



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**Citotoxicidad y producción de ROS inducidas por
irradiación del sistema rHDL/rodamina en terapia
fotodinámica**

TESIS QUE PRESENTA

Alfredo Delgadillo Ramírez

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Licenciado en Biología

DIRECTORES

Dra. en C.S. Liliana Aranda Lara

Dra. en C. Keila Isaac Olivé

TOLUCA, ESTADO DE MEXICO 2022

"No te preocupes por los fracasos, preocúpate por las oportunidades que pierdes cuando ni siquiera lo intentas".

Jack Canfield.

Índice

Abreviaturas.....	5
Índice de figuras	6
Índice de tablas	6
Resumen	7
1. Introducción	9
2. Marco teórico.....	11
2.1Cáncer.....	11
2.2 Nanotecnología.....	12
2.2.1 Nanomedicina y sus aplicaciones.	13
2.2.2 Empleo de nanopartículas como transportador de fármacos en tratamientos oncológicos.	14
2.2.3 Tipos de nanosistemas de transporte y liberación de fármacos.....	16
2.2.4 Mecanismos de distribución y transporte de nanopartículas.....	18
2.3 Nanosistemas basados en lípidos como transportadores de fármacos.....	21
2.3.1 Lipoproteínas como transportadores de fármacos.....	22
2.4 Lipoproteínas de alta densidad	24
2.4.1 Síntesis y metabolismo de HDL (HDL).....	24
2.4.2 Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL).....	26
2.4.3 Síntesis de rHDL.....	27
2.4.5. Mecanismos de entrega de fármacos en rHDL.....	28
2.5 Terapia fotodinámica	29
2.6 Fotosensibilizadores.....	33
2.6.1 Rodaminas como fotosensibilizadores	35
2.7 Sistema de entrega de luz en PDT	36
2.7.1 Radiación Cerenkov.....	38
2.7.2 Absorción de dos fotones	39
3. Planteamiento del problema	40
4. Justificación	41
5. Hipótesis.....	42
6. Objetivos.....	42
7. Materiales	43

8. Metodología	46
8.1 Preparación rHDL	46
8.2 Cultivo celular	46
8.3 Cuantificación relativa de la expresión de receptores SR-B1	47
8.4 Evaluación cualitativa de liberación de las rodaminas por las rHDL.....	48
8.4.1 Evaluación de liberación específica mediada por el sistema rHDL y el receptor SR-B1.	48
8.5 Evaluación de la viabilidad celular con XTT	49
8.5.1 Evaluación de la viabilidad celular con XTT en tratamientos con irradiados con luz Cerenkov	49
8.6 Evaluación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por microscopia de fluorescencia.....	50
2.5. Análisis estadístico	50
9. Resultados y discusión.....	52
9.1 Expresión relativa del receptor SR-B1	52
9.2 Evaluación cualitativa de liberación de las rodaminas mediada por HDL.....	53
9.2.1 Evaluación de liberación específica mediada por el sistema rHDL y el receptor SR-B1.....	55
9.3 Viabilidad celular de T47D en presencia de rHDL-rodaminas e irradiación a 532 nm	56
9.3.1 Evaluación de la viabilidad celular con XTT en tratamientos con irradiados con luz Cerenkov.	58
9.4 Evaluación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por microscopia de fluorescencia.....	59
10. Conclusiones	61
11. Referencias	62

Abreviaturas

Apo: Apolipoproteína

CR: Radiación Cerenkov

EPR: Efecto de permeabilidad y retención aumentada

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

LCAT: Lecitín colesterol aciltransferasa

NPs: Nanopartículas

NIR: Región cercana al infrarrojo

PDT: Terapia fotodinámica

PS: Fotosensibilizador

ROS: Especies de oxígeno reactivo

R6: Rodamina 6G

R123: Rodamina 123

RB: Rodamina B

rHDL: Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas

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

XTT: Ensayo tetrazolio/formazán

1PA: Single Photon Absorption

2PA: Absorción de doble fotón (Two-photon absorption)

¹⁷⁷Lu: Lutecio 177

Índice de figuras

Fig. 1: Representación de la acumulación pasiva y activa.....	14
Fig 2: Esquematización de rutas endocíticas y transporte intracelular	20
Fig. 3: Estructura básica de una lipoproteína.	22
Fig.4. Proceso de formación de las HDL	25
Fig.5 Liberación citosólica directa del agente terapéutico o de imagen usando nanopartículas rHDL.....	26
Fig. 6. Diagrama de Jablonski esquematizado en PDT	31
Fig.7.Dependencia de la longitud de onda y porcentaje de la transmisión de luz en la piel.	37
Fig.8: Expresión relativa del receptor SR-B1 en células de cáncer de mama T47D y cáncer de próstata PC3.....	52
Fig.10 : % Captación HDL-R123 con bloqueo y sin bloqueo de receptores SR-B1.....	55
Fig. 11. Porcentaje de viabilidad celular del sistema rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB.	57
Fig. 12. Porcentaje de viabilidad celular del sistema rHDL-R6G y radiación Cerenkov (¹⁷⁷ Lu).....	58
Fig. 13. Producción de ROS del sistema rHDL-R6G irradiada con 532 nm en células T47D.	60

Índice de tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la terapia fotodinámica.	32
Tabla 2. Descripción de Variables	51

Resumen

La terapia fotodinámica (PDT) es una modalidad de fototerapia que usa fuentes de luz para excitar agentes fotosensibles (fotosensibilizador) y producir especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS se generan a través de dos tipos de reacciones. La reacción de tipo I que implica la transferencia de electrones a una molécula sustrato para formar radicales libres. La reacción de tipo II produce el estado de oxígeno electrónicamente excitado y altamente reactivo conocido como oxígeno singlete. Ambas especies son altamente reactivas y citotóxicas con la capacidad de producir daños oxidativos en la membrana celular y proteínas. Sin embargo, la PDT convencional está limitada por la baja acumulación del fotosensibilizador. Para superar este obstáculo, se ha implementado la estrategia de utilizar sistemas transportadores, cuyo fin es incrementar, en el interior de la célula, la concentración de los agentes terapéuticos. Entre estos nuevos sistemas se encuentran las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL). Estos vehículos ya se aplican en varias terapias, entre ellas la terapia fotodinámica. Que ha comenzado a explorar la conjugación este tipo de transportadores con nuevos agentes fotosensibilizadores, como la rodamina que son compuestos químicos heterocíclicos de gran fotoestabilidad, excitación a bajas longitudes de onda, un alto campo de emisión de fluorescencia, solubilidad en agua y permeables a la membrana plasmática. Sin embargo, este sistema de liberación de fármacos conjugada con las rodaminas cuenta con pocas investigaciones respecto a su aplicación en terapia fotodinámica. Por tal motivo, el objetivo del proyecto fue evaluar la citotoxicidad y producción de radicales libres (ROS) inducidas por irradiación del sistema rHDL-rodamina en células positivas a SR-B1 y su potencial aplicación en terapia fotodinámica. Para lograr este objetivo se evaluó la citotoxicidad mediante el estudio de viabilidad celular inducida por la interacción entre el sistema rHDL-rodamina e irradiación a 532 nm y luz Cerenkov en células T47D a través de un ensayo XTT. Se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno inducidas por la interacción entre el sistema rHDL-rodamina e irradiación a 532 nm en células T47D mediante microscopia de fluorescencia a través del ensayo CellRox. Se evaluó la captación de las rodaminas mediada por el sistema rHDL en células T47D mediante microscopia de fluorescencia. El presente trabajo muestra que sistema rHDL-R6 irradiado a 532 nm y sin irradiación produjeron disminuciones significativas en la viabilidad celular lo que representa un alto efecto citotóxico/fototóxico. El sistema rHDL-123 al ser irradiado a 532 nm produjo una ligera disminución en la viabilidad y rHDL-B no mostró efecto. Los

sistemas rHDL-R6 y R6G irradiado por luz Cerenkov (100 uCi) mostraron una disminución en la viabilidad celular, lo que indica actividad fotodinámica.

En los estudios de microscopia de fluorescencia se obtuvo la siguiente jerarquía en relación a la internalización intracelular de las rodaminas en células T47D: RG6>R123>RB. La rodamina R6 demostró tener la capacidad para producir especies reactivas de oxígeno de una manera eficiente.

Este trabajo muestra que el sistema rHDL-R6G y rHDL-123 irradiados a 532 nm tienen capacidad para efectos producir citotóxico/fototoxico. Lo que los vuelve candidatos para la terapia fotodinámica. También se encontró que la radiación Cerenkov tiene potencial como fuente de luz interna y finalmente se indica que la rodamina 6G es el mejor candidato como agente fotosensibilizador debido a capacidad para producir ROS e internalizarse de manera eficiente.

1. Introducción

La terapia fotodinámica (PDT) es una modalidad de terapia que usa fuentes de luz para activar moléculas fotosensibles (fotosensibilizador) y producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Roblero Bartolón et al., 2015). Los fotosensibilizadores (PS) al ser irradiados con luz pasan a un estado excitado (Abrahamse & Hamblin, 2016; Roblero Bartolón et al., 2015), y transfieren la energía de excitación al oxígeno molecular presente en el tejido, dando lugar al oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y otros iones radicales, los cuales son altamente reactivos y citotóxicos con la capacidad de producir daños oxidativos en la membrana celular y proteínas (van Straten et al., 2017). De manera localizada y semi-controlada, ya que muchos de los PS tienen propiedades específicas que limitan su rango de acción en diferentes tejidos, como solo poder activarse en presencia de determinadas longitudes de onda de luz. La administración de los PS se hace a través de transportadores específicos (NPs) diseñados para ser atraídos y liberar su carga a los sitios de interés mediante el uso de proteínas receptoras o ligandos. Esto potencia su seguridad como agente terapéutico en comparación con los fármacos o tratamientos más usados en la actualidad (Allison & Sibata, 2010; Roblero Bartolón et al., 2015; van Straten et al., 2017). Sin embargo, PDT está limitada por dos factores: la concentración del fotosensibilizador y la penetración de la luz visible en el tejido.

Las rodaminas son compuestos orgánicos heterocíclicos fluorescentes que presentan una baja toxicidad, fotoestabilidad, solubilidad en agua y tienen capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (C. Liu et al., 2019). Además, las propiedades catiónicas de algunas rodaminas permiten que estas se localicen y acumulen en las mitocondrias de células de cáncer (C. Liu et al., 2019), por lo que tienen potencial para ser agentes anticancerígenos (Davies et al., 2016).

Una manera de incrementar la concentración de agentes terapéuticos y/o de imagen en el interior de la célula blanco es a través de sistemas de transporte a escala nanométrica. Dichos sistemas pueden ser diseñados con características que permitan el reconocimiento específico de moléculas expresadas en las células blanco (Lucky et al., 2015). Los sistemas de liberación controlada como nanopartículas poliméricas han incrementado la eficiencia fotodinámica al mejorar la producción de $^1\text{O}_2$. Sin embargo, estos sistemas tienen la desventaja de recircular en el torrente sanguíneo, dando como resultado una disminución de la concentración del fotosensibilizador en el tejido blanco

(Lucky et al., 2015). Recientemente, las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) (Shahzad et al., 2011), se han utilizado para transportar y liberar de manera específica agentes terapéuticos o de imagen en células de cáncer positivas a SR-B1 (Isaac-Olivé et al., 2019). Las HDL son reconocidas por el receptor SR-B1 al interactuar con la apolipoproteína A1 (Apo-A1), el cual es el mayor componente estructural y funcional de las HDL. Las rHDL tienen la ventaja de: ser biocompatibles, capacidad de incorporar moléculas anfífilas y/o hidrofóbicas y/o hidrofílicas y un mecanismo de internalización celular vía receptor SR-B1 (Rui et al., 2017; Sabnis et al., 2012; Shahzad et al., 2011). Por tales características, se ha comenzado a usar transportadores basados en las HDL como vehículos de fármacos en varias terapias, entre ellas la terapia fotodinámica (Ma et al., 2018; Meyer et al., 2013; Raut et al., 2018; R. Zhang et al., 2019). Sin embargo, este sistema de liberación de fármacos no ha sido evaluado como transportador de rodaminas para su aplicación en terapia fotodinámica. Por tal motivo, el objetivo del presente proyecto es evaluar la citotoxicidad y producción de radicales libres (ROS) inducidas por irradiación del sistema rHDL-rodamina con el fin de evaluar su potencial como sistema de transporte de rodamina en células de cáncer positivas a SR-B1 para su aplicación en terapia fotodinámica.

2. Marco teórico

2.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por el crecimiento descontrolado y una rápida propagación de células anormales en el organismo (Barrios & Garau, 2017). Las células de cáncer se producen cuando una célula normal sufre alteraciones en su genoma por agentes carcinógenos (Cooper & Hausman, 2007), perdiendo la capacidad de regular los mecanismos del ciclo celular, la reparación del ADN, la inactivación de genes supresores y la apoptosis (Bast Jr. et al., 2017).

El proceso mediante el cual una célula normal se convierte en una célula neoplásica (carcinogénesis), puede ser dividido en cuatro fases: iniciación, promoción, conversión y progresión del tumor (Bast Jr. et al., 2017). Durante la iniciación, el ADN muta por carcinógenos químicos o físicos, permitiendo la activación de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores, confiriendo a la célula la capacidad de dividirse a una mayor velocidad y heredar estas mutaciones primarias a las nuevas células (células iniciales) (Bast Jr. et al., 2017; Cooper & Hausman, 2007; Karin & Greten, 2005). La promoción tumoral es el proceso donde las células iniciales acumulan más mutaciones, su genoma se hace más inestable debido al efecto ejercen los promotores tumorales y hay una selección clonal donde las células con más mutaciones adaptativas comienzan a proliferar a mayor rapidez y formar los primeros microambientes tumorales (Bast Jr. et al., 2017; Cooper & Hausman, 2007). La conversión o transformación maligna, es la fase donde las células pre-neoplásicas adquieren un fenotipo maligno, los agentes tumorales inhiben en su totalidad los genes supresores de tumorales y activan determinados proto-oncogenes, otorgando finalmente a las células sus caracteres neoplásicos funcionales (Hallmarks) (Bast Jr. et al., 2017). Finalmente, la progresión del tumor se caracteriza por el incremento en el tamaño del tumor, la invasión y metástasis. Durante esta fase, nuevas mutaciones pueden ser adquiridas, permitiendo a la célula de cáncer adquirir más ventaja sobre el crecimiento y tener más de un fenotipo maligno (Bast Jr. et al., 2017; Karin & Greten, 2005)

De acuerdo con Hanahan y Weinberg (2011), hay 10 alteraciones fisiológicas esenciales (Hallmarks) que caracterizan a una célula tumoral: 1) señalización autocrina anormal que contribuye al crecimiento incontrolado de las células de cáncer, 2) insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, 3) evasión de la muerte celular programada (apoptosis), 4) ilimitado potencial de replicación, 5) angiogénesis ininterrumpida, 6) invasión de tejidos y metástasis, 7) reprogramación del metabolismo energético, 8) la evasión de la respuesta inmunológica, 9) un genoma inestable con numerosas mutaciones y 10) Capacidad de promover inflamaciones tumorales (Bast Jr. et al., 2017; Hanahan & Weinberg, 2011).

2.2 Nanotecnología

La nanotecnología comprende la creación, manipulación y uso de materiales a escalas nanométricas (Boisseau & Loubaton, 2011; Patra et al., 2018). Con aplicaciones en los campos de: química, física, ingeniería, biología y medicina (Ferrari, 2005). Las primeras tres disciplinas antes enunciadas emplean la nanotecnología para formar compuestos químicos con arreglos atómicos específicos para mejorar la eficiencia o durabilidad, desarrollo de nanodispositivos o nanopartículas para monitoreo, manipulación o entrega de compuestos, el desarrollo de nuevos materiales, etc. (Adams & Barbante, 2015). La biología y medicina utilizan los nanorecursos enunciados anteriormente en *sistemas nano-biológicos integrados* compuestos por 4 sectores de aplicación: medición celular donde se estudia la estructura y composición celular a escala nanométrica., alteración celular o perturbación celular, donde se estudia el funcionamiento y metabolismo de las células *In vivo* a nivel nanométrico., diagnóstico médico donde se aplican los recursos médicos como nanotransportadores o nanodispositivos para desarrollar nuevas metodologías de detección de enfermedades., y tratamiento médico donde se aplican para la aplicación de nuevas terapias más seguras como terapia fotodinámica (PDT) (Hamblin et al., 2015; Wong et al., 2013).

2.2.1 Nanomedicina y sus aplicaciones.

La nanomedicina es el término para definir la aplicación de la nanotecnología en la medicina (Boisseau & Loubaton, 2011), y las principales áreas donde se emplea son: diagnóstico molecular, farmacéutica y medicina regenerativa (Boisseau & Loubaton, 2011; Emerich & Thanos, 2003).

La aplicación de la nanotecnología en el diagnóstico molecular se basa en el empleo de nanopartículas como lipoproteínas, liposomas, dendrímeros, etc. (Jain, 2003), para transportar sondas de marcaje que permitan detectar alteraciones a nivel molecular y/o genético, principalmente la localización de mutaciones de genes. (Boisseau & Loubaton, 2011; Jain, 2003). Teniendo como ejemplo el síndrome mielodisplásico, una enfermedad originada por mutaciones en los genes *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *RUNX1*, *SRSF2* y *SF3B1* de las células de la médula ósea, los estudios convencionales para la detección de la enfermedad que incluyen hemogramas completos, biopsias medulares y estudios de citogenética que demoran más de 13 días, mientras que una prueba que conjunta nanotransportadores y sondas de marcaje de hibridación fluorescente como FISH reduce el estudio a 2 o 3 días (Song et al., 2017).

El área farmacéutica se utiliza para el desarrollo de vehículos que mejoren la eficiencia del transporte y liberación de agentes quimioterapéuticos como: doxorubicina, metotrexato, paclitaxel, etc. (Boisseau & Loubaton, 2011; Emerich & Thanos, 2003).

La medicina regenerativa, que comprende los procesos para crear tejidos funcionales y regeneración de órganos dañados como hígado, músculos, tendones, tejido neural, piel, hueso, etc. (Boisseau & Loubaton, 2011). Para ello se diseñan nanomateriales con características específicas en propiedades físicas como tamaño, forma y topografía de superficie., propiedades químicas como los elementos químicos de elaboración, microarreglos atómicos, propiedades electroquímicas, etc. (Yang et al., 2019). El objetivo es sintetizar materiales que provean de estructuras de superficie y soporte a las células y que a su vez estimulen la adhesión, movilidad y diferenciación celular (Engel et al., 2007). Uno de los casos más comunes es la regeneración de regiones óseas, donde los osteoblastos son cultivados en nano superficies de titanio que debido a sus propiedades químicas favorece la expresión de determinados fenotipos celulares óseos a diferencia de cuando son cultivados en placas Petri de vidrio o plástico (Zinger et al., 2005).

2.2.2 Empleo de nanopartículas como transportador de fármacos en tratamientos oncológicos.

Los avances en la nanomedicina han permitido el desarrollo e implementación de nuevos métodos y técnicas en las terapias oncológicas. Uno de estos es el uso de nanopartículas para la administración de fármacos, los cuales permiten resolver las limitaciones que presentan los métodos convencionales de suministración (Dadwal et al., 2018).

Las nanopartículas cargadas de fármacos se distribuyen por el torrente sanguíneo donde permanecerán un tiempo prolongado antes de llegar a su objetivo (Attama & Umeyor, 2015). Para que el fármaco llegue al tumor debe evitar ser detectado por el sistema reticuloendotelial y la actividad fagocítica esplénica-linfática, ya que estos participan en la respuesta inmune primaria contra microorganismos, proteínas y partículas extrañas (Attama & Umeyor, 2015; Blanco et al., 2015; Vargas et al., 2013). Una vez alcanzado el tumor, las nanopartículas pueden alcanzar el tejido mediante dos mecanismos: acumulación pasiva y activa (Fig. 1).

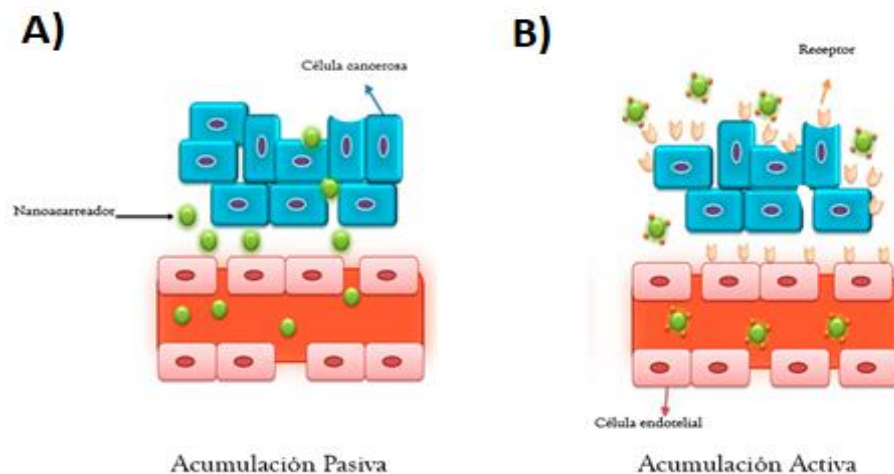


Fig. 1: Representación de la acumulación A) pasiva y B) activa de un nanoportador en el tejido tumoral. Modificado de Rojas-Aguirre et al, 2016.

Acumulación Pasiva

Una de las características más importantes que presenta un tejido tumoral, son sus células que se reproducen y crecen de manera descontrolada (Rojas-Aguirre et al., 2016). Lo que estimula el proceso de la angiogénesis, pero de una manera acelerada y defectuosa, originando una arquitectura con fenestraciones que en combinación con un sistema de drenaje linfático disfuncional, produce una patofisiología única conocida como efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) (Rojas-Aguirre et al., 2016). Lo anterior, permite que las nanopartículas puedan anclarse en las fenestras y liberen los fármacos, aumentando su rango de acción, aunque la difusión es variable (Dadwal et al., 2018) o aumentar la concentración del fármaco en el tumor donde está retenido (Fig. 1a) (Rojas-Aguirre et al., 2016).

Acumulación Activa

Las células tumorales suelen sobreexpresar algunos tipos de receptores de membrana que promueven su crecimiento descontrolado (Dadwal et al., 2018; Rojas-Aguirre et al., 2016). Si el nanoacarreador se «decora» con un ligando (péptido, proteína o anticuerpo) que reconozca al receptor, se dirigirá y acumulará preferentemente en el tejido tumoral, en donde deberá liberar su carga terapéutica (Fig. 1b) (Rojas-Aguirre et al., 2016).

2.2.3 Tipos de nanosistemas de transporte y liberación de fármacos

Las nanopartículas empleadas como sistemas de administración de fármacos, pueden tener diferentes tamaños, formas y están compuestas de diversos materiales como: lípidos, polímeros, partículas virales, componentes organometálicos, etc. (Dadwal et al., 2018). Los objetivos primarios de estos vehículos son: encapsular fármacos, incrementar la distribución y reducir la toxicidad, además de proveerles protección contra la degradación (Bhatia, 2016; De Jong & Borm, 2008). Una gran parte de las nanopartículas utilizadas como sistemas de transporte para el tratamiento de cáncer, están constituidas principalmente por polímeros o lípidos.

Transportadores basados en polímeros

Las nanopartículas poliméricas son transportadores coloidales de un tamaño de 10 a 1000 nm, estos se dividen en dos categorías: nanocápsulas y nanoesferas. El primero son sistemas vesiculares con una cubierta polimérica y un núcleo interno, mientras en el segundo consiste de una matriz polimérica (D'Mello et al., 2016; des Rieux et al., 2006). Los fármacos se unen covalentemente o se encapsulan dentro de la matriz polimérica o el núcleo (Dadwal et al., 2018), y algunas nanopartículas de este tipo son:

- **Micelas poliméricas:** Son copolímeros anfifílicos unidos que se acumulan para formar una estructura con un núcleo y cubierta, de un tamaño menor a 100 nm en medios acuosos (Dadwal et al., 2018). Estas características le permiten tener un núcleo hidrofóbico estable y que los polímeros sean solubles en agua, debido a esto tienen alto potencial para la administración sistémica de fármacos insolubles (Bhatia, 2016).
- **Dendrímeros:** Son macromoléculas de dimensiones nanométricas, compuestas de múltiples ramificaciones de monómeros que emergen de un núcleo central, además de ser solubles en agua y tienen una cavidad interna hueca donde se pueden cargar fármacos o marcadores (Dadwal et al., 2018).

Transportadores basados en lípidos

Las nanopartículas lipídicas están compuestas de polímeros lipídicos (fosfolípidos) y alcanzan tamaños de 5 nm a cientos de nanómetros (des Rieux et al., 2006; Mehanna et al., 2012). Estas moléculas se forman cuando soluciones lipídicas saturadas son dispersas en un tensioactivo acuoso, formando vesículas lipídicas o emulsiones (Ashara et al., 2018; Malam et al., 2009; Vamsi & Perumal, 2016). La nanopartícula más representativa de este grupo es:

- **Liposomas:** Son estructuras esféricas que se forman espontáneamente, cuando lípidos son dispersos en un medio acuoso (Torrelló et al., 2002). Su tamaño suele ser mayor a 20 nm, son insolubles y forman dispersiones coloidales (Dadwal et al., 2018). Estas nanopartículas son ampliamente usadas para encapsular fármacos hidrofílicos (Vamsi & Perumal, 2016).

2.2.4 Mecanismos de distribución y transporte de nanopartículas

Las nanopartículas internalizan su carga a la célula principalmente por medio de la endocitosis (Iversen et al., 2011; Oh & Park, 2014), el cual pertenece a los mecanismos del transporte activo. En este proceso la célula captura material del entorno extracelular a través de la formación de una invaginación que posteriormente generara vesículas endocíticas (Sahay et al., 2010). La endocitosis a la vez se divide principalmente en dos tipos: fagocitosis y pinocitosis; sin embargo hay otras categorías especialistas como: endocitosis mediada por clatrina o caveolas y/o independiente de clatrina y caveolas (Behzadi et al., 2017; Garrett & Mellman, 2001; Ogawa & Kobuke, 2008; Oh & Park, 2014; Sahay et al., 2010).

La fagocitosis es el proceso mediante el cual la célula engulle partículas sólidas de gran tamaño y la pinocitosis engulle moléculas pequeñas disueltas en un fluido (Calvo & Mendoza, 2012; Sahay et al., 2010). La diferencia que existe en estos mecanismos radica en el tamaño del endosoma que se forma. En la fagocitosis las vesículas tienen tamaños superiores de 250 nm y la pinocitosis el tamaño de los endosomas es menor a 150 nm (Alberts et al., 2002). Esta última posee una subcategoría denominada macropinocitosis que forma macropinosomas de 5 μm a 0.2 μm (Garrett & Mellman, 2001). Además, la fagocitosis es realizada comúnmente por los macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas. Mientras que la pinocitosis se presenta en todos los tipos de células y tiene múltiples formas dependiendo del origen y función de la célula (Doherty & McMahon, 2009; Sahay et al., 2010).

La endocitosis mediada por clatrina es un mecanismo para internalizar macromoléculas menores a 100 nm (C. Wang et al., 2017). Durante este proceso ligandos y algunos receptores de membrana como la familia Fc γ se unen, formando el complejo ligando-receptor (Garrett & Mellman, 2001; McMahon & Boucrot, 2011). El cual señala proteínas específicas que reclutan clatrina para la formación de la vesícula (Garrett & Mellman, 2001). Mientras ocurre este recubrimiento, también se lleva a cabo el empaquetamiento de los materiales a internalizar (McMahon & Boucrot, 2011). La vesícula recién formada viajará al interior de la célula donde el revestimiento de clatrina se desprenderá, permitiendo que se fusione con los endosomas primarios, donde continuaran el proceso hasta que puedan escapar y liberar su carga (Garrett & Mellman, 2001; McMahon & Boucrot, 2011).

La endocitosis mediada por caveolas, es un mecanismo que internaliza materiales por medio de invaginaciones uniformes de la membrana plasmática denominadas caveolas, que tienen un diámetro de 50-100 μm y que se caracterizan por la presencia de caveolina, una proteína integral de la membrana (González-Muñoz, 2009). Esta proteína forma oligómeros que recubrirán a las vesículas, las cuales serán liberadas de la membrana plasmática a través de la acción dinámica (fusión) de los caveosomas presentes en la célula, los cuales pueden evitar los lisosomas y proteger el contenido de la degradación (González-Muñoz, 2009).

La endocitosis independiente de clatrina y caveolas, ocurre en células que carecen de clatrina o caveolina, como células Hela y células de algunas regiones del cerebro (Damke et al., 1995; Mayor & Pagano, 2007). Estas internalizan mediante los componentes de la estructura del citoesqueleto de actina o mediante proteínas que inducen a la curvatura de la membrana plasmática como las proteínas del dominio BAR, para formar vesículas, (Soriano -Castell, 2016).

El tipo de endocitosis que las NPs utilizaran, está determinada por diversos factores como: La forma y el tamaño, ya que las nanopartículas de 4 nm a 100 nm han demostrado ser fagocitadas (Gustafson et al., 2015), las que poseen un tamaño de 0.1- 2 μm son internalizadas por endocitosis mediada por clatrina o caveolina (Kamm Roger et al., 2010) además la forma esférica contribuye a mejorar el rendimiento de la internalización y en algunos casos promueve que las NPs se internalicen por macropinocitosis (Behzadi et al., 2017; Rizvi & Saleh, 2018).

La densidad de carga y la polaridad, si NPs tienen propiedades catiónicas, pueden interactuar mejor con la membrana plasmática, la cual se encuentra negativamente cargada en su interior (Fröhlich, 2012; Salatin & Yari Khosroushahi, 2017; Zanella et al., 2019), los componentes (lípidos o polímeros) catiónicos interactúan electroestáticamente con los proteoglicanos de la membrana celular, esto activa una serie de mecanismos que internalizan los nanosistemas mediante la fagocitosis o una penetración directa de la membrana mediante una translocación (Behzadi et al., 2017; El Ouahabi et al., 1997; Fröhlich, 2012; Salatin & Yari Khosroushahi, 2017).

La hidrofobicidad y las fuerzas interfaciales tienen un rol importante en la interacción de las NPs y los fosfolípidos de la membrana celular (Behzadi et al., 2017), se ha observado que las moléculas hidrofóbicas son más termodinámicamente estables y se pueden

incorporar más rápidamente en la membrana y penetrarla con más facilidad, con la posibilidad de no requerir un mecanismo de transporte activo, ya que existe la posibilidad de las NPs internalicen mediante transporte pasivo (Behzadi et al., 2017; Prabhakar et al., 2013)

El proceso de internalización de las NPs en la célula (Fig. 2) comienza con la formación de una vesícula endocítica a partir de una invaginación de la membrana plasmática denominada endosoma temprano (Gutiérrez & López, 2010; Salatin & Yari Khosroushahi, 2017; Smith et al., 2019), mientras el endosoma se mueve por el citosol, la ATPasa vacuolar bombea protones al interior, haciendo que el pH disminuya de manera gradual y el endosoma madure, (García-Sánchez, 2013). Finalmente, el endosoma llega a los lisosomas donde las nanopartículas pueden ser degradadas por enzimas que están activas en un ambiente ácido. Sin embargo, durante el transcurso de la ruta endocítica, las nanopartículas pueden escapar al citosol para evitar la degradación lisosomal y entregar su carga (Gutiérrez & López, 2010; Smith et al., 2019).

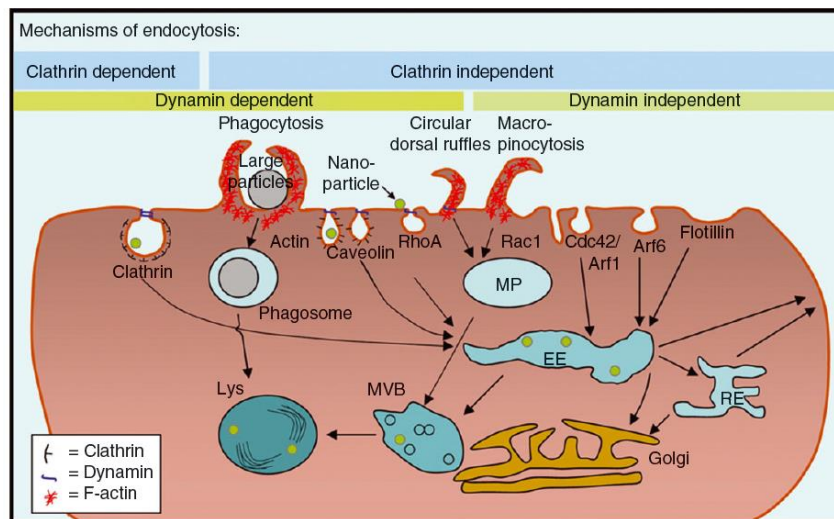


Fig 2: Esquemización de rutas endocíticas y transporte intracelular. Las NPs (puntos verdes) captadas por endocitosis están encerradas dentro de endosomas tempranos (EE), fagosomas o macropinosomas (MP). Estas vesículas con partículas, maduran luego por la vía degradativa y se convierten en cuerpos endosomas tardíos (MVB), que se fusionan con lisosomas (Lys). Alternativamente, las nanopartículas se pueden transportar de regreso a la superficie celular directamente desde EE o a través de los endosomas de reciclaje (RE). Tomado de : Iversen et al., 2011

2.3 Nanosistemas basados en lípidos como transportadores de fármacos

Las nanopartículas lipídicas están compuestas por fosfolípidos, triglicéridos y colesterol, los cuales se encuentran de manera natural en la membrana plasmática y lipoproteínas (Kumar, 2019).

Los sistemas de transporte basados en lípidos tiene varias ventajas como: una mejor biodisponibilidad, protegen al fármaco de la degradación de agentes ambientales, poseen múltiples vías de administración y pueden encapsular fármacos lipofílicos o hidrofílicos (Villafuerte Robles et al., 2008).

Los fármacos y otras moléculas pueden ser incorporados a estos sistemas mediante las siguientes técnicas: homogeneización por presión a alta temperatura (Hot HPH) u homogeneización por presión a baja temperatura (Cold HPH), microemulsión, emulsificación solvente, método de evaporación, doble emulsificación, agitación a alta velocidad, difusión y ultrasonificación (Cruz et al., 2016)

2.3.1 Lipoproteínas como transportadores de fármacos

Las lipoproteínas son una familia natural de complejos macromoleculares que consisten en apoproteínas anfifílicas, fosfolípidos y lípidos neutrales (Fig. 3) (Chaudhary et al., 2019). Además, exhiben características únicas como: interacciones con los receptores celulares, una superficie exterior hidrofílica y una organización dinámica para la absorción de lípidos (Raut et al., 2018). Estas propiedades los vuelve candidatos ideales para el transporte de fármacos, principalmente porque pueden encapsular en su núcleo fármacos lipídicos y en la superficie puede conjugarse con otros agentes químicos-biológicos (Dadwal et al., 2018; Pan et al., 2004). Además, las lipoproteínas presentan varias ventajas como transportadores respecto a otras nanopartículas como: el tamaño que oscila de 7 nm a 80 nm (Pan et al., 2004), mientras que en otras oscila de 20 nm a 200 nm (Dadwal et al., 2018). Entre más pequeñas sean las partículas, más fácil es su entrada a los tumores y su potencial citotóxico es mayor (Fröhlich, 2012; Patra et al., 2018). Otra ventaja es su dinámica de localización e internalización mediada por el mecanismo receptor-ligando (Dadwal et al., 2018; Ng et al., 2011; Pan et al., 2004).

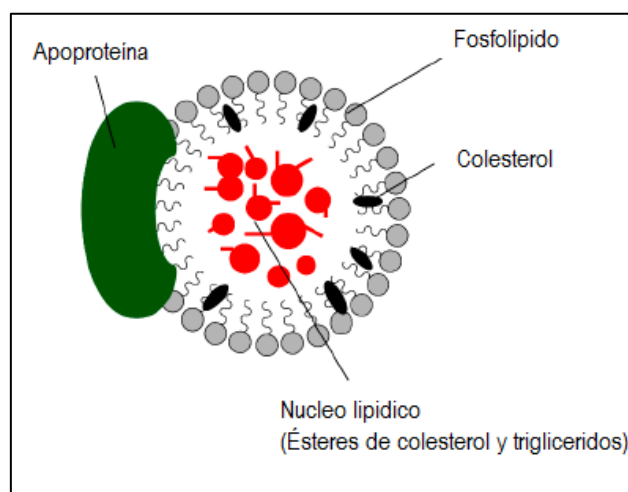


Fig. 3: Estructura básica de una lipoproteína.

Modificado de Chaudhary et al, 2019

Las lipoproteínas presentes en el cuerpo humano se clasifican en función de su densidad como; quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Errico et al., 2013).

Las lipoproteínas de muy baja densidad (*Very Low Density Lipoproteins*) son moléculas que tienen un tamaño de 30 a 80 nm. Su superficie puede estar conjugada por diferentes apolipoproteínas debido a que cuando entran al plasma son catabolizadas por una serie de acciones bioquímicas que incluye el intercambio de apolipoproteínas con Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III y Apo E. Debido a esto, las VLDL tienen un alto potencial para transportar antineoplásicos, principalmente porque varias células de cáncer sobreexpresan receptores para Apo E, un ligando proteico presente en la superficie de las VLDL. Actualmente, estas lipoproteínas se utilizan para transportar 5-iododeoxiuridina, doxorubicina y vindicina (Pan et al., 2004).

Las lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoproteins*), son moléculas del tamaño de 25-30 nm, cuya función principal es transportar colesterol. Para ello emplea la apoB-100, el mayor ligando presente en su superficie y cuyos receptores se encuentran sobreexpresados en células cancerígenas de cerebro e hígado. Por ello, las LDL son empleadas como transportadores de fármacos lipofílicos como: metotrexato, floxuridina y recientemente algunos PS (Pan et al., 2004).

2.4 Lipoproteínas de alta densidad

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son moléculas compuestas de diversas macromoléculas biológicas (Kuai et al., 2016). Y su principal función es transportar y recolectar colesterol de los tejidos para posteriormente llevarlo hacia el hígado para su eliminación. Este proceso es denominado transporte inverso del colesterol (Cuneo, 2001).

El principal componente proteico de las HDL es la apolipoproteína A-1 (Apo A-1) que es un polipéptido de 28 kDa, contiene ocho dominios α -helicoidales anfipáticos de 22 aminoácidos, cada uno de los cuales es responsable del andamiaje del tamaño y la forma de las HDL naturales (Borhani et al., 1997; Frank & Marcel, 2000; Ma et al., 2018).

2.4.1 Síntesis y metabolismo de HDL (HDL)

La biosíntesis de las HDL es complejo e involucra componentes proteicos, lipídicos y una progresiva maduración de la molécula (Rader & Rader, 2006). Para generar una HDL se requiere de Apo A-1 y Apo A-II que compondrán el 70% de la molécula, estas apolipoproteínas son sintetizadas en el intestino e hígado y segregadas en el torrente sanguíneo (Weng & Breslow, 1996; Zhou et al., 2015). Posteriormente, estas apolipoproteínas comenzarán a asociarse con fosfolípidos y colesterol (lipidación) por medio de mecanismos dependientes del transportador ATP Binding Cassette (ABCA1) que facilita el flujo de salida y ensamblaje de lípidos (Kornmueller et al., 2019; Sánchez, 2017), generando HDL inmaduras que tendrán una morfología discoidal de 7 a 13 nm de diámetro, compuesta de una bicapa lipídica. En esta fase la Apo A-1 aún no está estabilizada (Kornmueller et al., 2019; Segrest et al., 1999). Las HDL inmaduras comenzarán una remodelación de su estructura para adquirir la forma esférica, para ello la enzima lecitín-colesterol aciltransferasa (LCTA) en conjunto con otras enzimas catalizará y convertirán el colesterol almacenado en la bicapa lipídica en ésteres más hidrófobos que el colesterol libre (Kornmueller et al., 2019; Rader & Rader, 2006), que se separaran en un núcleo oleoso interno. Consecutivamente, la morfología de la HDL discoidal se altera en forma de lente y finalmente en partículas esféricas, denominadas HDL3 o HDL maduras, que están listas para recolectar y transportar colesterol (Kornmueller et al., 2019; Silva et al., 2008).

Las HDL participan en una de las rutas del influjo del colesterol, denominado transporte inverso del colesterol (Cuneo, 2001; Rader & Rader, 2006). Para ello, las HDL toman el colesterol del hígado o tejidos periféricos, mediante la interacción del ligando Apo A-1 y el receptor SR-B1 (scavenger receptor class BI) (Rader & Rader, 2006). Este receptor es muy importante porque promueve la recepción hepática de colesterol esterificado y libre, mediante un proceso conocido como captación selectiva. Donde el SR-B1 internaliza o remueve partículas de colesterol de las HDL, posteriormente estas moléculas viajan por el torrente sanguíneo hasta tejidos objetivo o bien son enviados al riñón o hígado para su excreción o degradación (Rader & Rader, 2006; Zhou et al., 2015)

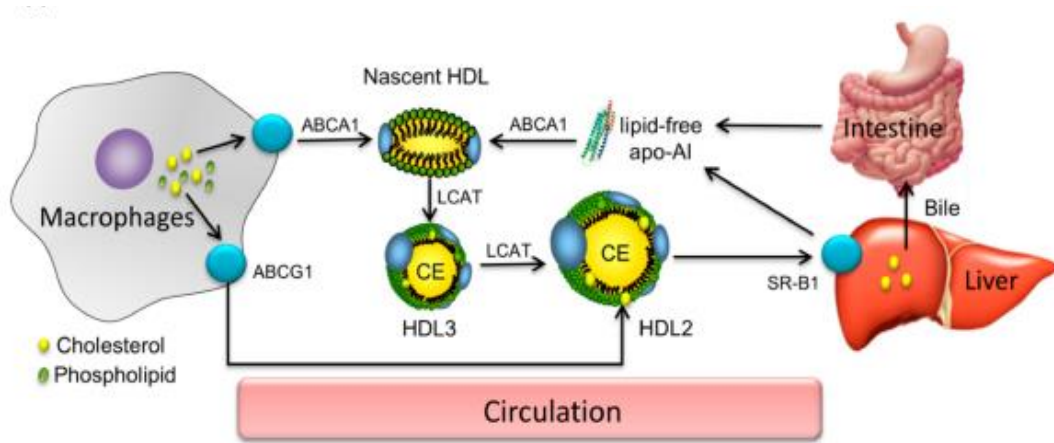


Fig.4. Proceso de formación de las HDL; Apo A1 y lípidos son excretados por el intestino e hígado, estos en conjunto con el transportador ABCA, ensamblarán una HDL discoidal inmadura. La lecitín colesterol aciltransferasa (LCAT), esterificará el colesterol y formará una HDL esférica madura, el cual tras esterificar más colesterol en el transporte inverso del colesterol completará su ciclo y será enviada al hígado para su degradación o reciclaje. Tomado de: Kornmueller et al, 2019

2.4.2 Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL)

El desarrollo de nuevos transportadores de fármacos para las terapias oncológicas se ha centrado en las NPs, especialmente aquellas que tienen un origen natural porque suponen varias ventajas respecto a otras (Raut et al., 2018). Entre estos tipos de nuevos nanotransportadores figuran las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) que exhiben una gran variedad de propiedades deseables como sistema de carga y liberación de fármacos antineoplásicos (Pedersbæk et al., 2019; Raut et al., 2018).

Las rHDL son partículas sintéticas y biomiméticas que emulan muchas de las propiedades de las HDL, lo que permiten tener un periodo más largo de circulación en el torrente sanguíneo, una bajo nivel de ser detectado por el sistema inmune como un agente nocivo, ser biodegradable, biocompatible y una interacción con receptores de membrana (Pedersbæk et al., 2019), especialmente con el receptor SR-B1 quien es el responsable de mediar el intercambio de colesterol u otros componentes en las células (Fig. 5) (Ma et al., 2018; Pedersbæk et al., 2019) además de estar sobreexpresado en muchos tipos de cáncer. Este último carácter es de gran importancia, ya que muchas terapias emplean el SR-B1 como mediador (Pedersbæk et al., 2019).

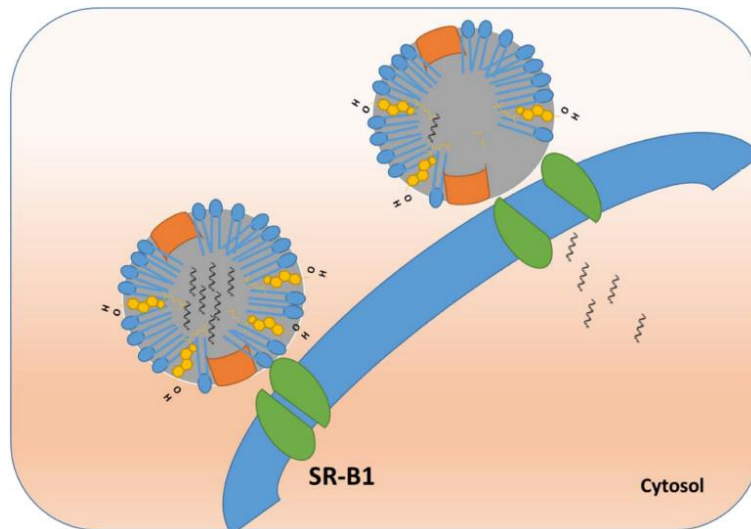


Fig.5 Liberación citosólica directa del agente terapéutico o de imagen usando nanopartículas rHDL

Tomado de: Raut et al., 2018

2.4.3 Síntesis de rHDL

Las rHDL, al emular muchas de las propiedades de las HDL naturales, requieren estar constituidas de Apo-A1 y varios tipos de lípidos, sin embargo, el creciente interés de utilizar estas NPs con otros fines al de transportar fármacos genera variaciones en su composición estructural al igual que su método de síntesis (Kornmueller et al., 2019); sin embargo hay ciertos criterios y métodos comunes para su elaboración estándar.

Para fabricar rHDL se requiere mezclar Apo A-1 y lípidos en un medio acuoso, es crítico elegir adecuadamente el tipo de lípido, ya que cada tipo se ordena de diferente manera y esto influye en la arquitectura de la rHDL. Si se obtiene una bicapa fosfolipídica la NP, será un nanodisco con capacidad única de cargar fármacos apolares, pero si los lípidos se ordenan en una monocapa lipídica esférica se obtendrán nanoesferas similares a las HDL naturales con capacidad de cargar fármacos polares (Cho, 2019; Kornmueller et al., 2019). La mezcla posteriormente será disuelta en un solvente orgánico y secado con nitrógeno u otro material similar para obtener una película lipídica que será rehidratada con buffer acuoso que contiene derivados de ácidos biliares como el colato de sodio que actúa como detergente junto con el componente proteico (Kornmueller et al., 2019). Para que las NPs se formen se debe eliminar el buffer acuoso mediante diálisis con un buffer libre de detergente, obteniendo así las suspensiones con las rHDL (Cho, 2019; Kornmueller et al., 2019; Pittmans et al., 1987). Otro método es sintetizar rHDL mediante la solubilización de membranas fosfolipídicas de liposomas preformados utilizando Apo A-1 (Massey & Pownall, 2008). Asimismo, se pueden obtener rHDL mediante la sonicación de suspensiones lipídicas ricas en fosfolípidos y ésteres de colesterol junto con Apo A-1, la cual se asociara a los lípidos para formar NPs esféricas (Kornmueller et al., 2019; Pittmans et al., 1987). Otro procedimiento alternativo es convertir rHDL discoidales que se pueden obtener en fases primarias de varios métodos de síntesis y convertirlas en partículas esféricas mediante incubación con LDL y LCAT para inducir el intercambio de lípidos. Posteriormente, purificar las NPs y recuperarlas mediante cromatografía en gel o ultracentrifugación (Jonas, 1986; Kornmueller et al., 2019).

2.4.5. Mecanismos de entrega de fármacos en rHDL

Las rHDL cargadas de fármacos se administran vía intravenosa, una vez dentro del torrente sanguíneo deben evadir la opsonización para evitar ser secuestrados por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) (Ma et al., 2018). Para ello se usan diversas estrategias, una de ellas requiere que las rHDL tengan en su composición polietilenglicol (PEG) este polímero le otorga a las NPs la propiedad de inhibir la unión de proteínas séricas responsables de activar respuestas inmunes a su superficie (D. Li et al., 2018). Otra estrategia emplea las propiedades miméticas de las rHDL que les permite emular a la perfección las HDL naturales del cuerpo y pasar desapercibidas; sin embargo este método hace que las NPs tengan un periodo más corto de circulación en el sistema sanguíneo (Ma et al., 2018; Pedersbæk et al., 2019). Mientras las rHDL viajan por el torrente sanguíneo deben tener la capacidad de llegar a su objetivo, para ello utilizan en conjunto los mecanismos de acumulación pasiva aprovechando la patofisiología del EPR que presentan los tumores, lo que permite que muchas de las NPs se anclen en el tejido cancerígeno (Ma et al., 2018; Rojas-Aguirre et al., 2016) y la acumulación activa que utiliza los receptores sobreexpresados de membrana de las células cancerígenas, para dirigir las NPs cuya composición estructural contiene ligandos afines a estos receptores, (C. C. Liu et al., 2013; Ma et al., 2018; Rojas-Aguirre et al., 2016). Sin embargo, si estos nanotransportadores son usados para tratar regiones del sistema nervioso central (CNS) deben superar otras barreras biológicas mediante otros mecanismos para alcanzar su objetivo (Ma et al., 2018; Zanella et al., 2019). Una vez que han alcanzado el tejido afectado, las rHDL localizan regiones de la membrana plasmática celular para comenzar el proceso de internalización mediado por receptores (Ma et al., 2018). Para ello el receptor SR-B1 reconoce la Apo A1 de las rHDL, tras unirse se formará un canal hidrofóbico en la membrana permitiendo el paso selectivo de la carga terapéutica, estas moléculas posteriormente serán secuestradas en endosomas y llevadas al citoplasma donde un porcentaje de estas moléculas escaparan de la ruta de la degradación lisosomal y podrán entregar su carga terapéutica (Ma et al., 2018; Y. Wang et al., 2016). Alternativamente, existe otra ruta para internalizar fármacos directamente en el citoplasma, para ello se emplean péptidos en la estructura de las rHDL que permiten sobreexplotar la capacidad de formación del canal hidrofóbico generado en la unión de Apo A1 y SR-B1 y hacer una translocación (Ma et al., 2018; Z. Zhang et al., 2009).

2.5 Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (PDT, del inglés *photodynamic therapy*) es una técnica ampliamente usada para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades, es poco invasiva, altamente selectiva y puede ser utilizada en diferentes órganos y tejidos accesibles a la luz (Benov, 2015; Master et al., 2013; Plata, 2019). Fundamentalmente, la PDT es la activación de un fotosensibilizador que al ser excitado por una longitud de onda adecuada y en presencia de oxígeno tisular, generara ROS y radicales libres, los cuales tiene la capacidad de producir daños citotóxicos a las células cercanas (Allison & Moghissi, 2013; Benov, 2015). Sin embargo, para comprender mejor la PDT se debe analizar el proceso de manera profunda.

Esta terapia emplea tres elementos clave: un fotosensibilizador (PS) que son moléculas fotosensibles con la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (De Freitas & Hamblin, 2016), una fuente de luz como: diodos LED, algún tipo de radiación (rayos X o radiación Cerenkov) o fotones de alta energía y oxígeno tisular (Ulrich E., 2014).

El método comienza con la administración de un PS de manera directa o por vía intravenosa al tejido afectado (Allison & Moghissi, 2013; Master et al., 2013). Este PS será expuesto a una fuente de luz, el cual activara una serie de acciones fotoquímicas fundamentales en la PDT (Allison & Moghissi, 2013; Ulrich E., 2014). Este proceso se explica con el diagrama de Jablonski (Fig. 5) el cual consta principalmente de los siguientes fases: absorción, fluorescencia, conversión interna, cruzamiento intersistema, fosforescencia, formación de especies reactivas de oxígeno, reacción del PS en estado triplete (^3PS) con biomoléculas e independiente de oxígeno (Plata, 2019; Ulrich E., 2014).

Los PS son sustancias con una disposición particular de electrones en sus orbitales moleculares y como casi todas las moléculas en el estado basal, tienen pares de electrones con spins opuestos en orbitales moleculares de baja energía (Benov, 2015; Ulrich E., 2014). Es durante la fase de absorción que el PS al ser expuesto a luz absorbe energía (fotones), generando que un electrón se eleve a un orbital de alta energía sin cambiar su spin, haciendo que la molécula entre a un estado de singlete excitado de corta duración (nanosegundos) denominado ^1PS (Benov, 2015; Zhu & Finlay, 2008). En este estado pueden ocurrir dos procesos: el PS puede perder su energía y

volver al estado basal emitiendo luz (fluorescencia) o mediante una conversión interna producir calor (Benov, 2015; Castano et al., 2004). Alternativamente, el estado ^1PS puede entrar en un proceso conocido como cruzamiento intersistema, donde se invierte el spin del electrón excitado, haciendo que los spines estén ahora paralelos. Este cambio en la configuración electrónica permite que la molécula entre al estado triplete excitado (^3PS) relativamente de larga duración (microsegundos) (Castano et al., 2004), esta larga vida útil y estable del ^3PS se debe porque este estado puede pasar a ^1PS mediante una "transición spin prohibido" en el cual un estado cuántico reactivo puede pasar a un estado cuántico reactivo de manera directa otorgándole estabilidad temporal al no estar mediada (Castano et al., 2004; Harris & Bertolucci, 1989), y esto es importante porque entre más larga sea la vida útil del estado triplete aumentan las probabilidades de formación de ROS (Benov, 2015). Además, durante esta transición prohibida el PS puede tomar dos rutas: volver al estado basal mediante la pérdida de energía en forma de emisión de luz (fosforescencia) o transferir energía a otra molécula (Benov, 2015; Castano et al., 2004; Ulrich E., 2014), en esta última opción pueden ocurrir dos tipos de reacción:

Tipo I: Hay una transferencia de electrones del ^3PS a un sustrato como biomoléculas, las cuales, mediante una reducción monovalente, producen radicales aniones superóxido (O_2^-); sin embargo esta ROS tiene un bajo nivel citotóxico, por lo que deben ser convertidas mediante una dismutación a peróxidos de hidrógeno, los cuales son más reactivos y citotóxicos (Benov, 2015; Castano et al., 2004).

Tipo II: El ^3PS transfiere energía directamente al oxígeno molecular, el cual pasa de su estado basal triplete ($^3\text{O}_2$) a un estado singlete ($^1\text{O}_2$), esto ocurre porque la transferencia obliga a que uno de los dos electrones no apareados suba a un orbital de alta energía y otro electrón invierta su spin. En este estado el oxígeno es altamente reactivo y citotóxico, se considera la ROS más importante para la PDT (Benov, 2015).

El tipo de reacción que se obtiene está mediada principalmente por el tipo de PS que se emplea y el área donde se administra, ya que las concentraciones de agua y otras sustancias que pueden actuar como sustratos ideales para transferencia de energía varían de acuerdo a la función del tejido (Benov, 2015; Zhu & Finlay, 2008)

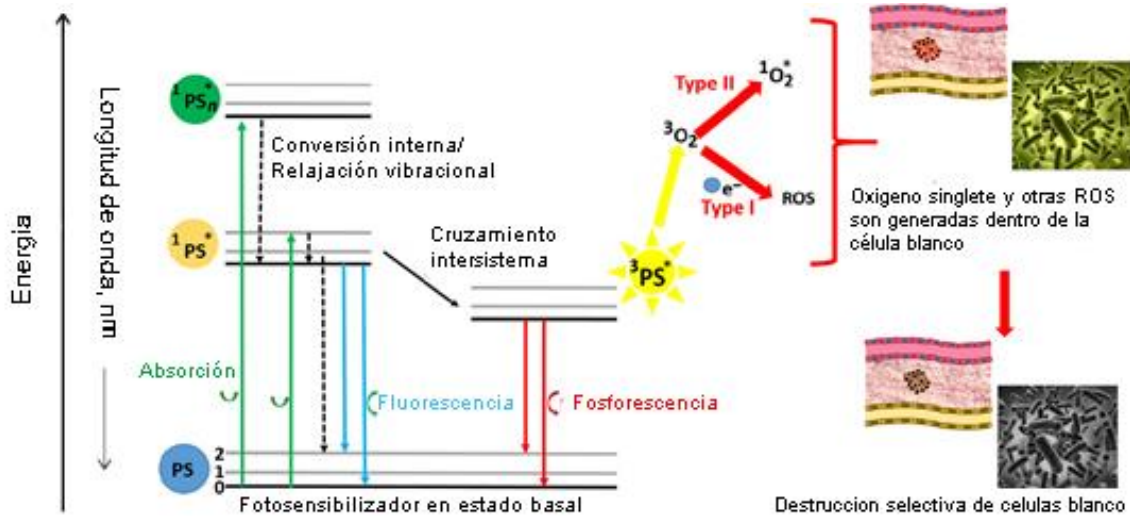


Fig. 6. Diagrama de Jablonski esquematizado en PDT: El fotosensibilizador (PS) es excitado por la luz haciendo que pase a un estado de excitación (1PS) posteriormente al realizar el cruzamiento intersistema se eleva al estado triplete (3PS), el cual transferirá energía al oxígeno molecular para generar oxígeno singlete (reacción tipo II) o transferirá electrones a otras biomoléculas para producir radicales libres de peróxidos o superóxido (reacción de tipo I). Modificado de: De Freitas & Hamblin, 2016

La muerte celular influenciada por la PDT puede ocurrir de distintas maneras, si esta terapia fue empleada para zonas externas o en tejidos poco profundos, la destrucción celular puede ocurrir por los daños producidos a la vasculatura sanguínea (Moor et al., 2003; Ormond & Freeman, 2013). Si esta terapia se utiliza para tumores, la destrucción celular puede ocurrir por necrosis o apoptosis. El tipo de mecanismo que se emplea viene determinado por la localización del PS dentro de la célula durante su activación (Moor et al., 2003). El proceso de la necrosis se deriva cuando el PS se encuentra localizado en los lisosomas, este los degrada causando una liberación de enzimas lisosomales y otros restos tóxicos dentro del citoplasma, los cuales inducirán daños a los organelos y membrana lipídica que conllevará a inhibiciones enzimáticas y daños a los componentes nucleares (Berg & Moan, 1997; Kessel, 2017; Moor et al., 2003). La apoptosis se puede inducir a través de varias rutas en la PDT, sin embargo, la más estudiada es la producida cuando el PS se localiza en la mitocondria, tras la activación del agente fotosensible hay una disminución rápida del potencial de membrana mitocondrial, lo que conlleva a la apertura de un poro que permite la liberación al citosol de varias proteínas intermembranales entre ellas el citocromo C, el cual una vez alcanza el citosol activa un

complejo proteico llamado apoptosoma que inicia la actividad de la caspasa 3 y 9, las cuales iniciara una serie de cascadas de señalización para activar la apoptosis (Moor et al., 2003).

La PDT puede generar respuestas inmunes tumorales secundarias, esto se origina cuando la terapia produce lesiones en la vasculatura, los cuales inducen una serie de cascadas de señalización que derivan en inflamaciones localizadas (Allison & Moghissi, 2013). En estos sitios se liberan mediadores inflamatorios entre los cuales se pueden encontrar citoquinas, factores de crecimiento y proteínas, tras su liberación estos estimulan varios tipos de glóbulos blancos incluidos neutrófilos y macrófagos, los cuales convergen en la zona de inflamación (Gollnick et al., 2003). Los macrófagos fagocitan las células neoplásicas dañadas por la PDT además presentan proteínas a los linfocitos T CD4 quienes activan linfocitos T CD8 citotóxicos con capacidad de inducir necrosis y apoptosis en las células cancerígenas cercanas (Allison & Moghissi, 2013).

Pese a que la PDT ofrece ventajas como tratamiento, también presenta varias desventajas. Calixto et al, 2003; las engloba de manera general en la siguiente tabla.

Terapia fotodinámica aplicada en el cáncer	
Ventajas	Desventajas
<p>Pocos efectos adversos</p> <p>Poco invasivo</p> <p>Corto tiempo de tratamiento</p> <p>Utilizable en entornos ambulatorios</p> <p>Doble selectividad</p> <p>Se puede aplicar en el mismo lugar varias veces.</p> <p>Poca o ninguna cicatriz después de la curación</p> <p>Más bajos costos que otros tratamientos</p>	<p>Fotosensibilidad después del tratamiento</p> <p>La eficacia del tratamiento depende de la precisión de entrega de luz en el tumor</p> <p>La oxigenación tisular es crucial en el efecto fotodinámico</p> <p>No puede tratar cáncer metastásico</p>

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la terapia fotodinámica.

2.6 Fotosensibilizadores

Un fotosensibilizador (PS) es una sustancia fotosensible, que al ser irradiada por luz, sus moléculas pasan a un estado excitado. En este estado pueden transferir energía, electrones o átomos de hidrógeno a otro sustrato o moléculas, generando especies reactivas de oxígeno (ROS), que son citotóxicas (Ulrich E., 2014).

Un PS debe reunir ciertas características ideales para ser empleado en la PDT. Kwiatkowski et al., 2018 las clasifica en el siguiente orden.

- Alto grado de pureza química
- Estabilidad a temperatura ambiente
- Efecto fotosensible solo en presencia de una longitud de onda específica
- Alta reactividad fotoquímica
- Máxima absorción de luz en longitudes de onda de 600 nm a 600 nm.
- Mínimo de absorción de luz en longitudes de onda 400 nm a 600 nm.
- Mínima citotoxicidad en la oscuridad
- Fácil solubilidad en tejidos del cuerpo
- Alta selectividad para tejidos neoplásicos
- Síntesis simple, económico y de fácil disponibilidad

Los fotosensibilizadores se clasifican en generaciones de acuerdo a su tiempo de desarrollo y sus características específicas.

Primera generación

Los PS de esta generación surgieron en 1970 denominados “derivados de hematoporfirinas”, estos tienen aplicaciones en la PDT restringidas a tumores y afecciones externas debido a que tienen un bajo nivel de absorción de luz de longitud de onda de 630 nm que solo pueden penetrar en tejido 2-3 mm, sin embargo a pesar de ser agentes fotosensibles débiles en varias características, proporciona un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete lo que se traduce en una alta eficiencia para producir $^1\text{O}_2$ por fotón absorbido (Kwiatkowski et al., 2018; Ormond & Freeman, 2013).

Segunda generación

En 1980 surgió esta nueva generación donde encontraban nuevos derivados de hematoporfirinas, benzoporfirinas, texafirinas, clorinas, etc. Esta segunda generación se caracterizó por tener una alta pureza química, una alta eficiencia para formar oxígeno singlete, una mayor penetración en los tejidos, debido a que su máxima absorción se encuentra en el rango de longitud de onda 650-800 nm, una rápida eliminación en el organismo y comenzaron a ser más selectivos. Sin embargo su mayor limitante es que eran pocos solubles en agua, lo que dificultaba su administración por vía intravenosa (Kwiatkowski et al., 2018)

2.6.1 Rodaminas como fotosensibilizadores

La búsqueda de nuevos PS que cumplan con los criterios para ser empleados en la PDT, ha llevado a examinar nuevos candidatos de origen sintético y natural. Entre estos se encuentran las rodaminas, que son compuestos orgánicos, con propiedades fluorescentes que generalmente se utilizan en investigaciones como colorantes para marcaje de células y microorganismos, entre otras aplicaciones (Arden et al., 1991). Se observó que la R123 y R6G tenían cierto potencial de uso para la PDT debido a su baja toxicidad, rápida eliminación, su gran fotoestabilidad, baja excitación, un alto campo de emisión de fluorescencia, solubilidad en agua y permeables a la membrana plasmática (C. Liu et al., 2019). Además de que exhiben propiedades catiónicas que les permite ser atraídas y acumuladas en la membrana plasmática y posteriormente una vez dentro de la célula dirigirse a las mitocondrias debido a su carga electronegativa. Esta migración hacia la mitocondria ocurre más particularmente con la R123 (Davies et al., 2016; C. Liu et al., 2019), esto se atribuye porque esta rodamina responde más estrictamente al potencial electronegativo intramitocondrial a diferencia de la R6G, que responde más al potencial de membrana plasmática (Mandalà et al., 1999; Shea et al., 1989).

La R123 y R6G tienden a ser retenidas en células del músculo cardíaco (particularmente R6G), células de glioma y otras líneas celulares de carcinoma (Mandalà et al., 1999; Morlière et al., 1990). Lo que sugeriría su potencial uso para tratar estas células, sin embargo, investigaciones indican que estas rodaminas en estado natural tienen una baja capacidad de producir oxígeno singlete tras ser irradiadas. Debido a que los átomos de halógeno en su estructura dificultan su capacidad para superar el cruzamiento intersistema y alcanzar el estado triplete, por lo que su rendimiento como agente terapéutico estaría muy limitado (Shea et al., 1989). Para superar esto, actualmente las rodaminas se les modifican agregando átomos pesados a su estructura como Br, I, etc., y cambiando los grupos halógenos por hidrógenos (C. Liu et al., 2019; Shea et al., 1989). Esto aumenta su rendimiento de producción de oxígeno singlete que en conjunto con su capacidad de localizar las mitocondrias inducen muerte celular de manera efectiva y localizada en las células neoplásicas (Davies et al., 2016; C. Liu et al., 2019).

2.7 Sistema de entrega de luz en PDT

En la PDT la fuente de luz es un factor crítico para obtener el mayor rendimiento terapéutico de los PS (Yoon et al., 2013). Generalmente, las fuentes lumínicas más comunes son: láser o diodos (LEDs) que operan con longitudes de onda que se encuentra en las regiones de la luz visible (380-770 nm) o infrarrojo cercano (750-2500 nm), los cuales solo son capaces de penetrar menos de un 1 cm en el tejido, restringiendo su efectividad solo en la piel, (Cline et al., 2019). Para superar esta limitante se comenzaron acoplar estas fuentes a fibras ópticas, lo que permitió entregar luz a regiones más profundas del cuerpo, principalmente al pulmón, esófago, boca, estómago y próstata (Star, 1990). Sin embargo, no pudieron superar el mayor problema que enfrentan los sistemas de luz en la PDT, penetrar tejidos ópticamente opacos como el cerebro (Ho, 2018; Star, 1990). Este problema ocurre por la dispersión de luz dentro estos tejidos y la absorción por cromatóforos endógenos, moléculas de agua, proteínas y pigmentos (Kalka et al., 2000; Sibata et al., 2000). Para superar esta dificultad se propuso aumentar la densidad total energética aplicada en el tejido objetivo, sin embargo, este método demostró que un aumento en las interacciones térmicas conllevaría al surgimiento de una hipertermia potencialmente letal (Sibata et al., 2000). Por lo que se estableció que futuras fuentes de luz en la PDT deberían mantener densidades bajas energéticas con el fin de evitar estas interacciones térmicas (Chen et al., 1996; Sibata et al., 2000). La siguiente propuesta para los nuevos sistemas de entrega de luz, se basa en superar la absorción lumínica que presentan las proteínas de la sangre, principalmente la hemoglobina, que tiene rangos de absorción que van cerca de 425,544 y 577 nm. También, se debe evitar que las moléculas de agua presentes en el medio absorban luz, lo cual sucede cuando las longitudes de onda son >1200 nm y finalmente se debe asegurar que haya suficiente energía para que los fotones puedan participar en las reacciones fotoquímicas, las cuales ocurren a longitudes de onda <900 nm. Por lo que se estableció que una fuente de luz ideal debe operar en los rangos de 650-900 nm (ventana terapéutica) para aplicaciones clínicas en la PDT (Sibata et al., 2000; Sordillo et al., 2014).

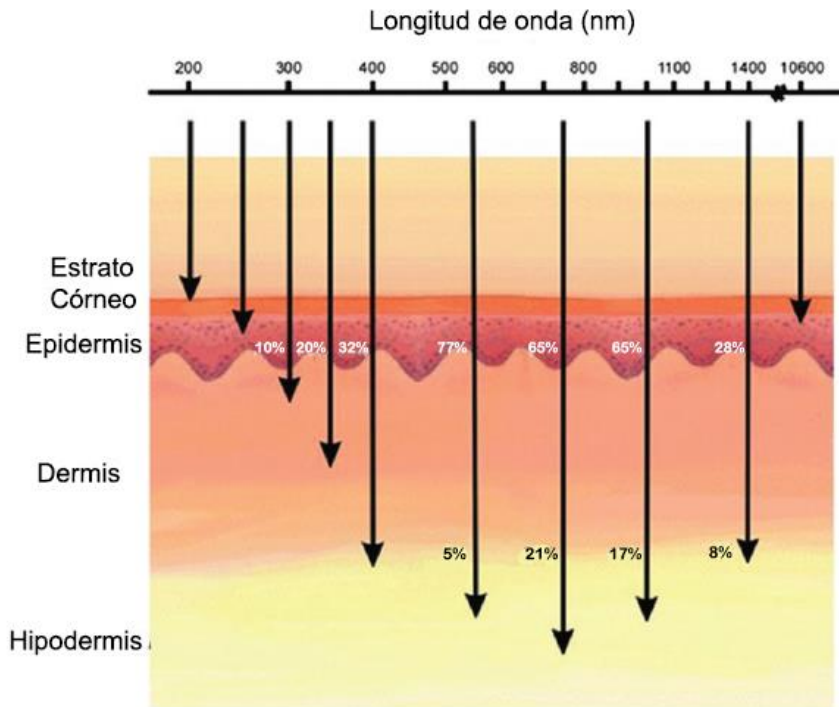


Fig.7. Dependencia de la longitud de onda y porcentaje de la transmisión de luz en la piel. Modificado de: Bolze et al., 2017

Los nuevos sistemas de entrega de luz operan bajo estos criterios, además la mayoría de estos tienen la capacidad de ser moduladas en diferentes longitudes de onda como las lámparas de xenón (400-1200 nm) y halógenas (600-800 nm), laser de argón, (450-530 nm), laser pulsado de vapor dorado (628 nm) o vapor de cobre (510-578), láser de estado sólido de neodimio (690-1100) (Kalka et al., 2000). Esto ha permitido resolver algunos de los problemas, además de impulsar el desarrollo de nuevos PS; sin embargo; han surgido nuevos retos para estos sistemas como el alto costo de producción y operación, una baja distribución multidireccional de luz y una baja transmitancia en tumores sólidos. Por lo que, aún se exploran nuevas fuentes de luz externas e internas, y entre posibles candidatos se encuentran los rayos X, la radiación Cerenkov y absorción de doble fotón (Cline et al., 2019; Kalka et al., 2000).

2.7.1 Radiación Cerenkov

La radiación Cerenkov (CR), es un fenómeno que ocurre cuando una partícula cargada β^+ o β^- producida por el decaimiento radiactivo viaja en un medio dieléctrico con una velocidad mayor que la luz. La partícula cargada induce una polarización en las moléculas del medio y cuando estas comienzan a regresar a su estado basal emiten radiación, la cual produce una luz blanca azulada (luz Cerenkov) que tiene una longitud de onda de 250-600 nm capaz de producir reacciones fotoquímicas (Kamkaew et al., 2016; Ran et al., 2012). Sin embargo, su aplicación clínica aún está en fases experimentales.

Entre los estudios realizados que muestran su capacidad de activar agentes fotosensibles y potencial uso en la PDT, se encuentran los de Kamkaew et al., 2016; Kotagiri et al., 2015; Ran et al., 2012; donde demostraron que los isotopos ^{18}F & ^{89}Zr , son capaces de producir radiación Cerenkov que en asociación con un PS inducen daños a las células neoplásicas. Así mismo también observaron que para obtener el mayor rendimiento se debe empaquetar el radionúclido y el PS en la misma nanoplataforma de administración (Cline et al., 2019). Permitiendo que este sistema sea más selectivo porque ambos elementos llegan en conjunto a las células (Cline et al., 2019; Kavadiya & Biswas, 2019); Sin embargo, el principal problema de este sistema es su baja eficiencia de luminiscencia, ya que el número de fotones generados por los radionúclidos es mucho menor de los que se producen mediante una irradiación externa, sin mencionar la pérdida de energía durante la conversión interna lo que disminuye su fototoxicidad (Cline et al., 2019; Glaser et al., 2015; Kavadiya & Biswas, 2019) .

A pesar de que la radiación Cerenkov presenta bajos rendimientos de luminiscencia, hay investigaciones enfocadas en mejorar esta capacidad mediante la conjugación con nanocentelladores. De acuerdo a Shaffer et al., 2017; mezclar radionúclidos que producen partículas β con nanopartículas centelladoras se obtiene un incremento significativo en la luminiscencia (Cline et al., 2019). Posibilitando aumentar la eficiencia de los PS y al conjuntarla con la tomografía de emisor de positrones (PET) permitiría monitorear *in vivo* la supresión de tumores (Cline et al., 2019).

2.7.2 Absorción de dos fotones

La absorción de dos fotones (2PA: Two-photon absorption) es un proceso óptico no lineal, en donde dos fotones de baja energía son absorbidos simultáneamente debido a que estos combinan su energía (Bolze et al., 2017; Ogawa & Kobuke, 2008), promoviendo que las moléculas pasen a un estado excitado. Este método es empleado cuando las longitudes de onda requeridas no pueden ser alcanzadas por la absorción de un solo fotón (Ogawa & Kobuke, 2008). Su incorporación en la PDT mejora dos aspectos: incrementa la penetración de luz en el tejido y el área espacial de distribución (Bolze et al., 2017). Aumentando la efectividad del tratamiento en comparación con la tradicional 1PA (single-photon absorption), donde un fotón de alta energía puede inducir el estado de excitación al PS; sin embargo, este método al operar en longitudes de onda de 400-700 nm, no penetra en tejidos ópticamente opacos (Gao et al., 2006; Sun et al., 2019). A diferencia 2PA, que opera en longitudes de onda (750-950 nm) que se encuentran en la región del infrarrojo cercano (NIR), evitando que los tejidos absorban y dispersen la luz, favoreciendo la transmisión en el tejido (Gao et al., 2006; Mak & Lung, 2014). Esto permite tratar *in vivo* los tumores (Gao et al., 2006), además la dependencia cuadrática en 2PA de la intensidad del láser permite una alta selectividad espacial al enfocar el rayo láser en un punto objetivo, evitando daños al tejido sano adyacente (Gao et al., 2006; Ogawa & Kobuke, 2008).

A pesar de que este sistema es más selectivo y seguro en comparación con otras fuentes de luz, su principal inconveniente es que funciona en pocos PS disponibles en el mercado (Mak & Lung, 2014).

3. Planteamiento del problema

En México el cáncer representa la cuarta causa de muerte, registrando 88 823 muertes durante el 2020 (INEGI, 2021) . Debido a esta creciente prevalencia es necesario encontrar opciones terapéuticas que sean eficaces, eficientes, asequibles y aceptables para los pacientes, debido a que las terapias convencionales como quimioterapia y radioterapia a menudo se asocian con efectos secundarios sistémicos o están limitadas por la dosis acumulada de radiación (Rosenblatt & Eduardo, 2017). La terapia fotodinámica ha emergido como una modalidad de tratamiento no invasiva, específica y económica que contribuye a la calidad de vida de los pacientes. 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 de electrones tipo I. Recientemente, las lipoproteínas de alta densidad HDL han mostrado ser eficaces en el transporte de fármacos.

El propósito del presente proyecto es evaluar la citotoxicidad y producción de radicales libres (ROS) inducidas por irradiación del sistema rHDL/rodamina con el fin de evaluar su potencial como sistema de transporte de rodamina en células de cáncer positivas a SR-B1 para su aplicación en terapia fotodinámica. En base a esto se plantean las siguientes preguntas de investigación.

1. ¿Es posible que las rodaminas tengan la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando son irradiadas a 532 nm?
2. ¿Qué efecto tendrá en la viabilidad celular de células de cáncer positivas a SRB1 el uso de rodaminas encapsuladas en nanopartículas de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) excitadas por irradiación?
3. ¿Es posible mejorar el rendimiento de internalización intracelular de la rodamina mediante el uso transportador rHDL?

4. Justificación

De acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tasa de incidencia de cáncer a nivel global durante el 2018 fueron 18.2 millones y con una tasa de mortalidad de 158.3 personas por cada 100,000 habitantes (OMS, 2020; Rosenblatt & Eduardo, 2017). Esto pone en manifiesto la necesidad de desarrollar o mejorar las terapias viables y seguras, como la terapia fotodinámica (PDT), la cual no es invasiva y con un costo menor a las terapias convencionales aunque tiene como limitante la baja acumulación del fármaco en las células blanco y las fuentes de luz no penetran tejidos ópticamente opacos (Ulrich E., 2014).

El presente proyecto pretende utilizar las rHDL como transportadores de 3 tipos de rodamina para incrementar la concentración de las rodaminas en células de cáncer positivas a SR-B1 y evaluar el efecto citotóxico y producción de ROS inducido por la activación de las rodaminas con irradiación láser y radiación cerenkov.

5. Hipótesis

El sistema HDL/rodamina tendrá un efecto citotóxico y producirá radicales libres cuando se irradie con luz ($\lambda = 532 \text{ nm}$).

6. Objetivos

General

- Evaluar la citotoxicidad y producción de radicales libres (ROS) inducidas por irradiación del sistema rHDL-rodamina en células positivas a SR-B1.

Específicos

- Preparar el sistema rHDL-rodamina
- Evaluar la expresión relativa del receptor SRB1 en células T47D y PC3.
- Evaluar la liberación específica de rodaminas mediada por rHDL y SRB1.
- Evaluar cualitativamente por microscopia de fluorescencia la liberación de rodaminas mediada por el sistema rHDL en células de cáncer de mamá T47D.
- Evaluar cualitativamente por microscopia de fluorescencia la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por interacción entre el sistema rHDL-rodamina e irradiación a 532 nm en células T47D.
- Evaluar la viabilidad celular inducida por interacción entre el sistema rHDL-rodamina e irradiación a 532 nm y luz Cerenkov en células T47D.

7. Materiales

Reactivos y preparación de soluciones de rHDL

- Fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC): 50 mg/ mL. Se preparó en cloroformo y se almacenó a -20° C.
- Colesterol libre (FC): 50 mg/mL. Se preparó en cloroformo y se almacenó a -20° C.
- Éster de colesterol (CE): 20 mg/ mL. Se preparó en cloroformo y se almacenó a -20°C.
- Apo-A1: 1mg.
- Tris- Buffer pH= 8: 10 mM Tris, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA. Se almacenó a -4° C.
- Rodamina 6G (Sigma-Aldrich, R8004) 1 mM: Se preparó en cloroformo y se almacenó a -4°C.
- Rodamina B (Sigma-Aldrich, R4127) 1 mM: Se preparó en cloroformo y se almacenó a -4°C.
- Rodamina 123 (Sigma-Adrich, R6626) 1 mM: Se preparó en cloroformo y se almacenó a -4°C.
- Desoxicolato de sodio: 100 mg/mL. Se preparó en Tris Buffer y se almacenó a -4°C.

Tamaños de muestras celulares

- 2×10^5 de células T47D o PC3 para estudios de expresión relativa del receptor SR-B1 (western blot)
- 2×10^5 de células T47D para estudios de liberación de las rodaminas mediada por rHDL
- 2×10^5 de células T47D para estudios de liberación intracelular de rodaminas con receptores bloqueados y no bloqueados
- 2×10^4 de células T47D para ensayo de viabilidad celular
- 2×10^5 de células T47D para estudios de especies reactivas de oxígeno ROS

Medios de cultivo celular

- Medio de cultivo celular RPMI-1640 (Sigma-Aldrich).
- Suero fetal bovino al 10%.
- Anfotericina B y antibióticos (estreptomicina y penicilina) al 1%.

Ensayos *in vitro*

Western blot

- Buffer de lisis RIPA (Tris 0.5 M pH 6.8, EDTA 0.2 M pH 8.0, EGTA 50 mM pH 7.9, β -mercaptoetanol)
- inhibidores de proteasas (leupeptin, aproptinin, PMSF) (thermofisher).
- Anticuerpo α anti-SCARB1 biotin producido en conejo (Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo monoclonal SR-BI (Sigma-Aldrich).

Ensayo liberación de rodaminas rHDL

- 45 μ l de cada solución de rHDL.
- Paraformaldehído: Se preparó disolviendo 0.750 g en 25 mL de PBS. Se agrega NaOH gota a gota hasta disolver. Se filtra a 0.22 μ m, se enfría y se ajusta el pH a 6.9 con HCl.
- PBS (250 mL): Se preparó disolviendo 2 g de NaCl, 0.05 g de KCl y 0.2775 g de Na₂HPO₄, posteriormente se ajustó el pH a 7.4.

Ensayo de viabilidad celular (XTT)

- Cloruro de tetrazolio (XTT) (Roche).
- PBS (250 mL): Se preparó disolviendo 2 g de NaCl, 0.05 g de KCl y 0.2775 g de Na₂HPO₄, posteriormente se ajustó el pH a 7.4.
- ¹⁷⁷Lu (IBA , Alemania).

Ensayo especies reactivas de oxígeno (ROS)

- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 300 nM en agua des ionizada.
- Electrón couplin
- Total Reactive Oxygen Species (ROS) (Sigma-Aldrich)

Instrumentación

- Microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse Ti).
- Espectrofotómetro de microplacas Agilent BioTek Epoch.
- Cámara de electroforesis horizontal mini gel Thermo Scientific
- Cámara de electroforesis vertical Bio-rad
- Vortex
- Membranas de filtración de *Millipore* 0.22 μm (Sigma-Aldrich)
- Láser pulsado de Nd: YAG

Material biológico

- Línea celular: T-47D ATCC (American Type Culture Collection).
- Línea celular PC3 ATCC (American Type Culture Collection).

8. Metodología

8.1 Preparación rHDL

Las rHDL se realizaron de acuerdo al protocolo realizado por Plata, 2019. Se preparó una mezcla con 300 μ L de fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC, 10 mg/mL), 7 μ L de colesterol libre (FC, 10 mg/mL), 7.5 μ L de éster de colesterol (CE, 4 mg/mL), 500 μ L de R6G o R123 o RB (1 mM), estos reactivos se disolvieron en cloroformo. La mezcla se homogenizó en baño ultrasónico a 4°C, hasta evaporar el cloroformo y así obtener una película de lípidos adherida a la superficie del vial de vidrio, se agregó 60 μ L de DMSO, 1 mg de Apo-A1 por goteo, 140 μ L de colato de sodio (20 mg/mL en buffer) y 2 ml de Tris-EDTA buffer (10 mM Tris buffer, 1 mM EDTA, 0.1 M KCl, pH = 8), se dejó dentro de baño sonicador hasta que la película se desprendió. La mezcla obtenida se homogenizó en vortex por 15 segundos. Posteriormente, se colocó en una membrana de celulosa de 14 kDa y se dializó durante 48 h manteniendo agitación constante y con 3 a 4 cambios de la solución dializadora. El contenido de la membrana se filtró con filtro milliporo de 0.22 μ m y se almacenó en un frasco de vidrio oscuro. Este proceso se realizó para cada tipo de rodamina

8.2 Cultivo celular

La línea celular de cáncer de mama T47D y cáncer de próstata PC3 se cultivó a 37 °C en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) 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%.

8.3 Cuantificación relativa de la expresión de receptores SR-B1

Se evaluó la expresión relativa del receptor SR-B1 en células T47D y PC3 mediante western blot. Las células se lisaron con el buffer de lisis RIPA (Tris 0.5 M pH 6.8, EDTA 0.2 M pH 8.0, EGTA 50 mM pH 7.9, β -mercaptoetanol) suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptin, aproptinin, PMSF). El lisado de células obtenido se recolectó por centrifugación. La proteína total se cuantificó por el método de Bradford. Posteriormente las proteínas se separaron por electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se incubó con anticuerpos monoclonales primarios específicos para SR-B1 (Sigma-Aldrich) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó con PBS y se añadió el anticuerpo secundario α -anti-conejo biotin (Sigma-Aldrich) y se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se colocó la membrana en un escáner para capturar las bandas en una imagen digital.

Para medir el nivel expresión de la proteína SR-B1 se comparó con Actina. Para ello se siguió los protocolos de Huang et al., 2019 & Davarinejad, 2015; mediante el uso de Image J se procesó la imagen previamente obtenida para la realización de un análisis semicuantitativo de comparación de los cocientes normalizados de los radios de intensidad de las bandas de las proteínas.. La realización del western blot se realizó por duplicado.

8.4 Evaluación cualitativa de liberación de las rodaminas por las rHDL

Para visualizar por microscopía de fluorescencia la liberación de las rodaminas mediada por las rHDL, se colocaron 2.5×10^5 células de T47D en cámaras de cultivo y se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se colocaron 45 µL de las soluciones rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB e incubaron a 37°C durante una hora. Se retiró el medio y se lavaron con PBS 1x, después se fijaron las células con paraformaldehído al 2% durante 15 min a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron 2 veces con PBS 1x frío y se agregó el marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se lavó nuevamente con PBS 1x frío y se cubrió con cubreobjetos. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse bajo la siguiente configuración: objetivo de 60X, filtro Texas red, exposición de 300 ms y ganancia de 2. En promedio se tomaron 5 campos de visión por cada preparación. Las imágenes se fusionaron mediante superposición de fluorescencia. El análisis cualitativo se basó en la observación de la intensidad de la señal de fluorescencia de la rodamina presente dentro de la célula.

8.4.1 Evaluación de liberación específica mediada por el sistema rHDL y el receptor SR-B1.

Para verificar la relación de liberación de rodaminas del sistema rHDL y el receptor SR-B1, se utilizó como modelo el sistema rHDL-R123 y células T47D. Para ello se cultivaron 2×10^5 células en una placa de 48 pocillos y se incubaron durante 24 h, a 37 ° C y 5% de CO₂. Posteriormente se les añadió un anticuerpo *anti-SCARB1* (anticuerpo de bloqueo) (200 ng) y se incubaron, nuevamente, durante 1 h, a 37 ° C y 5% CO₂. Se colocaron 30 µl de una solución de rHDL-R123 1µM y se incubaron nuevamente por 1 h. Se preparó otro grupo sin bloqueo, para fines comparativos.

Después del tiempo de incubación, se retiraron los sobrenadantes evitando arrastrar precipitado celular y se conservaron. Para estimar el nivel relativo de R123 que se internalizó en las células T47D en presencia de los receptores bloqueados, se midieron las absorbancias de los sobrenadantes utilizando el espectrofotómetro Epoch. Cada lectura se corrigió restando el control y la proporción de estas absorbancias corregidas indicó el porcentaje de liberación intracelular cuando el receptor SR-B1 estaba parcialmente bloqueado.

8.5 Evaluación de la viabilidad celular con XTT

La viabilidad y citotoxicidad celular se evaluó por ensayo de reducción colorimétrica del cloruro de tetrazolio una sal redox (XTT, Roche), que se reduce a productos de formazán por acción del NAPH y coenzima Q presentes en las células metabólicamente activas. Para este ensayo se colocaron 2.5×10^4 células T47D/pozo en una placa de 96 pozos e incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO_2 . La distribución de los pozos fue de manera alternada y cubriendo un total de 48 pozos, se utilizaron seis pozos por cada tratamiento y para el grupo control. Posteriormente, se agregaron los tratamientos: rHDL-R123 o rHDL-R6G o rHDL-RB e incubaron por 1 h. Tras la incubación se irradiaron con 532 nm mediante un láser pulsado de Nd: YAG a una potencia de 3 mW/cm^2 durante 10 min. Se retiró el medio y se lavaron dos veces con PBS 1x estéril. Posteriormente, se colocaron 100 μl de PBS 1x en cada pozo y se agregaron 50 μl de la mezcla de reacción XTT (50 μl de XTT + 1 μl electrón coupling) y se incubó por 24 h. Al finalizar el periodo de incubación, se cuantificaron los productos de formazán mediante la toma de espectros absorbancia en un espectrofotómetro Epoch. Los valores de absorbancia de cada tratamiento se corrigieron por fondo y se obtuvo el promedio y desviación estándar. Se calculó el porcentaje de viabilidad para cada tratamiento utilizando como el 100% al grupo control.

8.5.1 Evaluación de la viabilidad celular con XTT en tratamientos con irradiados con luz Cerenkov

Con el propósito de tener algunos resultados preliminares utilizando otra fuente de excitación, se cultivaron 2.5×10^4 células T47D/pozo en una placa de 96 pozos e incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO_2 . Cubriendo 48 pozos. Posteriormente se agregó a un grupo rHDL-R6G + ^{177}Lu con diferentes actividades (mCi) y a otro grupo rodamina-R6G + ^{177}Lu con diferentes actividades (mCi). Los tratamientos (n=6) se dejaron incubar por 24 h y posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo XTT a las 24 h utilizando el procedimiento anteriormente descrito (apartado 8.5).

8.6 Evaluación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por microscopia de fluorescencia

Para evaluar la producción de ROS, se sembraron 2.5×10^5 células en 2 portaobjetos con cámara e incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Se agregó rHDL-R6G y se incubaron nuevamente por una 1h. Uno de los tratamientos se irradio a 532 nm durante 10 min. Posteriormente ambos agregó el reactivo CellRox Green Reagent (485/520 nm) a una concentración de 5µM por muestra y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Se removieron los medios y se lavó tres veces con PBS 1X (pH 7.2-7.6). Se fijaron las muestras con formaldehído al 2% por 15 min y se lavó nuevamente con PBS 1x. Se agregó el marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y cubrió con un cubreobjetos. La muestra se incubó a 37°C por 5 min en oscuridad antes de llevar las muestras al microscopio. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse bajo la siguiente configuración las imágenes se adquirieron con un objetivo de 60X, filtro para Texas red (rodamina), filtro para DAPI, filtro para GFP (cell rox) con tiempo de exposición de 300 ms. En promedio se tomaron 5 campos de visión por cada preparación.

Las imágenes se fusionaron mediante superposición de fluorescencia, debido a la alta intensidad de la señal de fluorescencia del indicador Cell Rox al superponer las imágenes para fusionarlas dentro de la suite del Nikon, el fondo de la Fig. 13 F y Fig. 13 J presenta variaciones de contraste.

El análisis cualitativo se basó en la observación de la intensidad de la señal fluorescencia emitida por el indicador CellRox.

2.5. Análisis estadístico

Para comparar los resultados de los experimentos cuantitativos se utilizó la prueba t-Student. Se consideraron significativas las diferencias con una $p < 0.05$. Para comparar entre tratamientos con las tres rodaminas, se utilizó la prueba ANOVA de muestras independientes, seguida de la comparación de medias mediante la prueba de Tuckey ($p < 0.05$).

Experimento	Variable	Unidad de medición	Tipo de variable	Estadístico
Expresión relativa de srb1	Expresión	Radios de las bandas intensidad	Cuantitativa	T de student
Liberación específica mediada por rHDL y SR-B1.	Captación	% captación	Cuantitativa	T de student
Evaluación cualitativa de internalización de rodamina	Captación	Intensidad de señal fluorescencia	Cualitativa	análisis descriptivo
Viabilidad celular de T47D en presencia de rHDL-rodaminas e irradiación a 532 nm	Daño intracelular	%viabilidad celular	Cuantitativa	Anova Y prueba de Tuckey
Viabilidad celular de T47D en presencia de rHDL-rodaminas e irradiación Cerenkov	Daño intracelular	%viabilidad celular	Cuantitativa	Anova Y prueba de Tuckey
Evaluación de Ros	Producción de ROS	Intensidad de señal fluorescente	Cualitativa	Análisis descriptivo

Tabla 2. Descripción de Variables

9. Resultados y discusión

9.1 Expresión relativa del receptor SR-B1

Las células T47D presentan una mayor expresión significativa ($p < 0.05$) del receptor SR-B1 en comparación con las células PC3 (Fig. 8). De acuerdo a J. Li et al., 2016 & Yuan et al., 2016; Las células de mama presentan en superficie celular un elevado número de receptores de SR-B1, para incrementar la transferencia de ésteres mediante las interacciones de SR-B1 y Apo-A1. Debido a su alto metabolismo (Schörghofer et al., 2015; Traugher et al., 2020). Cuando estas células adquieren el fenotipo maligno, SR-B1 es el receptor que más es sobreexpresado (Gutierrez-Pajares et al., 2016).

Debido a la alta expresión del receptor SR-B1 en las células de cáncer T47D se usó esta línea como modelo para los estudios *in vitro* posteriores.

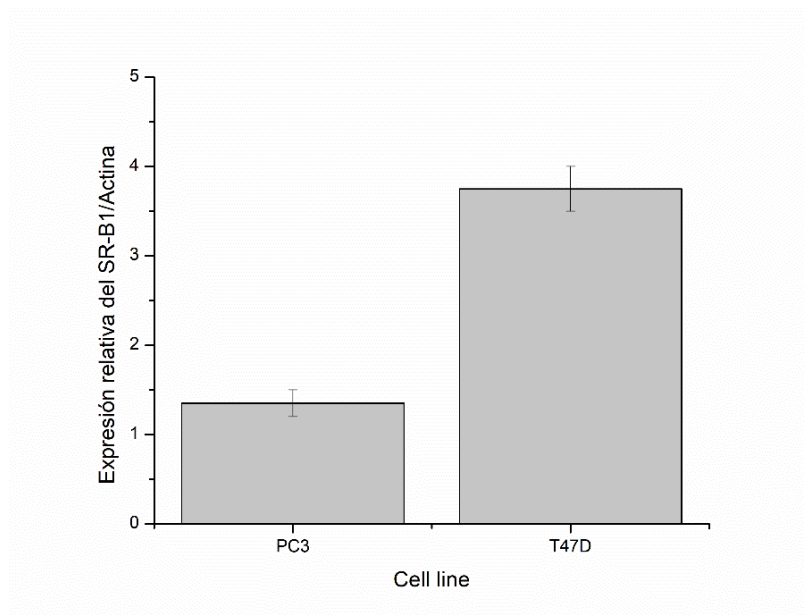


Fig.8: Expresión relativa del receptor SR-B1 en células de cáncer de mama T47D y cáncer de próstata PC3.

9.2 Evaluación cualitativa de liberación de las rodaminas mediada por HDL

En las imágenes de microscopía de fluorescencia (fig. 9) se observan células T47D con los núcleos teñidos de DAPI y el citoplasma teñido de una coloración rojiza, producto de las rodaminas internalizadas. Entre más saturado este el citoplasma de rodamina más intensa es la señal fluorescente. Bajo este principio R6G es quien más se internalizó en comparación con las rodaminas 123 y B. La predisposición de mejor captación de rodamina 6G se debe principalmente a sus propiedades electroquímicas, al ser un compuesto catiónico presenta una mayor afinidad a la membrana plasmática que se encuentra electronegativamente cargada (C. Liu et al., 2019). Esto favorece que las moléculas catiónicas se acumulen y tengan una migración al citosol más rápida. (C. Liu et al., 2019; Shea et al., 1989). Además, su estructura química cuenta con cadenas largas de éster butílico, que incrementa su capacidad lipofílica (Wainwright, 2010), que favorece su paso a través de la sección de las colas hidrófobas de la membrana celular.

A pesar de que R123 es un compuesto de carácter catiónico igual que R6G, presento una menor internalización. Esta baja captación puede estar asociada a la ligeramente menor afinidad que tiene R123 con la membrana celular en comparación con R6G (Klier et al., 2021). También es posible que parte de la rodamina internalizada ya se encuentre dentro de la mitocondria lo que disminuye su señal de fluorescencia.

La RB es un compuesto de carga neutra (zwitterion), esta propiedad tiene efecto directo en las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas que en consecuencia afecta su capacidad de solubilizarse en solventes apolares (Reichardt & Welton, 2011). Por lo de los tres tipos de rodaminas es la que menor capacidad de penetrar la membrana celular posee.

La diferencia de internalización también puede estar asociada a las concentraciones de rodaminas presentes en las rHDL. De acuerdo a la metodología de Plata, 2019; que se usó para la síntesis de las rHDL-rodamina, las eficiencias de encapsulamiento son las siguientes: rodamina 123 (24.11%), rodamina 6G (19.75%) y rodamina B (13.33%). Por lo que, hay menos cantidad de rodamina B para ser internalizadas en las células a comparación de las otras.

De acuerdo al estudio de realizado por Jiménez-Mancilla et al., 2021; las células tratadas con rodaminas libres vs rodaminas administradas vía sistema de transporte rHDL, demostró que hay una mayor internalización de estas vía rHDL.

Este mejor rendimiento de internalización del sistema se debe al mecanismo de interacción entre Apo-A1 presente en las nanopartículas y el receptor SR-B1, el cual se encuentra altamente expresado en células de cáncer. Esta interacción específica de la Apo-A1 con el receptor SR-B1 genera un canal de intercambio para la formación de endosomas de manera más rápida y eficiente (Sivasubramanian et al., 2019).

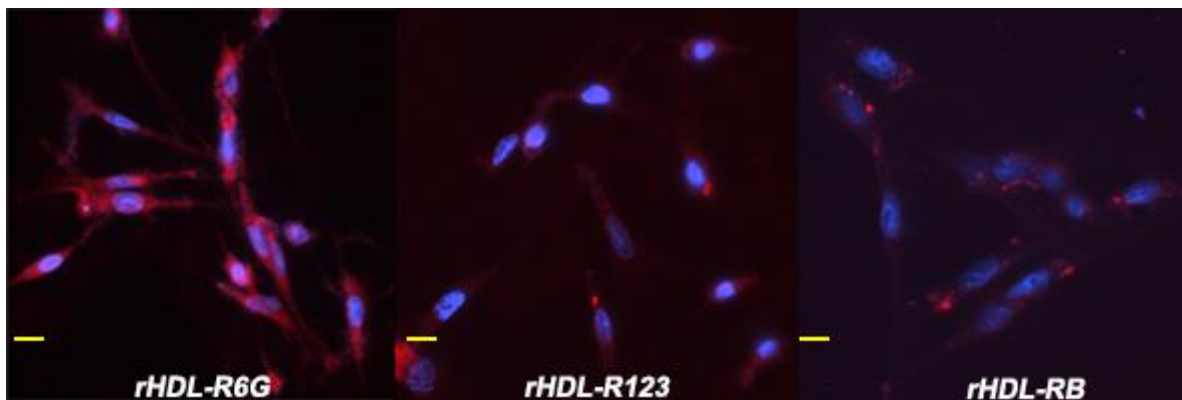


Fig. 9: Imagen de fluorescencia de la liberación de R6G, R123 y RB mediada por rHDL en T47D
Nota: Barra de escala: 10 μ m: Magnificación 60x: Núcleo celular (DAPI; color azul), citoplasma (rodamina; color rojo): imagen fusionada por superposición de fluorescencia.

9.2.1 Evaluación de liberación específica mediada por el sistema rHDL y el receptor SR-B1.

Para mostrar el reconocimiento específico del sistema con los receptores SR-B1, se evaluó la liberación intracelular de la R123 mediada por rHDL en células T47D con receptores SR-B1 bloqueados. Se seleccionó la R123 debido a que su mayor atrapamiento en la rHDL significaría, en principio, una mayor liberación intracelular. Como se observa en la Figura 10, la liberación intracelular con receptores bloqueados disminuyó significativamente (14%, $p < 0.05$) con relación a la internalización sin bloqueo. Lo cual demuestra la especificidad del sistema rHDL a receptores SR-B1. Este fenómeno ocurre porque las rHDL internalizan compuestos mediante la interacción específica de apo-A1 del receptor SR-B1, si estos sitios de unión en el receptor son inhibidos, apo-A1 es incapaz de acoplarse a SR-B1, por lo tanto no hay interacciones que promueva el intercambio entre la NPs y las células (De Beer et al., 2001; Kornmueller et al., 2019; Mooberry et al., 2016; Williams et al., 2000).

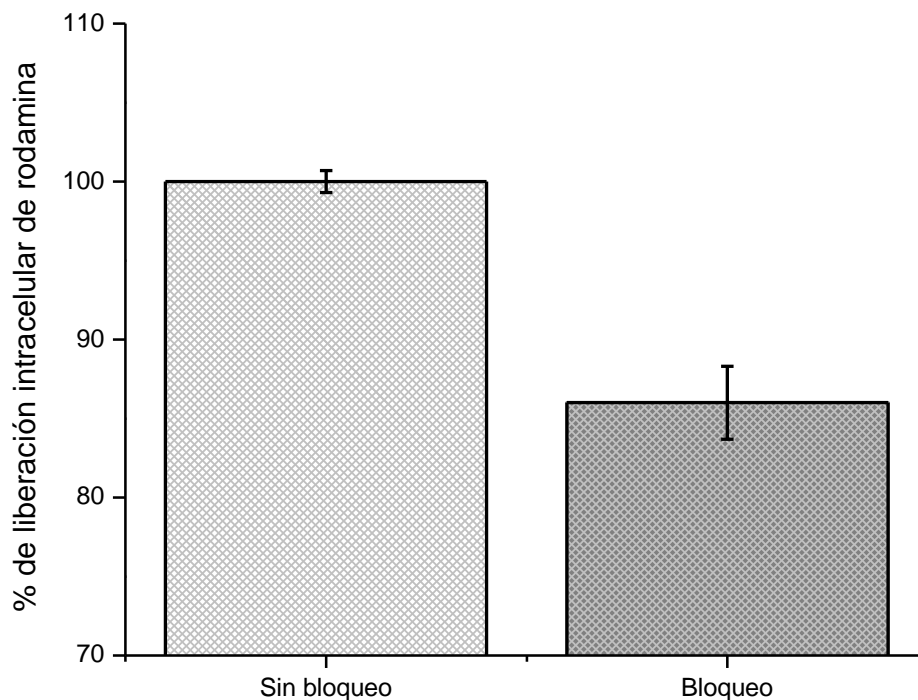


Fig.10 : % Captación rHDL-R123 con bloqueo y sin bloqueo de receptores SR-B1.

9.3 Viabilidad celular de T47D en presencia de rHDL-rodaminas e irradiación a 532 nm

El sistema rHDL-R6G demostró tener capacidad citotóxica a una concentración $1\mu\text{M}$ para las células T47D incluso sin exposición (Fig.11) y cuando el sistema se irradia a 532 nm incrementa su fototoxicidad, ya que disminuye de manera significativa la viabilidad celular ($p < 0.05$). Lo cual indica actividad fotodinámica (Jiménez-Mancilla et al., 2021), producida por las reacciones de transferencia tipo I con bio-sustratos y O_2 (Hirakawa et al., 2011; Hirakawa & Ito, 2015; Jiménez-Mancilla et al., 2021).

El sistema conjugado de rHDL-R123 irradiado mostró una mayor disminución en la viabilidad celular comparación con rHDL-R123 sin irradiación (Fig.11). Esto indica que el sistema tiene capacidad fototóxica aunque en menor rango que R6G. Este rendimiento se debe a su baja capacidad para producir reacciones de transferencia electrónica con O_2 (Jiménez-Mancilla et al., 2021) Sin embargo, no debe descartarse como potencial candidato como agente terapéutico en PDT.

El sistema rHDL-RB no mostro diferencias significativa ($p > 0.05$) entre su estado basal y al ser irradiadas. Este rendimiento está asociado a su baja capacidad para producir ROS mediante reacción de transferencia electrónica (Jiménez-Mancilla et al., 2021) así como su baja capacidad de internalizarse en las células. Sin embargo autores sugieren que la capacidad fototóxica puede aumentarse alterando su estructura química (C. Liu et al., 2019).

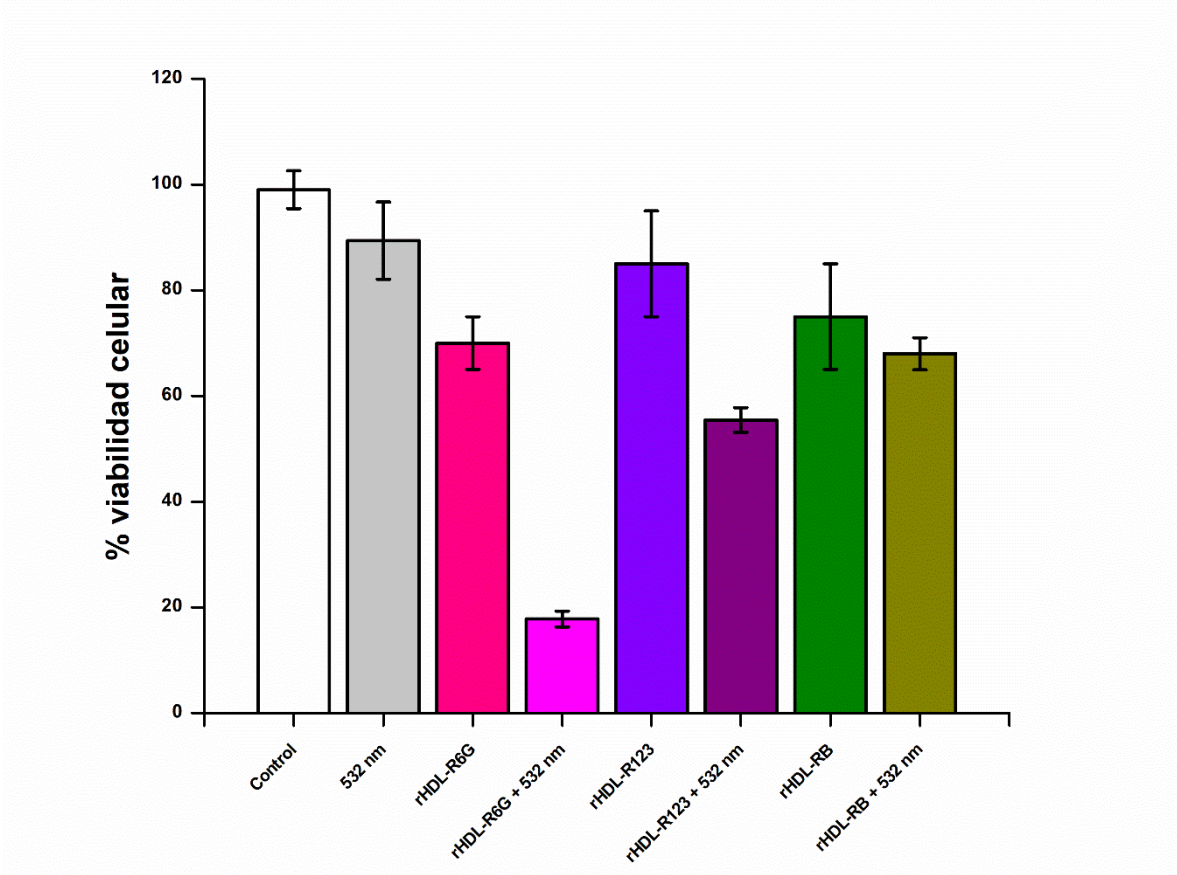


Fig. 11. Porcentaje de viabilidad celular del sistema rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB.

9.3.1 Evaluación de la viabilidad celular con XTT en tratamientos con irradiados con luz Cerenkov.

El sistema rHDL-R6G y R6G disminuyeron la viabilidad celular ($p < 0.05$). Cuando se expusieron a la luz Cerenkov derivada del ^{177}Lu (100 uCi), lo que indica actividad fotodinámica (Fig.12). Esto sugiere que ^{177}Lu tiene potencial para actuar como una fuente de luz interna. Sin embargo hay que indicar que esta disminución en la viabilidad también puede estar asociada al efecto de la energía ionizante del radionucleido. Por lo que se requiere de más estudios para determinar el potencial uso del Lutecio 177 como agente en PDT.

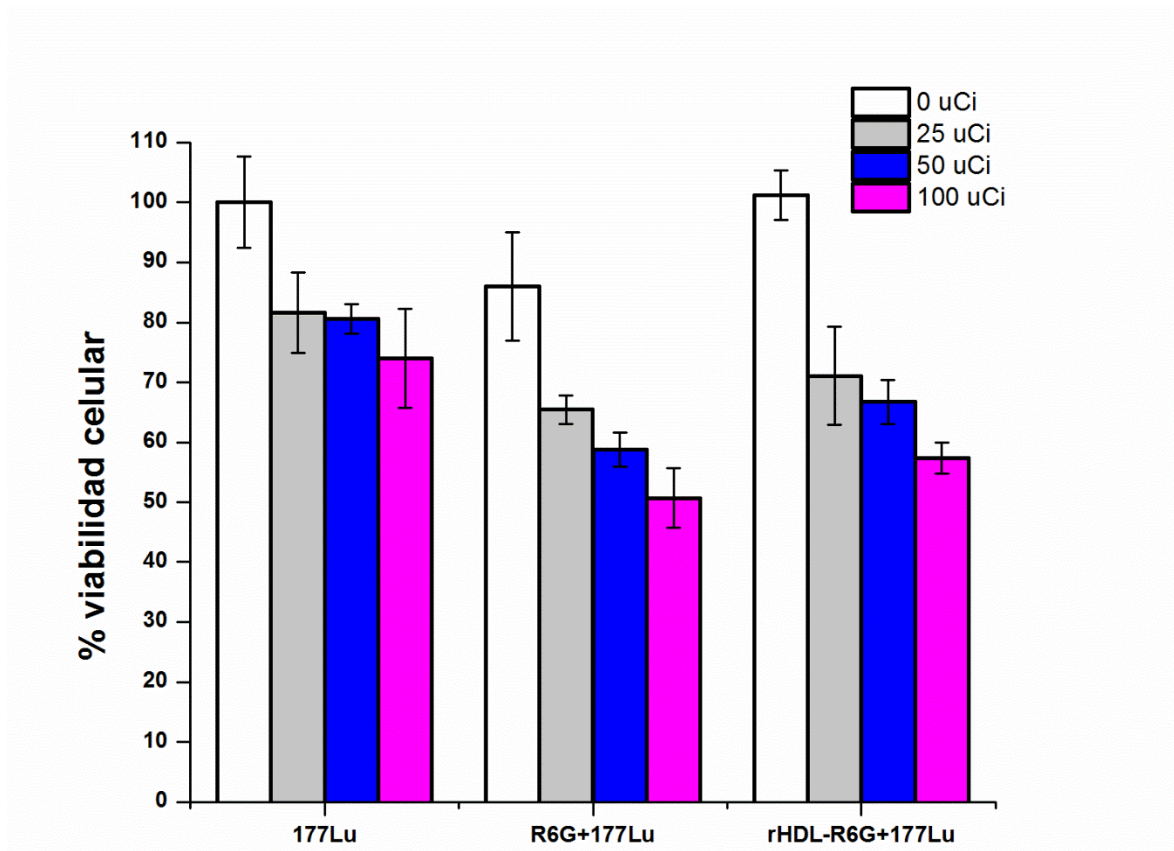


Fig. 12. Porcentaje de viabilidad celular del sistema rHDL-R6G y radiación Cerenkov (^{177}Lu).

9.4 Evaluación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por microscopia de fluorescencia

En las imágenes de microscopia de fluorescencia se observan células T47D tratadas con el sistema rHDL-6G irradiado y sin irradiación (Fig.13). En la figura 13l, la rodamina se encuentra con actividad de excitación, esto se puede apreciar por la señal de fluorescencia roja dentro del citoplasma. Esto indica que las rodaminas han absorbido energía y están liberando este excedente mediante la emisión de luz e intercambio de energía con las biomoléculas del medio que derivara en la producción especies reactivas de oxígeno (ROS) (De Freitas & Hamblin, 2016). Esto se confirma en la figura 13m, donde se observa que el citoplasma de la célula presenta una fuerte señal de fluorescencia verde que indica que el agente reductor Cell Rox se ha oxidado por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula. (Murschhauser et al., 2019).

Al comparar el sistema rHDL-R6G irradiado (Fig. 13l; 13m) contra el sistema rHDL-R6G no irradiado (Fig. 13h; 13i) podemos observar que el sistema no irradiado no produce señal de fluorescencia. Indicando que no hay producción de especies reactivas de oxígeno.

Como se sabe, las ROS interactúan con varias moléculas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, dando lugar a daño oxidativo irreversible con la consecuente inducción de efectos letales para las células donde se producen (De Freitas & Hamblin, 2016; Murschhauser et al., 2019). Por lo la sobreproducción de ROS inducida por la combinación rHDL-6G e irradiación con 532 nm indican un potencial citotóxico de este sistema.

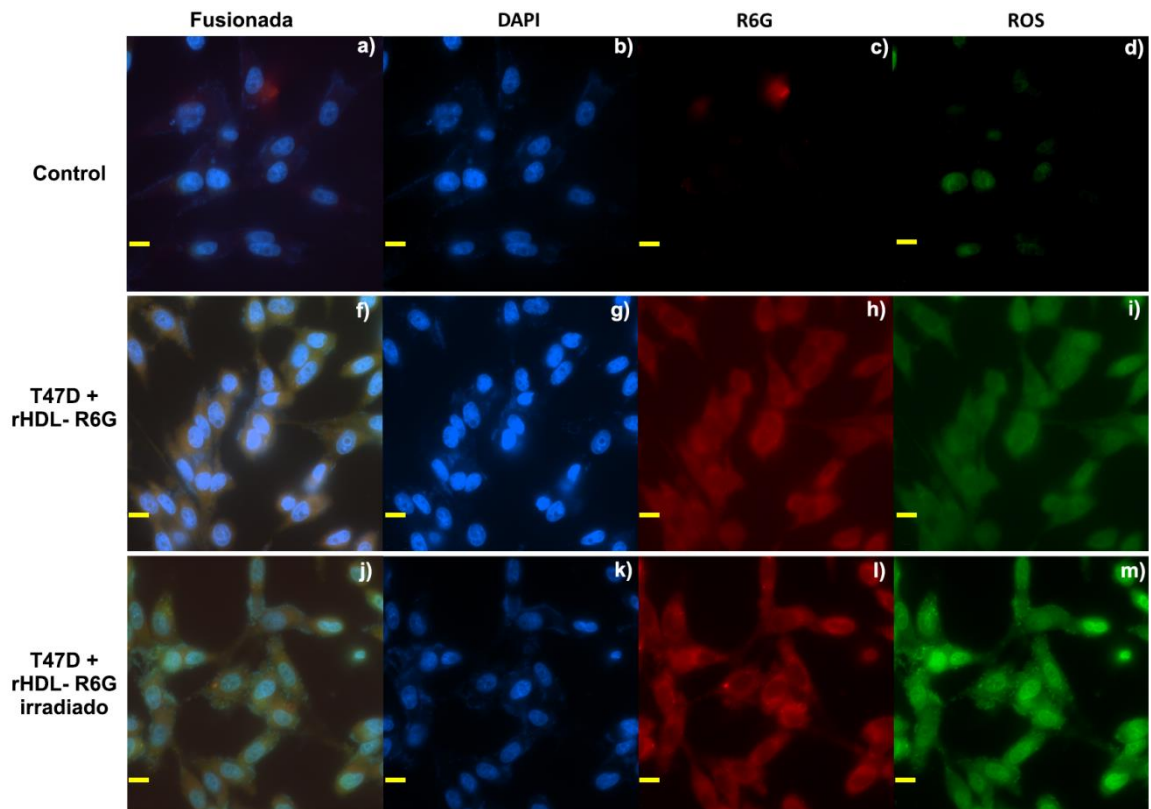


Fig. 13. Producción de ROS del sistema rHDL-R6G irradiada con 532 nm en células T47D.

Nota: Barra de escala: 10 μm . Magnificación 60x. Colorantes: DAPI; color azul (núcleo), Rodamina; color rojo (citoplasma), CellRox; color verde (citoplasma). Imagen fusionada por superposición de fluorescencia.

10. Conclusiones

- Las rodaminas R6G y 123 mediadas por el sistema rHDL para su internalización, demostraron poseer un efecto citotóxico sobre las células de cáncer, este efecto puede potenciarse al irradiar las células a una longitud de onda de 532 nm.
- La rodamina R6G mediada por el sistema rHDL para su internalización celular, demostró tener capacidad de formar especies reactivas de oxígeno cuando son irradiadas a una longitud de onda de 532 nm.
- Las nanopartículas de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) demostraron encapsular las rodaminas adecuadamente, así como dirigir y liberarlas de manera eficiente a través de la interacción con los receptores SR-B1.
- La rodamina R6G internalizada en las células de manera libre o mediada por rHDL, en presencia de ^{177}Lu (100 uCi) demostró un efecto fototóxico.

11. Referencias

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
- Adams, F., & Barbante, C. (2015). Nanotechnology and Analytical Chemistry. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 69, pp. 125–157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63439-9.00004-9>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the cell* (4th ed.). Garland Science.
- Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clinical Endoscopy*, 46(1), 24–29. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>
- Allison, R. R., & Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2), 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>
- Arden, J., Deltau, G., Huth, V., Kringel, U., Peros, D., & Drexhage, K. H. (1991). Fluorescence and lasing properties of rhodamine dyes. *Journal of Luminescence*, 48–49, 352–358. [https://doi.org/10.1016/0022-2313\(91\)90137-K](https://doi.org/10.1016/0022-2313(91)90137-K)
- Ashara, K. C., Paun, J. S., Soniwala, M. M., Chavada, J. R., & Badjatiya, J. K. (2018). Nanoparticulate Drug Delivery System: a Novel Approach. *International Journal of Drug Regulatory Affairs*, 1(2), 39–48. <https://doi.org/10.22270/ijdra.v1i2.109>
- Attama, A. A., & Umeyor, C. E. (2015). The use of solid lipid nanoparticles for sustained drug release. *Therapeutic Delivery*, 6(6), 669–684. <https://doi.org/10.4155/tde.15.23>
- Barrios, E., & Garau, M. (2017). Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *Anales de La Facultad de Medicina*, 4(1), 9–46.
- Bast Jr., R. C., Croce, C. M., Hait, W. N., Hong, W. K., Kufe, D. W., Piccart-Gebhart, M., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Wang, H., & Holland, J. F. (2017). *Hollad-Frei Cancer Medicine* (9th ed.). Wiley-Blackwell.
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake

- of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>
- Benov, L. (2015). Photodynamic therapy: Current status and future directions. *Medical Principles and Practice*, 24(suppl 1), 14–28. <https://doi.org/10.1159/000362416>
- Berg, K., & Moan, J. (1997). Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 65(3), 403–409. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb08578.x>
- Bhatia, S. (2016). Natural Polymer Drug Delivery Systems. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae* (pp. 1–225). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3>
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
- Boisseau, P., & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*, 12(7), 620–636. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>
- Bolze, F., Jenni, S., Sour, A., & Heitz, V. (2017). Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 53(96), 12857–12877. <https://doi.org/10.1039/C7CC06133A>
- Borhani, D. W., Rogers, D. P., Engler, J. A., & Brouillette, C. G. (1997). Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12291–12296. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12291>
- Calvo, M., & Mendoza, E. (2012). *Toxicología de alimentos*. McGraw-Hill Interamericana.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- Chaudhary, J., Bower, J., & Corbin, I. R. (2019). Lipoprotein drug delivery vehicles for

- cancer: Rationale and reason. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24).
<https://doi.org/10.3390/ijms20246327>
- Chen, Q., Chen, H., & Hetzel, F. W. (1996). Tumor oxygenation changes post-photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 63(1), 128–131.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03003.x>
- Cho, K.-H. (2019). High-Density Lipoproteins as Biomarkers and Therapeutic Tools. In *High-Density Lipoproteins as Biomarkers and Therapeutic Tools* (Vol. 1). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7387-9>
- Cline, B., Delahunty, I., & Xie, J. (2019). Nanoparticles to mediate X-ray-induced photodynamic therapy and Cherenkov radiation photodynamic therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11(2), e1541.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1541>
- Cooper, G., & Hausman, R. (2007). *The Cell: A Molecular Approach* (4th ed.). Sinauer Associates.
- Cruz, M. E., Simoes, S. I., Corvo, M. L., Figueira, M. B., & Gaspar, M. M. (2016). Formulation of NPDDS for Macromolecules. In Y. Pathak & D. Thassu (Eds.), *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization* (p. 416). CRC Press.
<https://doi.org/10.3109/9781420078053>
- Cuneo, C. (2001). Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y enfermedad coronaria. *Revista Feredación Argentina de Cardiología*, 30, 103–111.
- D'Mello, S., Das, S., & Das, N. (2016). Polymeric Nanoparticles for Small-Molecule Drugs: Biodegradation of Polymers and Fabrication of Nanoparticles. In Y. Pathak & D. Thassu (Eds.), *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization* (p. 416). CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9781420078053>
- Dadwal, A., Baldi, A., & Kumar Narang, R. (2018). Nanoparticles as carriers for drug delivery in cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup2), 295–305. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1457039>
- Damke, H., Baba, T., Van Der Blik, A. M., & Schmid, S. L. (1995). Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of

- dynamamin. *Journal of Cell Biology*, 131(1), 69–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.1.69>
- Davarinejad, H. (2015). Quantifications of Western Blots with ImageJ. In *University of York*. <http://www.yorku.ca/yisheng/Internal/Protocols/ImageJ.pdf>
- Davies, K. S., Linder, M. K., Kryman, M. W., & Detty, M. R. (2016). Extended rhodamine photosensitizers for photodynamic therapy of cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.033>
- De Beer, M. C., Durbin, D. M., Cai, L., Jonas, A., De Beer, F. C., & Van der Westhuyzen, D. R. (2001). Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *Journal of Lipid Research*, 42(2), 309–313.
- De Freitas, L. F., & Hamblin, M. R. (2016). Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42864-4.00001-4>
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133–149. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>
- des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y. J., & Pr eat, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, 116(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.08.013>
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- El Ouahabi, A., Thiry, M., Pector, V., Fuks, R., Ruyschaert, J. M., & Vandenbranden, M. (1997). The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Letters*, 414(2), 187–192. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00973-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00973-3)
- Emerich, D. F., & Thanos, C. G. (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4, 655–663.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1517/14712598.3.4.655>

- Engel, E., Michiardi, A., Navarro, M., Lacroix, D., & Planell, J. A. (2007). Nanotechnology in regenerative medicine : the materials side. *Trends in Biotechnology*, 1, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.10.005>
- Errico, T. L., Chen, X., Martin Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: Estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 25(2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003>
- Feng, H., Wang, M., Wu, C., Yu, J., Wang, D., Ma, J., & Han, J. (2018). High scavenger receptor class B type i expression is related to tumor aggressiveness and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Medicine (United States)*, 97(13), 1–7. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010203>
- Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 161–171. <https://doi.org/10.1038/nrc1566>
- Frank, P. G., & Marcel, Y. L. (2000). Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *Journal of Lipid Research*, 41(6), 853–872. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828078>
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5577–5591. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>
- Gao, D., Agayan, R. R., Xu, H., Philbert, M. A., & Kopelman, R. (2006). Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells. *Nano Letters*. <https://doi.org/10.1021/nl0617179>
- García-Sánchez, E. (2013). *Estudio de la macropinocitosis como mecanismo endocítico de entrada del Virus de la Peste Porcina Africana* [Universidad Autonoma de Madrid]. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/660467/garcia_sanchez_elena.pdf?sequence=1
- Garrett, W. S., & Mellman, I. (2001). Studies of endocytosis. In *Dendritic Cells* (Second Edi). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-012455851-9/50055-9>

- Glaser, A. K., Zhang, R., Andreozzi, J. M., Gladstone, D. J., & Pogue, B. W. (2015). Cherenkov radiation fluence estimates in tissue for molecular imaging and therapy applications. *Physics in Medicine and Biology*, *60*(17), 6701–6718. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/60/17/6701>
- Gollnick, S. O., Evans, S. S., Baumann, H., Owczarczak, B., Maier, P., Vaughan, L., Wang, W. C., Unger, E., & Henderson, B. W. (2003). Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *British Journal of Cancer*, *88*(11), 1772–1779. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600864>
- González-Muñoz, E. (2009). Papel de las caveolas/caveolina-1 en la fisiología del adipocito [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/1023>
- Gutierrez-Pajares, J. L., Ben Hassen, C., Chevalier, S., & Frank, P. G. (2016). SR-BI: Linking Cholesterol and Lipoprotein Metabolism with Breast and Prostate Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00338>
- Gutiérrez, M., & López, S. (2010). Mecanismo de entrada de los virus: una manera de conocer la célula. *TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol. D.R. © TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *26*(131), 26–34.
- Hamblin, M. R., Chiang, L. Y., Lakshmanan, S., Huang, Y. Y., Garcia-Diaz, M., Karimi, M., De Souza Rastelli, A. N., & Chandran, R. (2015). Nanotechnology for photodynamic therapy: A perspective from the Laboratory of Dr. Michael R. Hamblin in the Wellman Center for Photomedicine at Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. *Nanotechnology Reviews*, *4*(4), 359–372. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2015-0027>
- Harris, D., & Bertolucci, M. (1989). *Symmetry and spectroscopy: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy* (1st ed.). Dover.
- Hirakawa, K., & Ito, H. (2015). Rhodamine-6G can photosensitize folic acid decomposition through electron transfer. *Chemical Physics Letters*, *627*, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.03.030>
- Hirakawa, K., Ochiai, S., Oikawa, S., & Kawanishi, S. (2011). Oxygen-independent DNA damage photosensitized by rhodamine-6G. *Trends in Photochemistry &*

Photobiology, 13.

- Ho, J. S. (2018). Wireless Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Proceedings of the 2018 IEEE International Conference on Service Operations and Logistics, and Informatics, SOLI 2018*, 5–6. <https://doi.org/10.1109/SOLI.2018.8476796>
- Huang, Y. T., van der Hoorn, D., Ledahawsky, L. M., Motyl, A. A. L., Jordan, C. Y., Gillingwater, T. H., & Groen, E. J. N. (2019). Robust comparison of protein levels across tissues and throughout development using standardized quantitative western blotting. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(146), 1–9. <https://doi.org/10.3791/59438>
- INEGI. (2021). *Estadísticas a proposito del día mundial contra el cáncer*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
- Isaac-Olivé, K., Ocampo-García, B. E., Aranda-Lara, L., Santos-Cuevas, C. L., Jiménez-Mancilla, N. P., Luna-Gutiérrez, M. A., Medina, L. A., Nagarajan, B., Sabnis, N., Raut, S., Prokai, L., & Lacko, A. G. (2019). [99 mTc-HYNIC-N-dodecylamide]: a new hydrophobic tracer for labelling reconstituted high-density lipoproteins (rHDL) for radioimaging. *Nanoscale*, 11(2), 541–551. <https://doi.org/10.1039/c8nr07484d>
- Iversen, T. G., Skotland, T., & Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6(2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.02.003>
- Jain, K. (2003). Nanodiagnosics : application of nanotechnology in molecular diagnostic. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2, 153–161.
- Jiménez-Mancilla, N. P., Aranda-Lara, L., Morales-Ávila, E., Camacho-López, M. A., Ocampo-García, B. E., Torres-García, E., Estrada-Guadarrama, J. A., Santos-Cuevas, C. L., & Isaac-Olivé, K. (2021). Electron transfer reactions in rhodamine: Potential use in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 113131. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113131>
- Jonas, A. (1986). Reconstitution of high-density lipoproteins. In *Methods in Enzymology* (Vol. 128, Issue C, pp. 553–582). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)28092-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)28092-1)

- Kalka, K., Merk, H., & Mukhtar, H. (2000). Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(3), 389–413.
[https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(00\)90209-3](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(00)90209-3)
- Kamkaew, A., Cheng, L., Goel, S., Valdovinos, H. F., Barnhart, T. E., Liu, Z., & Cai, W. (2016). Cerenkov Radiation Induced Photodynamic Therapy Using Chlorin e6-Loaded Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(40), 26630–26637. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10255>
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), 749–759.
<https://doi.org/10.1038/nri1703>
- Kavadiya, S., & Biswas, P. (2019). Design of Cerenkov radiation–assisted photoactivation of TiO₂ nanoparticles and reactive oxygen species generation for cancer treatment. *Journal of Nuclear Medicine*, 60(5), 702–709.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.118.215608>
- Kessel, D. (2017). Subcellular Targeting as a Determinant of the Efficacy of Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 93(2), 609–612.
<https://doi.org/10.1111/php.12692>
- Klier, P. E. Z., Martin, J. G., & Miller, E. W. (2021). Imaging Reversible Mitochondrial Membrane Potential Dynamics with a Masked Rhodamine Voltage Reporter. *Journal of the American Chemical Society*, 143(11), 4095–4099.
<https://doi.org/10.1021/jacs.0c13110>
- Kornmueller, K., Vidakovic, I., & Prassl, R. (2019). Artificial high density lipoprotein nanoparticles in cardiovascular research. *Molecules*, 24(15).
<https://doi.org/10.3390/molecules24152829>
- Kotagiri, N., Sudlow, G. P., Akers, W. J., & Achilefu, S. (2015). Breaking the depth dependency of phototherapy with Cerenkov radiation and low-radiance-responsive nanophotosensitizers. *Nature Nanotechnology*, 10(4), 370–379.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2015.17>
- Kuai, R., Li, D., Chen, Y. E., Moon, J. J., & Schwendeman, A. (2016). High-Density Lipoproteins: Nature’s Multifunctional Nanoparticles. *ACS Nano*, 10(3), 3015–3041.

<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07522>

- Kumar, R. (2019). Lipid-Based Nanoparticles for Drug-Delivery Systems. In *Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 249–284). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814033-8.00008-4>
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzińska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *106*(June), 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Li, D., Fawaz, M. V., Morin, E. E., Ming, R., Sviridov, D., Tang, J., Ackermann, R., Olsen, K., Remaley, A. T., & Schwendeman, A. (2018). Effect of Synthetic High Density Lipoproteins Modification with Polyethylene Glycol on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Molecular Pharmaceutics*, *15*(1), 83–96. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00734>
- Li, J., Wang, J., Li, M., Yin, L., Li, X. A., & Zhang, T. G. (2016). Up-regulated expression of scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) is associated with malignant behaviors and poor prognosis of breast cancer. *Pathology Research and Practice*, *212*(6), 555–559. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.03.011>
- Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*, *9*(2), 106–118. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>
- Liu, C., Zhou, L., Wei, F., Li, L., Zhao, S., Gong, P., Cai, L., & Wong, K. M. C. (2019). Versatile Strategy to Generate a Rhodamine Triplet State as Mitochondria-Targeting Visible-Light Photosensitizers for Efficient Photodynamic Therapy [Research-article]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *11*(9), 8797–8806. <https://doi.org/10.1021/acscami.8b20224>
- Lucky, S. S., Soo, K. C., & Zhang, Y. (2015). Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical Reviews*, *115*(4), 1990–2042. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>
- Ma, X., Song, Q., & Gao, X. (2018). Reconstituted high-density lipoproteins: novel biomimetic nanocarriers for drug delivery. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 8, Issue 1, pp. 51–63). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.11.006>

- Mak, N. K., & Lung, M. L. (2014). PDT-Induced Apoptosis. In *Encyclopedia of Cancer* (Issue Iii, pp. 1–4). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27841-9_7145-3
- Malam, Y., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.004>
- Mandalà, M., Serck-Hanssen, G., Martino, G., & Helle, K. B. (1999). The fluorescent cationic dye rhodamine 6G as a probe for membrane potential in bovine aortic endothelial cells. *Analytical Biochemistry*, 274(1), 1–6. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4253>
- Massey, J. B., & Pownall, H. J. (2008). Cholesterol is a determinant of the structures of discoidal high density lipoproteins formed by the solubilization of phospholipid membranes by apolipoprotein A-I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(5), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.03.003>
- Master, A., Livingston, M., & Sen Gupta, A. (2013). Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges. *Journal of Controlled Release*, 168(1), 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.02.020>
- Mayor, S., & Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 603–612. <https://doi.org/10.1038/nrm2216>
- McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8), 517–533. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>
- Mehanna, M., Motawaa, A., & Samaha, M. (2012). Pharmaceutical particulate carriers: Lipid - Based carriers. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 2(1), 10–22.
- Meyer, J., Graf, G., & Van der Westhuyzen, D. (2013). New developments in selective cholesteryl ester uptake. *Current Opinion in Lipidology*, 24(5), 386–392. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283638042>

- Mooberry, L. K., Sabnis, N. A., Panchoo, M., Nagarajan, B., & Lacko, A. G. (2016). Targeting the SR-B1 receptor as a gateway for cancer therapy and imaging. *Frontiers in Pharmacology*, 7(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00466>
- Moor, A. C. E., Ortel, B., & Hasan, T. (2003). Mechanisms of photodynamic therapy. In *Photodynamic Therapy* (Vol. 23, Issue 1, pp. 19–58). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847551658-00019>
- Morlière, P., Santus, R., Bazin, M., Kohen, E., Carillet, V., Bon, F., Rainasse, J., & Dubertret, L. (1990). Is Rhodamine 123 a Photosensitizer? *Photochemistry and Photobiology*, 52(4), 703–710. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1990.tb08670.x>
- Murschhauser, A., Röttgermann, P. J. F., Woschée, D., Ober, M. F., Yan, Y., Dawson, K. A., & Rädler, J. O. (2019). A high-throughput microscopy method for single-cell analysis of event-time correlations in nanoparticle-induced cell death. *Communications Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0282-0>
- Ng, K. K., Lovell, J. F., & Zheng, G. (2011). Lipoprotein-inspired nanoparticles for cancer theranostics. *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 1105–1113. <https://doi.org/10.1021/ar200017e>
- Ogawa, K., & Kobuke, Y. (2008). Recent Advances in Two-Photon Photodynamic Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/187152008783961860>
- Oh, N., & Park, J. H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9(SUPPL.1), 51–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>
- OMS. (2020). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. In *Geneva: World Health Organization*; https://doi.org/10.1007/978-3-662-11496-4_24
- Ormond, A. B., & Freeman, H. S. (2013). Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 6(3), 817–840. <https://doi.org/10.3390/ma6030817>
- Pan, G., Øie, S., & Lu, R. (2004). Biological Protein Nanostructures and Targeted Drug Delivery. In D. R. Lu & S. Øie (Eds.), *Cellular Drug Delivery* (Vol. 53, Issue 9, pp.

218–225). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-745-1>

Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H.-S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

Pedersbæk, D., Kræmer, M. K., Kempen, P. J., Ashley, J., Braesch-Andersen, S., Andresen, T. L., & Simonsen, J. B. (2019). The Composition of Reconstituted High-Density Lipoproteins (rHDL) Dictates the Degree of rHDL Cargo- and Size-Remodeling via Direct Interactions with Endogenous Lipoproteins [Research-article]. *Bioconjugate Chemistry*, 30(10), 2634–2646. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00552>

Pittmans, R. C., Glass, C. K., Atkinsons, D., & Smalls, D. M. (1987). Synthetic High Density Lipoprotein Particles. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(6), 2435–2442.

Plata, A. (2019). *Preparacion y caracterizacion de lipoproteinas de alta densidad como transportadores de rodamina para terapia fotodinamica* [Universidad Autónoma del Estado de Mexico]. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/105207?show=full>

Prabhakar, U., Maeda, H., K. Jain, R., Sevick-Muraca, E. M., Zamboni, W., Farokhzad, O. C., Barry, S. T., Gabizon, A., Grodzinski, P., & Blakey, D. C. (2013). Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Research*, 73(8), 2412–2417. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4561>

Rader, D. J., & Rader, D. J. (2006). Molecular regulation of HDL metabolism and function : implications for novel therapies Find the latest version : Science in medicine Molecular regulation of HDL metabolism and function : implications for novel therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3090–3100. <https://doi.org/10.1172/JCI30163.3090>

Ran, C., Zhang, Z., Hooker, J., & Moore, A. (2012). In vivo photoactivation without “light”: Use of cherenkov radiation to overcome the penetration limit of light. *Molecular*

Imaging and Biology, 14(2), 156–162. <https://doi.org/10.1007/s11307-011-0489-z>

- Raut, S., Mooberry, L., Sabnis, N., Garud, A., Dossou, A. S., & Lacko, A. (2018). Reconstituted HDL: Drug delivery platform for overcoming biological barriers to cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 9(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01154>
- Reichardt, C., & Welton, T. (2011). *Solvents and solvent effect in organic chemistry* (4th ed.). Wiley & Sons.
- Rizvi, S. A. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>
- Roblero Bartolón, G. V., Ramón Gallegos, E., Massieu, W., Manuel, S., Zacatenco, D., Gustavo, A., Madero, C. P., & 07738, D. F. (2015). Uso de nanopartículas en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy) contra el cáncer Gaceta médica de México artículo de revisión. *Gaceta Medica de Mexico*, 151, 1–6. www.anmm.org.mx
- Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., & González-Méndez, I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química*, 27(4), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>
- Rosenblatt, E., & Eduardo, Z. (2017). Radiotherapy in cancer care: facing the global challenge. In IAEA. International Atomic Energy Agency.
- Rui, M., Xin, Y., Li, R., Ge, Y., Feng, C., & Xu, X. (2017). Targeted Biomimetic Nanoparticles for Synergistic Combination Chemotherapy of Paclitaxel and Doxorubicin. *Molecular Pharmaceutics*, 14(1), 107–123. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00732>
- Sabnis, N., Nair, M., Israel, M., McConathy, W. J., & Lacko, A. G. (2012). Enhanced solubility and functionality of valrubicin (AD-32) against cancer cells upon encapsulation into biocompatible nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7(1), 975–983. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28029>
- Sahay, G., Alakhova, D. Y., & Kabanov, A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. In

Journal of Controlled Release (Vol. 145, Issue 3, pp. 182–195). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>

Salatin, S., & Yari Khosroushahi, A. (2017). Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(9), 1668–1686. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13110>

Sánchez, P. (2017). *Papel de ABCA1 en el contenido de colesterol de membrana y en el transporte de glucosa mediada por GLUT4 en fibras musculares de ratones adultos* [Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/145392>

Schörghofer, D., Kinslechner, K., Preitschopf, A., Schütz, B., Röhrli, C., Hengstschläger, M., Stangl, H., & Mikula, M. (2015). The HDL receptor SR-BI is associated with human prostate cancer progression and plays a possible role in establishing androgen independence. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0087-z>

Segrest, J. P., Jones, M. K., Klom, A. E., Sheldahl, C. J., Hellinger, M., De Loof, H., & Harvey, S. C. (1999). A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 31755–31758. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31755>

Shaffer, T. M., Pratt, E. C., & Grimm, J. (2017). Utilizing the power of Cerenkov light with nanotechnology. *Nature Nanotechnology*, 12(2), 106–117. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.301>

Shahzad, M. M. K., Mangala, L. S., Han, H. D., Lu, C., Bottsford-Miller, J., Nishimura, M., Mora, E. M., Lee, J.-W., Stone, R. L., Pecot, C. V., Thanapparasr, D., Roh, J.-W., Gaur, P., Nair, M. P., Park, Y.-Y., Sabnis, N., Deavers, M. T., Lee, J.-S., Ellis, L. M., ... Sood, A. K. (2011). Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 13(4), 309–319. <https://doi.org/10.1593/neo.101372>

Shea, C. R., Chen, N., Wimberly, J., & Hasan, T. (1989). Rhodamine Dyes as Potential Agents for Photochemotherapy of Cancer in Human Bladder Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 49(14), 3961–3965.

Sibata, C. H., Colussi, V. C., Oleinick, N. L., & Kinsella, T. J. (2000). Photodynamic

- therapy: A new concept in medical treatment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(8), 869–880. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000800002>
- Silva, R. A. G. D., Huang, R., Morris, J., Fang, J., Gracheva, E. O., Ren, G., Kontush, A., Jerome, W. G., Rye, K. A., & Davidson, W. S. (2008). Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12176–12181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803626105>
- Sivasubramanian, M., Chuang, Y. C., & Lo, L. W. (2019). Evolution of nanoparticle-mediated photodynamic therapy: From superficial to deep-seated cancers. *Molecules*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030520>
- Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R., & Such, G. K. (2019). The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 30(2), 263–272. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732>
- Song, Q., Peng, M., Chu, Y., & Huang, S. (2017). Techniques for detecting chromosomal aberrations in Myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*, 8(37), 62716–62729. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17698>
- Sordillo, L. A., Pu, Y., Pratavieira, S., Budansky, Y., & Alfano, R. R. (2014). Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows. *Journal of Biomedical Optics*, 19(5), 056004. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.5.056004>
- Soriano -Castell, D. (2016). Rac1 y Calmodulina regulan la dinámica de membrana durante la endocitosis independiente de Clatrina [Universidad de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/398892>
- Star, W. M. (1990). Light delivery and light dosimetry for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*, 5(2), 107–113. <https://doi.org/10.1007/BF02031371>
- Sun, C. L., Li, J., Wang, X. Z., Shen, R., Liu, S., Jiang, J. Q., Li, T., Song, Q. W., Liao, Q., Fu, H. B., Yao, J. N., & Zhang, H. L. (2019). Rational Design of Organic Probes for Turn-On Two-Photon Excited Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy. *Chem*, 5(3), 600–616. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.12.001>

- Torrelló, M., Viscasillas, A., & Del Pozo, A. (2002). Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *Offarm*, 21(9), 188–190.
- Traugher, C. A., Opoku, E., Brubaker, G., Major, J., Lu, H., Lorkowski, S. W., Neumann, C., Hardaway, A., Chung, Y.-M., Gulshan, K., Sharifi, N., Brown, J. M., & Smith, J. (2020). SR-B1 uptake of HDL promotes prostate cancer proliferation and tumor progression. *BioRxiv*, 20. <https://doi.org/10.1101/2020.02.24.963454>
- Ulrich E., S. (2014). Photodynamic Therapy. In M. H. Abdel-Kader (Ed.), *Photodynamic therapy from theory to application*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39629-8>
- Vamsi, V., & Perumal, O. (2016). Nanosystems for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In Y. Pathak & D. Thassu (Eds.), *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization* (p. 416). CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9781420078053>
- van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H., Oliveira, S., & Robinson, D. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, 9(12), 19. <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>
- Vargas, P., Hurtado, R., & Villalobos, J. (2013). Esplenomegalia. *Rev.Fac.Med. (Mex.)*, 56(2), 37–45. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422013000600005
- Villafuerte Robles, L., García F., B., Garzón S., M. D. L., Hernández L., A., & Vázquez R., M. L. (2008). Solid lipid nanoparticles | Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 39(1), 38–52.
- Wainwright, M. (2010). *Photosensitisers in biomedicine*. Wiley-Blackwell.
- Wang, C., Zhao, T., Li, Y., Huang, G., White, M. A., & Gao, J. (2017). Investigation of endosome and lysosome biology by ultra pH-sensitive nanoprobe. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 113, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.08.014>
- Wang, Y., Wang, C., Ding, Y., Li, J., Li, M., Liang, X., Zhou, J., & Wang, W. (2016). Biomimetic HDL nanoparticle mediated tumor targeted delivery of indocyanine green for enhanced photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.037>

- Weng, W., & Breslow, J. L. (1996). Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(25), 14788–14794.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14788>
- Williams, D. L., De La Llera-Moya, M., Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Connelly, M. A., Azharrt, S., Anantharamaiah, G. M., & Phillips, M. C. (2000). Binding and cross-linking studies show that scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic α -helix as a recognition motif. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(25), 18897–18904.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M002411200>
- Wong, I. Y., Bhatia, S. N., & Toner, M. (2013). Nanotechnology: Emerging tools for biology and medicine. *Genes and Development*, *27*(22), 2397–2408.
<https://doi.org/10.1101/gad.226837.113>
- Yang, Y., Chawla, A., Zhang, J., Esa, A., Jang, H. L., & Khademhosseini, A. (2019). Applications of Nanotechnology for Regenerative Medicine; Healing Tissues at the Nanoscale. In *Principles of Regenerative Medicine* (pp. 485–504). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809880-6.00029-1>
- Yoon, I., Li, J. Z., & Shim, Y. K. (2013). Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*, *46*(1), 7–23.
<https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.7>
- Yuan, B., Wu, C., Wang, X., Wang, D., Liu, H., Guo, L., Li, X. A., Han, J., & Feng, H. (2016). High scavenger receptor class B type I expression is related to tumor aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Tumor Biology*, *37*(3), 3581–3588. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4141-4>
- Zanella, D., Bossi, E., Gornati, R., Faria, N., Powell, J., & Bernardini, G. (2019). The direct permeation of nanoparticles through the plasma membrane transiently modifies its properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1861*(10), 182997.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.019>

- Zhang, R., Qin, X., Kong, F., Chen, P., & Pan, G. (2019). Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane. *Drug Delivery*, 26(1), 328–342. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1582730>
- Zhang, Z., Cao, W., Jin, H., Lovell, J. F., Yang, M., Ding, L., Chen, J., Corbin, I., Luo, Q., & Zheng, G. (2009). Biomimetic nanocarrier for direct cytosolic drug delivery. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(48), 9171–9175. <https://doi.org/10.1002/anie.200903112>
- Zhou, L., Li, C., Gao, L., & Wang, A. (2015). High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 4015–4021. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3930>
- Zhu, T. C., & Finlay, J. C. (2008). The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics*, 35(7), 3127–3136. <https://doi.org/10.1118/1.2937440>
- Zinger, O., Zhao, G., Schwartz, Z., Simpson, J., Wieland, M., Landolt, D., & Boyan, B. (2005). Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials*, 26(14), 1837–1847. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.035>