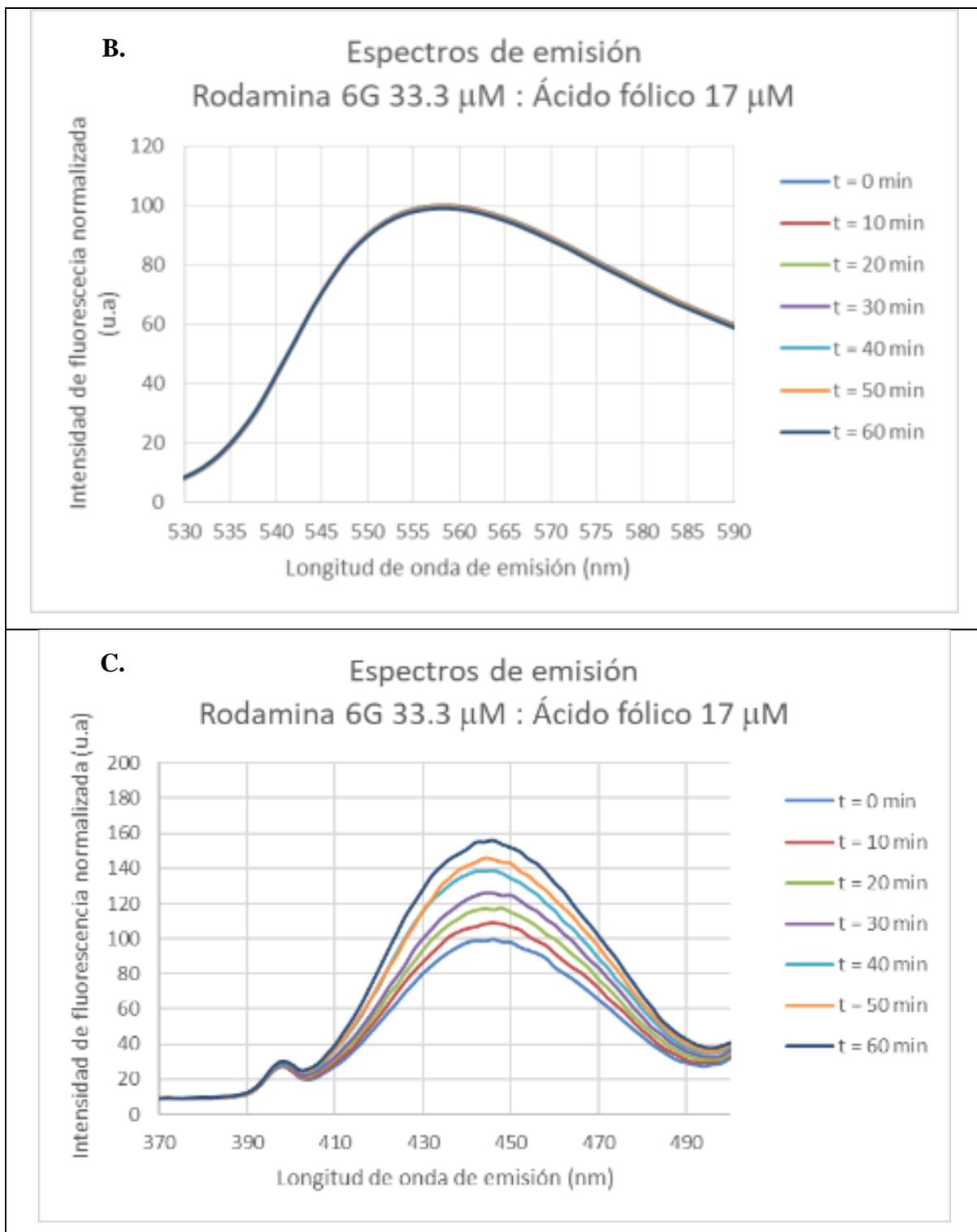
La *figura 16* muestra que entre el tiempo  $t = 0$  min y el resto de los tiempos de irradiación si hubo un ligero cambio (de 100% para  $t = 0$  min a 106-108 % en el resto de los tiempos), pues la tolerancia para considerar que no hay cambio en la señal de ácido fólico es de 3 unidades

% según se indica en la *tabla 10*. Sin embargo, a partir de los 10 min la señal de emisión a 450 nm del ácido fólico (excitación en 350 nm) se estabilizó. Esto quiere decir que, la luz láser por sí sola no provoca ruptura en el ácido fólico.

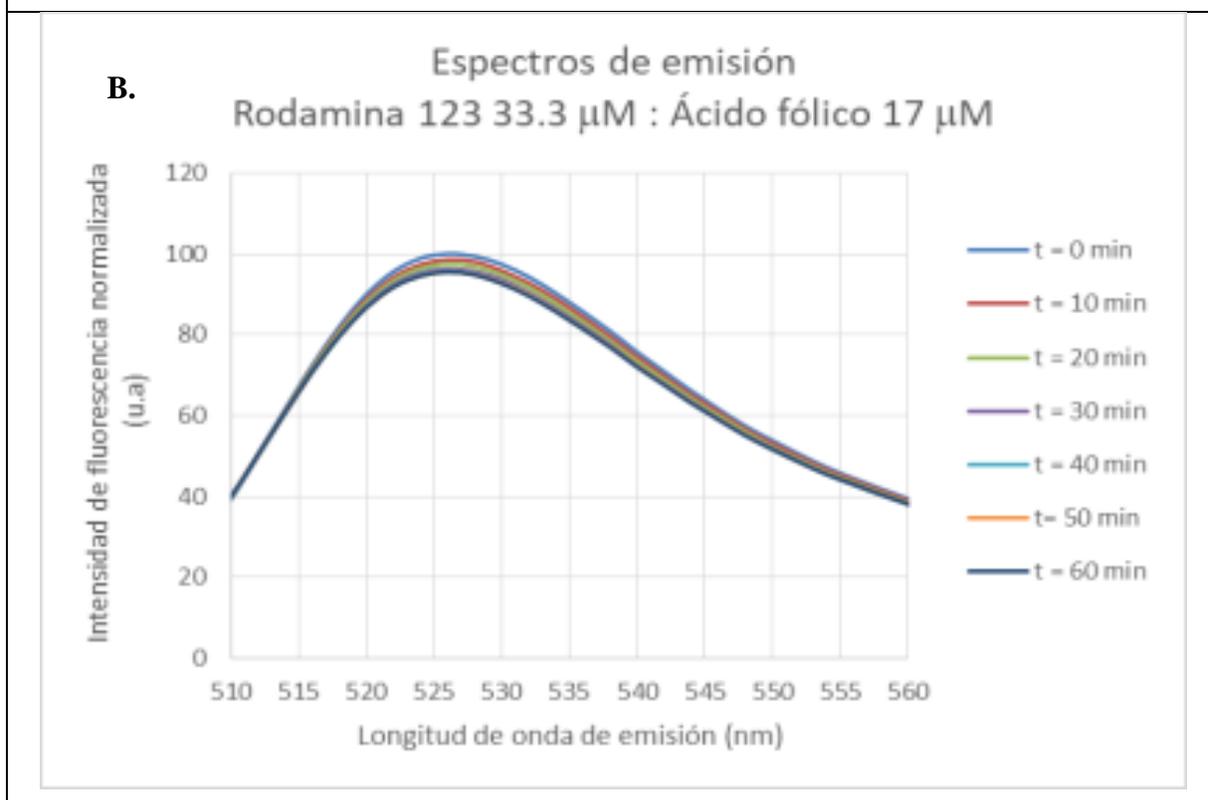
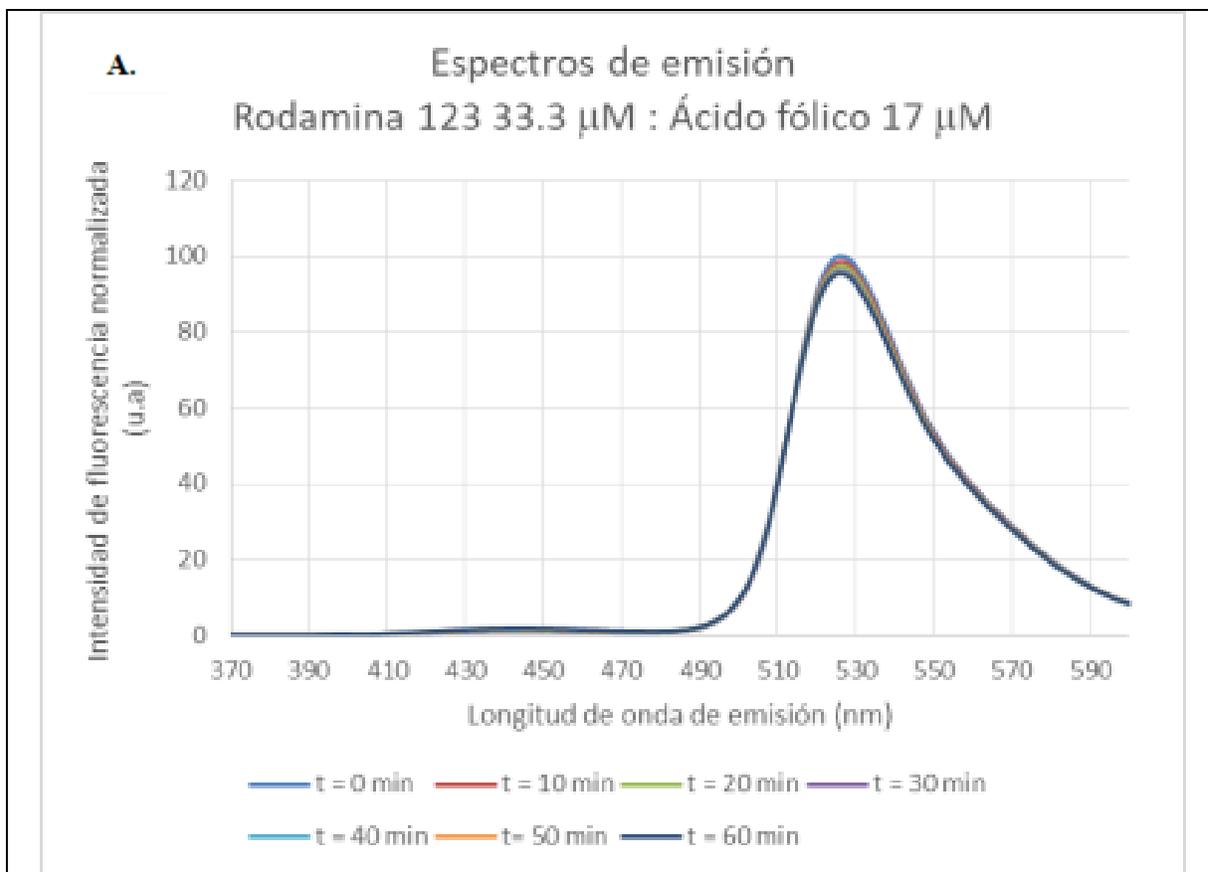
En un experimento similar que no incluyó la irradiación con el láser, a las soluciones WS-6G, WS-123 y WS-B se le registraron los espectros de emisión en los mismos tiempos y condiciones que los mostrados en la *Figura 16* (datos no mostrados). El comportamiento obtenido fue el mismo al de la figura 2, no hubo incremento en la señal de emisión del ácido fólico a 450 nm. Por lo tanto, en ausencia del láser, no hay interacción entre las rodaminas y el ácido fólico. Estos dos resultados indican que, cualquier incremento en la señal de fluorescencia de emisión a 450 nm (excitación 350 nm) que se detecte posterior a la irradiación de las soluciones WS-6G, WS-123 y WS-B con luz láser a 532 nm será debido al rompimiento de la molécula de ácido fólico como resultado de reacciones de transferencia que ocurren cuando las rodaminas son excitadas por la luz.

### 10.2.3 Determinación de la ocurrencia de reacciones de trasferencias en la Rodamina 6G, Rodamina 123 y Rodamina B por fluorescencia utilizando ácido fólico como sustrato.





*Figura 17 Espectros de fluorescencia obtenidos después de la irradiación con 532 nm a diferentes tiempos de de WSI-6G normalizados con respecto al valor máximo de fluorescencia obtenido al tiempo  $t = 0$  min. A. espectro de emisión completo B. Región correspondiente a las emisiones de las rodaminas C. Región correspondiente a la emisión del ácido fólico.*



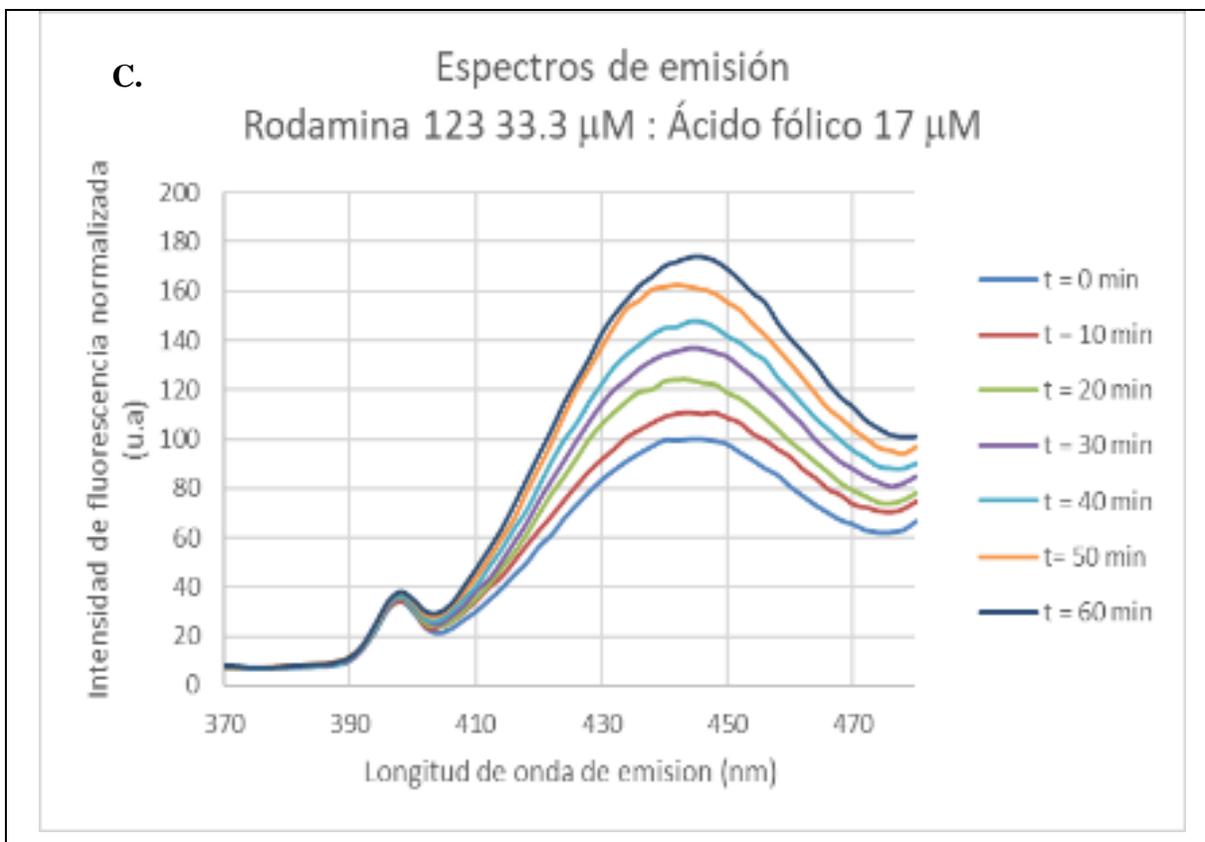
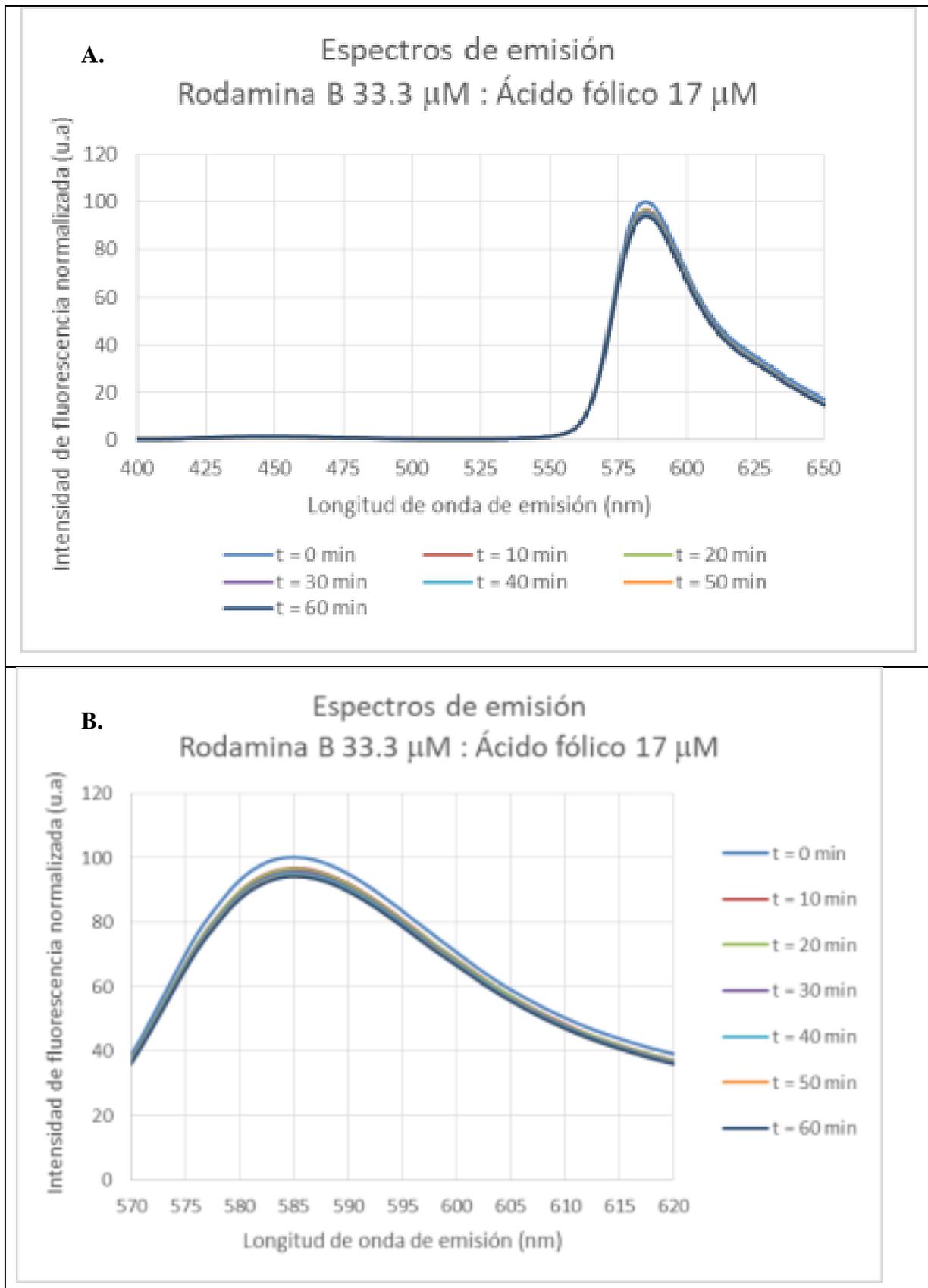
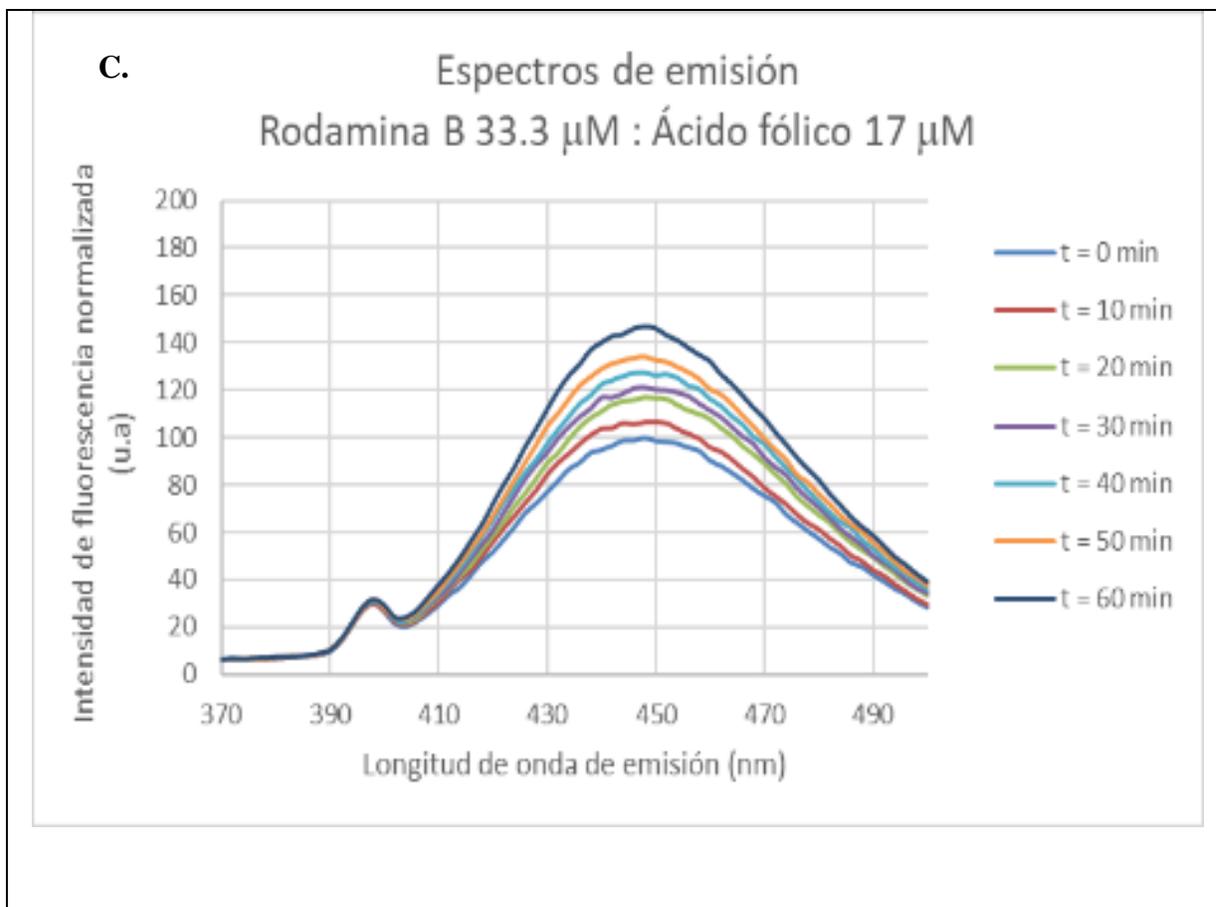


Figura 18 Espectros de fluorescencia obtenidos después de la irradiación con 532 nm a diferentes tiempos de de WSI-123 normalizados con respecto al valor máximo de fluorescencia obtenido al tiempo  $t = 0$  min. A. espectro de emisión completo B. Región correspondiente a las emisiones de las rodaminas C. Región correspondiente a la emisión del ácido fólico.





*Figura 19 Espectros de fluorescencia obtenidos después de la irradiación con 532 nm a diferentes tiempos de de WSI-B normalizados con respecto al valor máximo de fluorescencia obtenido al tiempo  $t = 0$  min. A. espectro de emisión completo B. Región correspondiente a las emisiones de las rodaminas C. Región correspondiente a la emisión del ácido fólico.*

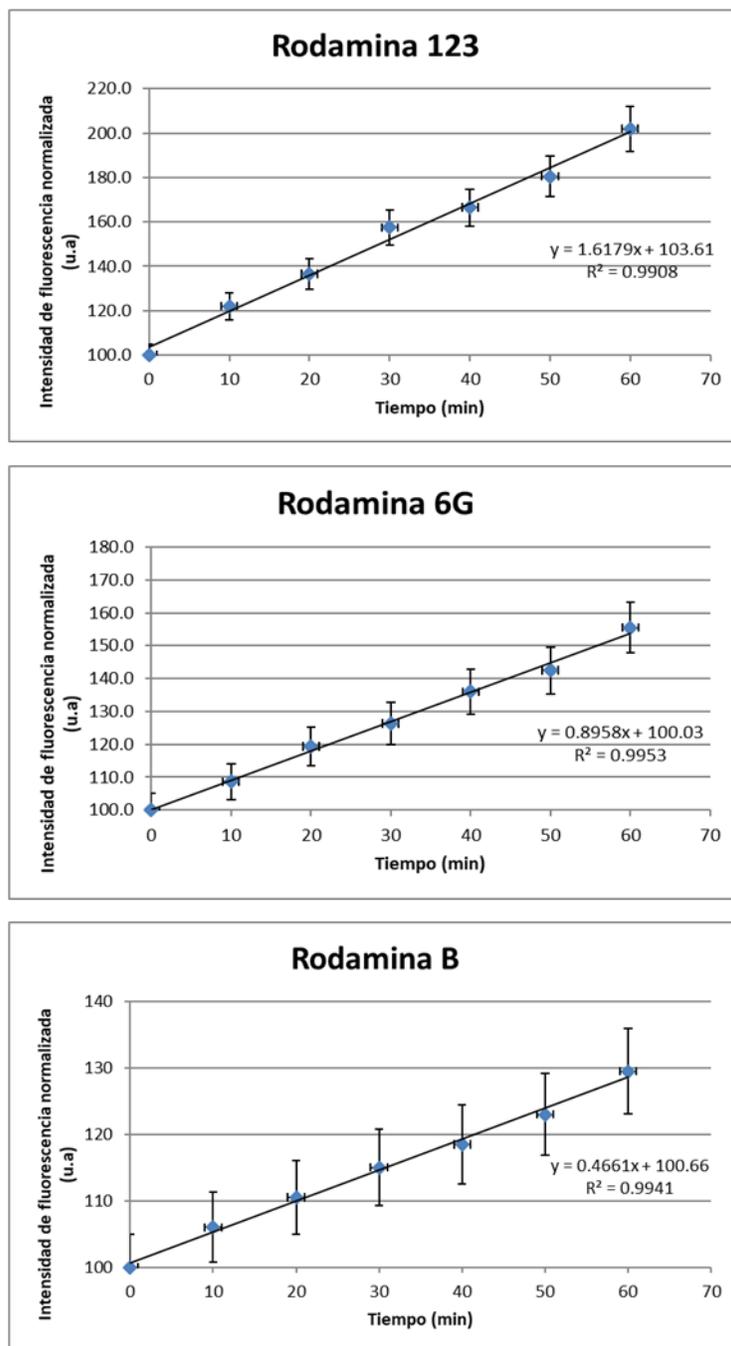
Los espectros denotados como A. de las *figuras 17, 18 y 19* corresponden al espectro de emisión completo de las soluciones WSI-6G, WSI-123 y WSI-B normalizados con respecto al valor máximo de fluorescencia obtenido al tiempo  $t = 0$  min. Los espectros denotados como B muestran solo la región correspondiente a las emisiones de las rodaminas y los espectros inferiores muestran solo la región correspondiente a la emisión del ácido fólico.

Los valores del máximo de fluorescencia de la Rodamina 6G (556 nm) en todos los tiempos se mantuvieron en el intervalo (98.9-100) % el cual está dentro de la variabilidad aleatoria instrumental ( $\pm 1.8\%$ ) para esa longitud de onda. En el caso de la Rodamina 123 los valores máximos de fluorescencia a 526 nm se mantuvieron en el rango (95.5-100) % los cuales están también dentro de la variabilidad aleatoria instrumental para esta longitud de onda ( $\pm 7\%$ ).

Finalmente, en el caso de la Rodamina B, los valores del máximo a 584 nm se encuentran en el rango (93.9-100) % y la variabilidad instrumental es ( $\pm 3.3\%$ ). Esto indica que en el caso de la Rodamina B hubo aproximadamente un 6% de degradación después de 1 h de irradiación. Estos resultados demuestran la estabilidad de las rodaminas a la irradiación con luz de 532 nm.

En el caso del ácido fólico, los rangos en los que se incrementaron los valores de la señal de fluorescencia fueron (100-156) %, (100-202) % y (100-130) % para la Rodamina 6G, Rodamina 123 y Rodamina B respectivamente. Como la variabilidad aleatoria de la señal a 448 nm es ( $\pm 4.1\%$ ), podemos entonces concluir que en las 3 rodaminas hubo reacciones de transferencia.

La *figura 20* muestra las curvas de Intensidad de fluorescencia del ácido fólico normalizada a 450 nm vs tiempo de irradiación en presencia de rodaminas cada dato, representa el valor promedio de las 3 repeticiones.



*Figura 20 Intensidad de fluorescencia normalizada a 450 nm vs tiempo de irradiación a 532 nm del ácido fólico, utilizando rodaminas como fotosensibilizadores.*

Se encuentra que a mayor pendiente hay una mayor ruptura del ácido fólico y por tanto mayor ocurrencia de reacciones de transferencia por min, el incremento de la señal se debe a la escisión del grupo pterina del ácido fólico debido a reacciones de transferencia desde las

rodaminas. Las barras de error en todos los casos son del 5%, ya que este fue el valor más alto de desviación estándar encontrado en todos los puntos de las 3 curvas.

A partir de la *figura 20*, se concluye que la frecuencia de ocurrencia de las reacciones de transferencias en las rodaminas irradiadas con 532 nm es Rodamina 123 > Rodamina 6G > Rodamina B.

### 10.3 Preparación de rHDL

Los productos obtenidos por los métodos 1 y 2 de preparación son dispersiones coloidales de lipoproteínas de alta densidad reconstituídas en medio acuoso, con apariencia turbia y translúcida, como se aprecia en la *Figura 21*, de color blanquecino en caso de las NPs vacías y de colores amarillo, anaranjado y rosa fluorescente para las NPs cargadas con rodaminas 123, 6G y B respectivamente.



*Figura 21 rHDL-Rod 6G*

Esta dispersión se mantuvo estable durante el tiempo de la investigación (meses), sin presentar sedimentación ni algún tipo de separación de fases o alguno de sus componentes.

Como se describirá en las próximas páginas, el método 2 de preparación tuvo un mejor rendimiento para la obtención de NPs de rHDL, según su tamaño de partícula, al ser cambiadas algunas condiciones no favorables del método 1, en la *tabla 10* se resumen las variables que cambiaron en el segundo método y las que permanecieron igual.

Las lipoproteínas de alta densidad reconstituídas pueden obtenerse en el laboratorio por un método sencillo y reproducible, sin embargo, hay algunos puntos críticos en su síntesis que son importantes controlar.

Se encontró que la cantidad de Apo-A1 utilizada en la preparación está directamente relacionada con el tamaño de partícula de rHDL, si se agrega menos de la necesaria, las partículas resultan con un gran tamaño. Algunos autores que han preparado nanopartículas con apolipoproteínas han determinado lo mismo (84) por lo que es importante agregar la cantidad adecuada que fue la utilizada en el método 2. Ya que para la preparación de rHDL

sólo se disponía de 1 mL de Apo A-1, se modificaron las concentraciones de los lípidos en solución, para que fuera congruente con la cantidad de apo-A1 utilizada.

**Tabla 10: Diferencias entre los métodos de preparación de rHDL**

Variables		Método 1	Método 2
Cantidad utilizada de reactivos	EYPC	15 mg	3 mg
	CE	0.15 mg	0.03 mg
	APO A1	1 mg	1 mg
	FC	0.35 mg	0.07 mg
	Rod 123	0.19 mg	0.19 mg
	Rod 6G	0.24 mg	0.24 mg
	Rod B	0.24 mg	0.24 mg
Temperatura		30° C	0 a 4° C
Contenedor		Vial de 2 mL	Matraz de 50 mL

Con la utilización de un recipiente con mayor volumen en el método 2 se incrementó el área superficial de adherencia para los lípidos y el espacio disponible entre las moléculas para colisionar durante la agitación, esto pudo influir también en el rendimiento de las NPs ya que de esta manera la probabilidad de que las moléculas de los componentes interaccionen fue más grande.

Controlar la temperatura es muy importante en el proceso, los fosfolípidos pueden estar en estado líquido-cristalino (fluido) o gel; al incrementar la temperatura, el estado gel se convierte en líquido-cristalino. Esto ocurre a una temperatura conocida como temperatura de transición ( $T_c$ ) (82), que en EYPC va de -15 a -7°C (83).

Para facilitar la encapsulación de las rodaminas y conseguir la dispersión homogénea de los lípidos y la fase acuosa, fue necesario mantener una agitación energética a una temperatura superior a la  $T_c$  de EYPC, por lo que se trabajó con temperaturas entre 0 y 4°C, lo cual se encontró más conveniente que lo realizado en el método 1, en el cual se trabajó a 30° C, siendo una temperatura excesiva que probablemente intervino con la estabilidad de los componentes.

Otro factor importante para la preparación es la elección de un solvente adecuado, el cual debe ser miscible con todos los componentes lipídicos utilizados y de fácil eliminación, en este caso se eligió el cloroformo, que por su naturaleza apolar es ideal para disolver los

compuestos lipídicos (el colesterol libre, colesterol esterificado y la fosfatidilcolina) y las rodaminas para su incorporación con los componentes lipídicos; además es de fácil eliminación, ya que es muy volátil, pudiendo ser eliminado al vacío.

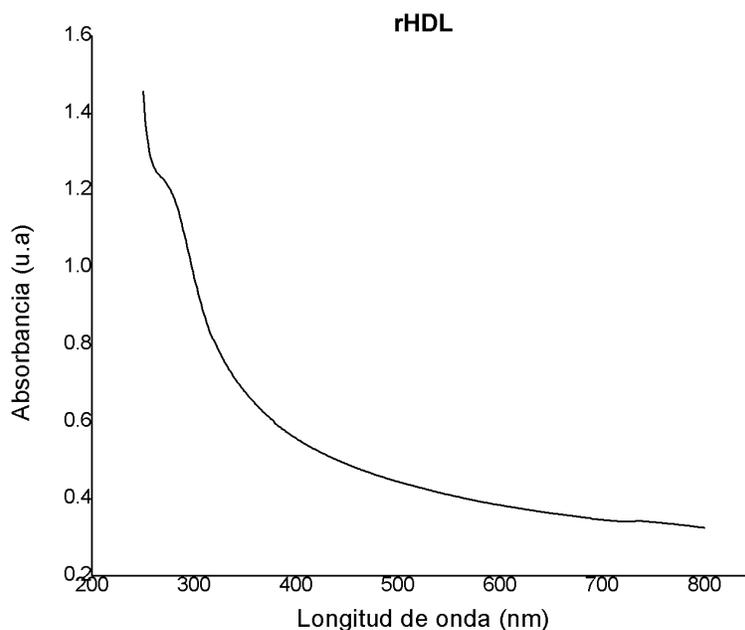
Con la agitación vigorosa, se consigue que los componentes utilizados interaccionen y se formen las nanopartículas; primero al mezclar los componentes lipídicos disueltos en cloroformo para conseguir una mezcla homogénea y, en su caso, incorporar las rodaminas y después al agregar la Apo-A1 en medio acuoso, una vez eliminado el cloroformo.

Es importante dializar el producto para eliminar el exceso de desoxicolato de sodio y otras impurezas, así como las rodaminas que no fueron captadas por las rHDL. De esta manera, el color que queda dentro de la membrana de diálisis corresponde al colorante que lograron captar las rHDL.

#### 10.4 Caracterización fisicoquímica de rHDL

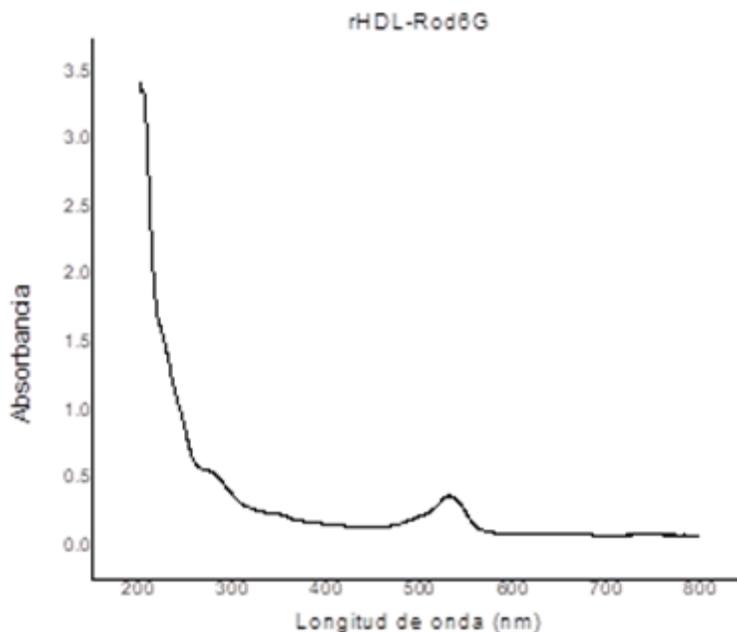
##### 10.4.1 UV-Vis

Los espectros de absorción de las rHDL vacías y cargadas con rodaminas Rod-123, Rod-6G y Rod-B, así como la determinación cuantitativa de la rodamina al interior de las nanopartículas, se muestran a continuación,



*Figura 22 Espectro de UV-Vis de rHDL vacías.*

La *figura 22* corresponde al espectro de absorción de las nanopartículas de rHDL vacías. Como se esperaba, en este espectro no aparece ninguna banda en la región visible ya que la solución de rHDL no absorbe luz en esta región.

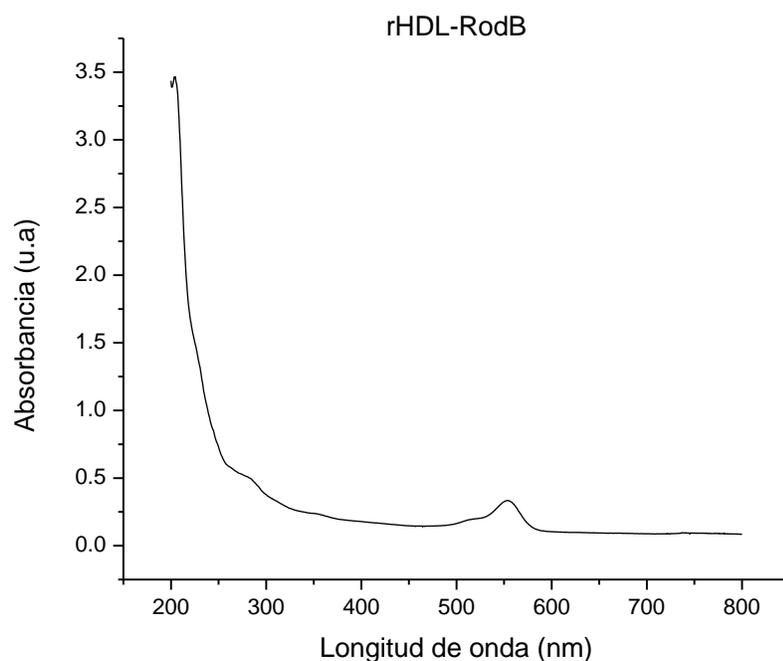


*Figura 23 Espectro de absorción de rHDL-Rod6G.*

La *figura 23* corresponde al espectro de absorción de las nanopartículas de rHDL cargadas con rodamina 6G (rHDL-Rod6G). En el espectro aparece una banda en una longitud de onda máxima de 530 nm, con una absorbancia de 0.365 u.a que corresponde a una concentración de 0.0495 mM según la curva estándar del *anexo C*.

Es posible observar que ocurrió un desplazamiento en la banda de la Rod-6G, ya que el máximo de absorción de esta molécula en solución acuosa se encontró en 527.5 nm. Este desplazamiento hacia el rojo en el espectro de absorción o efecto batocrómico puede deberse a una modificación en la estructura de la rodamina al introducirse en las rHDL.

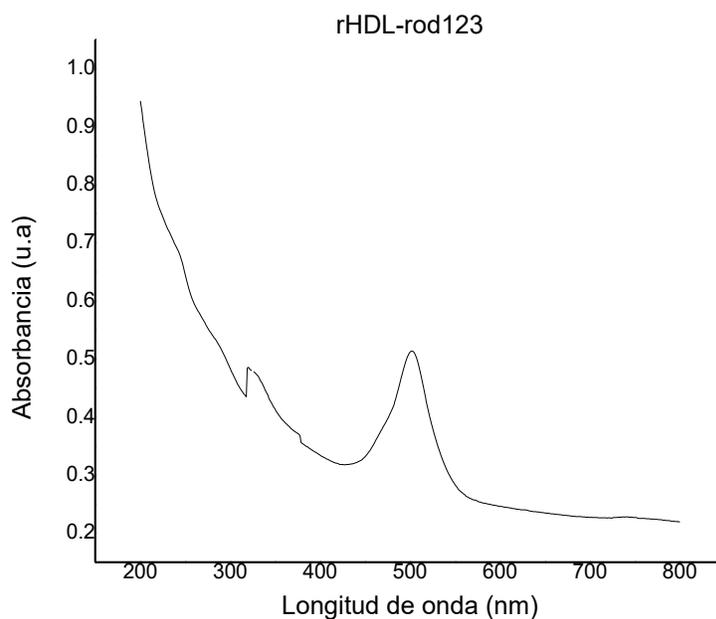
La cantidad inicial de rodamina agregada en la preparación de las nanopartículas fue de 0.24 mg, de los cuales permanecieron 0.0474 mg después de la diálisis, por lo que se puede afirmar que el 19.75% de la rodamina 6G fue internalizada en rHDL.



*Figura 24 Espectro de absorción de rHDL-Rod B.*

El máximo de absorción del espectro de rHDL-Rod B [Figura 24] se determinó en 553.5 nm, con una absorbancia de 0.334 u.a que corresponde a una concentración de 0.0334 mM ó 0.0320 mg según el volumen preparado que fue de 2mL, calculada por regresión lineal como se muestra en el *anexo C*.

La intensidad de la banda corresponde a una absorbancia de 0.334 u.a, con este dato se obtuvo la concentración de la rodamina B a partir de una curva estándar de 0.0334 mM que corresponde a 0.0320 mg. La cantidad inicial de rodamina agregada en la preparación de las nanopartículas fue de 0.24 mg, por lo que la cantidad de rodamina B que se internalizó en rHDL fue del 13.33%



*Figura 25 Espectro de absorción de rHDL-Rod123.*

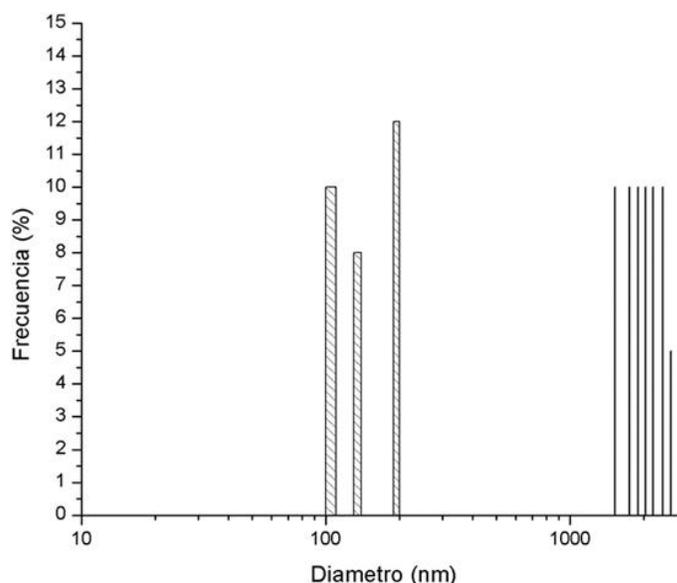
Según la *figura 25*, el máximo de absorción correspondiente a una  $\lambda_{\max} = 502$  nm es de 0.5136, con este dato y el coeficiente de extinción molar fue calculada la concentración de rod 123 presente en el sistema de rHDL (*Anexo C*), resultando en 0.0603 mM. La cantidad de Rod123 que permaneció en las nanopartículas fue de 0.0459 mg de los 0.1904 mg agregados inicialmente, por lo que se internalizó el 24.11%.

Durante la preparación de rHDL, es mediante el proceso de diálisis que se eliminan los restos de rodaminas que no ingresan al núcleo de las nanopartículas de rHDL, así como el exceso de otros reactivos; por lo que se asume que la rodamina que permanece en la solución es la que logró internalizarse en el núcleo de las rHDL y que la rodamina determinada por espectrofotometría UV-Vis corresponde a lo que se internalizó en las nanopartículas de rHDL.

Según estos resultados, el orden de atrapamiento de rodaminas al interior de rHDL fue en orden de Rod 123 > Rod 6G > Rod B. Es importante mencionar que la concentración determinada de las rodaminas es una aproximación, ya que debe considerarse que ésta se

encuentra internalizada en las partículas lipídicas, por lo que la luz que atraviesa la solución del analito podría verse obstaculizada por las partículas que rodean la rodamina, resultando en una alteración del espectro de absorción.

#### 10.4.2 Tamaño de partícula (DLS)



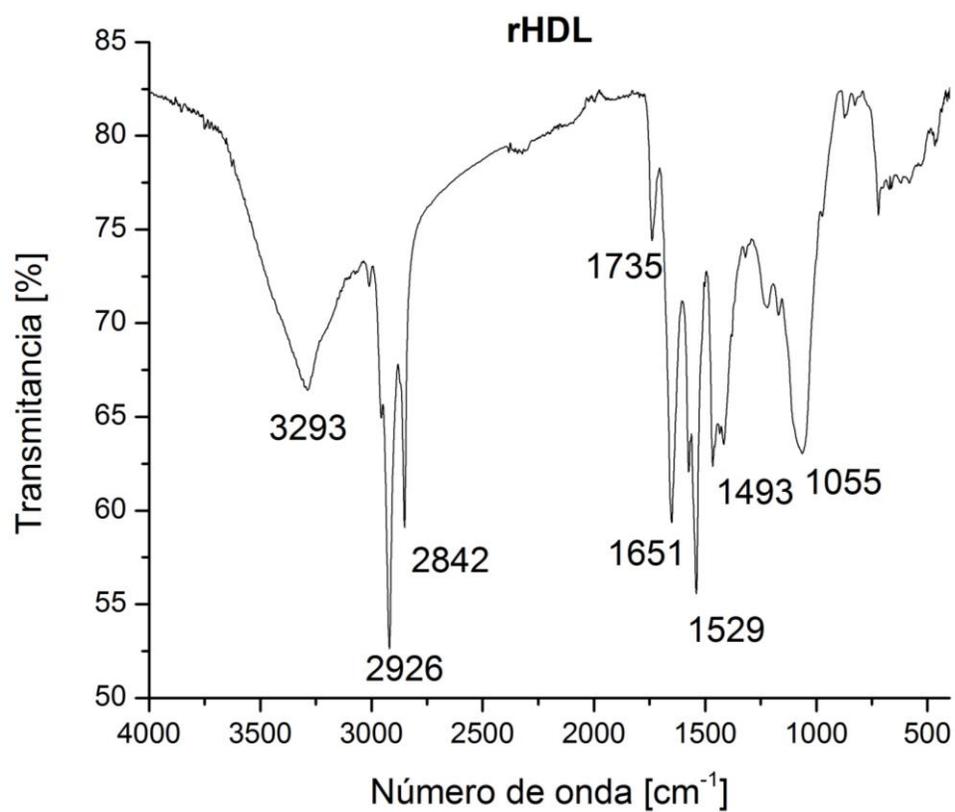
*Figura 26 Distribución de tamaño de partícula por DLS de rHDL preparadas por el método 2.*

El tamaño de partícula es un factor determinante en la eficiencia de la captación celular, por lo que es importante controlar este parámetro en un sistema de administración de fármacos. Los resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula por DLS, según la *figura 26* muestran que en la dispersión de rHDL preparadas por el método 1, existen partículas con diferente diámetro, pero la mayor dispersión se encuentra por encima de los 1000 nm y todas tienen un tamaño superior a 100 nm.

Si bien, las partículas de hasta 3  $\mu\text{m}$  pueden ser internalizadas por un mecanismo de fagocitosis (11), se desean partículas con un diámetro inferior a 50 nm (5), en el que tienen una mayor tasa de internalización y por lo tanto sean más efectivas como sistemas de transporte de fármacos, en este caso, rodaminas.



### 10.4.3 Espectroscopía Infrarroja FT-IR



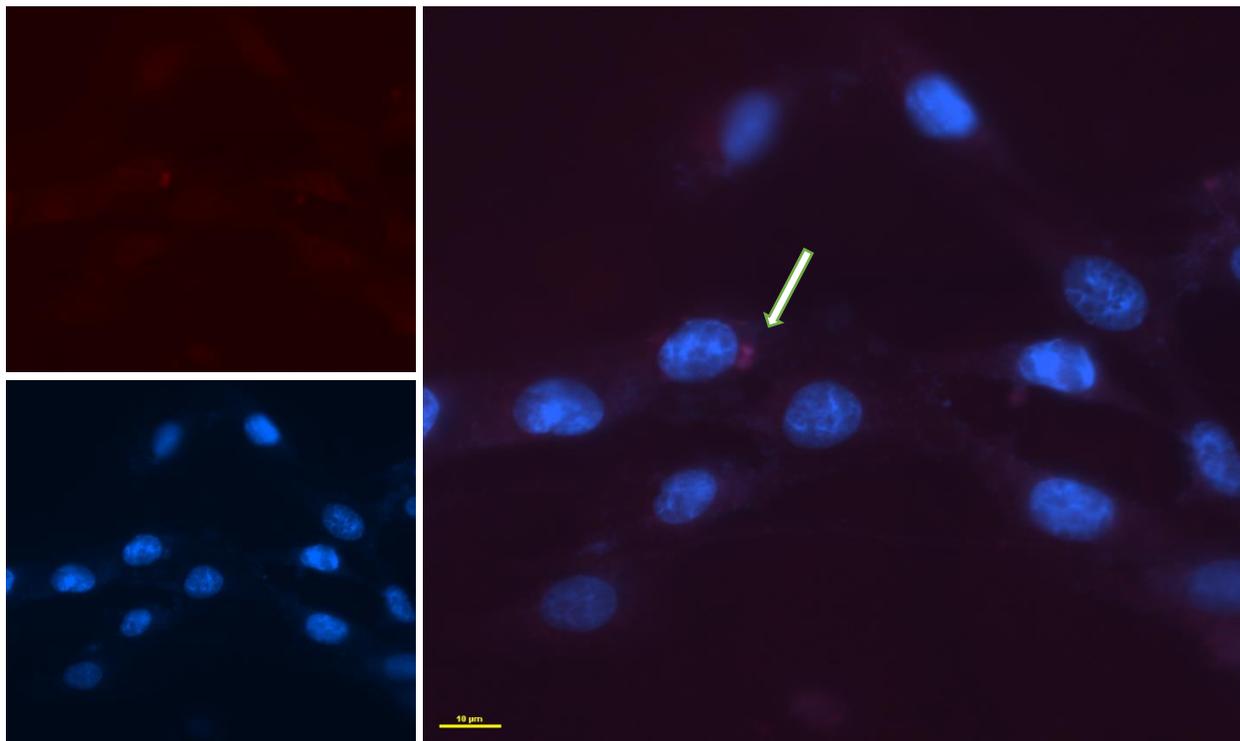
*Figura 28 Espectro IR de rHDL*

Las bandas del espectro infrarrojo de rHDL [Figura 28], se describen a continuación en la tabla 11.

<i>Tabla 11 Asignación de las bandas del espectro IR de rHDL.</i>			
<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Descripción</b>	<b>Asignación</b>	<b>Observaciones</b>
3293	Banda ancha de intensidad media	O-H	Estiramiento simétrico del grupo OH del colesterol.
2926	Banda estrecha de alta intensidad	CH <sub>3</sub>	Estiramiento asimétrico de los grupos metilo de las cadenas hidrocarbonadas.
2842	Banda estrecha de intensidad media	CH <sub>2</sub>	Estiramiento asimétrico de los grupos metileno de las cadenas hidrocarbonadas.
1735	Banda estrecha de alta intensidad	C=O	Estiramiento del carbonilo.
1651	Banda estrecha de alta intensidad	H <sub>2</sub> O	Flexión H-O-H
1529	Banda estrecha, de alta intensidad	CH <sub>3</sub>	Estiramiento de flexión asimétrica de los grupos metilo de la colina
1493	Bandas estrechas de intensidad media	CH <sub>2</sub>	Flexión H-C-H de las cadenas hidrocarbonadas
1055	Banda estrecha de intensidad media	C-O	Vibración del esqueleto de colina

## 10.5 Caracterización biológica

### 10.5.1 Microscopía de fluorescencia



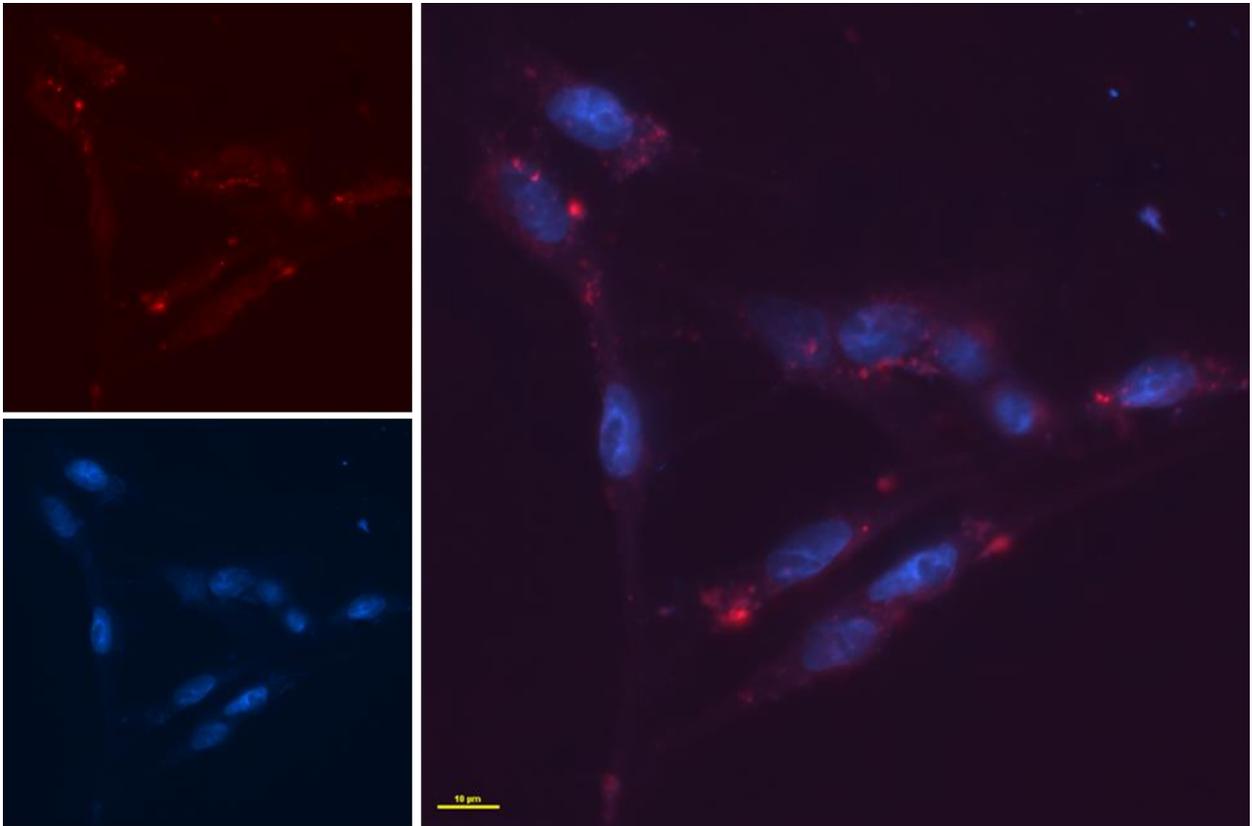
*Figura 29 Células T-47D tratadas con Rod 123 (citoplasma, flecha), núcleos en azul teñidos con DAPI.*

En la *figura 29* se observan células que fueron únicamente tratadas con rodamina 123 y se aprecian unas pequeñas manchas fluorescentes en los citoplasmas que se deben a la rodamina que logró atravesar las membranas por sí sola.

La rodamina 123, en particular, presentó fotoblanqueo, que es la descomposición irreversible de las moléculas de los fluorocromos, directamente relacionado con la intensidad de excitación y con el tiempo durante el cual estamos excitando la muestra.

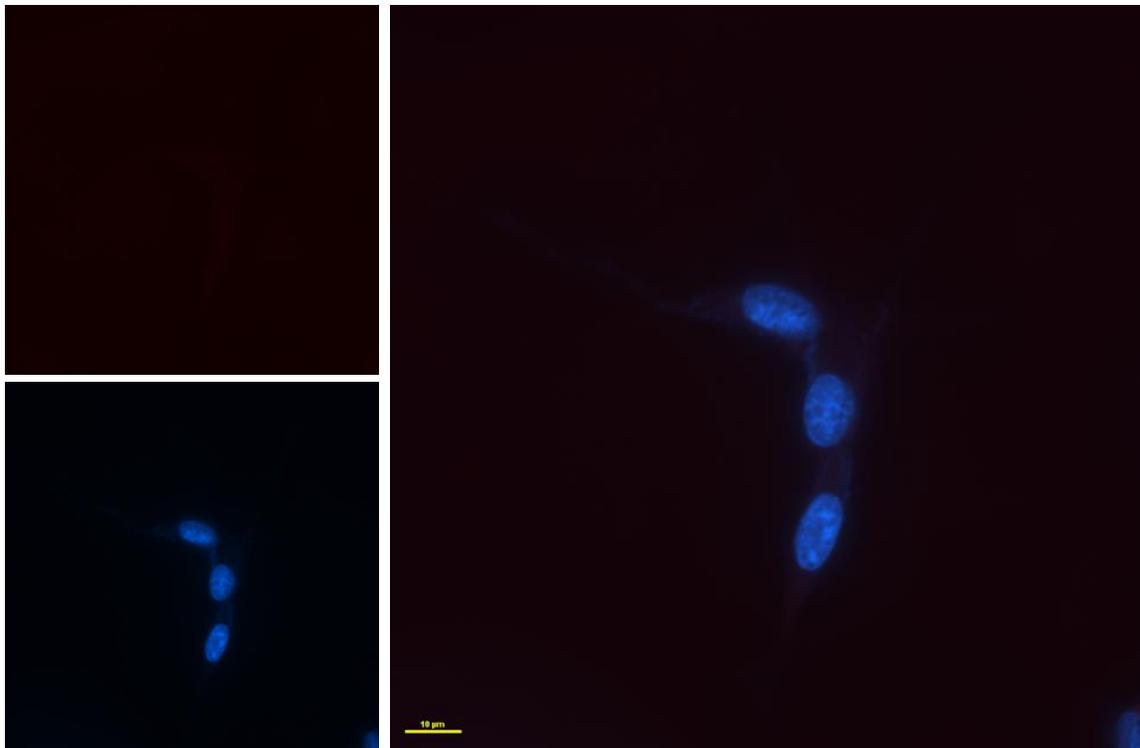
Esta condición se presentó tanto en las células tratadas con Rod-123 como en las células tratadas con rHDL-Rod 123 [*Figura 30*] y disminuyó la intensidad de fluorescencia que se logró observar en el microscopio.

Para explicar el rápido blanqueo de la Rod 123 citosólica, se puede proponer tentativamente que la Rod 123 liberada de las mitocondrias interactúa con estructuras citosólicas que modifican sus propiedades fotoquímicas o fluorescentes (72).



*Figura 30 Células T47-D tratadas con rHDL-Rod123 (citoplasma), núcleos en azul teñidos con DAPI.*

En la *figura 30* se nota que hay una mayor concentración de la rodamina al interior de las células en comparación con la *figura 31*, ya que los citoplasmas de estas células fluorescen con mayor intensidad, esto demuestra que se internalizó una mayor cantidad de esta rodamina cuando se utilizó el tratamiento de rHDL-Rod123.



*Figura 31 Células T-47D tratadas con Rod 6G (citoplasma), núcleos en azul teñidos con DAPI.*

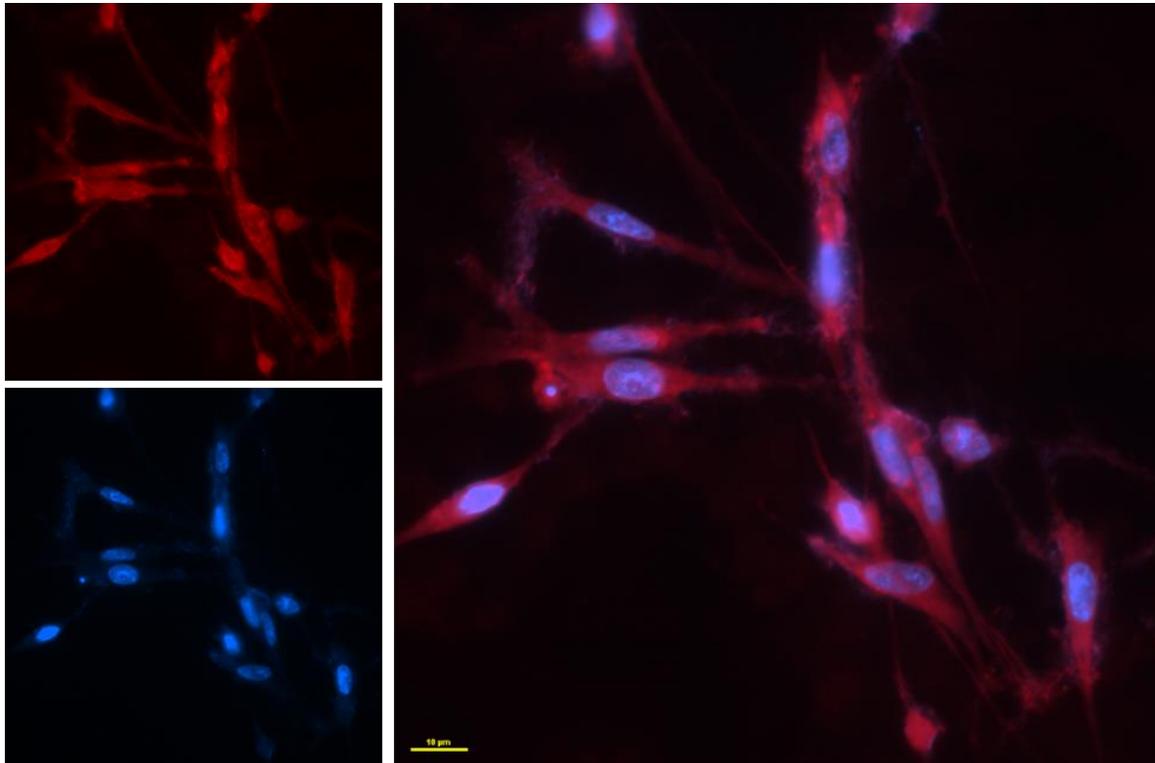
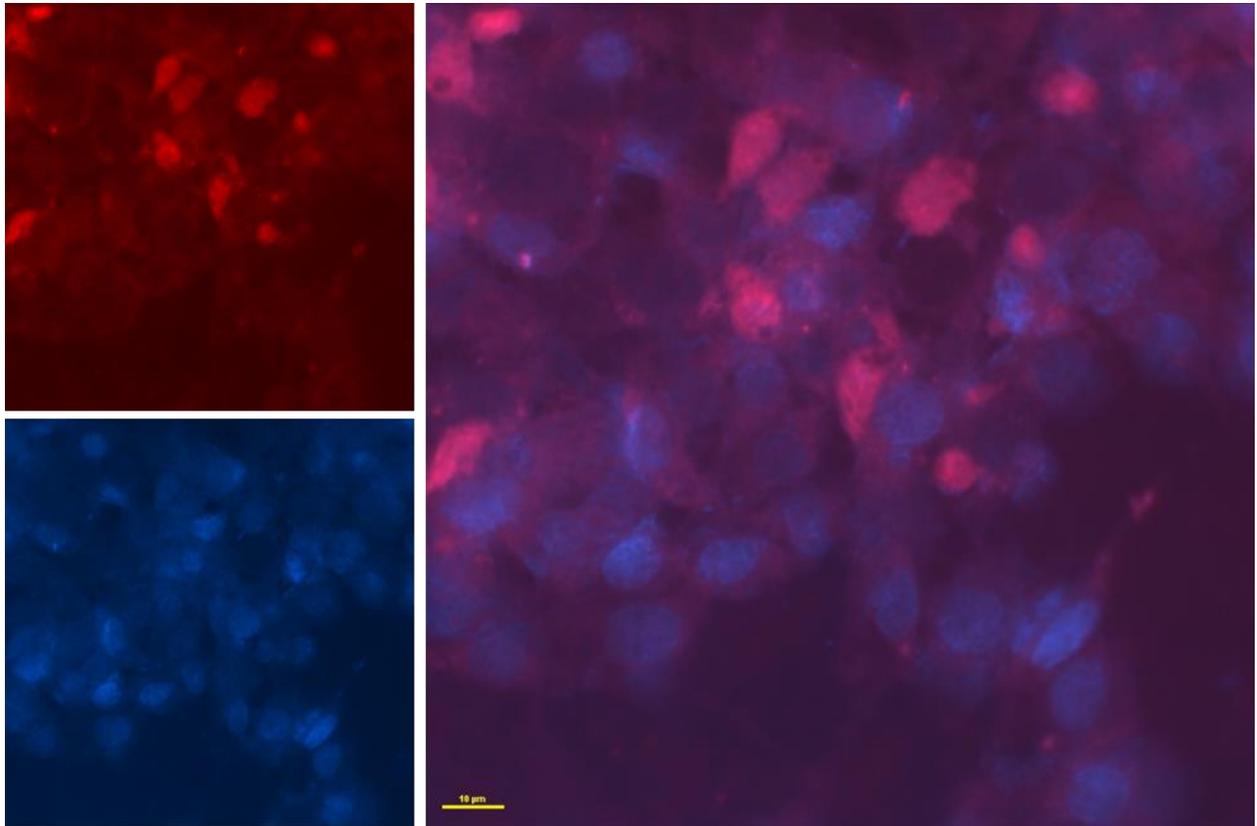
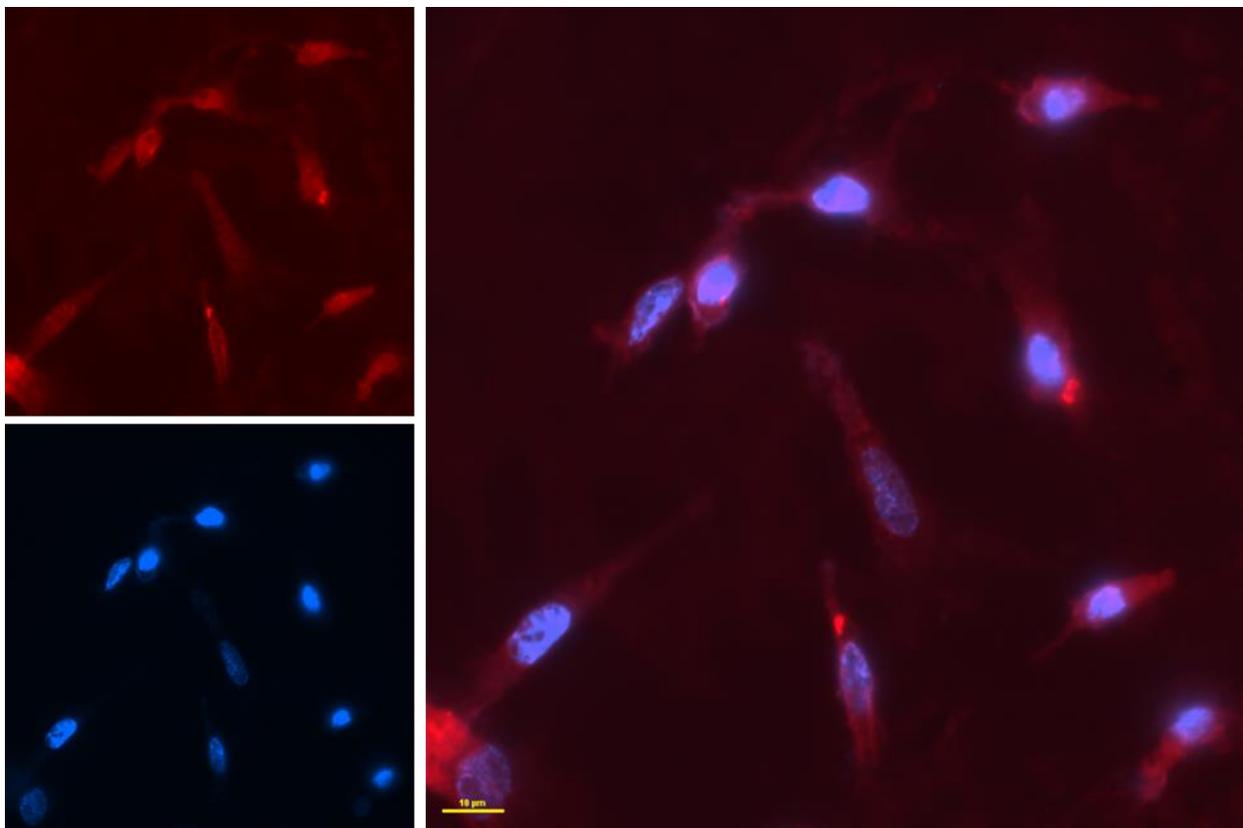


Figura 32 Células T-47D tratadas con rHDL-Rod6G (citoplasma), núcleos en azul teñidos con DAPI.

En la *figura 31*, aunque se capturó un campo con pocas células, no es posible observar la rodamina 6G dentro de ellas; a diferencia de la *figura 32*, en la que se pueden apreciar los citoplasmas bien teñidos con la rodamina que fluorescen con gran intensidad. El vehículo de rHDL también demostró mejorar la captación de Rod 6G.



*Figura 33 Células T-47D tratadas con Rod B (citoplasma), núcleos en azul teñidos con DAPI.*



*Figura 34 Células T-47D tratadas con rHDL- Rod B (citoplasma), núcleos en azul teñidos con DAPI.*

En la *figura 33* tenemos un campo saturado de células en el que se aprecia que la rodamina B fue captada en algunas de ellas, pero se aprecia una mayor internalización en las células tratadas con rHDL-RodB como se observa en la *figura 34*.

El paso a través de las membranas biológicas es un factor determinante en la capacidad de un fármaco para producir un efecto biológico determinado, por ello es importante considerar las características fisicoquímicas del fármaco para predecir su comportamiento biológico.

En este caso, se demostró que las rodaminas Rod123, Rod 6G y Rod B son compuestos liposolubles, por lo que se espera que por sí solas logren atravesar la membrana celular, ya que se sabe que ésta tiene afinidad por los compuestos hidrofóbicos, debido a que está compuesta principalmente por fosfolípidos que no permiten la entrada a compuestos iónicos.

Por ello, la utilización de un vehículo que tenga afinidad por las membranas plasmáticas, como las nanopartículas de rHDL, puede mejorar la internalización de compuestos lipofílicos, como las rodaminas, al interior de la célula.

Gracias a que las rodaminas son compuestos fluorescentes, es posible determinar cualitativamente su captación al interior de las células a través de un microscopio de fluorescencia.

Comparando la intensidad de fluorescencia en las células tratadas con los vehículos de rHDL+ rodaminas, es la rodamina 6G la que fluoresce con mayor intensidad dentro de los citoplasmas y por lo tanto es la que fue capaz de internalizarse en mayor cantidad.

Estos resultados son evidencia de la eficacia de las nanopartículas de rHDL como vehículo para el transporte de rodaminas al interior de la célula, para discutir el porqué de su efectividad se debe analizar algunos factores que pueden influir.

Las rodaminas son compuestos con cierto carácter hidrófobo, esto les permite internalizarse en el citoplasma celular mediante el vehículo de rHDL. La naturaleza lipídica de las nanopartículas de rHDL mejora la difusión de las rodaminas al interior de la membrana plasmática, ya que esta debido a su composición, es más permeable para las sustancias hidrofóbicas.

Además, se sabe que las células de cáncer sobreexpresan el receptor SR-B1 y las HDL, al igual que las nanopartículas de rHDL, tienen afinidad por este receptor gracias a la Apo A-1 en su composición. Esto facilita su entrada a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptor.

En resumen, las nanopartículas de rHDL mostraron ser efectivas para mejorar la captación de las 3 rodaminas 123, 6G y B al interior de las células y esto queda demostrado cualitativamente gracias a este experimento.

## 11 Conclusiones

Las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas demostraron ser un vehículo eficaz para el transporte de rodaminas al interior de células de cáncer positivas a SR-B1 para su aplicación en terapia fotodinámica.

La irradiación de las soluciones de ácido fólico + rodaminas resultó en el decremento de la concentración de ácido fólico, determinado por espectrometría de fluorescencia. Esto demuestra que las rodaminas 123, 6G y B al ser irradiadas con el láser Nd:YAG generan radicales libres de oxígeno mediante reacciones de transferencia electrónica, que rompen biomoléculas, como el ácido fólico por lo que tienen potencial para ser utilizadas como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica.

Se demostró, mediante el cálculo del coeficiente de partición que las rodaminas 123, 6G y B son compuestos solubles en agua y en solventes no polares como el octanol, por lo que se logró predecir que se internalizarían eficazmente en las rHDL.

Se obtuvieron las lipoproteínas de alta densidad sintéticas, compuestas de fosfolípidos (EYPC), colesterol libre, colesterol esterificado (palmitato de colesterol) y apo-A1; vacías y cargadas con rodaminas 123, 6G y B en solución acuosa. La solución de rHDL vacías es de una apariencia blanca y turbia, mientras que las partículas cargadas tienen el color característico de cada rodamina, (amarillo, anaranjado y rosa respectivamente).

Los puntos críticos para considerar en la síntesis de rHDL, y rHDL-Rodaminas son: las cantidades necesarias de cada reactivo, en especial de Apo-A1, la temperatura de la reacción y de almacenamiento de los reactivos, el solvente adecuado para incorporar las sustancias lipídicas, así como su eliminación, la agitación vigorosa y la diálisis del producto.

Las rodaminas 123, 6G y B lograron internalizarse en el núcleo lipídico de las rHDL, gracias a su carácter lipófilo. Esto fue determinado cuantitativamente mediante espectrofotometría UV-Vis. Los espectros de absorción de las nanopartículas de rHDL-Rodaminas muestran las bandas características de cada una (123,6G y B) con diferentes intensidades, esto demuestra que las rodaminas se encuentran dentro de las nanopartículas.

Las rHDL mostraron una distribución de tamaño de partícula que va desde 12.77 hasta los 204.4 nm, pero con una mayor proporción de partículas inferiores a 100 nm el cual es un

tamaño adecuado para un sistema de administración de fármacos. Se encontró que es importante considerar los puntos críticos en la síntesis para obtener el tamaño de partícula conveniente.

Mediante espectroscopía infrarroja se encontraron bandas características de los grupos funcionales de la Fosfatidilcolina y el colesterol, que son los componentes principales de rHDL.

Se observó en el microscopio de fluorescencia que las células de cáncer de la línea celular T47-D tenían una mayor cantidad de rodaminas 123, 6G y B en sus citoplasmas luego de ser tratadas con las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas cargadas con rodaminas (rHDL-Rod123, rHDL-Rod6G y rHDL-RodB) que las células tratadas únicamente con las rodaminas; esto prueba que las rHDL funcionan como un vehículo de transporte de rodaminas al interior de las células y podrían ser utilizadas como un vehículo de transporte para otros fármacos con carácter lipófilo.

Las rHDL sintetizadas son capaces de transportar rodaminas 123, 6G y B al interior de células de cáncer positivas a SR-B1 y las rodaminas demostraron que al ser irradiadas pueden descomponer biomoléculas, por lo que el sistema de rHDL-Rodaminas podrá ser utilizado para el tratamiento de cáncer mediante terapia fotodinámica.

## ANEXOS

## A) Especificaciones y certificados de análisis.

20/2/2019

Specification Sheet

# Specification Sheet

SIGMA-ALDRICH

<b>Product Name</b>	Rhodamine 6G, Dye content ~95 %
<b>Product Number</b>	R4127
<b>Product Brand</b>	SIGMA
<b>CAS Number</b>	<a href="#">989-38-8</a>
<b>Molecular Weight</b>	479.01

**TEST**

<b>APPEARANCE (COLOR)</b>
<b>APPEARANCE (FORM)</b>
<b>SOLUBILITY (COLOR)</b>
<b>SOLUBILITY (METHOD)</b>
<b>CARBON CONTENT</b>
<b>NITROGEN CONTENT</b>
<b>DYE CONTENT</b>
<b>WAVELENGTH (1) (UV)</b>
<b>EXTINCTION (1%/1CM) (1) (UV)</b>
<b>SOLVENT (UV)</b>

**SPECIFICATION**

Brown-Red
Powder
Dark Red
1MG/ML IN WATER
66.5 - 74.0 %
5.0 - 6.2 %
~ 95 %
~ 525 NM
≥ 1700
WATER

**SIGMA-ALDRICH**3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com**Certificate of Analysis**

**Product Name:** RHODAMINE 6G  
Dye content ~ 95 %

**Product Number:** R4127

**Batch Number:** BCBV3262

**Brand:** Sigma

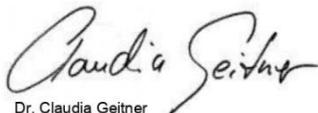
**CAS Number:** 989-38-8

**Formula:**  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$

**Formula Weight:** 479.01

**Quality Release Date:** 31 MAY 2017

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	BROWN-RED	BROWN-RED
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
SOLUBILITY (COLOR)	DARK RED	DARK RED
SOLUBILITY (METHOD)	1MG/ML IN WATER	1 MG/ML IN WATER
CARBON CONTENT	66.5 - 74.0	67.3 %
NITROGEN CONTENT	5.0 - 6.2	5.6 %
DYE CONTENT	~ 95 %	APPROX. 96 %
WAVELENGTH (1) (UV)	~ 525 NM	526.6 NM
EXTINCTION (1%/1CM) (1) (UV)	≥ 1700	1855
SOLVENT (UV)	WATER	WATER



Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

**SIGMA-ALDRICH**<sup>®</sup>

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

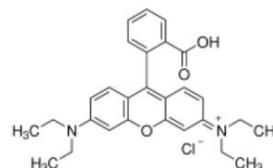
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

## Product Specification

Product Name:  
Rhodamine B - ≥95% (HPLC)

**Product Number:** R6626  
**CAS Number:** 81-88-9  
**MDL:** MFCD00011931  
**Formula:** C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
**Formula Weight:** 479.01 g/mol



### TEST

### Specification

Appearance (Color)	Faint Green to Very Dark Green
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Faint Red to Red and Faint Purple to Purple
Solubility (Turbidity)	Clear
1 mg/mL, H <sub>2</sub> O	
UV Absorbance Ratio	≤ 0.50
ABS at 510 nm/Abs at Lambda Max, in MeOH	
EmM	104.5 - 115.8
Lambda Max	542 - 554 nm
Purity (HPLC)	≥ 95 %

Specification: PRD.4.ZQ5.10000006871

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

20/2/2019

Specification Sheet

# Specification Sheet

SIGMA-ALDRICH

<b>Product Name</b>	Rhodamine 123, mitochondrial specific fluorescent dye
<b>Product Number</b>	R8004
<b>Product Brand</b>	SIGMA
<b>CAS Number</b>	<a href="#">62669-70-9</a>
<b>Molecular Weight</b>	380.82

**TEST**

<b>Appearance (Color)</b>
<b>Appearance (Form)</b>
<b>Infrared spectrum</b>
<b>Carbon (dry basis)</b>
<b>Nitrogen (dry basis)</b>
<b>Water (by Karl Fischer)</b>
<b>Solubility (Turbidity)</b>

**SPECIFICATION**

Red to Brown
Powder
Conforms to Structure
62,2 - 70,2 %
6,9 - 7,8 %
≤10,0 %
Clear to Slightly Hazy 1mg/ml in Ethanol
Conforms to Requirements Yellow-Orange

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

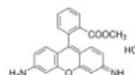
Outside USA: eurtechserv@sial.com

**Certificate of Analysis**

Product Name:

Rhodamine 123 - mitochondrial specific fluorescent dye

**Product Number:** R8004  
**Batch Number:** MKCF0567  
**Brand:** SIGMA  
**CAS Number:** 62669-70-9  
**MDL Number:** MFCD00012664  
**Formula:** C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · HCl  
**Formula Weight:** 380.82 g/mol  
**Quality Release Date:** 10 JAN 2018  
**Recommended Retest Date:** JAN 2022



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Red to Brown	Brown-Red
Appearance (Form)	Powder	Powder
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Carbon (Dry Basis)	62.2 - 70.2 %	65.7 %
Nitrogen (Dry Basis)	6.9 - 7.8 %	7.1 %
Water (by Karl Fischer)	≤ 10.0 %	5.4 %
Solubility (Turbidity) 1mg/ml in Ethanol	Clear to Slightly Hazy	Very Slightly Hazy
Solubility (Color) Yellow-Orange	Conforms to Requirements	Yellow-Orange
Recommended Retest Period 4 Years	-----	-----

Michael Grady, Manager  
 Quality Control  
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

B) Estimación del coeficiente de bipartición.

1) *Experimental.*

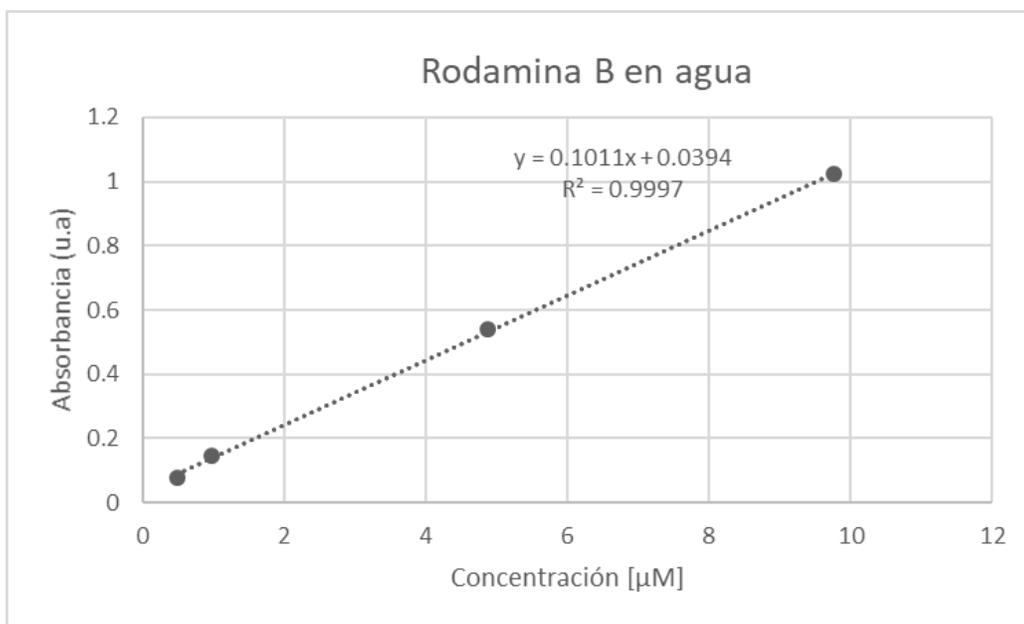


Figura 35 Curva estándar para la determinación de la rodamina B en la fase acuosa.

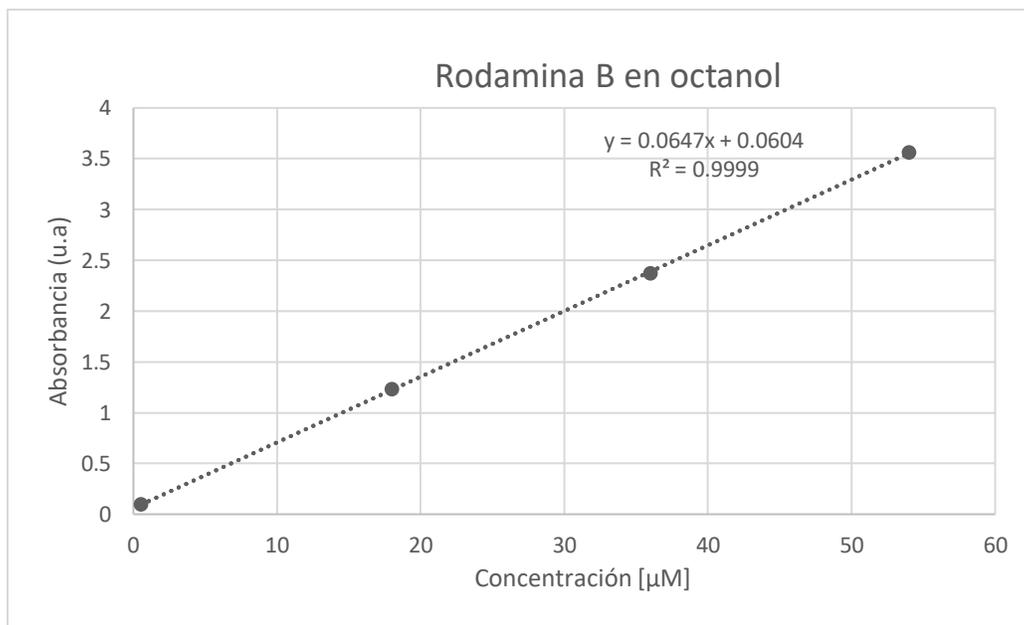


Figura 36 Curva estándar para la determinación de la rodamina B en la fase octanólica.

Rodamina B en agua		
Muestra	Abs	Concentración (μM)
1	0.14783	1.0725
2	0.3179	2.7547
3	0.4131	3.6963
	Promedio	2.5078

Rod B en octanol		
Muestra	Abs	Concentración (μM)
1	0.4484	5.9969
2	0.462	6.2071
3	0.44278	5.9100
	Promedio	6.0380

$$\text{Log } P \text{ Rod B} = \text{Log} \left( \frac{6.0380}{1.0725} \right) = 0.7505$$

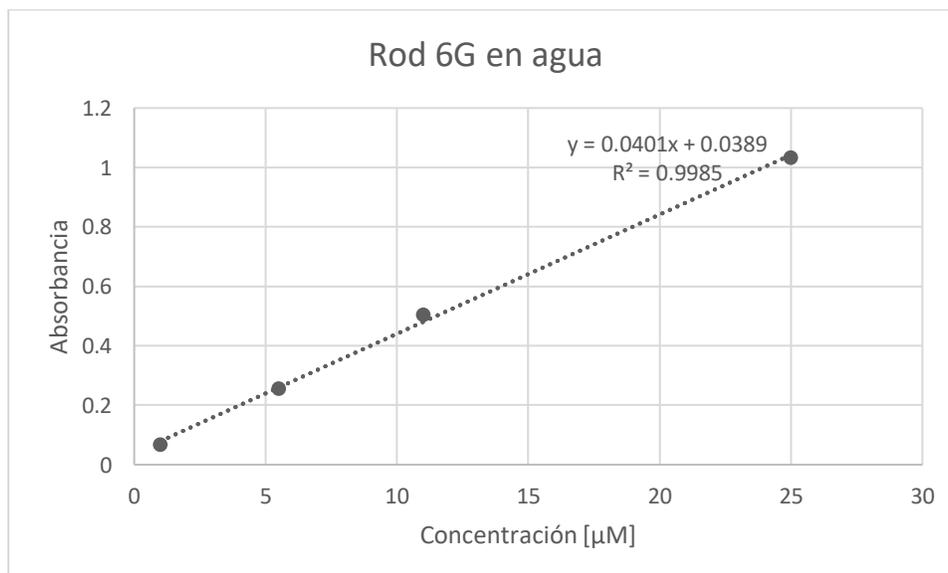
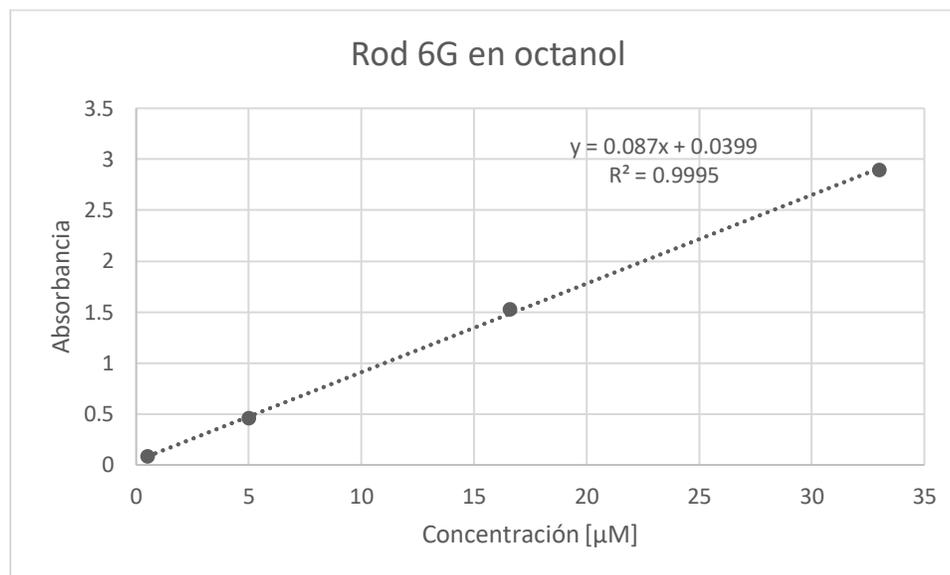


Figura 37 Curva estándar para la determinación de la rodamina 6G en la fase acuosa.



*Figura 38 Curva estándar para la determinación de rodamina 6G en la fase octanólica.*

<b>Rodamina 6G en agua</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Abs</b>	<b>Concentración (µM)</b>
<b>1</b>	<b>0.1475</b>	<b>2.7082</b>
<b>2</b>	<b>0.091</b>	<b>1.2993</b>
<b>3</b>	<b>0.3383</b>	<b>7.4663</b>
<b>Promedio</b>	<b>0.1922</b>	<b>3.8246</b>

<b>Rodamina 6G en octanol</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Abs</b>	<b>Concentración (µM)</b>
<b>1</b>	<b>0.3545</b>	<b>3.6161</b>
<b>2</b>	<b>0.4842</b>	<b>5.1069</b>
<b>3</b>	<b>0.4864</b>	<b>5.1322</b>
<b>Promedio</b>	<b>0.4417</b>	<b>4.6184</b>

$$\text{Log } P \text{ Rod 6G} = \text{Log} \left( \frac{4.6118}{1.2993} \right) = 0.5502$$

## 2) Teórico.

Table 1—Selected Fragment Descriptions and Coefficients

	Coeff <sup>a</sup> (Freq) <sup>b</sup>		Coeff <sup>a</sup> (Freq) <sup>b</sup>
<b>Aromatic atoms</b>		<b>Aliphatic nitrogen</b>	
Carbon	0.2940 (6735)	—NO <sub>2</sub> (aliphatic attachment)	-0.8132 (51)
Oxygen	-0.0423 (164)	—NO <sub>2</sub> (aromatic attachment)	-0.1823 (728)
Sulfur	0.4082 (306)	>N< (+5 valence, single bonds)	-6.6000 (85)
<b>Aromatic nitrogen</b>		—N=C=S (aliphatic attachment)	0.5236 (13)
Nitrogen [N=O, oxide type]	-2.4729 (91)	—N=C=S (aromatic attachment)	1.3369 (24)
Nitrogen [+5 valence type]	-6.6500 (51)	—NP (phosphorus attachment)	-0.4367 (84)
Nitrogen at a fused ring location	-0.0001 (12)	—N (two aromatic attachments)	-0.4657 (88)
Nitrogen in a five-member ring	-0.5262 (851)	—N (one aromatic attachment)	-0.9170 (2209)
Nitrogen in a six-member ring	-0.7324 (1050)	—N(O) (nitroso, +5 valence)	-1.0000 (33)
<b>Aliphatic carbon</b>		—N=C (aliphatic attach)	-0.0010 (543)
—CH <sub>3</sub> (methyl)	0.5473 (5257)	—NH <sub>2</sub> (aliphatic attachment)	-1.4148 (1027)
—CH <sub>2</sub> —	0.4911 (4630)	—NH— (aliphatic attachment)	-1.4962 (1597)
—CH	0.3614 (2126)	—N< (aliphatic attachment)	-1.8323 (1274)
>C< (no hydrogens, single bonds, three or more carbons attached)	0.2676 (591)	—N(O) (nitroso)	-0.1299 (149)
C (no hydrogens)	0.9723 (907)	—N=N— (azo, includes both N)	0.3541 (118)
<b>Olefinic and acetylenic carbon</b>		<b>Aliphatic oxygen</b>	
=C< (two aromatic attachments)	-0.4186 (11)	—OH (nitrogen attachment)	-0.0427 (52)
=CH <sub>2</sub>	0.5184 (162)	—OH (phosphorus attachment)	0.4750 (8)
=CH— or =C<	0.3836 (1044)	—OH (olefinic attachment)	-0.8855 (23)
≡CH or ≡C—	0.1334 (46)	—OH (carbonyl attachment)	0.0 <sup>d</sup>
<b>Carbonyls and thiocarbonyls<sup>c</sup></b>		—OH (aliphatic attachment)	-1.4086 (861)
CHO— (aldehyde, aliphatic attachment)	-0.9422 (23)	—OH (aromatic attachment)	-0.4802 (558)
CHO— (aldehyde, aromatic attachment)	-0.2828 (49)	=O	0.0 <sup>d</sup>
—C(=O)OH (acid, aliphatic attachment)	-0.6895 (547)	—O— (two aromatic attachments)	0.2923 (77)
—C(=O)OH (acid, aromatic attachment)	-0.1186 (180)	—OP (aromatic attachment)	0.5345 (88)
—NC(=O)N— (urea-type)	1.0453 (612)	—OP (aliphatic attachment)	-0.0162 (180)
NC(=O)O (carbamate-type)	0.1283 (340)	—ON— (nitrogen attachment)	0.2352 (115)
NC(=O)S (thiocarbamate type)	0.5240 (20)	—O— (carbonyl attachment)	0.0 <sup>d</sup>
—C(=O)O (ester, aliphatic attachment)	-0.9505 (599)	—O— (one aromatic attachment)	-0.4664 (1156)
—C(=O)O (ester, aromatic attachment)	-0.7121 (335)	—O— (aliphatic attachment)	-1.2566 (584)
—C(=O)N (aliphatic attachment)	-0.5236 (1474)	<b>Phosphorus</b>	
—C(=O)N (aromatic attachment)	0.1599 (490)	—P=O	-2.4239 (153)
—C(=O)S (thioester, aliphatic attachment)	-1.1000 (5)	—P=S	-0.6587 (74)
—C(=O)— (noncyclic, 2 aromatic attachments)	-6099 (38)	<b>Aliphatic sulfur</b>	
—C(=O)— (cyclic, 2 aromatic attachment)	-0.2063 (16)	—SO <sub>2</sub> N (aromatic attachment)	-0.2079 (417)
—C(=O)— (cyclic, aromatic, olefinic attachment)	-0.5497 (56)	—SO <sub>2</sub> N (aliphatic attachment)	-0.4351 (45)
—C(=O)— (olefinic attachment)	-1.2700 (191)	—SO <sub>2</sub> OH (sulfonic acid)	-3.1580 (11)
—C(=O)— (aliphatic attachment)	-1.5586 (152)	—SO <sub>2</sub> O (aliphatic attachment)	-0.7250 (28)
—C(=O)— (one aromatic attachment)	-0.8666 (189)	—S(=O)— (one aromatic attachment)	-2.1103 (57)
NC(=S)N (thiourea-type)	1.2905 (45)	—SO <sub>2</sub> — (one aromatic attachment)	-1.9775 (76)
<b>Cyano (—C≡N)</b>		—SO <sub>2</sub> — (two aromatic attachments)	-1.1500 (42)
N≡CS (sulfur attachment)	0.3540 (7)	—SO <sub>2</sub> — (aliphatic attachment)	-2.4292 (23)
N≡CN (nitrogen attach)	0.3731 (36)	—S(=O)— (aliphatic attachment)	-2.5458 (11)
C≡NC=N	0.0562 (53)	—S—S (disulfide)	0.5497 (5)
—C≡N (other aliphatic attachment)	-0.9218 (94)	—S— (one aromatic attachment)	0.0535 (133)
—C≡N (aromatic attachment)	-0.4530 (153)	—S— (two aromatic attachments)	0.5335 (41)
		—SP (phosphorus attachment)	0.6270 (45)
		—S— (two nitrogen attachments)	1.2000 (40)
		—SC= (aliphatic C=)	-0.1000 (118)
		—S— (aliphatic attach)	-0.4045 (106)
		=S	0.0 <sup>d</sup>
		<b>Halogens</b>	
		Halogen {all} (nitrogen attachment)	0.0001 (138)
		—F (aliphatic attachment)	-0.0031 (377)
		—F (aromatic attachment)	0.2004 (248)
		—Cl (aliphatic attachment)	0.3102 (274)
		—Cl (aromatic attachment)	0.6445 (1124)
		—Br (aliphatic attachment)	0.3997 (58)
		—Br (aromatic attachment)	0.8900 (284)
		—I (aliphatic attachment)	0.8146 (16)
		—I (aromatic attachment)	1.1672 (94)
		<b>Silicon</b>	
		—Si— (aromatic or oxygen attachment)	0.6800 (15)
		—Si— (aliphatic attachment)	0.3004 (5)

<sup>a</sup> Coefficient determined by regression. <sup>b</sup> Frequency; number of compounds in the entire experimental database (8406 compounds) that contain this fragment. <sup>c</sup> Carbonyl is always considered aliphatic by this method. <sup>d</sup> By definition; included as part of other fragments.

*Figura 39 Coeficientes para calcular el coeficiente de partición, según el método átomo fragmento, tomado de: (79).*

Table 2—Correction Factors Involving Aromatic Ring Substituent Positions

	Coeff <sup>a</sup> (Freq) <sup>b</sup>		Coeff <sup>a</sup> (Freq) <sup>b</sup>
Ortho Interactions		Can be either ortho or non-ortho	
—COOH/—OH	1.1930 (19)	—NO <sub>2</sub> with —OH, —N<, or —N=N—	0.5770 (104)
—OH/ester	1.2556 (31)	—C=N with —OH or —N (e.g. cyanophenols or amines)	0.5504 (39)
amino (at 2-position) on pyridine	0.6421 (53)	—NO <sub>2</sub> /—NC(=O) (cyclic-type)	0.3994 (12)
Alkyloxy (or alkylthio) ortho to 1 aromatic nitrogen	0.4549 (67)	—NO <sub>2</sub> /—NC(=O) (non-cyclic-type)	0.7181 (30)
Alkyloxy ortho to two aromatic nitrogens (or pyrazine)	0.8955 (43)	Non-ortho reactions	
Alkylthio ortho to two aromatic nitrogen (or pyrazine)	0.5415 (25)	—N</—OH (e.g. 4-aminophenol)	—0.3510 (59)
Carboxamide (—C(=O)N) ortho to an aromatic nitrogen	0.6427 (37)	—N</ester (e.g. 4-aminobenzoic acid methyl ester)	0.3953 (49)
any <sup>c</sup> /—NHC(=O)C (e.g. 2-methylacetanilide)	—0.5634 (94)	—OH/ester	0.6487 (9)
any <sup>c</sup> /two/—NHC(=O)C (e.g. 2,6-dimethylacetanilide)	—1.1239 (40)	Others	
any <sup>c</sup> /—C(=O)NH (e.g. 2-methylbenzamide)	—0.7352 (26)	Amino-type <sup>d</sup> (at 2-position) on triazine, pyrimidine, or pyrazine	0.8566 (254)
any <sup>c</sup> /two/—C(=O)NH (e.g. 2,6-dimethylbenzamide)	—1.1284 (16)	NC(=O)NS on triazine or pyrimidine (2-position)	—0.7500 (6)
amino-type <sup>d</sup> /—C(=O)N	0.6194 (17)	1,2,3-trialkyloxy	—0.7317 (40)

<sup>a</sup> Coefficient determined by regression. <sup>b</sup> Frequency; number of compounds in the entire experimental database (8406 compounds) that contain this correction factor. <sup>c</sup> Any refers to any ortho substituent other than hydrogen (with the exception of —OH or an amino-type). <sup>d</sup> Can be a primary, secondary, or tertiary amine, including —N—C(=O) types

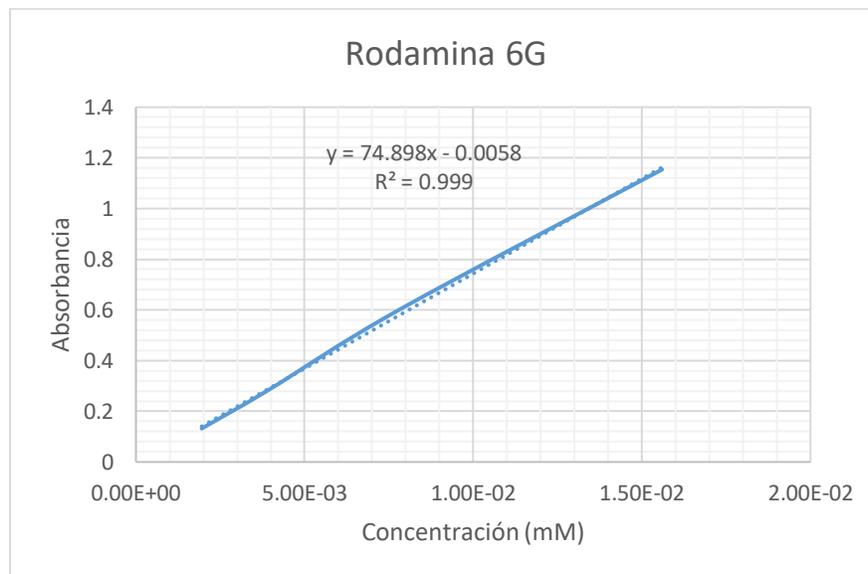
Table 3—Miscellaneous Correction Factors

	Coeff <sup>a</sup> (Freq) <sup>b</sup>		Coeff <sup>a</sup> (Freq) <sup>b</sup>
Various carbonyl factors		Various ring factors	
More than one aliphatic —C(=O)OH	—0.5865 (22)	1,2,3-Triazole ring	0.7525 (124)
HO—CC(=O)CO—	1.7838 (30)	Pyridine ring (nonfused)	—0.1621 (392)
—C(=O)—C—C(=O)N	0.9739 (24)	sym-Triazine ring	0.8856 (71)
—C(=O)NC(=O)NC(=O)— (e.g. barbiturates)	1.0254 (93)	Fused aliphatic ring correction	—0.3421 <sup>c</sup> (295)
—NC(=O)NC(=O)— (e.g. uracils)	0.6074 (135)	Various alcohol, ether, and nitrogen factors	
Cyclic ester (non-olefin type)	—1.0577 (69)	More than one aliphatic —OH	0.4064 (271)
Cyclic ester (olefin-type)	—0.2969 (10)	—NC(C—OH)C—OH	0.6365 (44)
Amino acid (α-carbon type)	—2.0238 (60)	—NCOC	0.5494 (142)
Di—N urea/acetamide aromatic substituent	—0.7203 (135)	HO—CHCOCH—OH	1.0649 (86)
C(C(=O)OH) aromatic (e.g. phenylacetic acid)	—0.3662 (125)	HO—CHC(OH)CH—OH	0.5944 (63)
di-N-aliphatic substituted carbamate	0.1984 (115)	—NH—NH— structure	1.1330 (159)
NC(=O)CR (R is one halogen)	0.3263 (33)	>N—N< structure	0.7306 (57)
—NC(=O)CR <sub>2</sub> (R is 2 or more halogens)	0.6365 (43)		
CC(=O)NCC(=O)OH	0.4193 (35)		
CC(=O)NC(C(=O)OH)S—	1.5505 (20)		
(Ar—O or —C—O)—CC(=O)NH—	0.4874 (38)		
>C=NOC(=O)	—1.0000 (48)		

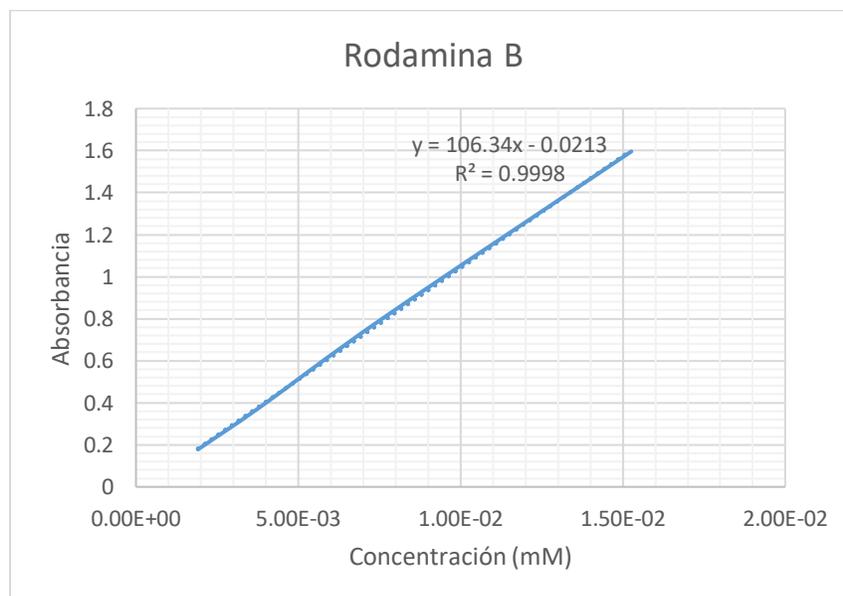
<sup>a</sup> Coefficient determined by regression. <sup>b</sup> Frequency; number of compounds in the entire experimental dataset (8406 compounds) that contain this correction factor. <sup>c</sup> The number of fused ring corrections applied to a structure depends upon the number of fused aliphatic carbons, the atoms in the rings, and the number of cyclic "bridges" (3-D type ring system); the maximum number of corrections is equivalent to the maximum number of free "fused carbons", carbons that can have, or do have, a linear substituent; the number of corrections is decreased by "bridging" and non-carbon ring members.

Figura 40 Factores de corrección según la posición de sustitución del anillo aromático.

**C) Curvas estándar de rodamina para la determinación de la internalización de las rodaminas en las nanopartículas de rHDL.**



*Figura 41 Curva estándar de rodamina 6G.*



*Figura 42 Curva estándar rodamina B.*

**D) Cálculo de concentración de rodaminas dentro de las nanopartículas de rHDL**

	Abs	$\lambda_{\max}$	Ecuación de la recta	Factor de dilución	Concentración (mM)
rHDL-Rod6G	0.365	527.5	$y=74.898x - 0.0058$	1:10	0.0495
rHDL-RodB	0.334	553.5	$y= 106.34x - 0.0213$	1:10	0.0334
rHDL-Rod 123	0.52	500	*	1:10	0.0603

\*Rod 123 por su coeficiente de extinción molar

Ecuación de Beer Lambert:  $\varepsilon = \frac{A}{lc}$ ; donde  $\varepsilon = 85200 M^{-1} y l = 1cm$

$$C = \frac{0.5136}{85200 M^{-1} cm^{-1} (1 cm)} = 6.03 \times 10^{-6} M$$

*Cantidad de rodaminas internalizada en rHDL*

rHDL-Rod 6G

$$2 mL \left( \frac{0.0495 mmol}{1000 mL} \right) \left( \frac{479.01 mg}{1 mmol} \right) = 0.0474 mg$$

rHDL-RodB

$$2 mL \left( \frac{0.0334 mmol}{1000 mL} \right) \left( \frac{479.01 mg}{1 mmol} \right) = 0.0320 mg$$

rHDL-Rod 123

$$2 mL \left( \frac{0.0603 mmol}{1000 mL} \right) \left( \frac{380.82 mg}{1 mmol} \right) = 0.0459 mg$$

## E) Tamaño de partícula (DLS)

<b>Diámetro (nm) (Fi)</b>	<b>F relativa (%) (Xi)</b>	<b>FiXi/100</b>
2312	0.23	5.3176
1944	0.37	7.1928
1635	0.21	3.4335
204.4	0.12	0.2453
171.9	0.34	0.5845
144.5	0.79	1.1416
121.5	1.37	1.6646
102.2	1.85	1.8907
85.9	2.11	1.8125
72.3	2.35	1.6991
60.8	2.74	1.6659
51.1	3.4	1.7374
43	4.57	1.9651
36.1	6.37	2.2996
30.4	8.76	2.663
25.55	11.56	2.9536
21.48	14.71	3.1597
18.06	19	3.4314
15.19	17.02	2.5853
12.77	2.13	0.272
<b>Media</b>		<b>47.715</b>

## 12 Referencias

1. Bhushan B. Springer handbook of nanotechnology [Internet]. [cited 2018 Oct 28]. 1500 p. Available from:  
[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=MWc9DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=1.%09Bhushan,+B.+\(Ed.\).+\(2017\).+Springer+handbook+of+nanotechnology.+Springer.&ots=eaNDVQal92&sig=T7hGfPTwwQLmYJqRSCuyGj3H0nI#v=onepage&q=1.%09Bhushan%2C+B.+\(Ed.\).+\(2017\).+Springer+h](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=MWc9DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=1.%09Bhushan,+B.+(Ed.).+(2017).+Springer+handbook+of+nanotechnology.+Springer.&ots=eaNDVQal92&sig=T7hGfPTwwQLmYJqRSCuyGj3H0nI#v=onepage&q=1.%09Bhushan%2C+B.+(Ed.).+(2017).+Springer+h)
2. Thassu Deepack, Pathak Yashwant DM. Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Swarbrick James, editor. NY: Informa healthcare; 22 p.
3. Lechuga LM, M. L. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. 2011 [cited 2018 Nov 4]; Available from: <http://hdl.handle.net/10261/44635>
4. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov A V. Endocytosis of nanomedicines. J Control Release [Internet]. 2010;145(3):182–95. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>
5. Foroozandeh P, Aziz AA. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. Nanoscale Res Lett. 2018;13.
6. Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C, Zhao Y. Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. Small [Internet]. 2011 May 23 [cited 2019 Sep 12];7(10):1322–37. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21520409>
7. Hirota K, Terada H. 寺田研 博士論文 食食機構.Pdf. 2012;
8. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2007 Mar [cited 2019 Sep 15];8(3):185–94. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318224>
9. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. Immunol Cell Biol [Internet]. 2011 Nov [cited 2019 Sep 15];89(8):836–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423264>

10. Zhu M, Nie G, Meng H, Xia T, Nel A, Zhao Y. Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. *Acc Chem Res* [Internet]. 2013 Mar 19 [cited 2019 Sep 15];46(3):622–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891796>
11. Panariti A, Misericocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol Sci Appl* [Internet]. 2012 Sep 7 [cited 2019 Sep 15];5:87–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24198499>
12. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(17):2873–96.
13. Dawson KA, Salvati A, Lynch I. Nanotoxicology: Nanoparticles reconstruct lipids. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(2):84–5.
14. Dausend J, Musyanovych A, Dass M, Walther P, Schrezenmeier H, Landfester K, et al. Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells. *Macromol Biosci* [Internet]. 2008 Dec 8 [cited 2019 Sep 15];8(12):1135–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18698581>
15. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008 Aug 19 [cited 2019 Sep 15];105(33):11613–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0801763105>
16. Martens T, Remaut K, Demeester J, De Smedt S, Braeckmans K. Nano today. [Internet]. Vol. 9, NANO TODAY. Elsevier; 2006 [cited 2019 Sep 15]. 344–364 p. Available from: <https://biblio.ugent.be/publication/5760110>
17. Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1310–6.
18. Thassu D, Pathak Y, Deleers M. Nanoparticulate Drug-Delivery Systems. In 2007 [cited 2018 Oct 31]. p. 1–31. Available from: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41887477/Nanoparticulate\\_Dru](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41887477/Nanoparticulate_Dru)

g\_Delivery\_Systems.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1541052865&Signature=dqRMCjC9x%2Fa1s5iipNoK6eOayPk%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DNanopart

19. De Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2008 [cited 2019 Jan 13];3(2):133–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18686775>
20. Lagos R, Camus J. Química educación. *Educ Química* [Internet]. 2016;27(4):264–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.04.002>
21. Martínez-soler G, Pérez-Artacho B, Sáez-Fernández E, Gallardo V, Arias J. Estrategias para el transporte de fármacos basadas en el efecto de permeación y retención aumentada Drug delivery strategies based on the enhanced permeation and retention effect. *ARS Pharm.* 2010;113–6.
22. Heldin C-H, Rubin K, Pietras K, Östman A. High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2019 Jan 5];4(10):806–13. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc1456>
23. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today* [Internet]. 2010;15(19–20):842–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.006>
24. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* [Internet]. 2006 Aug 7 [cited 2019 Jan 5];25(34):4633–46. Available from: <http://www.nature.com/articles/1209597>
25. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2014;66:2–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>
26. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2014;10(2):81–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>

27. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(2):145–60.
28. Omstead D, Sjoerdsma J, Bilgicer B. Polyvalent Nanoobjects for Precision Diagnostics. *Annu Rev Anal Chem.* 2019;12(1):1–20.
29. Raut S, Dasseux JL, Sabnis NA, Mooberry L, Lacko A. Lipoproteins for therapeutic delivery: Recent advances and future opportunities. *Ther Deliv.* 2018;9(4):257–68.
30. Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(8):876–85.
31. Mohy Eldin MS, Kamoun EA, Sofan MA, Elbayomi SM. l-Arginine grafted alginate hydrogel beads: A novel pH-sensitive system for specific protein delivery. *Arab J Chem* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2018 Oct 28];8(3):355–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214000100>
32. Calixto GMF, Bernegossi J, De Freitas LM, Fontana CR, Chorilli M, Grumezescu AM. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules.* 2016;21(3):1–18.
33. Mooberry L. UNTHSC Scholarly Repository Evaluation of Reconstituted High Density Lipoprotein as an Anticancer Drug Delivery Platform. Univ North Texas Heal Sci Cent [Internet]. 2009; Available from: <http://digitalcommons.hsc.unt.edu/theses%0Ahttp://digitalcommons.hsc.unt.edu/theses/45>
34. Thaxton CS, Rink JS, Naha PC, Cormode DP. Lipoproteins and lipoprotein mimetics for imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;106:116–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.020>
35. Lin Q, Jin CS, Huang H, Ding L, Zhang Z, Chen J, et al. Nanoparticle-Enabled, Image-Guided Treatment Planning of Target Specific RNAi Therapeutics in an Orthotopic Prostate Cancer Model. *Small* [Internet]. 2014 Aug 13 [cited 2019 Jan 13];10(15):3072–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24706435>

36. Lacko AG, Sabnis NA, Nagarajan B, McConathy WJ. HDL as a drug and nucleic acid delivery vehicle. *Front Pharmacol* [Internet]. 2015 Oct 26 [cited 2019 Jan 7];6:247. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2015.00247/abstract>
37. Lund-Katz S, Phillips MC. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell Biochem* [Internet]. 2010 [cited 2019 Jan 7];51:183–227. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213545>
38. Saito H, Lund-Katz S, Phillips MC. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog Lipid Res*. 2004;43(4):350–80.
39. Voet D, Voet JG. *Bioquímica* [Internet]. Editorial Médica Panamericana; 2006 [cited 2019 May 14]. Available from: [https://books.google.com.mx/books/about/Bioquímica.html?id=r5bedH\\_aST0C](https://books.google.com.mx/books/about/Bioquímica.html?id=r5bedH_aST0C)
40. Mathews CK, Van Holde KE (Kensal E, Ahern KG, González de Buitrago JM). *Bioquímica* [Internet]. Addison Wesley; 2002 [cited 2019 Oct 7]. Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=yClxhenSfA8C&dq=mathews+bioquimica&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiN0-brsInlAhUJ2qwKHWI1BhkQ6AEIKTAA>
41. Laris E M del R, Arteaga L A, Cuevas M A, Rigotti R A. El colesterol HDL: ¿un nuevo objetivo terapéutico en el manejo de las dislipidemias y la aterosclerosis? *Rev Med Chil* [Internet]. 2005 Jul [cited 2019 Jan 31];133(7). Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872005000700011&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872005000700011&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
42. Kuai R, Li D, Chen YE, Moon JJ, Schwendeman A. High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles. *ACS Nano*. 2016;10(3):3015–41.
43. Tardif JC, Ballantyne CM, Barter P, Dasseux JL, Fayad ZA, Guertin MC, et al. Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: A randomized trial. *Eur Heart J*. 2014;35(46):3277–86.

44. Tricoci P, D'Andrea DM, Gurbel PA, Yao Z, Cuchel M, Winston B, et al. Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein, CSL112, in Patients With Atherosclerosis: Safety and Pharmacokinetic Results From a Phase 2a Randomized Clinical Trial. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2015 Aug 25 [cited 2019 Jul 28];4(8):e002171. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.115.002171>
45. Yingchoncharoen P, Kalinowski DS, Richardson DR. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2018 Oct 28];68(3):701–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27363439>
46. Ditiatkovski M, D'Souza W, Kesani R, Chin-Dusting J, de Haan JB, Remaley A, et al. An Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide Designed with a Reductionist Approach Stimulates Reverse Cholesterol Transport and Reduces Atherosclerosis in Mice. *PLoS One*. 2013;8(7).
47. Leman LJ, Maryanoff BE, Ghadiri MR. Molecules that mimic apolipoprotein A-I: Potential agents for treating atherosclerosis. *J Med Chem*. 2014;57(6):2169–96.
48. Zhang Z, Chen J, Ding L, Jin H, Lovell JF, Corbin IR, et al. HDL-Mimicking Peptide-Lipid Nanoparticles with Improved Tumor Targeting. *Small* [Internet]. 2010 Feb 5 [cited 2019 Jan 9];6(3):430–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200901515>
49. Neyen C, Mukhopadhyay S, Gordon S, Hagemann T. An apolipoprotein A-I mimetic targets scavenger receptor a on tumor-associated macrophages: A prospective anticancer treatment? *Oncoimmunology*. 2013;2(6):3–6.
50. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides - ATVB in focus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1325–31.
51. Kader A, Pater A. Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little affect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma

- cells. *J Control Release* [Internet]. 2002 Apr 23 [cited 2019 Jan 7];80(1–3):29–44. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365901005363>
52. Master A, Livingston M, Sen Gupta A. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges. *J Control Release* [Internet]. 2013;168(1):88–102. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.02.020>
53. Bolze F, Jenni S, Sour A, Heitz V. Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy. *Chem Commun* [Internet]. 2017;53(96):12857–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7CC06133A>
54. Ormond A, Freeman H. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials (Basel)* [Internet]. 2013 Mar 6 [cited 2019 Sep 23];6(3):817–40. Available from: <http://www.mdpi.com/1996-1944/6/3/817>
55. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1(4):279–93.
56. Roblero-Bartolón GV, Ramón-Gallegos E. Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. *Gac Med Mex*. 2015;151(1):85–98.
57. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR, Mroz P, Yaroslavsky A, et al. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2011 Jun 3 [cited 2019 Feb 27];3(2):2516–39. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/2/2516>
58. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. Vol. 473, *Biochemical Journal*. 2016. p. 347–64.
59. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem Rev*. 2015;115(4):1990–2042.

60. Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, et al. Photodynamic Therapy for Treatment of Solid Tumors — Potential and Technical Challenges. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2008 Aug [cited 2019 Sep 23];7(4):309–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18642969>
61. Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol*. 2008;26(11):612–21.
62. Calixto G, Bernegossi J, Fonseca-Santos B, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2014 [cited 2018 Oct 27];9:3719–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143724>
63. Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncol*. 2010;6(6):929–40.
64. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2010 Nov 14 [cited 2019 Sep 5];7(11):653–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838415>
65. Zhang Z, Cao W, Jin H, Lovell J, Yang M, Ding L, et al. Biomimetic Nanocarrier for Direct Cytosolic Drug Delivery. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2009 Nov 16 [cited 2019 May 16];48(48):9171–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876988>
66. Sharman WM, van Lier JE, Allen CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2004 Jan 13 [cited 2019 Sep 5];56(1):53–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706445>
67. Reddi E. Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1997;37(3):189–95.
68. Jutta Arden Gerhard Delta Volker Huth Ute Kringel Dimitrios Peros Karl H. Drexhage. Fluorescence and lasing properties of rhodamine dyes. 2002;49:352–8.

69. Hirakawa K, Ito H. Rhodamine-6G can photosensitize folic acid decomposition through electron transfer. *Chem Phys Lett* [Internet]. 2015;627:26–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2015.03.030>
70. Ferguson MW, Beaumont PC, Jones SE, Navaratnam S, Parsons BJ. Excited state and free radical properties of Rhodamine 123: a laser flash photolysis and radiolysis study. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 1999 Jan 1 [cited 2019 Aug 11];1(2):261–8. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=a807013j>
71. Davis S, Weiss MJ, Wong JR, Lampidis TJ, Chen LB. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1985 Nov 5 [cited 2019 Aug 12];260(25):13844–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4055760>
72. Morlière P, Santus R, Bazin M, Kohen E, Carillet V, Bon F, et al. IS RHODAMINE 123 A PHOTSENSITIZER? *Photochem Photobiol* [Internet]. 1990 Oct 1 [cited 2019 Aug 11];52(4):703–10. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1990.tb08670.x>
73. Ferguson MW, Beaumont PC, Jones SE, Navaratnam S, Parsons BJ. Excited state and free radical properties of Rhodamine 123: A laser flash photolysis and radiolysis study. *Phys Chem Chem Phys*. 1999;1(2):261–8.
74. Powers SK, Beckman WC, Brown JT, Kolpack LC. Interstitial laser photochemotherapy of rhodamine-123-sensitized rat glioma. *J Neurosurg* [Internet]. 1987 Dec [cited 2019 Aug 11];67(6):889–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3681427>
75. Stracke F, Heupel M, Thiel E. Singlet molecular oxygen photosensitized by Rhodamine dyes: Correlation with photophysical properties of the sensitizers. *J Photochem Photobiol A Chem*. 1999;126(1–3):51–8.
76. OMS. No Title [Internet]. *Cáncer. Datos y cifras*. 2018 [cited 2019 Jun 11]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

77. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 61/18 2 DE FEBRERO DE 2018 PÁGINA 1/13 &quot;ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL... DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)&quot; DATOS NACIONALES. 2018;13. Available from:  
[http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_Nal.pdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf)
78. Aldaco-Sarvide F, Pérez-Pérez P, Cervantes-Sánchez G, Torrecillas-Torres L, Erazo-Valle-Solís AA, Cabrera-Galeana P, et al. Mortalidad por Cáncer en México: actualización 2015. *Gac Mex Oncol.* 2018;17(1).
79. M. MW, H. HP. Atom Fragment Contribution Method for Estimating Octanol-Water Partition-Coefficients. *J Pharm Sci.* 1995;84(1):83–92.
80. Introducción a la química farmacéutica [Internet]. McGraw-Hill/Interamericana; 2001 [cited 2019 Jun 27]. Available from:  
[https://books.google.com.mx/books/about/Introducción\\_a\\_la\\_química\\_farmacéutic.html?id=iCXOPQAACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.mx/books/about/Introducción_a_la_química_farmacéutic.html?id=iCXOPQAACAAJ&redir_esc=y)
81. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. Environmental Organic Chemistry [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2002 [cited 2019 Jun 30]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471649643>
82. Zamacona JMDPE. WO2007063156A1 - Procedimiento de preparación de liposomas - Google Patents [Internet]. Procedimiento de preparación de liposomas. 2005 [cited 2019 Nov 25]. Available from:  
<https://patents.google.com/patent/WO2007063156A1>
83. Beney L, Perrier-Cornet JM, Hayert M, Gervais P. Shape modification of phospholipid vesicles induced by high pressure: Influence of bilayer compressibility. *Biophys J* [Internet]. 1997;72(3):1258–63. Available from:  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78772-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78772-1)
84. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arab

J Chem [Internet]. 2017; Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>