



Universidad Autónoma del Estado de México



Facultad de Medicina

MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA

**Lipoproteínas de baja densidad miméticas como sistema de transporte de
Valrubicina/siRNA para terapia combinada**

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN FÍSICA MÉDICA

Presenta

HANSEL TORRES VELÁZQUEZ

Comité de tutores

Dra. en Q. Keila Isaac Olivé

Dra. en C. S. Liliana Aranda Lara

Dra. en C. Q. Rosa Maydelid Trujillo Nolasco

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 2025.

Tabla de contenidos

(i) Resumen	4
(ii) Summary	5
(iii) Abreviaturas	6
(iv) Índice de figuras	8
(v) Índice de tablas	9
1. Introducción	10
2. Marco Teórico	13
2.1 La célula	13
2.2 El ribosoma	14
2.3 El ARN y la síntesis de proteínas	15
2.4 ARN de interferencia pequeño (siRNA)	15
2.5 Lipoproteínas de baja densidad	16
2.6 Proteína rad51	17
2.7 Valrubicina (AD-32)	18
2.8 Terapia fotodinámica (PDT)	19
2.9 Especies reactivas de oxígeno (ROS)	21
3. Antecedentes	21
3.1 Terapia combinada con agentes fotodinámicos	21
3.1.1 Agentes quimioterapéuticos con propiedades fotodinámicas	24
3.2 Lipoproteínas naturales y sintéticas como sistema de transporte	24
4. Planteamiento del problema	28
5. Pregunta de investigación	28
6. Hipótesis	28
7. Objetivos	29
7.1 Objetivo general	29
7.2 Objetivos específicos y metas	29
8. Justificación	30
8.1 Importancia social	31
8.2 Aportación científica	31
9 Metodología	32
I. Determinación de la densidad de potencia (pp) segura para irradiación en tejido blando	32
II. Evaluación de la producción de $O_2^{\cdot-}$ y $^1O_2$	33

III. Preparación de las lipoproteínas miméticas de baja densidad mLDL.	34
IV. Espectroscopía UV-Vis	35
V. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)	36
VI. Eficiencia de atrapamiento (EE) de siRNA-Cy3 en las mLDL-cy	36
VII. Eficiencia de atrapamiento (EE) de VAL en las mLDL-vs	36
VIII. Ensayo de captación y reconocimiento específico de las mLDL-cy	37
IX. Análisis de biodistribución de las mLDL-cy por fluorescencia	38
X. Evaluación de la eficacia terapéutica de las mLDL	39
10. Resultados	40
I. Determinación de densidad de potencia (pp) segura para irradiación en tejido blando	40
II. Evaluación de la producción de $O_2^{\cdot-}$ y $^1O_2$	41
III. Preparación de las lipoproteínas miméticas de baja densidad mLDL	44
III-a. Espectroscopía UV-Vis	44
IV. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)	47
V. Eficiencia de atrapamiento (EE) de siRNA-Cy3 y VAL en las mLDL	48
VI. Ensayo de captación y reconocimiento específico de las mLDL-cy	49
VII. Análisis de biodistribución de las mLDL-cy mediante fluorescencia	50
VIII. Evaluación de la eficacia terapéutica de las mLDL	52
11. Discusión	53
12. Conclusiones	60
13. Referencias	61

RESUMEN

El objetivo de las terapias combinadas es mejorar la eficacia del tratamiento mediante la combinación de dos o más enfoques terapéuticos complementarios. La valrubicina (VAL) es un agente quimioterapéutico con características potenciales para su uso como fotosensibilizador. Por otro lado, el siRNA-RAD51 se utiliza para silenciar genes relacionados con la reparación del ADN. El siRNA sintético es inestable, por lo que requiere protección para su aplicación in vivo. Las lipoproteínas de baja densidad miméticas (mLDL) son lipoproteínas sintéticas que imitan el comportamiento de las lipoproteínas naturales gracias al péptido mimético de la apolipoproteína B-100. Las células cancerosas pueden reconocerlas debido a la alta expresión del receptor LDL. Estas propiedades permiten su uso como nanotransportadores para agentes oncológicos. En este estudio, se investigó el potencial del VAL como agente fotosensibilizador evaluando la producción de ROS ($^1\text{O}_2$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$) durante la irradiación con 532 nm utilizando ABMA y DCPIP como indicadores. A continuación, se prepararon mLDL cargadas con VAL y siRNA-RAD51 (mLDL-vs) con un tamaño de 400 nm y una eficiencia de encapsulación del 85 % para el siRNA y del 55 % para la valrubicina. El nanosistema mostró in vitro, en células T47D, la liberación de agentes oncoterapéuticos, especificidad y mayores efectos citotóxicos en comparación con el mismo cargado solo con VAL o siRNA-RAD51. La biodistribución del mLDL-vs mostró una mayor acumulación en los tumores y el hígado. Al comparar los efectos terapéuticos del mLDL-vs con los mostrados por el mLDL-siRNA-RAD51 (mLDL-si) y el mLDL(VAL) administrados a ratones con tumores implantados con células T47D, se observó una mayor reducción de la actividad metabólica tumoral con el sistema combinado que con sus partes individuales. Estos resultados muestran la posible aplicación del efecto citotóxico combinado de VAL y siRNA-RAD51. Esta terapia dual basada en quimioterapia y terapia génica podría mejorarse aún más con terapia fotodinámica, utilizando VAL como fotosensibilizador. Además, los resultados muestran que es posible utilizar mLDL como sistema de transporte simultáneo para agentes terapéuticos, preservando al mismo tiempo su especificidad y biocinética.

SUMMARY

The purpose of combination therapies is to enhance treatment efficacy by combining two or more complementary therapeutic approaches. Valrubicin (VAL) is a chemotherapeutic agent with potential characteristics for use as a photosensitizer. On the other hand, siRNA-RAD51 is used to silence genes related to DNA repair. Synthetic siRNA is unstable, so it requires protection for in vivo application. Mimetic low-density lipoproteins (mLDL) are synthetic lipoproteins that mimic the behavior of natural lipoproteins thanks to the apolipoprotein B-100 mimetic peptide. These can be recognized by cancer cells due to the high expression of the LDL receptor. These properties allow them to be used as nanocarriers for oncotherapeutic agents. In this study, the potential of VAL as a photosensitizing agent was investigated by evaluating the production of ROS ($^1\text{O}_2$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$) during irradiation with 532 nm using ABMA and DCPIP as indicators. Next, mLDL loaded with VAL and siRNA-RAD51 (mLDL-vs) were prepared with a size of 400 nm and an entrapment efficiency of 85% for siRNA and 55% for Valrubicin. The nanosystem showed in vitro, in T47D cells, release of oncotherapeutic agents, specificity, and increased cytotoxic effects compared to the same loaded only with VAL or siRNA-RAD51. The biodistribution of mLDL-vs showed greater accumulation in tumors and the liver. When comparing the therapeutic effects of mLDL-vs with those shown by mLDL-siRNA-RAD51 (mLDL-si) and mLDL(VAL) administered to mice with tumors implanted with T47D cells, there was a greater reduction in tumor metabolic activity with the combined system than with its individual parts. These results show the potential application of the combined cytotoxic effect of VAL and siRNA-RAD51. This dual therapy based on chemotherapy and gene therapy could be further enhanced with photodynamic therapy, using VAL as a photosensitizer. In addition, the results show that it is possible to use mLDLs as a simultaneous transport system for therapeutic agents while preserving their specificity and biokinetics.

ABREVIATURAS

ABMA	Ácido antraceniil-bis(metileno)dimalónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ago2	Proteína Argonauta
Apo	Apolipoproteínas
ApoB-100	Apolipoproteína B-100
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ARN_m	Ácido ribonucleico ribosómico
ARN_m	Ácido ribonucleico transcripcional
AuNP	Nanopartículas de oro
Bchl-BOA	Bisoleato de bacterioclorina e6
CR	Radiación Cerenkov
DCPIP	Diclorofenolindofenol
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DPSSL	Láser de estado sólido bombeado por diodo
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble hebra
EC	Éster de colesterol (colesteril palmitato)
EE	Eficiencia de atrapamiento
GBM	Glioblastoma multiforme
Gem	Gemcitabina
HepG2	Hepatoblastoma humano G2
ILs	Inmunoliposomas
IP	Intraperitoneal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad

LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
mLDL	Lipoproteína de baja densidad mimética
mLDL-Cy	Lipoproteína de baja densidad mimética cargada con valrubicina y siRNA-Cy3
mLDL-si	Lipoproteína de baja densidad mimética cargada con siRNA-Cy3
mLDL-r	Lipoproteína de baja densidad mimética cargada con siRNA-RAD51
mLDL-VAL	Lipoproteína de baja densidad mimética cargada con valrubicina
mLDL-vs	Lipoproteína de baja densidad mimética cargada con valrubicina y siRNA-RAD51
MTX	Metotrexato
NP	Nanopartícula
PC	Fosfatidilcolina
PDI	Índice de polidispersión
PDT	Terapia fotodinámica
PS	Fotosensibilizador
PTT	Terapia fototérmica
PTX	Paclitaxel
rHDL	Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (sintéticas)
RISC	Complejo Silenciador Inductor de RNA
rLDL	Lipoproteínas de baja densidad reconstituidas (sintéticas)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
siMcl-1	Células mieloides tipo 1
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
UV-Vis	Ultravioleta – visible
VAL	Valrubicina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Estructura y ubicación del ADN (18)	12
Fig. 2 Estructura de las LDL(21)	14
Fig. 3 Estructura química de la VAL (28)	16
Fig. 4 Espectro de excitación y emisión de la valrubicina. Izquierda, valrubicina libre con 10% de DMSO. Derecha, valrubicina encapsulada en rHDL.	17
Fig. 5 Penetración en tejido de diferentes longitudes de onda del haz (33)	18
Fig. 6 Geometría utilizada para medir las variaciones de temperatura con irradiación láser de 532 nm.	29
Fig. 7 Geometría utilizada para la irradiación de soluciones con láser de 532 nm.	30
Fig. 8 Variaciones de temperatura durante irradiación con láser de 532 nm con diferentes densidades de potencia.	37
Fig. 9 Espectros de absorbancia de VAL irradiada con $p_p = 214.5 \text{ W/cm}^2$.	38
Fig. 10 Espectros de absorbancia de VAL irradiada con $p_p = 114.4 \text{ W/cm}^2$.	38
Fig. 11 Espectros de absorbancia de VAL irradiada con $p_p = 28.6 \text{ W/cm}^2$.	38
Fig. 12 Espectros de absorción de ABMA-VAL al ser irradiadas diferentes tiempos con diferentes densidades de potencias p_p : (a) 214.5 W/cm^2 , (b) 114.4 W/cm^2 , (c) 24.5 W/cm^2	39
Fig. 13 a) Espectro de absorción de solución de DCPIP:VAL irradiada con láser de 532 nm	40
Fig. 14 Espectros de absorción de los componentes individuales de las mLDL: (a) VAL, b) siRNA RAD-51, c) Péptido mimético de la ApoB-100 sitio B (Péptido Apo B-100) y d) siRNA-Cy3	42
Fig. 15 Espectros de absorción de mLDL cargadas con Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-si), Ca/siRNA-RAD51 (mLDL-r) y Val + Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-cy).	43
Fig. 16 Histogramas de frecuencia del tamaño de partícula obtenidos mediante DLS con ajuste de curva gaussiana ordenadas por PDI. a) mLDL vacías, b) LDL sin el péptido mimético, c) mLDL-vs, d) mLDL-si.	44-45
Fig. 17 Curva de calibración para VAL, con base en el valor de la banda de absorción a 500 nm.	46
Fig. 18 Curva de calibración para Cy3.	46
Fig. 19 Imágenes de microscopía de fluorescencia de células 4T1 post-tratamiento in vitro, con mLDL-cy con y sin bloqueo de R-LDL.	47
Fig. 20 Imágenes de fluorescencia de órganos murinos a diferentes tiempos tras el tratamiento con a) mLDL-VAL y b) mLDL-si.	48
Fig. 21 Concentración de mLDL-cy para cada órgano en modelo murino, analizado con base en su intensidad de fluorescencia y normalizado por μg de masa.	48
Fig. 22 Resultados de gammagrafía de tumores con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-BOMBESINA/RGD, para evaluación de angiogénesis y carcinogénesis.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Terapias con siRNA	24
Tabla 2. Tamaño de partícula y PDI de las mLDL, mLDL-si y mLDL-vs	44
Tabla 3. Tamaño de los tumores (mm) inducidos con células T47D al inicio del tratamiento, y masa final (g) de los mismos luego de ser tratados con mLDL-r, mLDL-VAL y mLDL-vs	16

1. INTRODUCCIÓN

La valrubicina, N-trifluoroacetiladriamicina-14-valerato (VAL), también conocida como AD-32, es una antraciclina que actúa como inhibidor de la topoisomerasa II con actividad antineoplásica. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la incorporación de nucleótidos en los ácidos nucleicos, lo que provoca daño cromosómico y conduce al arresto del ciclo celular en la fase G2 (1). Sin embargo, su carácter hidrofóbico ha limitado su aplicación clínica (2). VAL es un análogo de la doxorubicina (DOX), otro agente quimioterapéutico muy utilizado que, además de interferir con la síntesis de ADN y ARN, ha demostrado generar especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando se expone a irradiación láser de 450 nm y a radiación Cherenkov emitida por ^{18}F -FDG (3,4). A partir de este antecedente se plantea la hipótesis de que la VAL también podría inducir la formación de ROS tras la irradiación con luz, lo que le conferiría potencial efecto fotosensibilizador (PS) en terapia fotodinámica (PDT) y abriría la posibilidad de una aplicación terapéutica adicional, más allá de su acción citotóxica convencional (1,5).

Las ROS son formas muy reactivas del oxígeno que cuando se acumulan en exceso y superan la capacidad del sistema celular antioxidante, generan estrés oxidativo y daño a estructuras como el ADN y las proteínas que conducen a la muerte celular (6,7). En la PDT la generación de ROS ocurre a través de reacciones de transferencia cuando se irradia un PS con una longitud de onda adecuada en presencia de oxígeno (6-8). Comúnmente se utiliza un láser de emisión continua, ya que permite un control más preciso de la dosis de luz y mantiene la activación constante del PS, aspecto fundamental dado que la eficacia clínica de un PS depende de la absorción eficiente de luz y de la posterior formación de ROS mediante reacciones de transferencia (7-9).

Las reacciones de transferencia por las cuales se producen ROS son de dos tipos. En la reacción tipo I, el PS transfiere electrones o átomos de hidrógeno a moléculas vecinas, generando radicales libres como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que a su vez puede dar lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y

radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). Estas ROS inducen daño a membranas, proteínas y ADN, activando señales que conducen a procesos de apoptosis o necrosis celular (7-9). En la reacción tipo II, el PS excitado transfiere directamente energía al oxígeno molecular circundante, generando oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el cual tiene propiedades fuertemente oxidantes, alta reactividad química con proteínas, lípidos, ARN y ADN provocando daño oxidativo localizado y apoptosis. La contribución de cada tipo de reacción depende de factores como la concentración de oxígeno, la naturaleza del PS y las condiciones de irradiación. La mayoría de los estudios señalan que el mecanismo predominante y más relevante es el tipo II (8-10).

Una manera de detectar la generación de ROS es mediante compuestos redox específicos (11), como el DCPIP (2,6-Diclorofenolindofenol) y ABMA (ácido 9,10-antracenediil-bis(metilen) dimalónico). Estos reactivos permiten identificar de manera selectiva el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $^1\text{O}_2$ respectivamente, mediante el análisis de sus bandas características de absorción (12,13), lo que permite distinguir entre ambos mecanismos de reacción.

En los últimos años, el uso de ácido ribonucleico de interferencia pequeño (siRNA, por sus siglas en inglés) ha constituido una alternativa eficaz de tratamiento para cáncer. El mecanismo de acción del siRNA se basa en su capacidad para incorporarse al complejo proteico denominado Complejo Silenciador Inductor de RNA (RISC, por sus siglas en inglés), que permite la escisión catalítica de una secuencia específica de ARN mensajero (ARNm) bloqueando la capacidad de la célula para sintetizar las proteínas codificadas por el ARNm degradado (14). Este mecanismo es especialmente útil cuando la secuencia degradada codifica la síntesis de proteínas que promueven proliferación celular o inhiben la apoptosis en células tumorales. No obstante, el uso terapéutico de siRNA se ve limitado por su rápida degradación *in vivo* debido a nucleasas presentes en el organismo. Una estrategia para superar esta limitación consiste en emplear lipoproteínas (Lp) como las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) las cuales ofrecen una opción para proteger y transportar eficientemente el siRNA mejorando su estabilidad y eficacia terapéutica (15).

Se han desarrollado péptidos miméticos que simulan la función de las apolipoproteínas (Apo) que forman parte de la estructura de las Lp, ofreciendo nuevas alternativas para diseñar LDL miméticas (mLDL) capaces de ser reconocidas e internalizadas en las células mediante la interacción con el receptor LDL (LDLR), sobreexpresado en varias líneas tumorales (16). Además, estas mLDL presentan características fisicoquímicas que permiten incorporarles fármacos altamente lipofílicos y agentes utilizados en PDT (17).

El objetivo de este proyecto consiste en desarrollar (mLDL) como sistema de transporte de VAL/siRNA para terapia combinada. Se espera que al dirigirse a células que sobreexpresan LDLR, el siRNA reduzca la capacidad de reparación celular, la VAL ejerza su efecto quimioterapéutico y, al irradiarse con un láser continuo de 532 nm, se generen ROS, potenciando su citotoxicidad por un efecto combinado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La célula

La célula es la unidad estructural, funcional y biológica fundamental de los seres vivos. Su organización básica comprende una **membrana plasmática** semipermeable, que regula el intercambio de sustancias con el medio externo; un **citoplasma** que constituye la mayor parte del volumen celular y alberga las estructuras internas; así **como material genético**, responsable de regular funciones celulares. Las células se clasifican en dos tipos: 1) procariotas, caracterizadas por la ausencia de un núcleo definido, el material genético se encuentra disperso en el citoplasma, carecen de organelos membranosos y su organización es más simple. 2) eucariotas, con mayor grado de complejidad estructural. Su diámetro es de 10 - 100 μm , el material genético está contenido dentro de un núcleo delimitado por una envoltura nuclear (Fig. 1) lo que permite una regulación más precisa de los procesos genéticos. Además, poseen organelos membranosos especializados, como mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, que permiten optimizar las funciones celulares (18).

Dentro de todos los componentes celulares, el material genético ocupa un papel central, ya que contiene la información para el desarrollo, funcionamiento y reproducción de la célula. Esta información está codificada en el ácido desoxirribonucleico (ADN), una macromolécula de doble hélice compuesta por dos cadenas complementarias. La ruptura de estas hebras puede comprometer la integridad genética de la célula, y sus consecuencias varían según la naturaleza del daño: una ruptura de cadena simple puede ser reparada con relativa facilidad, mientras que una ruptura de doble cadena representa un desafío mayor y puede derivar en mutaciones, disfunción o incluso la muerte celular. Por otro lado, la reparación incorrecta de las rupturas de doble cadena puede causar delección o reacomodo de cromosomas que causan cáncer y otros trastornos genéticos (14).

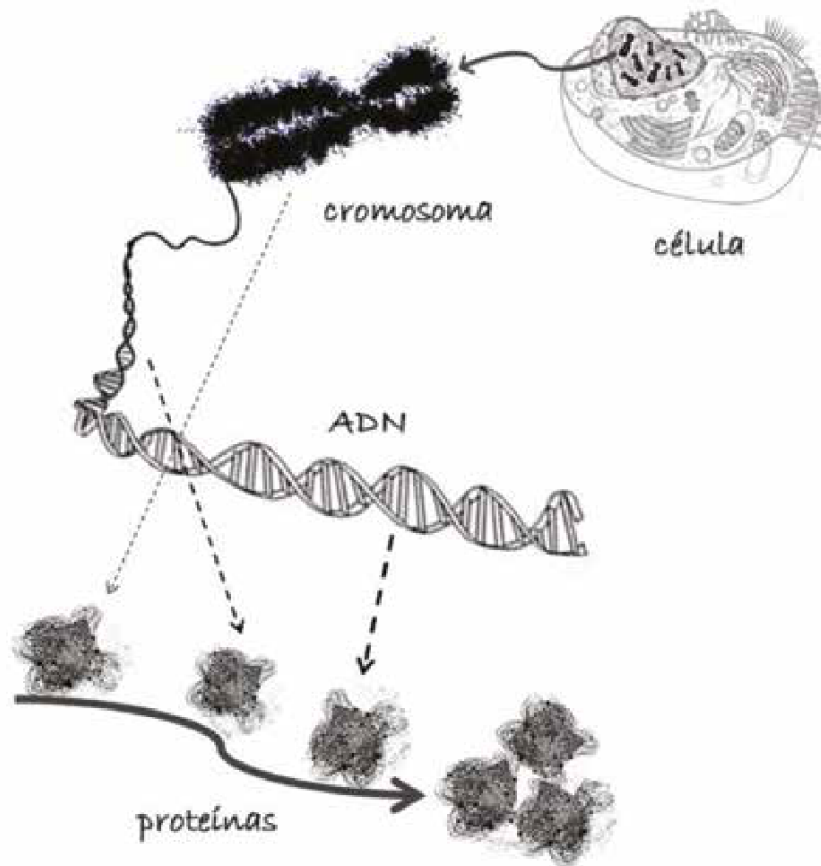


Fig. 1 Estructura y ubicación del ADN (18).

2.2 El ribosoma

Los ribosomas son organelos celulares donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas. Estos complejos macromoleculares están formados por proteínas y ARN ribosómico (ARNr) el cual, además de servir como andamiaje para las proteínas ribosómicas, también tiene función catalítica en la formación de enlaces peptídicos durante la traducción. La abundancia de ribosomas en una célula refleja la importancia de la síntesis proteica para su funcionamiento: en células de mamíferos con división constante, se estima que existen alrededor de 10 millones de ribosomas por célula. La producción y regulación de los ribosomas están muy relacionadas con el crecimiento y ciclo celular, así como con su capacidad de responder al estrés. Por ello, cambios en la cantidad o funcionamiento de los

ribosomas pueden afectar procesos normales del organismo y también favorecer el crecimiento de células tumorales o modificar la respuesta al tratamiento (18).

2.3 El ARN y la síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas involucra la acción coordinada de tres tipos de ARN: mensajero (ARNm), de transferencia (ARNt) y ribosómico (ARNr), así como diversas proteínas. El ARNm actúa como molde, transportando desde el núcleo la información genética codificada en tripletes de bases denominados codones, cada uno de los cuales corresponde a un aminoácido específico. En el ribosoma, el ARNt reconoce los codones del ARNm mediante su anticodón complementario, facilitando la incorporación del aminoácido correspondiente a la cadena proteica en crecimiento. Por su parte, el ARNr cumple un doble papel: actúa como andamiaje estructural para el ensamblaje del ribosoma y tiene una función catalítica en la formación de los enlaces peptídicos durante la traducción, asegurando la correcta elongación de la proteína (18).

2.4 ARN de interferencia pequeño (siRNA)

Las células cuentan con un mecanismo de defensa, que se manifiesta a través del ARN pequeño de interferencia (siRNA). El proceso comienza con la presencia de ARN de doble cadena (dsRNA), que puede ser de origen viral o introducido de forma experimental (por ejemplo, siRNA sintético). Este dsRNA se reconoce por la enzima Dicer, una endonucleasa tipo RNasa III, que lo degrada en fragmentos cortos de entre 21 y 23 nucleótidos con extremos 3' sobresalientes (14,19).

Estos fragmentos, llamados siRNAs maduros, se incorporan en un complejo multiproteico llamado RISC. La incorporación del siRNA al RISC se lleva a cabo en varias etapas: 1) *Selección de la hebra guía*, basada en la estabilidad de los extremos del dúplex. La hebra con el extremo menos estable se selecciona como hebra guía y permanece unida a un complejo denominado pre-RISC, mientras que la otra hebra (hebra pasajera) se degrada y se libera. 2) *Activación del RISC*: Una

vez incorporada la hebra guía al pre-RISC, este se vuelve funcional. El componente principal del complejo resultante (complejo RISC) en mamíferos es la proteína Argonata (Ago2). 3) *Reconocimiento del ARNm*: La hebra guía dirige al RISC hacia el ARNm complementario mediante apareamiento de bases y Ago2 corta el ARNm en el sitio de emparejamiento. 4) *Degradación del ARNm*: Tras el corte, el ARNm es degradado rápidamente por exonucleasas, impidiendo su traducción en el ribosoma y, finalmente se silencia la expresión del gen correspondiente (14,19). Este mecanismo es la base de la terapia génica.

Aunque los siRNA sintéticos representan una alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento de diversas patologías, su aplicación clínica se ve limitada por su inestabilidad en condiciones fisiológicas. Los siRNA se degradan fácilmente por nucleasas presentes en el entorno extracelular y se eliminan del organismo a través de filtración glomerular lo que reduce su biodisponibilidad y eficacia terapéutica (19). Para superar estas barreras, se han desarrollado sistemas de liberación y direccionamiento específicos que protegen al siRNA de la degradación y aseguran su entrega eficiente a las células diana (15). En este contexto, las Lp constituyen una opción altamente atractiva.

2.5 Lipoproteínas de baja densidad

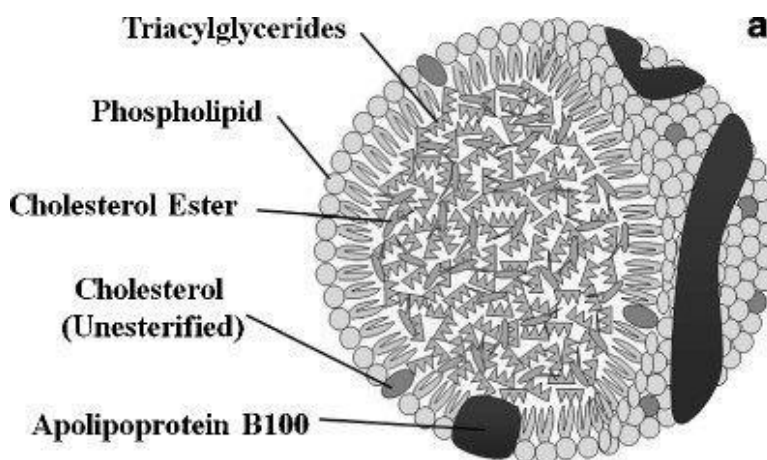


Fig. 2 Estructura de las LDL (20).

Las lipoproteínas de baja densidad ($1.019 \text{ g/ml} < \rho < 1.063 \text{ g/ml}$) son partículas esféricas encargadas de transportar colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos. Están compuestas por un núcleo hidrofóbico, rodeado por una capa superficial anfipática (Fig. 2). En el núcleo se encuentran ésteres de colesterol y, en menor proporción, triglicéridos. La capa superficial está formada por fosfolípidos, colesterol libre y una única molécula de apolipoproteína B-100 (Apo B-100). Esta apolipoproteína (Apo) recubre casi toda la superficie de la LDL y cumple funciones estructurales, además de ser esencial para el reconocimiento por parte de sus receptores específicos en la membrana celular. La Apo B-100 se sintetiza primordialmente en el hígado, cuyas células tienen mayor expresión del LDLR que las restantes células del organismo (21,22).

Los receptores LDLR están anclados en la membrana plasmática en regiones especializadas denominadas “*clathrin-coated pits*”. Estas regiones participan activamente en procesos de endocitosis mediada por receptores. Cuando la LDL se asocia a su receptor se forma un complejo LDL-receptor (LDL-LDLR) que se internaliza en la célula mediante una vesícula endocítica. Posteriormente, esta vesícula pierde su cubierta de clatrina, se fusiona con los endosomas y la LDL se dirige hacia los lisosomas. En los lisosomas, las proteínas y lípidos que conforman la LDL se degradan por enzimas hidrolíticas liberando aminoácidos y colesterol no esterificado (20,21).

Las lipoproteínas de baja densidad miméticas (mLDL) son LDL sintéticas que se preparan con péptidos de Apo B-100 en lugar de la Apo B-100 completa. Tienen un comportamiento en el cuerpo humano idéntico a las LDL naturales ya que los péptidos miméticos imitan el comportamiento biológico de las Apo (16).

2.6 Proteína Rad51

La proteína RAD51 es una enzima clave en la reparación del ADN, se ha demostrado que impide la replicación de una cadena de ADN que ya ha sido replicada (23), es decir impide la síntesis de proteínas innecesarias. Su sobreexpresión en ciertos tumores confiere quimio y radioresistencia, pues

aumenta la capacidad de las células malignas para reparar el daño inducido. Debido a su papel en la reparación del ADN, RAD51 ha emergido como una proteína clave en el desarrollo de nuevas estrategias de terapia génica.

2.7 Valrubicina (AD-32)

La valrubicina (VAL: N-trifluoroacetiladriamicina-14-valerato), es un análogo estructural de la doxorrubicina (DOX) con mayores efectos citotóxicos y menos cardiotoxicidad. Su mecanismo de acción consiste en interferir la actividad de la ADN topoisomerasa II y la reparación del ADN. Al impedir la reparación de la doble cadena del ADN, la VAL provoca acumulación de roturas que desencadenan una cascada de señales que conducen a la detención del ciclo celular (fase G2) y a la apoptosis (1,24,25).

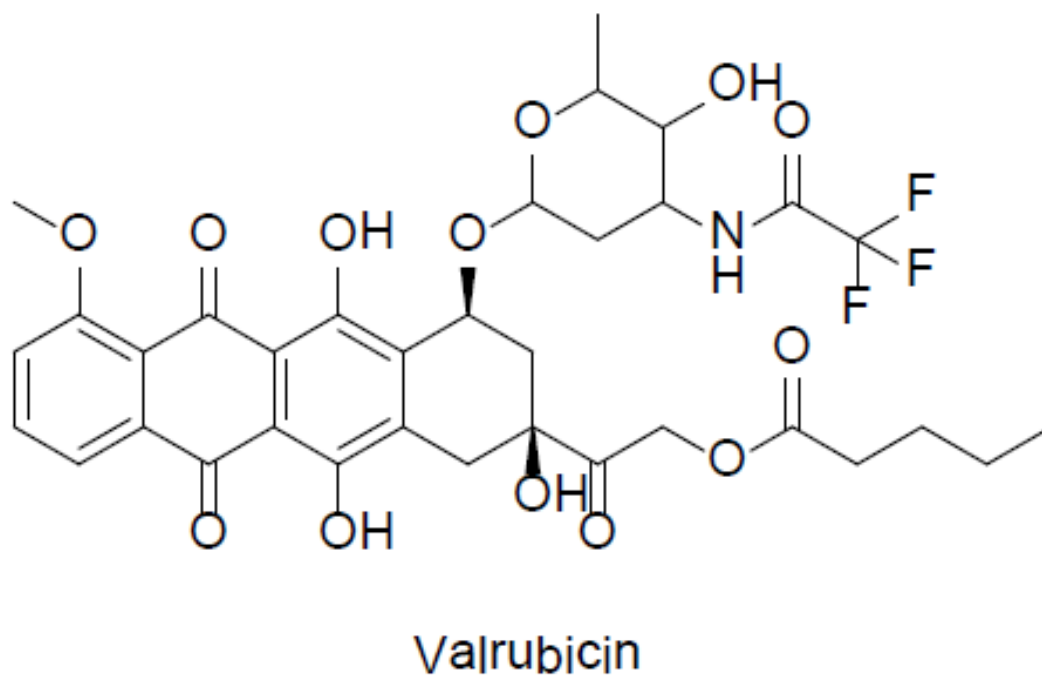


Fig. 3. Estructura química de la VAL (26).

Debido a su estructura química, rica en anillos aromáticos conjugados (Fig.3), VAL es capaz de emitir fluorescencia según los espectros que se muestran en la Fig.4. Estas propiedades fluorescentes representan una ventaja que puede ser explotada para aplicaciones clínicas (27). Sin embargo, el rendimiento cuántico de

fluorescencia de la VAL es muy bajo por lo que su uso como PDT no es conveniente. Se ha demostrado que si se encapsula en nanosistemas lipídicos este rendimiento puede incrementarse (25,27).

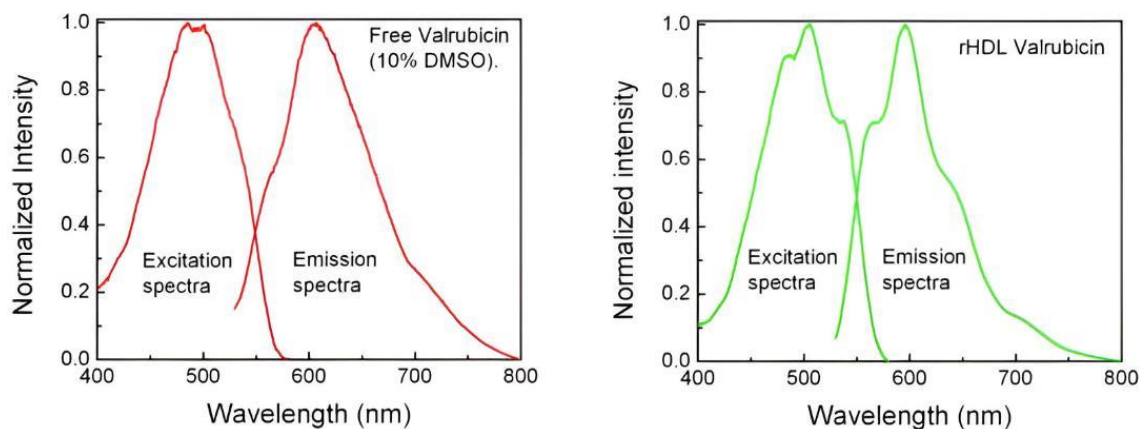


Fig. 4. Espectro de excitación y emisión de la VAL. Izquierda: VAL libre con 10% de DMSO. Derecha: VAL encapsulada en rHDL (27).

2.8 Terapia fotodinámica (PDT)

La PDT es una forma de terapia no invasiva utilizada en el tratamiento de diversas patologías incluido el cáncer. Consiste en la activación de un componente fotosensible conocido como fotosensibilizador (PS, por sus siglas en inglés) utilizando longitudes de onda (λ) específicas usualmente en el espectro visible o del infrarrojo cercano. La activación de un PS tiene un efecto citotóxico en las células mediante dos vías: 1) aumento de temperatura y 2) producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este último depende del oxígeno presente en las células blanco.

En los últimos años, el uso de nanopartículas (NP) como sistemas de transporte para PS ha cobrado relevancia como estrategia para aumentar su concentración en los tejidos diana y reducir su acumulación en tejidos sanos, lo que se traduce en mayor eficacia terapéutica y menor toxicidad sistémica (Kwiatkowski et al, 2018). Entre los fármacos que han sido estudiados como posibles PS se encuentran la doxorubicina (DOX) y el metotrexato (MTX), los cuales han demostrado la capacidad de generar $^1O_2$ cuando se exponen a irradiación con

láser de 450 nm o a radiación Cherenkov generada por ^{18}F lúor. Este fenómeno amplía su utilidad dentro del campo de la PDT (3,28,29).

En este contexto, la elección de la λ que se utilice en PDT es un factor determinante, ya que influye directamente en la profundidad de penetración en el tejido y en la eficiencia de activación del PS. Aunque comúnmente se han empleado λ cercanas a los 450 nm, también se han explorado otras opciones, como la luz verde de 532 nm, la cual presenta una mayor capacidad de penetración en tejidos blandos, alcanzando profundidades de aproximadamente 3 mm (30) (Ver Fig. 5).

Cuando una parte del tumor se encuentra dentro del rango de penetración del haz luminoso, no solo esa región manifiesta los efectos fotodinámicos, también se ha observado un fenómeno secundario conocido como “efecto espectador”, mediante el cual las células tumorales que han sido destruidas por la PDT pueden inducir la muerte celular en células vecinas. Este efecto ha sido previamente documentado en terapias con agentes quimioterapéuticos como la DOX lo que sugiere un posible mecanismo complementario que amplía la eficacia terapéutica de la PDT (31).

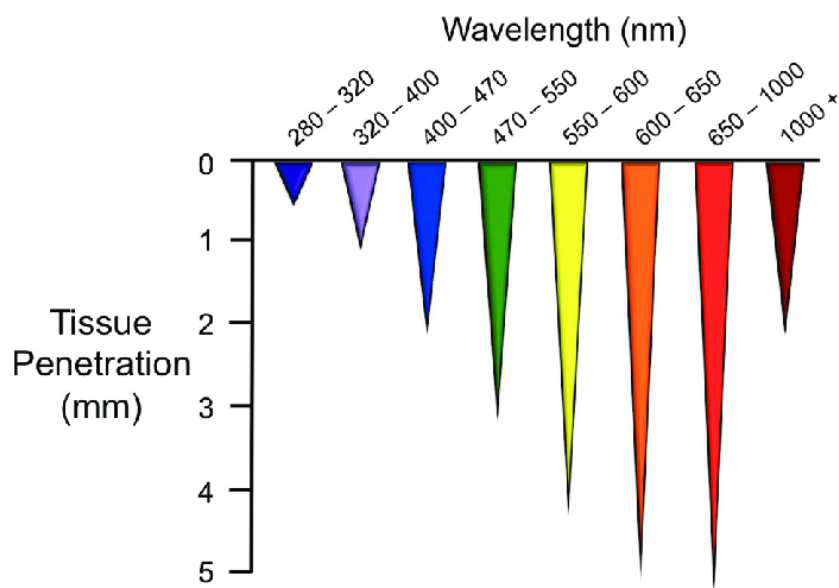


Fig. 5. Penetración en tejido de diferentes longitudes de onda del haz (31).

2.9 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Durante un tratamiento con PDT se producen reacciones fotodinámicas por dos mecanismos, denominados Tipo I y Tipo II.

Tipo I: En un estado triplete excitado T^1 , un PS puede transferir un protón (H^+) o un electrón (e^-) a moléculas vecinas. Esta transferencia entre el PS y el tejido cancerígeno (sustrato) causa la formación de radicales libres y aniones que atacan otras moléculas o se recombinan para dar lugar a una gran cantidad de productos. En un ambiente aeróbico se forma el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que genera otras ROS (H_2O_2 , $HO_2^{\cdot}$ y $HO^{\cdot}$). Esta cascada de reacciones conduce al estrés oxidativo y a la destrucción de células cancerígenas (8,9).

El DCPIP (2,6-Diclorofenolindofenol) es un indicador redox utilizado para detectar $O_2^{\cdot-}$ de forma indirecta. Cambia de color cuando se reduce debido a esta especie lo que se traduce en el cambio de sus bandas de absorción, específicamente a 600 nm (32).

Tipo II: Cuando el PS pasa del estado base al estado triplete excitado (T^1) transfiere energía directamente a una molécula de oxígeno en estado energético base y se forma el denominado oxígeno singlete ($^1O_2$) con propiedades fuertemente oxidantes, alta reactividad química y que interacciona primordialmente con biomoléculas como proteínas, lípidos, ARN y ADN (8-10).

El ABMA ácido (9,10-antracenediil-bis(metileno) dimalónico es un indicador que se ha utilizado con éxito para detectar $^1O_2$, en soluciones acuosas mediante el análisis de sus bandas distintivas de absorción, principalmente las de 400 y 380 nm (12). Tiene la ventaja de su sensibilidad exclusiva al $^1O_2$ (33).

3. ANTECEDENTES

3.1 Terapia combinada con agentes fotodinámicos

La terapia contra el cáncer ha evolucionado con la finalidad de lograr tratamientos más efectivos, entre los que destacan las terapias combinadas (29,34).

La PDT, por ejemplo, es una modalidad terapéutica mínimamente invasiva que implica la administración localizada de PS capaz de acumularse, preferentemente, en tejidos tumorales. Posteriormente, el PS se activa con luz de una λ específica, lo que induce la generación de ROS, en particular $^1\text{O}_2$. Las ROS que se forman provocan daño citotóxico, promoviendo la destrucción de células tumorales sin afectar significativamente al tejido sano circundante (7,29,31).

Los PS pueden ser incorporados en sistemas de liberación controlada, como nanopartículas (NP) ya sea de forma individual o en combinación con fármacos citotóxicos. Esta estrategia no solo mejora el transporte, la biodisponibilidad y la liberación dirigida de compuestos con propiedades fisicoquímicas desfavorables, sino que también permite el desarrollo de terapias multimodales. Al integrar un PS con otros agentes terapéuticos, se combinan distintos mecanismos de acción, como la generación de ROS inducidas por la activación del PS, y la citotoxicidad directa de los fármacos citotóxicos, lo que potencia la eficacia antitumoral. Además, la superficie de las NP puede ser funcionalizada con grupos específicos para facilitar el direccionamiento hacia células diana, aumentando la especificidad del tratamiento y reduciendo efectos adversos (7,29,30).

El verde de indocianina, por ejemplo, ha demostrado una notable eficacia terapéutica cuando se transporta mediante NP poliméricas hacia células de adenocarcinoma mamario (MCF-7) y carcinoma hepatocelular (HepG2). Tras su acumulación en el tejido tumoral, y posterior irradiación con un láser de 807 nm, se ha observado una significativa citotoxicidad celular. Esta respuesta se atribuye a la acción del verde de indocianina, ya que a dicha λ no se han reportado efectos fototóxicos atribuibles a la irradiación (31).

Algunos enfoques terapéuticos, como la terapia fototérmica (PTT), permiten inducir efectos fotodinámicos adicionales a través de la irradiación del agente fototérmico utilizado. Un ejemplo son las nanopartículas de oro (AuNP), comúnmente empleadas en PTT por su capacidad para convertir energía lumínica en calor. Sin embargo, se ha demostrado que, al ser irradiadas con un láser de 980 nm a dosis ultra bajas ($\sim 150 \text{ mW/cm}^2$), estas nanopartículas también inducen

generación de $^1\text{O}_2$, un mecanismo característico de la PDT, lo que resulta en un incremento significativo de la citotoxicidad (34). Este hallazgo sugiere que bajo ciertas condiciones las AuNP pueden comportarse como agentes PS, lo que le confiere propiedades tanto fototérmicas como fotodinámicas. Esta terapia combinada no está limitada a agentes fototérmicos, ya que se ha encontrado evidencia de agentes quimioterapéuticos que presentan propiedades fotodinámicas cuando se irradian con ciertas longitudes de onda.

En 2019, Wang et al., (35) desarrollaron un sistema de NP para la administración conjunta de siRNA de células mieloides tipo 1 (siMcl-1) y gemcitabina (Gem) dirigido contra el cáncer pancreático. El sistema se basó en un liposoma catiónico en el que se introdujo en el núcleo el siMcl-1 en forma de complejo electrostático con protamina, mientras que la Gem fue encapsulada en la bicapa de fosfolípidos. Este sistema demostró eficacia en la coadministración de Gem y siMcl-1 a células tumorales, suprimiendo de manera significativa la expresión de siMcl-1 tanto *in vitro* (en líneas celulares de cáncer pancreático PANC-1 y BxPC-3) como *in vivo*. Mostró también una notable inhibición de la metástasis en un modelo ortotópico de cáncer pancreático.

Por otro lado, Butowska et al, (36) desarrollaron un sistema de NP lipídicas para la administración conjunta de doxorubicina (DOX) y siRNA. La DOX se conjugó a la superficie de las NP previamente cargadas con siRNA, optimizando así su administración simultánea. Los resultados experimentales demostraron una inhibición eficiente de la expresión del gen Bcl-2, junto con una entrega eficaz de DOX, que produjo una significativa inhibición del crecimiento tumoral en un modelo murino de linfoma (36).

Asimismo, Zhang et al, (37) diseñaron un sistema de NP compuesto por un lípido tripeptídico (L), laurato de sacarosa (S) y folato-PEG2000-DSPE (FA), con el objetivo de coadministrar paclitaxel (PTX) y siRNA. Las NP obtenidas mostraron una alta eficiencia de encapsulación de PTX (97 %), notable capacidad de retención de siRNA, mejor absorción celular y una liberación sostenida y controlada de los agentes terapéuticos. Este sistema manifestó una significativa

inhibición de la expresión de VEGF, así como inducción de apoptosis en células cancerosas, demostrando marcada actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (37).

3.1.1 Agentes quimioterapéuticos con propiedades fotodinámicas

Algunos agentes quimioterapéuticos han demostrado poseer propiedades como PS. Por ejemplo, la DOX, al ser irradiada con un láser de 450 nm o mediante la radiación Cherenkov generada por ^{18}F -FDG, es capaz de producir oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y, en menor proporción, radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Al administrar a células de cáncer de mama T47D, los resultados indican que el efecto citotóxico de la DOX aumenta ya que el efecto quimioterapéutico actúa en sinergia con el efecto fotodinámico (3).

En un estudio realizado por Gallaga-González et al, (28) se evaluó el uso de metotrexato (MTX) y paclitaxel (PTX) en combinación con la radiación Cherenkov (CR) generada por ^{18}F -FDG para inducir la producción de ROS. Los resultados demostraron que PTX no es un candidato adecuado para su aplicación en PDT ya que no generó ROS. En contraste, el MTX produjo oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), lo que resultó en una reducción significativa de la viabilidad celular en células T47D tras la fotoactivación. Además, se confirmó que la producción intracelular de ROS constituye el principal mecanismo de citotoxicidad en este contexto (28).

Estos hallazgos respaldan el potencial terapéutico de la fotoactivación mediada por CR y destacan la sinergia entre la quimioterapia y la PDT combinadas.

3.2 Lipoproteínas naturales y sintéticas como sistema de transporte

Las NP de naturaleza lipídica han demostrado ser capaces de transportar y liberar simultáneamente agentes terapéuticos, como el PTX y la herceptina. Un sistema basado en NP de lípidos sólidos (SLN) fue caracterizado fisicoquímicamente, mostrando una eficiencia de encapsulación del $98.6 \pm 0.5\%$ para PTX y del $98.9 \pm 0.6\%$ para herceptina. El sistema, dirigido a células de cáncer de mama, demostró

capacidad para liberar el contenido de ambos productos en el citoplasma de las células (38). Un estudio similar se realizó por Nikanjam et al., (39) donde emplearon LDL sintéticas como sistema de entrega de PTX-oleato en células de glioblastoma multiforme (GBM). Las LDL se conjugaron con un péptido bifuncional de 29 aminoácidos que mimetiza la Apo B-100, lo que les permitió interactuar específicamente con células que sobreexpresan el LDLR, presentes en el GBM. (39). En un estudio realizado por Wojtanik and Liscum (40) se evaluó la cinética de NP de LDL a través de la membrana celular, así como su capacidad para ingresar al citoplasma. Esto permitió observar que las células son capaces de internalizar y metabolizar eficientemente estas NP (40).

El trabajo de Marrota et. al., (41) es especialmente relevante para este proyecto pues ha utilizado LDL sintéticas (rLDL) para transportar agentes fotodinámicos como bisoleato de bacterioclorina e6 (Bchl-BOA) y colestril oleato de bacterioclorina e6 (Bchl-CE) con el objetivo de evaluar su efecto en el crecimiento tumoral de injertos de hepatoblastoma humano G2 (HepG₂). Los resultados demostraron que un agente fotodinámico puede ser activado eficazmente tras su transporte hacia células tumorales y su liberación en el citoplasma, validando el potencial terapéutico de este enfoque (41). Zhu et. al., (42). prepararon y caracterizaron NP de N-succinil quitosano acopladas a siRNA/LDL con DOX. La eficiencia de carga de siRNA en las NP fue de 71.06 % $\pm$ 1.42 %. Demostraron que la LDL protege al siRNA de la degradación, y los análisis *in situ* en modelos de tumores hepáticos mostraron una captación de estas LDL cargadas, marcadas con Cy7 (42).

Georgievski et. al, (25) utilizaron VAL disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) para cargar inmunoliposomas (ILs) resultando NP lipídicas cargadas con VAL y anticuerpos específicos (Val-ILs) con un tamaño promedio de 115 nm en las cuales se logró enlazar aproximadamente un 50% de los anticuerpos utilizados. Estas NP mostraron una eficiencia de atrapamiento de VAL de aproximadamente 58% (25).

Como se muestra en la Tabla 1 en la actualidad existen fármacos en el mercado que utilizan siRNA, bien modificado para aumentar su estabilidad, bien unido a diferentes tipos de NP (43).

Tabla 1 Terapias con siRNA

Fármaco	Marca comercial	Condición clínica	Sistema de transporte	Vía de administración	Año de aprobación	Referencia
Patisiran	Onpattro®	Amiloidosis hereditaria por transtiretina (hATTR) con polineuropatía	Nanopartículas lipídicas (LNP) y PEG que recubren el siRNA protegiéndolo en entornos ácidos	Intravenosa	2018 (FDA, EUA)	(44)
Givosiran	Givlaari®	Porfiria hepática aguda	Conjugado GalNAc en los cuales se modifica el siRNA a nivel molecular para aumentar su estabilidad	Subcutánea	2019 (FDA, EUA)	(45)
Lumasiran	Oxlumo®	Hiperoxaluria primaria tipo 1 (PH1)	Conjugado GalNAc	Subcutánea	2020 (UE/EEUU)	(46)
Inclisiran	Leqvio®	Hipercolesterolemia primaria y dislipidemia mixta	Conjugado GalNAc	Subcutánea	2020 (UE), 2021 (FDA, EUA)	(47)
Vutrisiran	Amvuttra®	Amiloidosis hATTR con polineuropatía (2025 también cardiopatía ATTR)	Conjugado GalNAc (ESC-GalNAc)	Subcutánea	2022 (EUA/UE)	(45)
Nedosiran	Rivfloza™	Hiperoxaluria primaria tipo 1 (PH1) en niños y adultos	Conjugado GalNAc	Subcutánea	2023 (FDA, EUA)	(48)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DOX es un agente quimioterapéutico que ha demostrado tener propiedades fotodinámicas. La VAL, cuya estructura y propiedades químicas son similares a la DOX, podría presentar también potencial fotodinámico. Por otro lado, el siRNA ha mostrado ser eficiente al inhibir la capacidad de reparación celular, aunque requiere de un sistema de transporte que lo proteja de la degradación en el organismo. La combinación VAL/siRNA podría potenciar el efecto terapéutico al combinar la acción quimioterapéutica, el efecto fotodinámico y el silenciamiento génico. Para lograr esta estrategia combinada es necesario desarrollar un sistema de entrega capaz de transportar ambos agentes de manera eficiente y específica hacia las células tumorales. Las lipoproteínas de baja densidad miméticas (mLDL) son una opción viable debido a su capacidad de reconocimiento específico por los LDLR sobreexpresados en diversos tipos de células cancerosas y a su capacidad de transporte de moléculas y agentes fotodinámicos de diferente naturaleza.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La VAL tendrá efecto fotodinámico, es decir será capaz de producir especies reactivas de oxígeno al irradiarse con un haz de 532 nm?

¿Pueden las mLDL cargadas con VAL/siRNA inducir de manera simultánea un efecto quimiofotodinámico y de silenciamiento génico con mayor eficiencia que las terapias individuales en células tumorales que sobreexpresan el receptor LDL?

6. HIPÓTESIS

Dado que, el siRNA inhibe el crecimiento celular y la VAL ejerce efecto quimioterapéutico y podría generar efecto fotodinámico al irradiarse con un haz de 532 nm, la encapsulación de ambos agentes en lipoproteínas de baja densidad

miméticas (mLDL) permitiría su transporte selectivo hacia células que sobreexpresan los LDLR. Se espera que este nanosistema combinado (silenciamiento génico, quimioterapia y fotodinámica) genere una mayor muerte celular y reduzca la supervivencia celular en comparación con la administración individual de los agentes.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Desarrollar un nanosistema basado en LDL miméticas (mLDL) que transporten VAL y siRNA de manera simultánea hasta el interior de células que sobreexpresen LDLR para lograr un efecto terapéutico combinado.

7.2 Objetivos específicos y metas

O.E.1. Determinar la densidad de potencia (p_p) segura de irradiación con láser de 532 nm que no genere daño térmico en tejido blando.

Meta 1.1 Determinación de una geometría útil para medir la temperatura de tejido durante irradiación con láser de 532 nm utilizando un termopar.

Meta 1.2 Determinación de la potencia que permita irradiar el tejido blando sin rebasar 45°C.

O.E.2. Caracterizar la producción de ROS al irradiar la VAL con láser de 532 nm a densidades de potencia de 214.5 W/cm², 114.4 W/cm² y 28.6 W/cm², a diferentes tiempos.

Meta 2.1 Evaluación de la producción de ¹O₂ utilizando ABMA como indicador.

Meta 2.2 Evaluación de la producción de O₂^{-•} usando DCPIP como indicador.

O.E.3. Preparar y caracterizar fisicoquímicamente LDL miméticas vacías (mLDL) utilizando el péptido de Apo B-100 de 15 aminoácidos con secuencia WGRLTRKRGLKLATA, denominado Apo B-sitio B (49) sintetizado a pedido por los laboratorios WatsonBio Sciences. Preparar también mLDL de igual composición que las mLDL vacías pero cargadas con: (i) el complejo Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-si); (ii) VAL (mLDL-VAL); (iii) el complejo Ca/siRNA-RAD51 (mLDL-r); (iv) simultáneamente con VAL y con Ca/siRNA-RAD51 (mLDL(Ca/siRNA-RAD51/VAL)=mLDL-vs y (v) simultáneamente con VAL y siRNA-Cy3 (mLDL(Ca/siRNA-Cy3/ VAL)=mLDL-cy.

Meta 3.1 Preparación de mLDL-cy y mLDL-vs con un tamaño de partícula menor de 500 nm y una eficiencia de atrapamiento de VAL y siRNA mayor al 60%.

Meta 3.2 Evaluación del reconocimiento específico de los LDLR y la transfección de las mLDL-cy mediante fluorescencia.

O.E.4. Evaluar efectos biológicos de las mLDLcy y mLDLvs en modelo murino.

Meta 5.1 Evaluación de la biodistribución de las mLDL-cy en un modelo murino con tumores inducidos con la línea celular 4T1.

Meta 5.2 Evaluación del tamaño del tumor inducido con células T47D en modelos murinos después del tratamiento con mLDL-vs sin irradiación con láser de 532 nm.

8. JUSTIFICACIÓN

Las células de cáncer desarrollan resistencia a diferentes tratamientos existentes. Se pretende minimizar este problema a través de la terapia combinada. El trabajo busca mejorar los resultados clínicos de la quimioterapia con VAL mediante dos vías: 1) utilizarla como un fotosensibilizador (PS) para efectuar PDT y 2) mediante el uso de siRNA para sensibilizar las células e incrementar el daño producido por la VAL.

8.1 Importancia social

El desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas contra el cáncer tiene como objetivo disminuir los efectos adversos en los pacientes y la resistencia al tratamiento. Al hacer más selectivo y eficaz un tratamiento se puede disminuir la duración y la dosis a administrar. Esto mejoraría la calidad de vida de un sector vulnerable de la población como lo son los pacientes con cáncer.

8.2 Aportación científica

Este estudio tiene como objetivo mejorar la eficacia de tratamientos existentes para cáncer, evaluando al mismo tiempo el potencial de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) como vectores de entrega simultánea de siRNA y un agente quimiofotodinámico. La hipótesis plantea que el silenciamiento de genes responsables de la reparación del ADN, combinado con un tratamiento quimioterapéutico debe aumentar la eficacia terapéutica.

La investigación tiene como objetivo desarrollar sistemas de mLDL cargadas con siRNA y VAL dirigidos específicamente a células tumorales que sobreexpresen el receptor LDLR.

9. METODOLOGÍA

I. Determinación de la densidad de potencia (ρ_p) segura para irradiación en tejido blando

Con el objetivo de evaluar la variación de temperatura que induce la irradiación con láser en tejido blando, y establecer parámetros seguros para la PTD, se diseñó un experimento que utiliza una porción *ex vivo* de tejido porcino. Se determinó la ρ_p que permie irradiar el tejido sin incrementar su temperatura por encima de los 45°C durante una exposición continua de 5 min.

Para todas las irradiaciones se utilizó un láser de estado sólido bombeado por diodo (DPSSL) de emisión continua (532 nm), marca Civillaser, acoplado a una fuente de alimentación modelo PSU-H-LED. Se evaluaron tres ρ_p : 214.5 W/cm², 114.4 W/cm² y 28.6 W/cm². El haz de 532 nm se hizo incidir directamente sobre la superficie del tejido de forma perpendicular y con la fuente fija. La medición de la temperatura se llevó a cabo mediante un termopar digital modelo UNI-T UT320A/UT320D, colocado a 1 mm de profundidad en el tejido como se observa en la Fig. 6.

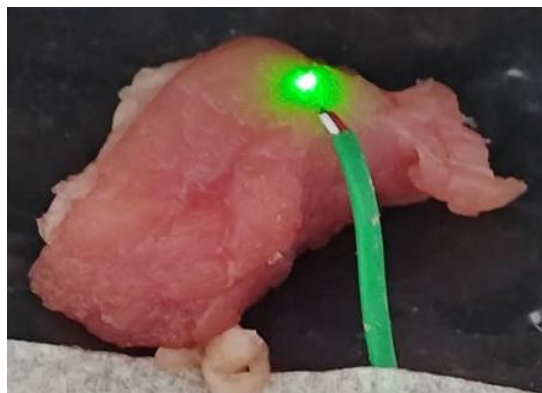


Fig. 6 Geometría utilizada para medir las variaciones de temperatura con irradiación láser de 532 nm.

II. Evaluación de la producción de $O_2^{\cdot-}$ y $^1O_2$

Para evaluar la producción de $O_2^{\cdot-}$ y $^1O_2$ al irradiar la VAL se utilizó un láser de estado sólido bombeado por diodo (DPSSL) de emisión continua de 532 nm, marca CivilLaser, acoplado a una fuente de alimentación modelo PSU-H-LED en presencia de los indicadores ABMA y DCPIP (100 μ M de concentración cada uno). Se prepararon las siguientes soluciones: VAL (1 mL, 11.5 μ M) + ABMA (375 μ L, 100 μ M) + 625 μ L de H_2O y VAL (1 mL, 11.5 μ M) + DCPIP (1 mL, 100 μ M). Las mezclas de VAL+indicador se homogeneizaron en vórtex durante 60 segundos y posteriormente se irradiaron utilizando la geometría mostrada en la Fig. 7.

Las soluciones se irradiaron por 30 min en intervalos de 5 min (6 ciclos) utilizando ρ_p de 214.5 W/cm², 114.4 W/cm² y 28.6 W/cm² para ABMA y para las soluciones de VAL y ABMA+ VAL. Para el DCPIP y la solución DCPIP+ VAL sólo se utilizó la ρ_p de 214.5 W/cm² y se agregó, además, un intervalo adicional de irradiación de 10 min, para confirmar la ausencia de ROS. Con el objetivo de evaluar los cambios en las bandas de absorción que permiten determinar la presencia de ROS, antes del primer ciclo y al finalizar cada irradiación, se midió la absorbancia de las mezclas utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S (Thermo Scientific). Los espectros se graficaron utilizando el software Origin®.



Fig. 7 Geometría utilizada para la irradiación de las soluciones con láser de 532 nm.

III. Preparación de las lipoproteínas miméticas de baja densidad mLDL

a. mLDL vacías.

En un vial se colocaron 234 μL de fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés) a una concentración de 10 mg/mL y 7.5 μL de colesteril palmitato (EC, por sus siglas en inglés) a una concentración de 4 mg/mL, ambos disueltos en cloroformo. La mezcla se homogeneizó en vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, se calentó lentamente en una parrilla hasta evaporar el cloroformo por completo asegurando que solo quedara una delgada película de lípidos adherida al vial y evitando el sobrecalentamiento para no degradar los lípidos. A continuación, se agregaron 60 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 140 μL de una solución de deoxicolato de sodio en agua libre de RNAsas (20 mg/mL). La mezcla se agitó nuevamente en vórtex durante 30 segundos. Seguidamente, se adicionaron 1,150 μL de Buffer Tris (tris (hidroximetil) aminometano), y la solución se sonicó durante 15 minutos. Al inicio de la sonicación se adicionaron por goteo (~ 60 s) 640 μL de péptido mimético de la apolipoproteína B-100 (Apo B sitio B), de 1 mg/mL de concentración disuelto en agua libre de RNAsas. Finalmente, la mezcla se colocó en agitación durante 24 h a 4°C y se purificó mediante diálisis en PBS 1X, durante otras 24 horas a 4°C.

b. mLDL-si y mLDL-r

Para la preparación de las mLDL cargadas con el complejo Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-si) o Ca/siRNA-RAD51 (mLDL-r) se utilizó el procedimiento descrito previamente, con la diferencia de que se adicionaron 1,100 μL de Buffer Tris en lugar de 1,150 μL . Al inicio de la sonicación, se añadieron al vial por goteo (~ 60 s) 50 μL del complejo Ca/siRNA-Cy3 o Ca/siRNA-RAD51, según el caso, y 640 μL del péptido Apo B sitio B disuelto en agua libre de RNAsas (1mg/mL).

c. mLDL-VAL

Se realizó el procedimiento indicado en el inciso **a**, hasta la formación de la película de lípidos. Después de esto, se adicionaron 100 µg de VAL disueltos en 50 µL de DMSO, la mezcla se agitó con vortex durante 5 min. Al finalizar, se continuó con la preparación descrita en **a**, ajustando el volumen de Buffer Tris a 1,100 µL.

d. mLDL-cy y mLDL-vs

Para la preparación de las mLDL cargadas con VAL y siRNA-Cy3 o siRNA-RAD51 en forma de complejos electrostáticos con iones Ca^{2+} (Ca/siRNA-Cy3 y Ca/siRNA-RAD51), se siguió la metodología descrita en el inciso **a** hasta la formación de la capa de lípidos. Posteriormente, se adicionó VAL (100 µg disueltos en 50 µL de DMSO) de acuerdo con el procedimiento descrito en el inciso **c**. A continuación, se agregaron 1,050 µL de Buffer Tris y se sonicó durante 15 minutos. Durante ese tiempo se añadieron por goteo, según lo descrito en el inciso **b**, 50 µL del complejo Ca/siRNA-Cy3 o Ca/siRNA-RAD51 respectivamente y 640 µL del péptido Apo B sitio B disuelto en agua libre de RNasas (1 mg/mL).

Todas las formulaciones de mLDL se ajustaron a un volumen final de 2 mL con Buffer Tris y se cargaron con 1,000 pmoles de siRNA.

IV. Espectroscopía UV-Vis

Los espectros de absorción UV-Vis de los componentes individuales, así como de las formulaciones mLDL-r, mLDL-si, mLDL-VAL y mLDL-cy se adquirieron a temperatura ambiente en el espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S (Thermo Scientific). La medición se efectuó en el rango de 200 a 700 nm empleando cubetas de cuarzo de 3 mL de capacidad. Los espectros del péptido Apo B sitio B y del siRNA-RAD51 se registraron con intervalos de 0.2 nm, mientras que para la VAL se utilizó un intervalo de 2 nm.

V. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)

El tamaño de partícula se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) con el analizador Nanotracs Wave MN4001 (Microtracs). Se midieron 100 µL de las soluciones de mLDL-cy y mLDL-vs en PBS 1X, pH 7.4. Las mediciones se realizaron a longitudes de onda (λ) de 657 nm, temperatura de 20°C, corriente de 15.79 mA, campo eléctrico de 14.35 V/cm y tiempo de muestreo de 128 ms. Con los datos obtenidos se generó un histograma, que se ajustó a una curva Gaussiana mediante el software Origin® lo que permitió obtener el PDI.

VI. Eficiencia de atrapamiento (EE) de siRNA-Cy3 en las mLDL-cy

La eficiencia de atrapamiento del Ca/siRNA-Cy3 en la mLDL-cy se determinó mediante la relación porcentual entre la concentración del Ca/siRNA-Cy3 en la NP y la concentración de Ca/siRNA-Cy3 en la solución inicial (1000 pmoles) usada para la preparación. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$EE_{siRNA}(\%) = \left(\frac{\text{Cantidad de siRNA en mLDL}}{\text{Cantidad de siRNA inicial}} \right) * 100$$

La cantidad de Ca/siRNA-Cy3 dentro de las mLDL-cy se determinó mediante una curva de calibración, elaborada a partir de concentraciones conocidas de siRNA-Cy3 desde 0 a 50 pmol ($R^2 = 0.9737$). La intensidad de fluorescencia del Cy3 se midió en el lector de placas VICTOR Nivo® Multimode Plate Reader, utilizando un filtro de excitación de 530/20 nm y filtro de emisión de 580/20 nm durante 500 ms. Dado que siRNA-RAD51 tiene el mismo comportamiento que siRNA-Cy3, la eficiencia de carga de las mLDL-vs se asumió igual a la encontrada para las mLDL-cy.

VII. Eficiencia de atrapamiento (EE) de VAL en las mLDL-vs

La cantidad de VAL se determinó mediante una curva de calibración elaborada a partir de concentraciones conocidas (0 µg/mL a 166.7 µg/mL) de VAL. Se midió el espectro de absorción utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S

(Thermo Scientific, EE. UU.) en un rango de 300 a 800 nm, con incrementos de 0.5 nm. Los valores de la banda a 500 nm se graficaron mediante el software Origin® y se obtuvo la recta de ajuste.

Una vez conocida la concentración inicial de VAL (100 µg) utilizada en la preparación de las mLDL-vs, se calculó la eficiencia de atrapamiento (%) utilizando la siguiente fórmula:

$$EE_{VAL}(\%) = \left(\frac{\text{Cantidad de VAL en mLDL}}{\text{Cantidad de VAL inicial}} \right) * 100$$

VIII. Ensayo de captación y reconocimiento específico de las mLDL-cy

Para la evaluación cualitativa de la transfección inducida por las mLDL-cy, se sembraron células T47D en una placa de 6 pozos (200,000 células/pozo) y se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, se agregó el equivalente a 100 pmol de las mLDL-cy o de siRNA-Cy3 libre, utilizado como grupo control, y se incubaron por 45 min.

Para evaluar la especificidad de las mLDL-cy hacia los receptores LDLR se realizó un ensayo de bloqueo. Previo a la incubación con mLDL-cy, las células se incubaron con el péptido Apo B sitio B (63.7 µL, equivalente al número de moles contenidos en las mLDL-cy utilizadas) durante 45 minutos. Al concluir el tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron con 600 µL de paraformaldehído al 2 % durante 15 min. Posteriormente, se retiró el paraformaldehído y se hizo un lavado con PBS 1X. Finalmente, se agregaron 50 µL de medio de montaje Vectashield con DAPI para la tinción nuclear y se colocó un cubreobjetos. La transfección cualitativa de siRNA-Cy3 se evaluó con el microscopio de fluorescencia Olympus con el objetivo de 40x.

IX. Análisis de biodistribución de las mLDL-cy por fluorescencia

Para el ensayo de biodistribución, se utilizaron ratones hembra de la cepa Balb-C de 7 a 8 semanas de edad, los cuales se adquirieron en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Morelos. Los ratones se alojaron en el bioterio del Laboratorio de Neuro-Inmuno-Endocrinología de la Facultad de Medicina de la UAEMéx.

La inducción del tumor en los ratones se realizó por inyección subdérmica de la línea celular de cáncer de mama 4T1 (600,000 células) en la clavícula derecha. Los animales se monitorearon diariamente. Después de 2 semanas el tumor fue visible, con un diámetro aproximado de 0.5 cm.

Una vez que se desarrolló el tumor se les administró por vía intravenosa 100 μ L de las mLDL-cy (42.6 pmol siRNA) y se sacrificaron a diferentes tiempos (1.5, 7 y 24 h). Después de sacrificados los animales se extrajeron tanto el tumor como los órganos de interés (hígado, riñones, bazo, corazón, pulmones). Posteriormente, se adquirieron imágenes de fluorescencia en el equipo Bruker in-vivo Xtreme para observar la captación de las mLDL-cy en los diferentes órganos.

Al finalizar esta prueba, el tumor y los órganos se almacenaron en formol al 4 % y se utilizaron para evaluar la distribución del sistema de manera cuantitativa mediante fluorescencia, utilizando el lector de placas VICTOR Nivo® con un filtro de excitación de 530/20 nm y un filtro de emisión de 580/20 nm. Tanto el tumor como los órganos de interés se homogenizaron y se colocaron en una placa de 96 pozos. La intensidad de fluorescencia se midió por triplicado para cada muestra (n=3) y los valores obtenidos se normalizaron en función del peso (mg) del tejido. Finalmente, los datos cuantitativos de biodistribución se graficaron con el software Origin®.

X. Evaluación de la eficacia terapéutica de las mLDL

Para la evaluación de la eficacia terapéutica, se inyectaron células T47D (1×10^6 células) en ratones atímicos ($n=2$) y se mantuvieron en observación hasta la formación del tumor. Una vez que el tumor fue visible se separaron en 4 grupos: control, mLDL-r, mLDL-VAL y mLDL-vs. El tratamiento se ajustó para una dosis acumulada de 95 μg de VAL y 856 pmol de siRNA-RAD51 (según correspondiera) dividida en 3 dosis, las cuales se administraron vía intraperitoneal (IP) los días 5, 7 y 10 a partir de la fecha de detección. El crecimiento del tumor se monitoreó antes de cada administración utilizando un vernier.

Una vez concluido el tratamiento, los ratones se inyectaron con una actividad de 270 μCi del radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-BOMBESINA/RGD, el cual se utiliza para detectar carcinogénesis y angiogénesis mediante imagen molecular (50). Una hora después se sacrificaron y se extrajo el tumor para evaluar la captación del radiofármaco en el equipo Bruker in-vivo Xtreme. Finalmente, se pesaron los tumores para evaluar, de manera cualitativa, la relación entre la captación del radiofármaco y el tratamiento efectuado.

10. RESULTADOS

I. Determinación de densidad de potencia (ρ_p) segura para irradiación en tejido blando

Tras evaluar diferentes ρ_p , se observó que las ρ_p más altas, de 214.5 W/cm^2 y 114.4 W/cm^2 , provocaron un aumento abrupto de la temperatura en el tejido, superando el límite de 45°C en apenas unos segundos de irradiación (Fig. 8). Este comportamiento confirma que estas ρ_p podrían generar daño térmico irreversible en aplicaciones clínicas si no se controlan adecuadamente. En contraste, la ρ_p más baja de 28.6 W/cm^2 , permitió mantener la temperatura del tejido por debajo del límite de seguridad durante 5 minutos de irradiación continua, sin evidenciar un aumento de temperatura que comprometiera la integridad del tejido.

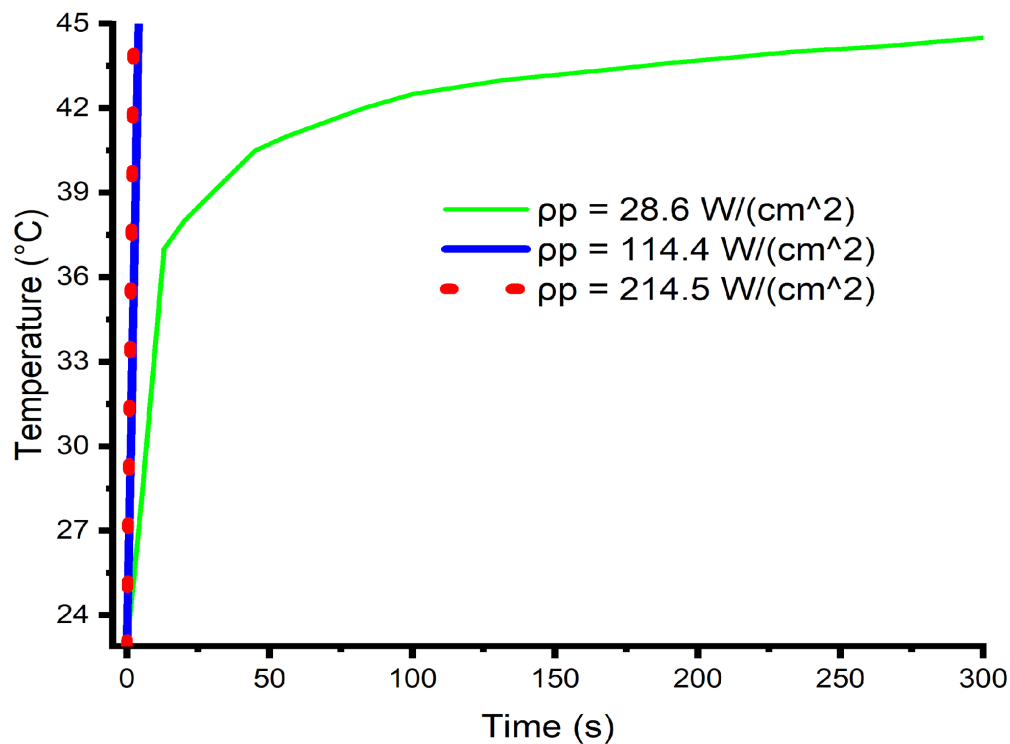


Fig. 8. Variaciones de temperatura durante irradiación con láser de 532 nm con diferentes densidades de potencia ρ_p .

II. Evaluación de la producción de $O_2^{\cdot-}$ y $^1O_2$

Con el fin de evaluar la interacción de la VAL con el láser de 532 nm, esta fue irradiada con diferentes p_p durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. Los espectros obtenidos (Figs. 9-11) muestran que la absorción disminuye en el rango de 425 a 625 nm a medida que se incrementan los tiempos de irradiación. Este comportamiento se observó con las tres p_p utilizadas, lo que indica que la interacción de la VAL con el láser de 532 nm conduce a su fotodegradación, comportamiento típico de los PS.

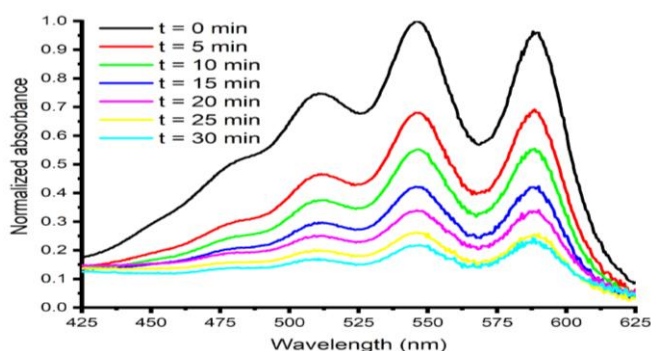


Fig. 9. Espectros de absorción de VAL irradiada con $p_p = 214.5 \text{ W/cm}^2$.

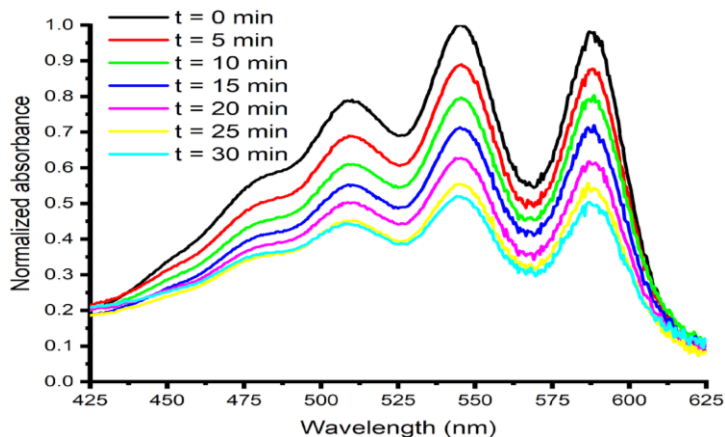


Fig. 10. Espectros de absorción de VAL irradiada con $p_p = 114.4 \text{ W/cm}^2$.

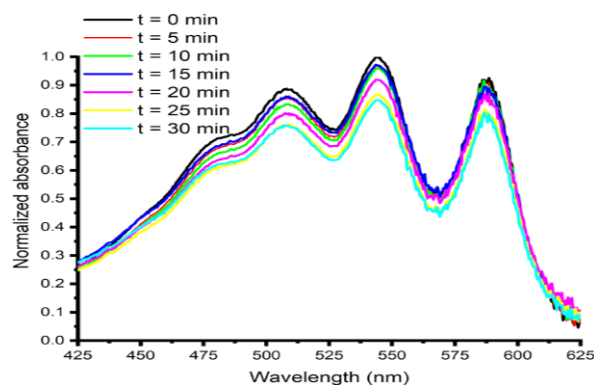
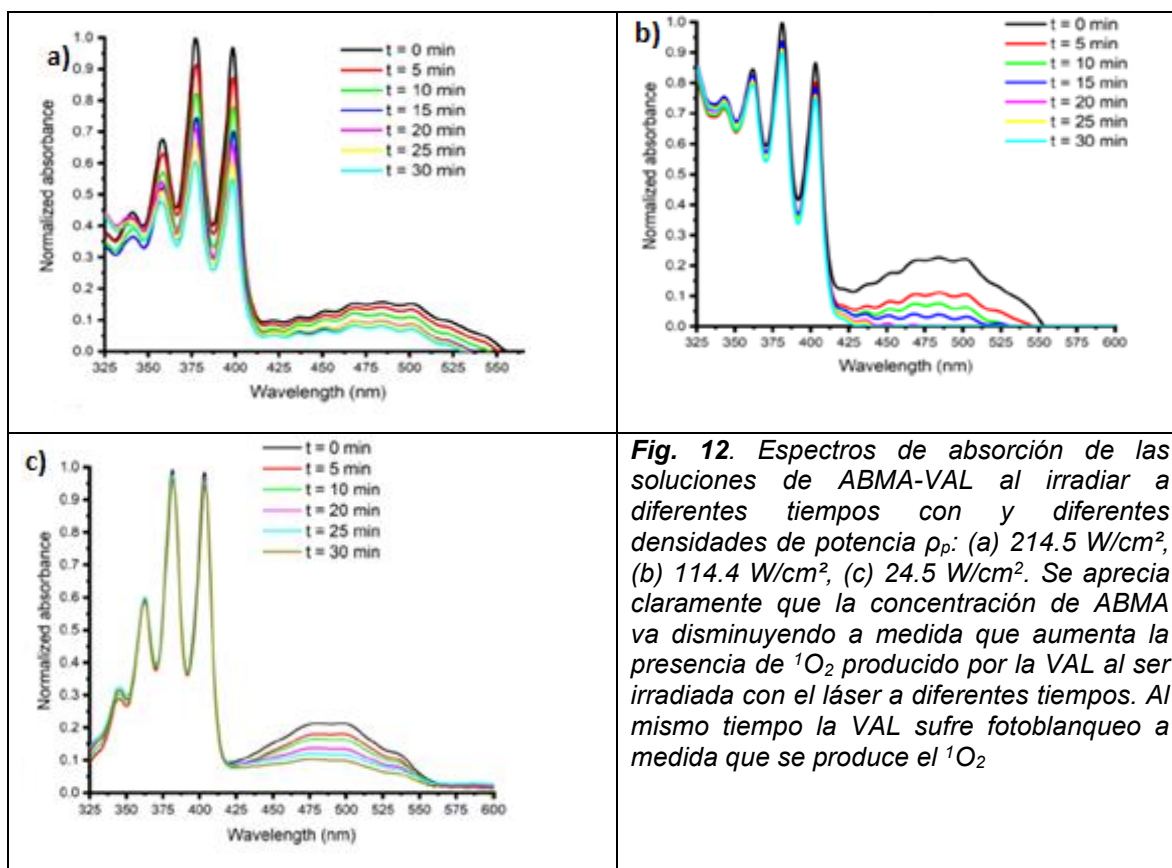


Fig. 11. Espectros de absorbancia de VAL irradiada con $p_p = 28.6 \text{ W/cm}^2$.

Para detectar la producción de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) se utilizó el ABMA. Este indicador reacciona de manera selectiva con el $^1\text{O}_2$ en medio acuoso por lo que es muy utilizado para su detección (33). La detección espectrofotométrica de $^1\text{O}_2$ con ABMA al irradiar la VAL se realizó mediante el monitoreo de las bandas de absorción características del ABMA (360 nm, 380 nm y 400 nm). Como se puede observar en la Fig. 12 al irradiar a diferentes tiempos la mezcla ABMA-VAL, con las p_p de 214.5 W/cm^2 (b), 114.4 W/cm^2 (d) y 24.5 W/cm^2 (f) la absorbancia de las tres bandas del ABMA disminuyó progresivamente a medida que aumentó el tiempo de irradiación. En particular, al irradiar durante 30 min la absorción de la banda de 400 nm disminuyó 45% con la p_p de 214.5 W/cm^2 (Fig. 12 b), 13.6% con la p_p de 114.4 W/cm^2 (Fig 12 d), en tanto que fue insignificante con la p_p de 24.5 W/cm^2 (Fig 12 f). Asimismo, en la región del espectro de 420 - 550 nm es posible apreciar el fotoblanqueo característico de los PS que experimentó la VAL durante la irradiación. Estos resultados confirman la hipótesis de que la interacción del láser de 532 nm con la VAL a diferentes p_p induce generación de $^1\text{O}_2$ detectable mediante el ABMA.



La posible formación del ion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) al irradiar la VAL se realizó con un experimento similar, pero en lugar de ABMA se utilizó DCPIP que es un indicador que al reaccionar con $\text{O}_2^{\cdot-}$ cambia su coloración de azul ($\lambda = 606 \text{ nm}$) a incoloro con la consiguiente disminución de la absorbancia a dicha longitud de onda (32).

Como se muestra en la Fig. 13 a) la diferencia de absorbancia entre el primer tiempo de irradiación (0 min) y el último (40 min) fue de solo 0.31 %. Durante los primeros 4 tiempos (5, 10, 15 y 20 min) se observó una pequeña disminución progresiva de la absorbancia, proporcional al tiempo de irradiación. A partir de 20 min y hasta los 40 min de irradiación se observa un ligero incremento de la absorbancia (Fig 13 b) debido probablemente a evaporación parcial de la solución durante la irradiación. La variación total de la absorbancia durante todo el tiempo de irradiación, sin embargo, fue menor al 3%, lo que sugiere que la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ fue insignificante.

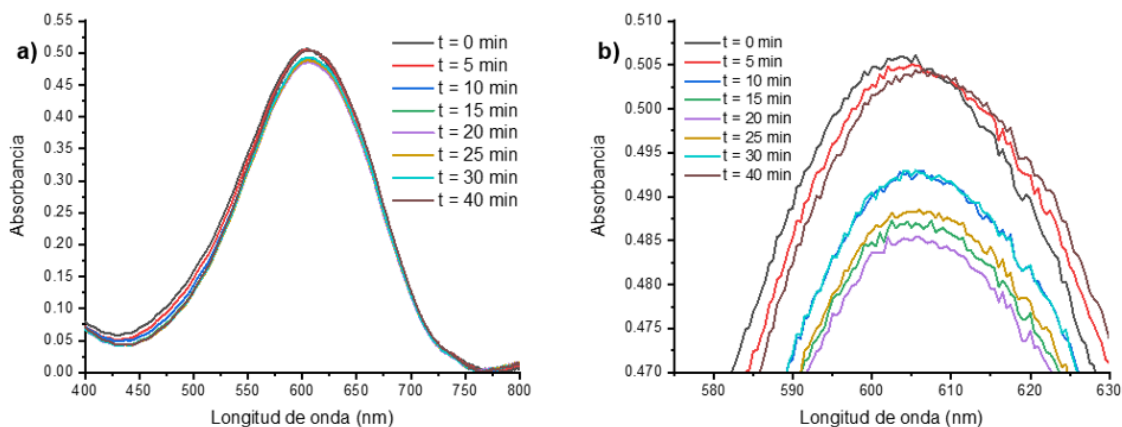


Fig. 13. (a) Espectros de absorción de solución de DCPIP-VAL irradiada a diferentes tiempos con láser de 532 nm; (b) Acercamiento en la región de absorción de la solución en el rango de 580-630 nm donde se aprecia que a partir de 20 min de irradiación se produce un ligero aumento de la absorbancia debido probablemente a evaporación parcial de la solución con el tiempo de irradiación.

III. Preparación de las lipoproteínas miméticas de baja densidad mLDL.

III-a Espectroscopía UV-Vis

En la Fig. 14 se muestran los espectros de absorción de los componentes individuales de las mLDL preparadas: a) VAL, b) siRNA-RAD-51, c) péptido Apo B sitio B y d) siRNA-Cy3. La VAL (Fig. 14 a) muestra dos bandas características. La primera, a 294 nm correspondiente a las interacciones $\pi \rightarrow \pi^*$ asociadas con los compuestos aromáticos presentes en su estructura, así como a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ derivadas de los grupos carbonilo (C=O). La segunda banda, centrada en los 498 nm, se atribuye a la presencia de un sistema altamente conjugado, característico de la estructura de la VAL (véase Fig. 3).

El espectro del siRNA/RAD-51 (Fig. 14 b) presenta dos bandas principales en 218 y 259 nm, atribuidas a transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ o $n \rightarrow \pi^*$ características de las bases nitrogenadas del ARN. Por otra parte, el péptido mimético Apo B sitio B (Fig. 14 c) muestra una banda en la región del UV lejano (180-230 nm), asociada a los enlaces peptídicos de los aminoácidos

correspondientes a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$. Adicionalmente, se observa una banda ancha en la región del UV cercano (240-295 nm), atribuida, principalmente, a las cadenas laterales de residuos aromáticos presentes en la secuencia peptídica (51).

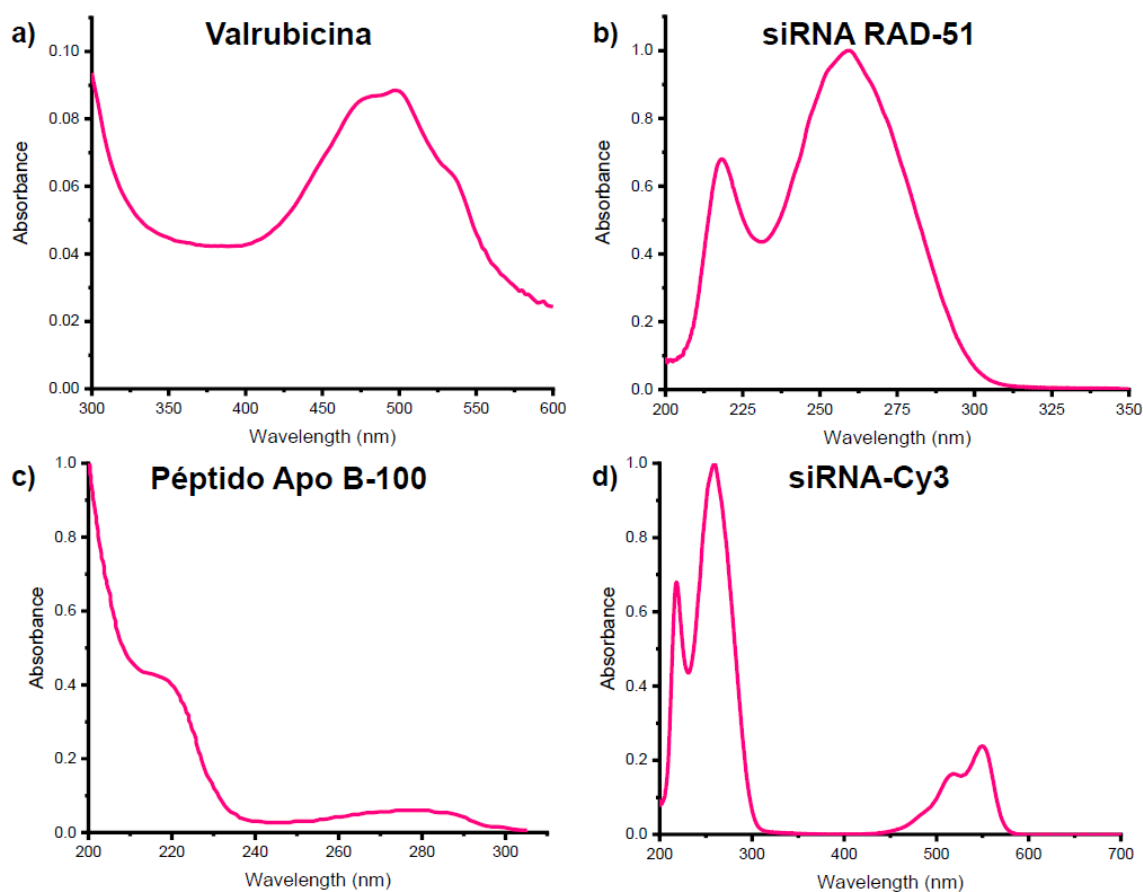


Fig. 14. Espectros de absorción de los componentes individuales de las mLDL: (a) Valrubicina; (b) siRNA RAD-51; (c) Péptido mimético ApoB sitio B; (d) siRNA-Cy3.

Para confirmar la correcta formación de los sistemas mLDL-cy y mLDL-vs se obtuvieron sus respectivos espectros (Fig 15) a fin de compararlos con los espectros de sus componentes individuales (Fig. 14). La Fig. 15 muestra los espectros de las mLDL cargadas con Ca/siRNA-RAD51 (mLDL-r) con Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-si) y con la mezcla Val + Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-cy). Al comparar los espectros, se observa que el sistema mLDL-r, no muestra señales en la región de 550 nm, consistente con la ausencia del Cy3 y con el hecho de que RAD51 no absorbe en esa región de longitudes de onda (Fig 14 b). En contraste, el sistema

mLDL-si muestra una banda de baja intensidad centrada alrededor de los 550 nm, atribuida a la absorción característica del Cy3 que se observa en la Fig 14 d. Esta señal confirma la incorporación del complejo Ca/siRNA-Cy3 en las mLDL. Finalmente, el sistema cargado con VAL y Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-cy) presenta también un incremento en la intensidad de la banda a los 550 nm con respecto al sistema mLDL-si. Este incremento de intensidad se atribuye a la interacción entre la VAL (Fig 14 a) y el resto de los componentes del nanosistema. Los cambios observados en la figura evidencian la presencia de ambos componentes (VAL y Ca/siRNA-Cy3) dentro de la NP, lo que respalda la correcta formación del nanosistema mLDL-cy.

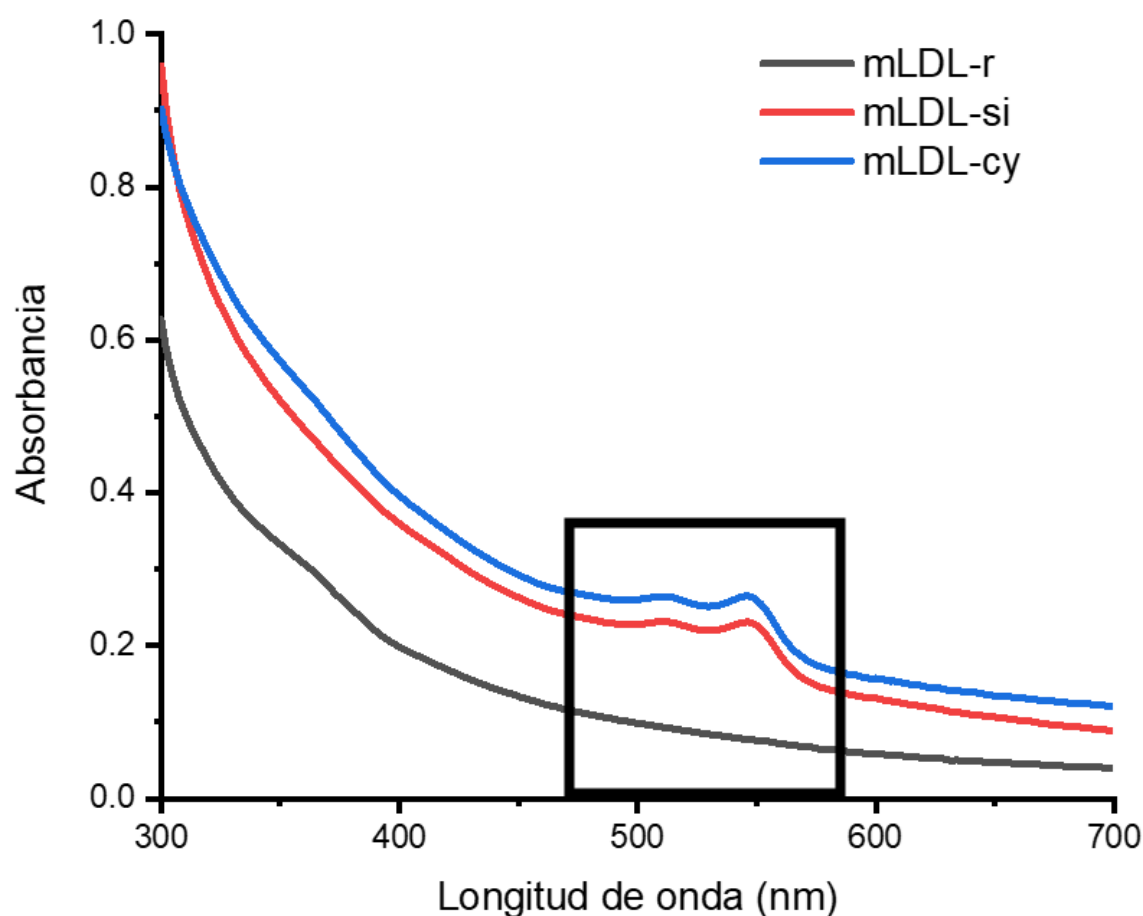


Fig. 15 Espectros de absorción de mLDL cargadas con Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-si), Ca/siRNA-RAD51 (mLDL-r) y Val + Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-cy).

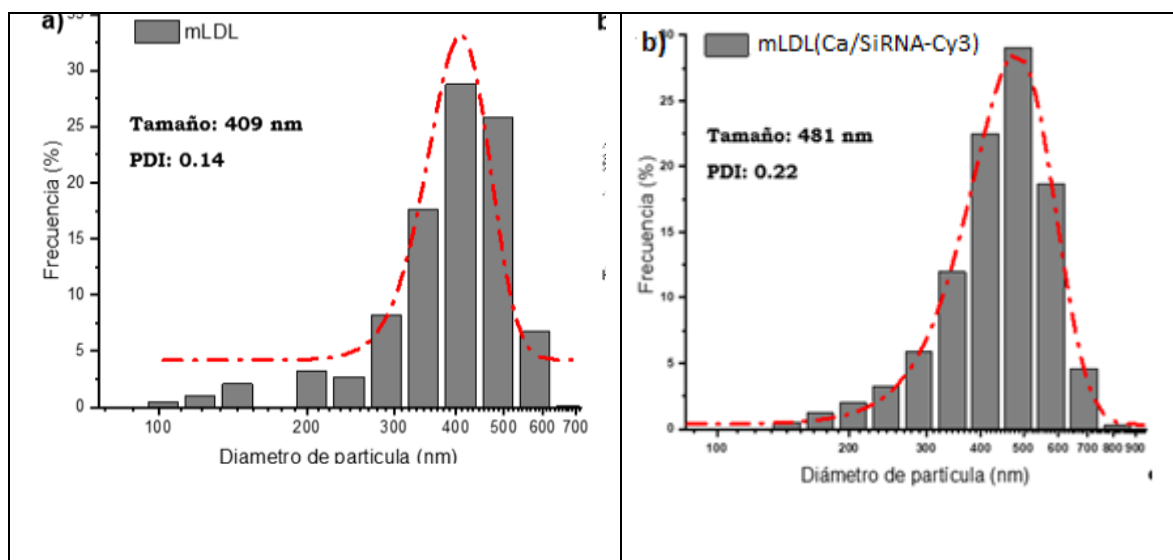
IV. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)

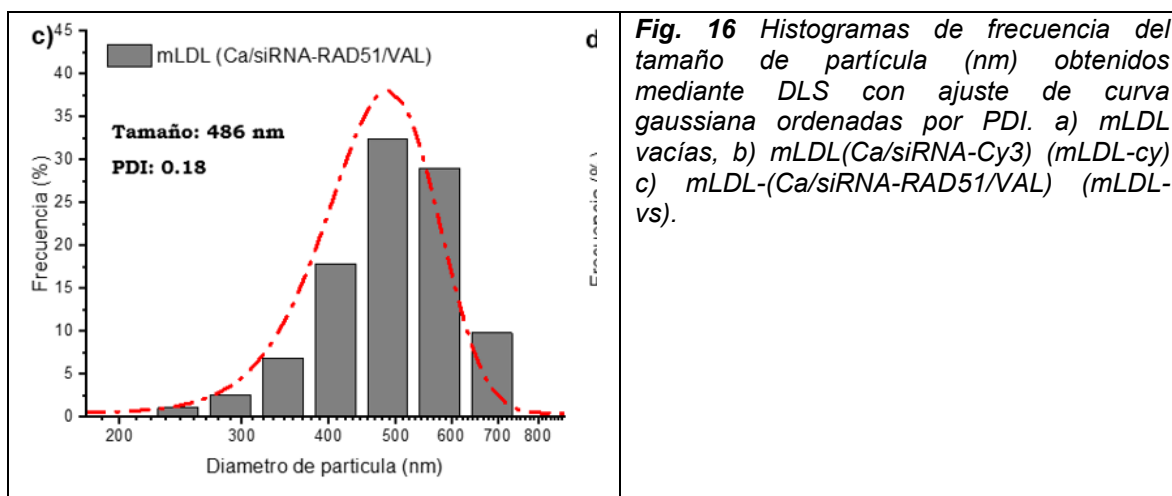
En la Tabla 2 se muestran los tamaños de partícula de los sistemas mLDL-vs y mLDL-si. A modo de comparación se muestra el tamaño de las mLDL vacías (mLDL) Como puede apreciarse, el diámetro hidrodinámico de las mLDL (409 ± 8 nm) se incrementa al incorporar tanto el complejo Ca/siRNA-Cy3 (mLDL-si, 481 ± 23 nm), como la mezcla VAL + Ca/siRNA-RAD51(mLDL-vs, 486 ± 16 nm).

Tabla 2 Tamaño de partícula y PDI de las mLDL, mLDL-si y mLDL-vs.

SISTEMA	DIÁMETRO HIDRODINÁMICO (nm)	PDI
mLDL	409 ± 8	0.14
mLDL-si (mLDL (Ca/siRNA-Cy3))	481 ± 23	0.22
mLDL-vs (mLDL(Val +siRNA RAD 51))	486 ± 16	0.18

El índice de polidispersidad (PDI) también se incrementa con la adición de los diferentes componentes. Los histogramas de los nanosistemas muestran una distribución de tamaño monomodal característica de las formulaciones homogéneas (Figura 16). Se aprecia también que al adicionar VAL no se modifica significativamente ni el tamaño ni la uniformidad de las mLDL-si.





V. Eficiencia de atrapamiento (EE) de siRNA-Cy3 y VAL en las mLDL

Para determinar la eficiencia de atrapamiento de la VAL y del siRNA en las mLDL se empleó la espectrofotometría (VAL) y la fluorescencia del Cy3 (siRNA). Previamente se construyeron las respectivas curvas de calibración de VAL (Fig. 17) y del siRNA-Cy3 (Fig. 18). La eficiencia de atrapamiento de VAL en las mLDL-vs fue de 95%, considerándose la misma para mLDL-cy. La eficiencia de atrapamiento de siRNA-Cy3 en las mLDL-cy fue del 85.3% y se consideró la misma para siRNA-RAD51 en mLDL-vs ya que ambos sistemas fueron formulados bajo las mismas condiciones experimentales y se ha demostrado que las diferencias entre siRNA-Cy3 y siRNA-RAD51 son insignificantes (52).

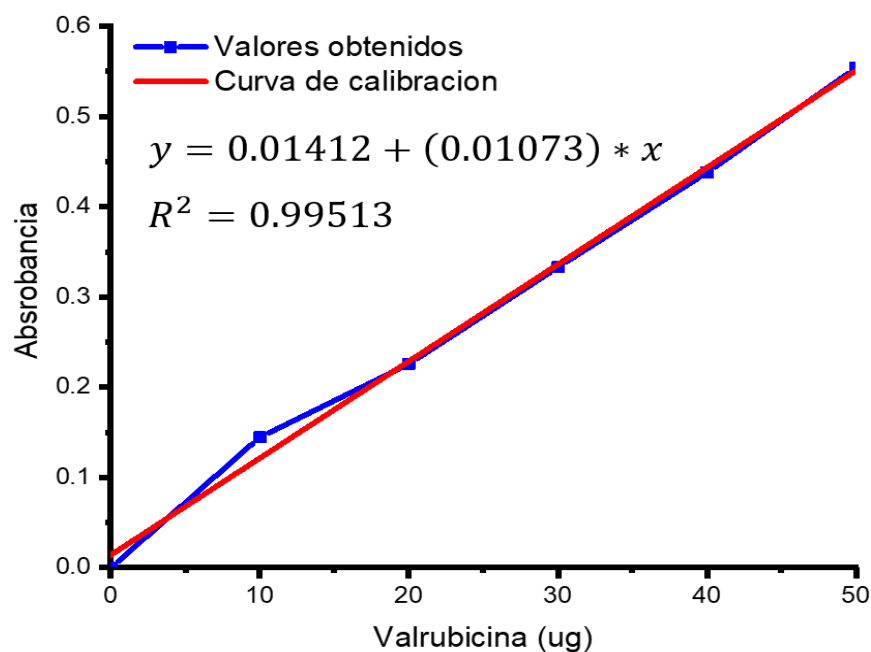


Fig. 17 Curva de calibración para VAL, construida a partir de la banda de absorción a 500 nm.

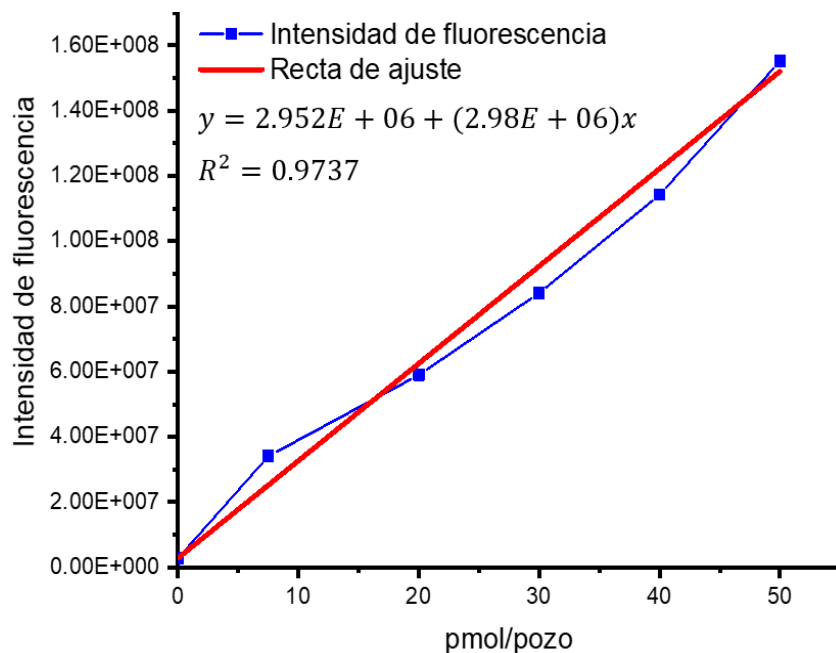


Fig. 18 Curva de calibración obtenida a partir de la fluorescencia de Cy3 empleando el filtro de excitación 530/30 nm y el filtro de emisión de 580/20 nm.

VI. Ensayo de captación y reconocimiento específico de las mLDL-cy

Se utilizó microscopia de fluorescencia para evaluar la captación y el reconocimiento específico del nanosistema mLDL-cy, mediante un ensayo de

bloqueo de LDLR presentes en las células T47D. En la Fig. 19 a se observa la internalización del nanosistema mLDL-cy en el citoplasma celular. Tal como se esperaba, cuando se realizó el bloqueo del receptor la intensidad de la señal disminuyó significativamente (Fig. 19 b) lo que indica que la captación e internalización están mediadas por la interacción con los receptores LDLR presentes en la membrana de las células.

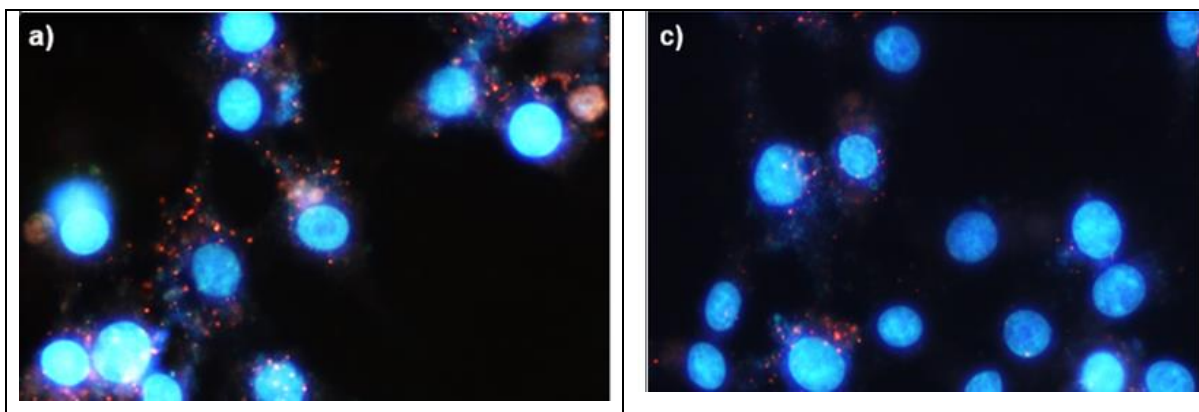


Fig. 19. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células T47D obtenidas post-tratamiento con mLDL-cy con y sin bloqueo de LDLR. (a) En ausencia de bloqueo de receptores se aprecia la internalización de mLDL-cy en las células. Después de bloquear los receptores LDLR la señal fluorescente disminuye significativamente indicando menor internalización de mLDL-cy (b)

VII. Análisis de biodistribución de las mLDL-cy mediante fluorescencia

Para determinar el comportamiento *in vivo* de las mLDL-cy se realizó un estudio de biodistribución a 1.5, 7 y 24 h en un modelo de ratón a los que previamente se les había inducido la formación de tumor utilizando la línea celular 4T1, muy empleada en modelos animales. Las imágenes *ex vivo* de fluorescencia y de rayos X combinadas (Fig. 20) muestran que la mayor captación del sistema mLDL-cy fue en el hígado seguido de tumor y riñones (Fig. 20 a). A las 24 horas la captación en todos los órganos ha disminuido apreciablemente, manteniéndose la mayor captación en hígado y tumor. La menor captación se observó en bazo, pulmones y corazón. A modo de comparación se realizó el mismo experimento, pero utilizando mLDL-si (Fig. 20 b) observándose un patrón de captación similar.

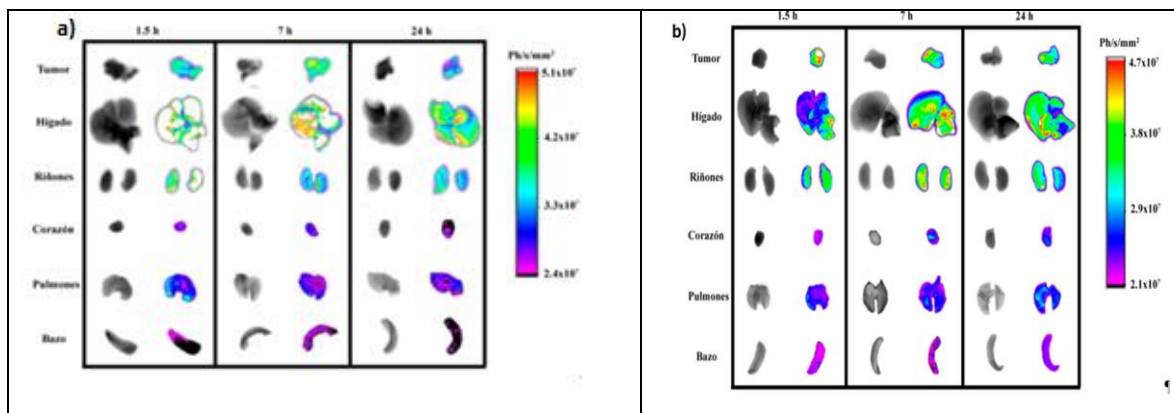


Fig. 20 Imágenes de fluorescencia de órganos murinos obtenidas con el sistema para imágenes de animales Bruker in Vivo Xtreme (Bruker) a diferentes tiempos tras el tratamiento con a) mLDL-cy y b) mLDL-si. El patrón de distribución es muy similar en ambos casos

Para confirmar los resultados obtenidos mediante imágenes, los órganos de los animales tratados con mLDL-cy (excepto el corazón) se pesaron y se cuantificó la fluorescencia con el lector de placas VICTOR Nivo® Multimode Plate Reader (Fig. 21). Los resultados coinciden con los mostrados en la Fig 21 a. Se asumió un comportamiento similar para las mLDL-vs.

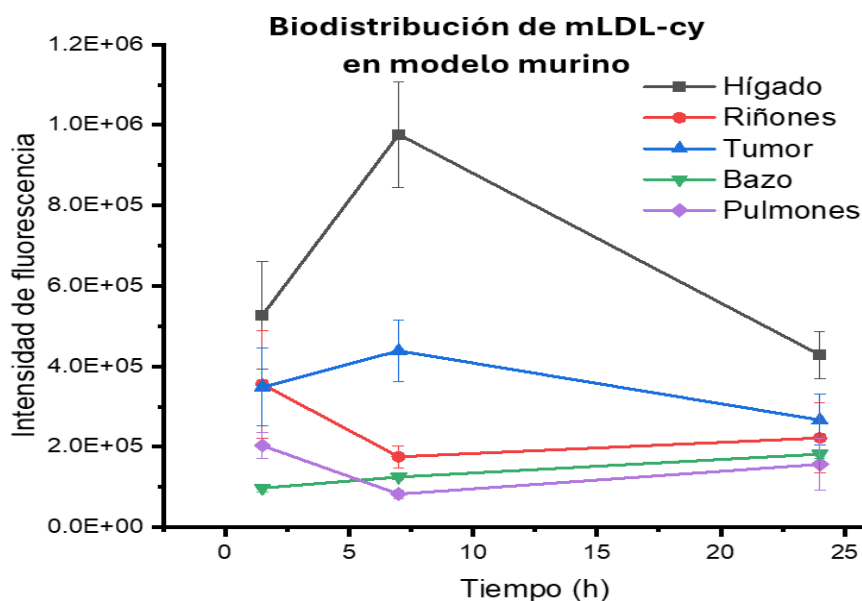


Fig. 21. Concentración de mLDL-cy para cada órgano extraído de los ratones, analizada a partir de la intensidad de la fluorescencia y normalizado por μg de masa.

VIII Evaluación de la eficacia terapéutica de las mLDL

En la Tabla 3 se observa el tamaño promedio del tumor al momento de recibir la primera dosis del tratamiento con mLDL cargada con siRNA-RAD51 (mLDL-r), con Val (mLDL-VAL) y con VAL+siRNA-RAD51 (mLDL-vs) (n=2 /tratamiento), así como las masas tumorales promedio luego de recibir la tercera dosis de cada tratamiento. Los tamaños iniciales de los tumores no difieren significativamente por lo que se tomó el grupo control como referencia.

Tabla 3 *Tamaño de los tumores (mm) inducidos con células T47D al inicio del tratamiento, y masa final (g) de los mismos luego de ser tratados con mLDL-r, mLDL-VAL y mLDL-vs*

	Control	mLDL-siRNA-RAD51 (mLDL-r)	mLDL-VAL	mLDL-VAL-Ca/siRNA-RAd51 (mLDL-vs)
Aplicación 1 ^{ra} dosis Tamaño (mm)	3.7 mm	3.5 mm	4.0 mm	3.4 mm
Masa final (g)	0.268	0.251	0.317	0.232

Antes de extraer los tumores a los animales tratados para obtener la masa tumoral reflejada en la Tabla 3 se obtuvieron las imágenes radioisotópicas de la captación tumoral de ^{99m}Tc-HYNIC-BOMBESINA/RGD (Fig. 22) con el objetivo de evaluar la carcinogénesis y la angiogénesis. Se aprecia que si bien las mLDL-VAL como las mLDL-r disminuyen la carcinogénesis y la angiogénesis de los tumores, el mayor efecto terapéutico se obtiene con mLDL-vs lo que indica mayor efectividad de la terapia conjunta que con las terapias independientes.

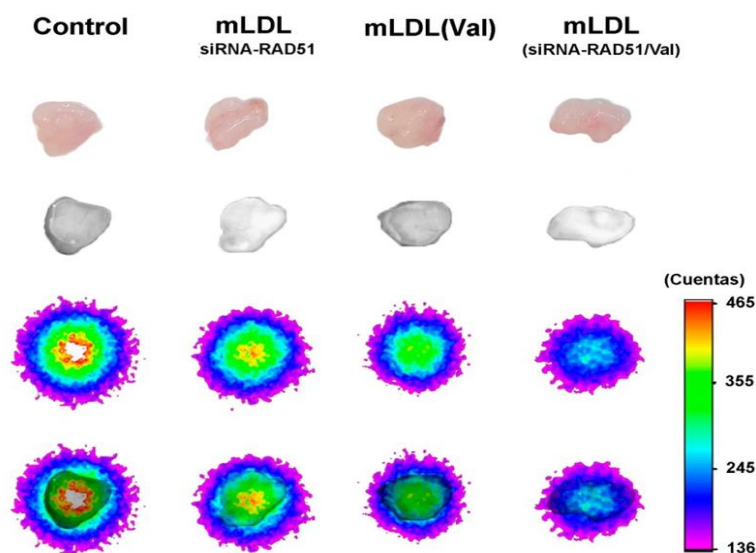


Fig. 22. Resultados de la imagen de los tumores obtenidas con el sistema de imagen para animales Bruker in-vivo Xtreme. Las imágenes se obtuvieron con ^{99m}Tc -HYNIC-BOMBESINA/RGD, para evaluación de angiogénesis y carcinogénesis. La figura confirma que la terapia conjunta VAL+RAD51 es más efectiva que cuando se realizan por separado

10. DISCUSIÓN

La PDT constituye una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer ya que la irradiación con luz se lleva a cabo en el sitio específico del tejido a tratar, lo que garantiza máxima protección al tejido sano y efectos colaterales mínimos. Como su basamento es la formación de ROS cuando se excita un PS uno de sus principales desafíos es identificar PS capaces de generar cantidades suficientes de ROS que puedan inducir una respuesta terapéutica efectiva (7-9,53).

La similitud estructural de la VAL y la DOX, cuya eficacia como PS ha sido demostrada (3) motivó la evaluación de VAL como posible PS. DOX se excita ~ 480 nm y emite ~590 nm (54), en tanto que VAL se excita ~498 nm y emite ~ 596 nm (27). La fluorescencia de ambas antraciclinas se incrementa cuando se encapsulan en nanosistemas lipídicos (27, 54).

Las LDL poseen cualidades ventajosas como transportadoras de fármacos: (i): no se reconocen por el MPS; (ii) sus tiempos de circulación sanguínea son largos; (iii) no son inmunogénicas; (iv) pueden transportar moléculas hidrofóbicas,

hidrofílicas y anfífilas tanto en los fosfolípidos o la Apo B-100 superficiales, como en el núcleo hidrófobo sin que cambien significativamente ni la estructura ni las propiedades biológicas de la molécula acarreada. Se pueden sintetizar con características fisicoquímicas predefinidas (15,55).

Otra ventaja de la LDL es su capacidad de carga multimodal, que facilita el desarrollo de sistemas teranósticos (55) y sistemas para terapia combinada (4, 15) como el que se desarrolla en el presente trabajo, donde se utiliza la VAL en calidad de quimioterapéutico/PS y el siRNA-RAD51 en calidad de agente capaz de evitar la reparación de las roturas del ADN que provocan tanto la quimioterapia como la PDT.

Las LDL, nativas y sintéticas, se unen al receptor LDLR a través de la apolipoproteína B-100 (Apo B-100) que se encuentra en la parte externa de la NP. Una vez unida a sus receptores la LDL se internaliza en la célula por endocitosis y libera en el citosol la carga transportada. Sin embargo, la preparación de LDL con ApoB-100 tiene el inconveniente de que ApoB-100 es difícil de aislar y propensa a agregarse por lo que resulta más práctico utilizar péptidos que mimetizan sus propiedades (16,49). Se ha demostrado que la sustitución de ApoB-100 por péptidos miméticos constituye una vía relativamente fácil y sencilla de lograr nanosistemas transportadores que se acumulen en células que expresan los LDLR (49) como las células hiperproliferativas. Los LDLR se sobreexpresan en diversos tipos de cáncer como cáncer gástrico, de hígado, de mama y la leucemia (56). Las NP de LDL, por tanto, se acumulan, de manera preferencial, en células cancerosas.

Las características fotodinámicas de la VAL son muy débiles ya que su rendimiento cuántico es muy pequeño. Sin embargo, cuando se encapsula en nanosistemas lipídicos el rendimiento cuántico aumenta ligeramente (27), por lo que uno de los primeros pasos del trabajo fue determinar si al irradiar la VAL a 532 nm con un láser de emisión continua se podrían formar ROS, en particular $^1\text{O}_2$ (Fig 12). La producción de $^1\text{O}_2$, que es la especie determinante en la efectividad de la PDT, es importante debido a su alta capacidad de reacción con las biomoléculas.

La reacción del, $^1\text{O}_2$ con las biomoléculas de su entorno induce una cadena de reacciones que conducen a la necrosis y la apoptosis (8-10).

A mayor potencia del láser se incrementa la producción de ROS por unidad de tiempo, por lo que se determinó primero la tolerancia térmica del tejido a diferentes potencias del láser para encontrar una potencia adecuada que no indujera daños térmicos irreversibles. Se sabe que en el tejido blando el daño térmico puede presentarse cuando la radiación tiene una longitud de onda (λ) en el rango de 380 nm - 1 mm, en particular en el rango 400 nm - 700 nm. En este último rango para lograr exposiciones seguras se recomienda exponer la piel durante periodos muy breves. De acuerdo con Ziegelberger (57), para evitar daño térmico en la piel, la p_p no debe exceder los 200 mW/cm² durante más de 10 segundos. Los resultados mostraron que si bien las p_p de 214.5 W/cm² y 114.4 W/cm² causaron un rápido incremento de temperatura, superando los 45 °C en pocos segundos, lo que representa un claro riesgo de daño térmico, la p_p de 28.6 W/cm² no produjo efectos térmicos severos, incluso durante irradiaciones continuas de hasta 5 minutos. Esta potencia, que supera en más de 140 veces el límite propuesto por Ziegelberger (57), no evidenció quemaduras ni daños graves en el tejido porcino *ex vivo* utilizado por lo que se utilizó en los experimentos de irradiación de tumores.

La irradiación de VAL con el láser produjo $^1\text{O}_2$, detectado mediante el indicador ABMA. Este indicador modifica sus propiedades al reaccionar con el $^1\text{O}_2$, de manera específica y altamente sensible, por lo que constituye una sonda muy apropiada para detectar la presencia de esta especie. La irradiación a 532 nm de VAL en presencia de ABMA provocó disminución de la absorción de ABMA proporcional al tiempo de irradiación lo que revela, de manera indirecta, que VAL tiene propiedades como PS (Fig. 12). La producción de esta especie cuando se irradió con p_p de 28.6 W/cm² es especialmente relevante ya que esta potencia se determinó previamente como segura en intervalos de hasta 5 min de irradiación.

La producción de $\text{O}_2^{\bullet}$, segunda especie importante en PDT, resultó insignificante (Fig. 13). Esta especie se detecta con el indicador DCPIP. En estado oxidado el

DCPIP es azul (λ_{max} 606 nm) pero cuando reacciona con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ se reduce pasando a incoloro. El desvanecimiento del máximo de absorción del DCPIP es una medida indirecta de la presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Fig. 13). El experimento demostró que la irradiar VAL en presencia de DCPIP no se observó la esperada disminución de la absorbancia del DCPIP lo que indica que en las condiciones del experimento VAL no produjo esta especie cuya importancia radica en que además de inducir necrosis y apoptosis participa en la cascada catalítica causada por la enzima superóxido dismutasa para formar el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$ altamente citotóxico y, al mismo tiempo, produce oxígeno reciclable (58).

En el experimento se esperaba disminución de la absorbancia de forma permanente y proporcional al tiempo de irradiación tal como se observa durante los primeros 20 minutos (Fig. 13). Sin embargo, después de ese tiempo de irradiación se percibió aumento de la absorbancia. Un resultado similar fue descrito previamente por Jiménez-Mancilla *et al.*, (59), atribuido a la formación de puentes de hidrógeno entre el DCPIP y el disolvente (DMSO) que pueden afectar el coeficiente de extinción molar del DCPIP y modificar la forma en que éste absorbe la luz en el espectro UV-Vis. Es importante resaltar que el empleo del láser continuo induce menor producción de ROS que cuando se emplean láseres pulsados (60).

Para mejorar las características de VAL como PS y con el objetivo de preparar un sistema multimodal se prepararon diversas NP a base de LDL. Como la Apo B-100 es muy grande (4536 AA) se prefirió utilizar un péptido mimético de ésta, denominado *ApoB sitio B* (secuencia WGRLTRKRGLKLATA) que comprende los residuos 3356-3368 de Apo B-100, considerados los de mejor enlazamiento a los LDLR (49). La composición del péptido: 6 residuos hidrófobos (1W, 3L, 2A) y 9 residuos polares (2G, 3R, 2T, 2K), contribuyen tanto a la estructura de la NP de mLDL como a su unión a los LDLR, en particular los 3 residuos R y 2 residuos K de naturaleza positiva, contribuyen significativamente al enlazamiento con los LDLR cuya naturaleza es eminentemente negativa (61).

Los análisis espectrales efectuados muestran que los nanosistemas obtenidos con mLDL tienen incorporados en la NP las distintas moléculas insertadas, (Figs 14 y 15). De acuerdo con su naturaleza la VAL (Log P ~ 2.2, versión de PubChem 2025.09.15) debe estar incorporada en el núcleo hidrofóbico, donde se acomodan las moléculas lipofílicas, en tanto que los complejos de Ca/siRNA, de naturaleza anfifílica se incorporan de preferencia en los fosfolípidos de la membrana mediante enlaces no covalentes (55,62,63).

Los diámetros hidrodinámicos de las mLDL obtenidas oscilan entre 400-500 nm, mayores a los obtenidos por otros autores (39), pero dentro del rango habitual de NP de origen lipídico (64). Se ha descrito que la LDL preparada con péptidos miméticos tiende a menor agregación que cuando se prepara con la ApoB-100 completa (65). Igualmente, se sabe también que cuando las HDL se preparan con péptidos miméticos sus tamaños tienden a incrementarse debido a la diferente conformación que adoptan los péptidos en la superficie de la NP con relación a las Apo completas (66) por lo que es de esperar un mecanismo similar en el caso de la LDL. A estos se añade que la incorporación de los complejos de Ca/siRNA-Cy3 y Ca/siRNA-RAD51 cuyo tamaño es de ~ 80 nm, (67) puede contribuir a incrementar el tamaño de las NP vacías. Nótese que el incremento de tamaño en el nanosistema mLDL-si es de 1.09 y mLDL-vs es de 1.1. Los PDI obtenidos muestran buena monodispersidad (Fig. 17 y tabla 2).

Si bien la absorbancia de la VAL en las NP de mLDL-cy no es suficiente para apreciar con nitidez su banda característica (Fig 15 a), se puede observar un ligero incremento en el espectro de las mLDL-cy en comparación con las mLDL-si que sugiere que VAL está presente en las mLDL-cy (Fig 16). La presencia de VAL en la estructura de las NP de mLDL-cy y mLDL-vs se corroboró también con la alta eficiencia de encapsulación (95%). En estudios previos, se ha reportado una eficiencia de encapsulación de VAL del 58 % en liposomas (25) y del 98% en sistemas autonanoemulsionantes (68). En este contexto, los resultados obtenidos reflejan una buena capacidad de encapsulación, similar a la de otros quimioterapéuticos encapsulados en LNP (37,38). Esta alta incorporación de la

VAL (95%) no provocó efectos negativos sobre la integridad del nanosistema ni de su capacidad de carga de siRNA (85%), debido a la conocida capacidad multimodal de carga de la LDL.

Las propiedades fisicoquímicas de los nanosistemas obtenidos son determinantes para su internalización celular. Se ha reportado que el rango óptimo de tamaño para una buena internalización celular es de 95-200 nm (69), sin embargo, se ha comprobado que la internalización depende no solo del tamaño, sino también de la flexibilidad de las NP y de la fortaleza de unión a los receptores celulares.

Con el fin de evaluar la especificidad en la captación celular del sistema basado en mLDL-cy, se realizó un experimento *in vitro* de bloqueo del receptor LDLR. Como se muestra en la Fig. 19, la saturación de estos receptores provocó una disminución significativa en la captación e internalización de las NP de mLDL-cy lo que confirma la especificidad de la interacción entre las mLDL y los LDLR.

Este resultado es esperable ya que el péptido utilizado está comprendido en la zona de máxima afinidad de la LDL por parte de sus receptores. Se sabe que los LDLR absorben alrededor del 70% de la LDL circulante (56). Los resultados de la Fig 19 confirman que la mLDL-cy se internalizó a través de los LDLR pues las moléculas de Ca/siRNA-Cy3 se aprecian claramente en el interior de las células.

Cuando las mLDL-cy se enlazan a sus respectivos receptores forman un complejo que entra en las células por endocitosis (56,63). Una vez dentro de la célula el complejo mLDL-cy/LDLR se disocia, la mLDL-cy se degrada en colesterol libre, ácidos grasos, aminoácidos Ca/siRNA-Cy3 y VAL. El complejo Ca/siRNA-Cy3 se desacopla y el siRNA-Cy3 se libera. Los iones Ca^{2+} contribuyen a este proceso (70). Las moléculas de VAL que llegan a las mitocondrias pueden entonces generar ROS cuando se irradian con el láser. Este resultado es relevante por dos razones: 1) el siRNA y la VAL pueden llegar al interior de la célula, gracias a la interacción entre las mLDL y los LDLR; 2) Como las ROS tienen una vida muy corta y una capacidad de difusión limitada, las moléculas de VAL que llegan a las mitocondrias, organelo blanco de la PDT, pueden generar ROS cuando se irradian con el láser. A esto se añade que la LDL se oxida durante la irradiación con láser y

el óxido resultante es citotóxico lo que incrementa la eficacia de la PDT (66). Estas características convierten a las NP de mLDL-cy en un nanosistema de terapia multimodal.

Para confirmar *in vivo* la captación e internalización del sistema mLDL-cy observada *in vitro* se realizaron estudios de biodistribución en un modelo murino con tumores inducidos con células 4T1 de cáncer de mama. Se evaluaron solamente aquellos órganos de importancia en el metabolismo de la LDL y de alta expresión de LDLR. Al analizar las imágenes obtenidas (Figs 21 y 22) se observó que la mayor captación en los grupos tratados con mLDL-cy ocurrió en hígado, tumor y riñones. Este resultado es consistente con el metabolismo fisiológico de las LDL y la expresión de LDLR en estos tejidos (21,56,71). La alta captación tumoral confirma la habilidad del nanosistema obtenido de dirigirse hacia las células tumorales con alta capacidad de proliferación y expresión de LDLR.

La mayor acumulación hepática de mLDL con respecto al tumor se debe al papel clave del hígado en el metabolismo de la LDL (21,22, 71). El hígado es el órgano de mayor expresión de LDLR (21,22,56,66). Aunque la acumulación hepática pudiera representar un riesgo para el uso clínico del nanosistema obtenido existen reguladores específicos para inhibir la actividad de LDLR en hígado (y en otros tejidos en los que se expresan) que contribuyen a mejorar la relación de captación tejido tumoral/tejido sano (65).

Por su parte, la acumulación renal es menor que la captación tumoral (Figs 21 y 22) por lo que no representa un gran peligro para el objetivo buscado. Está asociada tanto con la presencia de LDLR en los riñones como con las propiedades superficiales de la mLDL (56,65). En la composición del péptido utilizado la mayoría de los residuos AA (60%) son de carácter polar, lo que le confiere un carácter hidrofílico a la superficie de la mLDL que contribuye a la acumulación y excreción renal.

El estudio realizado para evaluar el comportamiento de tumores tras el tratamiento con mLDL-r, mLDL-VAL y mLDL-vs. Si bien no se observó un significativo efecto en la tasa de crecimiento tumoral entre los tratamientos con respecto al control

(Tabla 3), la captación de ^{99m}Tc -HYNIC-BOMBESINA/RGD muestra una clara disminución de la actividad carcinogénica y angiogénica de los tratamientos con mLDL vs control (Fig. 24). El efecto de la terapia combinada es mayor que en las terapias individuales. La captación tumoral de ^{99m}Tc -HYNIC-BOMBESINA/RGD ocurrió en el orden: mLDL-vs > mLDL-VAL > mLDL-r. Estos resultados indican que el nanosistema mLDL-VAL-siRNA tiene potencial clínico y justifican una evaluación más detallada que incluya otras variables que permitan apreciar mejor sus cualidades.

11. CONCLUSIONES

Los objetivos planteados en el trabajo de tesis fueron cumplidos. La VAL demostró que es capaz de producir $^1\text{O}_2$ detectable mediante ABMA tras su irradiación a 532 nm con un láser de emisión continua, utilizando una ρ_p segura para irradiar el tejido blando sin causar daño térmico. Este resultado es particularmente importante ya que indica que VAL puede utilizarse para obtener no solo efecto quimioterapéutico, sino también como PS en PDT.

Los resultados obtenidos respaldan el potencial terapéutico de la combinación quimioterapia/PDT (VAL) y terapia génica (siRNA). En particular, las mLDL cargadas simultáneamente con VAL y siRNA (mLDL-vs y mLDL-cy) demostraron que se captan e internalizan en las células de manera específica e inducen producción eficaz de $^1\text{O}_2$ tras la irradiación con un haz de 532 nm. Estas características se confirmaron mediante imágenes de tumores obtenidas por captación de ^{99m}Tc -HYNIC-BOMBESINA/RGD luego de aplicar tres dosis de mLDL-vs. Se comprobó que las NP de mLDL-VAL(Ca/siRNA-RAD51) (mLDL-vs) reducen de manera significativa la angiogénesis y la carcinogénesis en comparación con las NP de mLDL(Ca/siRNA-RAD51), (mLDL-r) y las NP de mLDL-VAL por separado.

Se recomienda ampliar los estudios incluyendo nuevas variables que permitan una caracterización más completa del nanosistema mLDL/VAL/siRNA

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. U. S. Food and Drug Administration (2016). Valstar (valrubicin) injection, for intraves use [Prescribing information]. Silver Spring, MD.
2. 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. *Int J Nanomedicine* 7:975–83 doi: 10.2147/IJN.S28029.
3. Quintos-Meneses, H.A, Aranda-Lara, L., Morales-Ávila, E., Torres-García, E., Camacho-López, M.Á, Sánchez-Holguín, M., Luna-Gutiérrez, M.A., Ramírez-Durán, N., Isaac-Olivé, K. (2020). In vitro irradiation of doxorubicin with ¹⁸F-FDG Cerenkov radiation and its potential application as a theragnostic system. *J Photochem Photobiol B.* 210:111961. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111961>.
4. Hosseini, N.S., Parvin, P., Ghasemi, F., Atyabi, F. (2016). Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. *Biomed Opt Express* 7 (6): 2400–2406. doi: 10.1364/BOE.7.00240
5. Mantareva, V., Braikova, D., Lazarova, I., Genova, t. (2024). Plants-occurring Anthraquinones as Photosensitive Compounds for Photodynamic Method: A Critical Overview. *Front. BioSci (Landmark Ed)* 29(5):168 <https://doi.org/10.31083/j.fbl2905168>.
6. Mesquita, M.Q., Días, C.J., Gamelas, S., Fardilha, M., Neves, M.G.P.M.S., Faustino, M.A.F. (2018). An insight on the role of photosensitizer nanocarriers for photodynamic therapy. *An Acad Bras Cienc* 90(1):1101–1130. doi: 10.1590/0001-3765201720170800.
7. Ferreira dos Santos A, Queiroz de Almeida DR, Ferreira Terra L, Baptista MS, Labriola L. (2019). Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *J Cancer Metastasis Treat* 5:25-45 doi: 10.20517/2394-4722.2018.83.
8. Correia, J.H., Rodrigues, J.A., Pimenta, S., Dong, T., Yang, Z. (2019) Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions . *Pharmaceutics* 13(9):1332. doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.
9. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother* 106:1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- 10 Koh E, Fluhr R. (2016) Singlet oxygen detection in biological systems: Uses and limitations. Vol. 11, *Plant Signaling and Behavior. Plant Signal Behav* 11(7): e1192742. doi: 0.1080/15592324.2016.1192742.
11. Murphy, M.P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C.J., Davies, K.J.A., Davies, M.J., *et al.* (2022) Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab.* 4(6):651–62. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>.

12. Wang, M., Maragani, S., Huang, L., Jeon, S., Canteenwala, T., Hamblin, M.R, Chian, L.Y. (2013) Synthesis of decacationic [60]fullerene decaiodides giving photoinduced production of superoxide radicals and effective PDT-mediation on antimicrobial photoinactivation. *Eur J Med Chem.*63:170–184. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.01.052.
13. Zhao B, Yin JJ, Bilski PJ, Chignell CF, Roberts JE, He YY. (2009) Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 241(2):163–172. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041008X09003469>.
14. Cruz Nieves, R.P., Ruíz Hernández, A. (2022). siRNA: el papel del silenciamiento genético en la terapéutica. *Avance y Perspectiva (CINVESTAV)* 3(4):406–17
15. Aranda-Lara, L., Escudero-Castellanos, A., Trujillo-Nolasco, M., Morales-Avila, E., Ocampo-García, B., Oros-Pantoja, R., Sánchez-Monroy, V., Isaac-Olivé, K (2025). Small Interfering RNA Carriers for Oncotherapy: A Preclinical Overview. *Pharmaceutics* 17 (11):1408 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17111408>
16. Nankar, S. A., Ahmed, S., Sharma, S.S., Pande, A.H. (2022). Apolipoprotein-mimetic Peptides: Current and Future Prospectives. *Curr Protein Pept Sci* 23(11):757-772. doi: 10.2174/1389203723666221003122624.
17. Ali, L.M.A., Gary-Bobo, M. (2022). Photochemical Internalization of siRNA for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 14(15):3597. doi: 10.3390/cancers14153597.
18. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2017) *La célula* 7ª ed. Cooper & Hausman Madrid. Marbán
19. Zhang, J., Chen, B., Gan, C., Sun, H., Zhang, J., Feng, L. (2023). A Comprehensive Review of Small Interfering RNAs (siRNAs): Mechanism, Therapeutic Targets, and Delivery Strategies for Cancer Therapy. *Int J Nanomedicine* 18:7605–7635 . doi: 10.2147/IJN.S436038.
20. Sobansky, M, R., Hage, D.S. (2012). Identification and analysis of stereoselective drug interactions with low-density lipoprotein by high-performance affinity chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 403(2):563–571. doi: 10.1007/s00216-012-5816-y.
21. Feingold, K.R. (2022). Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.*51(3):437-458. doi: 10.1016/j.ecl.2022.02.008.
22. 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. *Clín Invest Arteriosclerosis* 25(2):98–103 I: 10.1016/j.arteri.2013.05.003.
23. Muñoz, S., Blanco-Romero, E., González-Acosta, D., Rodríguez-Acebes, S., Megías, D., Lopes, M., Mendes, J. (2024). RAD51 restricts DNA over-replication from re-activated origins. *EMBO J* 43(6):1043-1064. doi: 10.1038/s44318-024-00038-z.
24. Onrust, S.V., Lamb, H.M. (1999). Valrubicin. *Drugs Aging* 15:69–75 (1999). <https://doi.org/10.2165/00002512-199915010-00006>.
25. Georgievski, A., Bellaye, P.S., Tournier, B., Choubley, H., Pais de Barros, J, P., Herbst, M., Béduneau, A., Callier, P., Collin, B., Végran, F., Ballerini, P., Garrido, C., Quéré, R. (2024). Valrubicin-loaded

immunoliposomes for specific vesicle-mediated cell death in the treatment of hematological cancers. *Cell Death Dis* 15(5):328 <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06715-5>.

26. Bhattacharya, B., Mukherjee, S. (2015). Cancer Therapy Using Antibiotics. *J Cancer Ther.* 06(10):849–858. doi: 10.4236/jct.2015.610093.
27. Shah, S., Chib, R., Raut, S., Bermudez, J., Sabnis, N., Duggal, D., Kimball, J.D., Lacko, A.G., Gryczynski, S., Gryczynski, I. (2016). Photophysical characterization of anticancer drug valrubicin in rHDL nanoparticles and its use as an imaging agent. *J Photochem Photobiol* 155:60-65. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.12.007.
28. Gallaga-González, U., Morales-Avila, E., Torres-García, E., Estrada, J. A., Díaz-Sánchez, L.E., Izquierdo, G., Aranda-Lara, L., Isaac-Olive, K. (2022). Photoactivation of Chemotherapeutic Agents with Cerenkov Radiation for Chemo-Photodynamic Therapy..*ACS Omega* 7(27):23591-23604. doi: 10.1021/acsomega.2c02153.
29. Li, R., Du, Y., Guo, W., Su, Y., Meng, Y., Shan, Z., Feng, Y. (2020). Methotrexate coated AZA-BODIPY nanoparticles for chemotherapy photothermal and photodynamic synergistic therapy. *Dyes and Pigments* 179:108351 <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108351>.
30. Ruggiero, E., Alonso-De Castro, S., Habtemariam, A., Salassa, L. (2016). Upconverting nanoparticles for the near infrared photoactivation of transition metal complexes: New opportunities and challenges in medicinal inorganic photochemistry. *Dalton Trans.*45(33):13012–20. doi: 10.1039/c6dt01428c.
31. Di, X., Bright, A.T., Bellott, R., Gaskins, E., Robert, J., Holt, S., Gewirtz, D., Elmore, L. (2008). A chemotherapy-associated senescence bystander effect in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 7(6):864–72. doi: 10.4161/cbt.7.6.5861.
32. Elbehery, N.H.A., Amr, A, E, G, E., Kamel, A.H., Elsayed, E.A., Hassan, S. S. M. (2019). Novel potentiometric 2,6-Dichlorophenolindophenolate (DCPIP) membrane-based sensors: Assessment of their input in the determination of total phenolics and ascorbic acid in beverages. *Sensors* 19(9):2058; <https://doi.org/10.3390/s19092058>.
33. Entradas, T., Waldrona, S., Volka, M. (2020). The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *J Photochem Photobiol. B: Biology* 204: 111787 <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>
34. Vankayala, R., Lin, C.C., Kalluru, P., Chiang, C.S., Hwang, K.C. (2014). Gold nanoshells-mediated bimodal photodynamic and photothermal cancer treatment using ultra-low doses of near infra-red light. *Biomaterials* 35(21):5527-38. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.065.
35. Wang, Y., Gao, F., Jiang, X., Zhao, X., Wang, Y., Kuai, Q., Nie, G., He, m., Pan, Y.J., Shi, W., Ren, S., Yuet, q. (2019). Co-delivery of gemcitabine and Mcl-1 SiRNA via cationic liposome-based system enhances the efficacy of chemotherapy in pancreatic cancer. *J Biomed Nanotechnol.* 15(5):966–78. doi: 10.1166/jbn.2019.2762. al.

36. Butowska K., Han, X., Gong, N., El-Mayta, R., Haley, R.M., Xue L, Zhong, W.Q., Guo, W., Wang, K., Mitchell, M.J. (2023). Doxorubicin-conjugated siRNA lipid nanoparticles for combination cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 13(4):1429–37. doi: 10.1016/j.apsb.2022.07.011.
37. Zhang, C., Zhao, Y., Zhang, E., Jiang, M., Zhi, D., Chen, H., Cui, S., Zhen, Y., Cui, J., Zhang, S. (2020) Co-delivery of paclitaxel and anti-VEGF siRNA by tripeptide lipid nanoparticle to enhance the anti-tumor activity for lung cancer therapy. *Drug Deliv*. 27(1):1397–411. doi: 10.1080/10717544.2020.1827085.
38. Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Gezgin, S., Dinh, T. (2016) The simultaneous delivery of paclitaxel and Herceptin® using solid lipid nanoparticles: In vitro evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol*. 35:98–105. doi: 10.1016/j.jddst.2016.06.010.
39. Nikanjam, M., Gibbs, A.R., Hunt, C.A., Budinger, T.F., Forte, T.M. (2007). Synthetic nano-LDL with paclitaxel oleate as a targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. *J Control Release*. 124(3):163-171. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.09.007.
40. Wojtanik, K.M., Liscum, L. (2003). The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *J Biol Chem* 278(17):14850-14856. doi: 10.1074/jbc.M300488200.
41. Marotta, D.E., Cao, W., Wileyto, E.P., Li, H., Corbin, I., Rickter, E., Glickson, J.D., Chance, B., Zheng, G., Busch, T.M. (2011). Evaluation of bacteriochlorophyll-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles for photodynamic therapy efficacy in vivo. *Nanomedicine (Lond)*. 6(3): 475–487. doi:10.2217/nnm.11.8.
42. Zhu, Q-ling., Zhou, Y., Guan, M., Zhou, X. F., Yang, S-di., Liu, Y., Chen, W-L., Zhang, C-g., Yuan, Z-q., Liu, C., Zhu, A-j., Zhang, X-n. (2014). Low-density lipoprotein-coupled N-succinyl chitosan nanoparticles co-delivering siRNA and doxorubicin for hepatocyte-targeted therapy. *Biomaterials*. 35(22):5965–5976. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.088.
43. Setten, R.L., Rossi, J.J., Han, S-P. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 18(6):421-446. doi: 10.1038/s41573-019-0017-4.
44. Akinc, A., Maier, M.A., Manoharan, M., Fitzgerald, K., Jayaraman, M., Barros, S., Ansell, S., Du, X., Hope, M.J., Madden, T.D., Mui, B.L., Semple, S.C., Tam, Y.K., Ciufolini, M., Witzigmann, D., Kulkarni, J.A., van der Meel, R., Cullis, P.R. (2019). The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol* 14(12):1084-1087. doi: 10.1038/s41565-019-0591-y.
45. U.S. FDA website (2023). Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/> (Accessed 14 Sept 2023).
46. Sander, F. G., Frishberg, Y., Hulton, S.A., Koren, M.J., O’Riordan, W.D., Cochat, P., Deschênes, G., et al., (2021) Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1 *New Engl J Med* 384 (13):1216-1226 doi: 10.1056/NEJMoa2021712.
47. Lamb, Y.N. (2021). Inclisiran: First Approval. *Drugs* .81(3):389-395. doi: 10.1007/s40265-021-01473-6.

48. Novo Nordisk website (2023). Product information: Rivfloza™ (Nedosiran). <https://www.novonordisk.com/> (Accessed 14 Sept 2023).
49. Martínez-Oliván, J., Arias-Moreno, X., Velazquez-Campoy, A., Millet, O., Sancho, J. (2014). LDL receptor/lipoprotein recognition: endosomal weakening of ApoB and ApoE binding to the convex face of the LR5 repeat. *FEBS Journal* 281: 1534–1546 doi: 10.1111/febs.12721.
50. Leung, K. (2012). 99mTc-Hydrazinonicotinyl(tricine)(TPPTS)-Glu-c(RGDyK)-bombesin [7-14]NH₂. En: *Base de Datos de Imágenes Moleculares y Agentes de Contraste (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): Centro Nacional de Información Biotecnológica (EE. UU.): 2004-2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK110069/>.
51. Zhang, Y., Sharan, S., Rinnan, Å, Orlén, V. (2021). Survey on methods for investigating protein functionality and related molecular characteristics. *Foods* 10(11):2848. doi: 10.3390/alimentos10112848.
52. Paredes-Hernández, U., Aguilar-Peña, L.V., Isaac-Olivé, K., Ocampo-García, B., Contreras, I., Estrada, J.A., Izquierdo, G., Morales-Avila, E., Aranda-Lara, L. (2025). Enhancing photodynamic and radionuclide therapy by small interfering RNA (siRNA)-RAD51 transfection via self-emulsifying delivery systems (SNEDDS). *Cytotherapy* 27(1):66-77. doi: 10.1016/j.jcyt.2024.08.003.
53. Srinivas, C., Kumaresan, M. (2011). Lasers for vascular lesions: Standard guidelines of care. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 77(3):3493–68. doi: 10.4103/0378-6323.79728.
54. Kauffman, M.K., Zhu, H., Jia, Z., Li, R.Y. (2016). Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. *React Oxyg Species (Apex)*. 2(6): 432–439. doi:10.20455/ros.2016.873.
55. Almer, G., Mangge, H., Zimmer, A., Prassl, R. (2015). Lipoprotein-related and apolipoprotein-mediated delivery systems for drug targeting and imaging. *Curr. Med. Chem* 22(31):3631–3651. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150716114625>.
56. He, B., Yang, Q. (2022). Recent Development of LDL-Based Nanoparticles for Cancer Therapy. *Pharmaceuticals (Basilea)* 16(1):18. doi: 10.3390/ph16010018.
57. Ziegelberger, G. (2013). ICNIRP guidelines on limits of exposure to incoherent visible and infrared radiation. *Health Physics*. 105(1): 74–96. doi: 10.1097/HP.0b013e318289a611.
58. Bianchini, B.H.S., Martelossi-Cebinelli, g., Carneiro, J.A., Rasquel-Oliveira, F.C., Casagrande, R., Verri, W.a. (2025). Superoxide Anion Generation, Its Pathological Cellular and Molecular Roles and Pharmacological Targeting in Inflammatory Pain: Lessons from the Potassium Superoxide Model. *Furute Pharmacol.* 5 (4), 60; <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol5040060>.
59. 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. *J Photochem Photobiol A Chem.* 400:113131 <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113131>.

60. Wang Z, Zhan M, Li W, Chu C, Xing D, Lu S, Long, H.X. (2021). Photoacoustic Cavitation-Ignited Reactive Oxygen Species to Amplify Peroxynitrite Burst by Photosensitization-Free Polymeric Nanocapsules. *Angew Chem Int Ed Engl*.60(9):4720-4731. doi: 10.1002/anie.202013301.
61. Tanaka, M., Hasegawa, M., Yoshimoto, N., Hoshikawa, K., Mukaia, T. (2019). Preparation of Lipid Nanodisks Containing Apolipoprotein E-Derived Synthetic Peptides for Biocompatible Delivery Vehicles Targeting Low-Density Lipoprotein Receptor. *Biol. Pharm. Bull.* 42 (8):1376–1383 doi: 10.1248/bpb. b19-00287.
62. Darvishi, M.H., Allahverdi, A., Hashemzadeh, H., Javadi, H.R. (2022). Investigation of the ionic conditions in siRNA-mediated delivery through its carriers in the cell membrane: a molecular dynamic simulation. *Sci Rep* 12(1):17520. doi: 10.1038/s41598-022-22509-1.
63. Dai, L., Li, S., Hao, Q., Zhou, R., Zhou, H., Lei, W., Kang, H., Wu, H., Li, Y., Ma, X. (2023). Low-density lipoprotein: a versatile nanoscale platform for targeted delivery. *Nanoscale Adv* 24;5(4):1011–1022. doi: 10.1039/d2na00883a.
64. McMillan, C., Druschitz, A., Rumbelow, S., Borah, a., Binici, b., Rattray, Z., Perrie, Y. (2024). Tailoring lipid nanoparticle dimensions through manufacturing processes. *RSC Pharm.* 1(4):841-853. doi: 10.1039/d4pm00128a.
65. Benítez-Amaro, A., Pallara C., Nasarre, L., Rivas, A., Benítez, S., Veja, A., Bornachea, O., Gonzalo-Calvo, D., Serra-Mir, G., Villegas, S., Prades, R., Sánchez-Quesada, J., ChivC., Sabido, E.,Tarrago, T., Llorente-Cortés, V. (2019). Molecular basis for the protective effects of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-derived peptides against LDL aggregation. *Biochim Biophys Acta (BBA) Biomembranes* 1861(7):1302-1316. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.05.003.
66. Sei, Y.J., Ahn, J., Kim, T., Shin, E., Santiago-Lopez, A.J., Jang, S.S., Jeon, N.L., Jang, Y.C., Kim, Y.T. (2018). Detecting the functional complexities between high-density lipoprotein mimetics. *Biomaterials* 170:58-69. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.011.
67. Ruvinov, E., Kryukov, O., Forti, E., Korin, E., Goldstein, M., Cohen, S. (2015). Calcium–siRNA nanocomplexes: What reversibility is all about. *J Control Release* 203: 150-160 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.029>.
68. Reyna-Lázaro L, Morales-Becerril A, Aranda-Lara L, Isaac-Olivé K, Ocampo-García B, Gibbens-Bandala B, Olea-Mejía, O., Morales-Avila, E. (2024). Pharmaceutical Nanoplatfoms Based on Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems for Optimal Transport and Co-delivery of siRNAs and Anticancer Drugs. *J Pharm Sci.*113(7):1907–1918. doi: 10.1016/j.xphs.2024.02.017.
69. Zhang, W., Taheri-Ledari, R., Ganjali, F., Mirmohammadi, S.S., Qazi,F.S., Saeidirad, M., KashtiAray, A., Zarei-Shokat, S.,Tianc, Y., Maleket, A. (2023). Effects of morphology and size of nanoscale drug carriers on cellular uptake and internalization process: a review. *RSC Advances* 13(1): 80-114 <https://doi.org/10.1039/D2RA06888E>.
70. Blacklow, S.C. (2007). Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins advances and frontiers. *Curr Opin Struct Biol.* 17(4): 419–426. doi: 10.1016/j.sbi.2007.08.017.

- 71 Heeren, J., Scheja, L. (2021) Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Mol Metabol* 50: 101238. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101238.

Anexos

Anexo 1. Hoja de recepción de artículo de investigación en revista

Material Letters

Materials Letters

Photochemical characterization of valrubicin as a precursor of singlet oxygen under continuous-wave 532 nm laser irradiation.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Short Communication
Keywords:	ROS; PDT; ABMA; DCPIP; singlet oxygen; valrubicin
Corresponding Author:	Maydelid Trujillo-Nolasco Universidad Autónoma del Estado de México MEXICO
First Author:	Hansel Torres-Velázquez
Order of Authors:	Hansel Torres-Velázquez
	Maydelid Trujillo-Nolasco
	Liliana Aranda-Lara
	Eugenio Torres-García
	Rigoberto Oros-Pantoja
	Keila Isaac-Olivé
Abstract:	Valrubicin produces $^1O_2$ when irradiated with a 532 nm continuous-wave laser at pp of 28.6 W/cm ² . Such irradiation showed to be safe when evaluated in an ex-vivo soft tissue model. Potentially, VAL could be useful for photodynamic therapy.

Anexo 2. Correo de acuse de artículo de investigación de revista Material Letters

Please verify your contribution to Photochemical characterization of valrubicin as a precursor of singlet ox...



Para Hansel Torres Velazquez



Responder

Responder a todos

Reenviar



lunes 20/10/2025 10:26 a. m.

Esta es la versión más reciente, aunque ha realizado cambios en otra copia. Haga clic aquí para ver el resto de versiones.

Mensaje reenviado el 20/10/2025 12:30 p. m..

Haga clic aquí para descargar imágenes. Para ayudarle a proteger su confidencialidad, Outlook ha impedido la descarga automática de algunas imágenes en este mensaje.

This is an automated message.

Journal: Materials Letters

Title: Photochemical characterization of valrubicin as a precursor of singlet oxygen under continuous-wave 532 nm laser irradiation.

Corresponding Author: Dra. Maydelid Trujillo-Nolasco

Co-Authors: Hansel Torres-Velázquez; Liliana Aranda-Lara; Eugenio Torres-García; Rigoberto Oros-Pantoja; Keila Isaac-Olivé

Manuscript Number: **MLBLUE-D-25-05058**

Dear Hansel Torres-Velázquez,

The corresponding author Dra. Maydelid Trujillo-Nolasco has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Materials Letters.

Submission Title: Photochemical characterization of valrubicin as a precursor of singlet oxygen under continuous-wave 532 nm laser irradiation.

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: [Yes, I am affiliated.](#)

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into a publishing agreement with Elsevier on my behalf, in the relevant form set out at <http://www.elsevier.com/copyright>; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant a license of rights to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. I understand that as the author I will have additional rights to reuse my work as set out at <http://www.elsevier.com/copyright>. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at rmtrujillon@uaemex.mx.

Thank you,
Materials Letters

More information and support

FAQ: What is copyright co-author verification?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial+manager/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

#AU_MLBLUE#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. [Remove my information/details](#). Please contact the publication office if you have any questions.

