



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias de la Conducta

**Nanocápsulas de lipoproteínas de alta densidad
marcadas con ^{177}Lu y cargadas con
doxorubicina para terapia multimodal de
tumores que sobreexpresan receptores SR-B1.**

TESIS

Para Obtener el Grado de:

Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C.S. Hilda Angeline Quintos Meneses

No. Cuenta: 0212526

Comité Tutorial:

Tutora Académica: Dra. Keila Isaac Olivé

Tutora Interna: Dra. Ninfa Ramírez Durán.

Tutora Externa: Dra. Myrna Alejandra Luna Gutiérrez.



Toluca, Estado de México, Febrero 2022.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”

-Marie Curie-

Agradecimientos.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (CONACYT-LANIDER).

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), Doctorado en Ciencias de la Salud.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca para estudios de posgrado.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	12
Introducción	14
1. Antecedentes	14
1.1. Lipoproteínas: Definición, función, estructura y clasificación.	14
1.2. Lipoproteínas de alta densidad (HDL): Origen y funciones	15
1.3. Receptor SR-B1: características y su sobreexpresión.	17
1.4. Nanocápsulas y su aplicación en células tumorales.	19
1.5. Nanocápsulas de rHDL dirigidas al receptor SR-B1 expresado en células tumorales.	22
1.6. Doxorubicina: Generalidades y cardiotoxicidad	23
1.7. Mecanismos de citotoxicidad de la doxorubicina.	26
1.8. Doxorubicina y su conjugación con nanocápsulas de rHDL.	28
1.9. Radiofármacos: Generalidades y uso como agentes teranósticos.	30
1.10. Lutecio-177 (¹⁷⁷ Lu).	31
1.11. Terapia fotodinámica y efecto Cerenkov con radionúclidos.	33
2. Planteamiento del problema	37
2.1. Pregunta de Investigación.	37
3. Justificación	38
4. Hipótesis	39
4.1. Hipótesis de trabajo.	39
5. Objetivos	39
5.1. Objetivo general.	39
5.2. Objetivos específicos.	39
6. Diseño metodológico	39
6.1. Diseño del estudio.	39
6.2. Universo y Muestra.	40
6.3. Criterios de inclusión y exclusión	41
6.3.1. Criterios de inclusión.	41
6.3.2. Criterios de exclusión	41
6.4. Variables del estudio.	41
6.4.1. Variables independientes.	41
6.4.2. Variables dependientes.	41
6.4.3. Variables intervinientes.	41
6.5. Procedimientos	42

6.5.1. Estudio de las propiedades fotosensibilizadoras de la DOX al irradiar con láser y CR.....	42
6.5.1.1 Determinación del coeficiente de extinción molar de DOX.....	42
6.5.1.2. Irradiación con luz láser de 450 nm y registro por espectrofotometría UV-Vis.....	42
6.5.1.3. Irradiación con luz Cerenkov proveniente de ¹⁸ F-FDG y espectrofotometría UV-Vis.	43
6.5.1.4. Estudios <i>in vitro</i>	44
6.5.1.5. Determinación del índice de combinación DOX / ¹⁸ F-FDG.....	45
6.5.2. Obtención de las nanocápsulas de rHDL/DOX/ ¹⁷⁷ Lu y determinación de sus propiedades como posibles agentes para terapia multimodal.....	45
6.5.2.1. Cuantificación relativa de la expresión del receptor SR-B1.....	45
6.5.3. Preparación general de las nanocápsulas y liposomas.....	46
6.5.3.1. Preparación de nanocápsulas de rHDL.....	46
6.5.3.2. Preparación de los liposomas.	47
6.5.4. Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas.....	48
6.5.4.1. Caracterización por espectrofotometría UV-Vis.	48
6.5.4.2. Tamaño por dispersión dinámica de luz (DLS).....	48
6.5.4.3. Tamaño por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	48
6.5.4.4. Estabilidad de las suspensiones coloidales de las nanocápsulas	48
6.5.4.5. Eficiencia de carga de las nanocápsulas de rHDL/DOX.	49
6.5.5. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto fotodinámico de rHDL/DOX en células T47D.	49
6.5.5.1. Variación del tiempo de irradiación a concentración constante de nanocápsulas rHDL/DOX	49
6.5.5.2. Variación de la concentración de rHDL/DOX para un tiempo de irradiación constante.	50
6.5.5.3. Captación celular de nanocápsulas rHDL/DOX y evaluación intracelular de ROS.....	50
6.5.6. Preparación del complejo ¹⁷⁷ Lu-p-SCN-Bn-DOTA (¹⁷⁷ Lu-DOTA).	51
6.5.7. Radiomarcado de nanocápsulas rHDL/DOX, rHDL y liposomas con ¹⁷⁷ Lu.....	52
6.5.8. Experimentos <i>in vitro</i> con las nanocápsulas.....	53
6.5.8.1. Captación celular de rHDL/DOX/ ¹⁷⁷ Lu, rHDL/ ¹⁷⁷ Lu y liposomas / ¹⁷⁷ Lu.	53
6.5.8.2. Evaluación de la saturación.	54
6.5.8.3. Evaluación de citotoxicidad.	54
6.5.9. Biodistribución <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	56
6.5.9.1. Biodistribución <i>in vivo</i> de rHDL/RB/ ¹⁷⁷ Lu en ratones sanos.	56
6.5.9.2. Biodistribución <i>ex vivo</i> de rHDL/DOX/ ¹⁷⁷ Lu en ratones con tumor inducido.	56
6.6. Análisis de datos	57
6.7. Aspecto ético e implicaciones bioéticas.	57

7. Resultados	58
7.1. Artículos publicados.....	58
7.2. Títulos de los artículos publicados.....	58
7.3. Página frontal del Primer Artículo.....	59
7.4. Página frontal del Segundo Artículo.....	60
8. Discusión General	61
9. Conclusiones Generales	70
10. Referencias	72
11. Anexos	84
11.1. Metodología General.....	84
11.2. Nomenclatura por orden alfabético.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una lipoproteína.....	14
Figura 2. Transporte Inverso de colesterol.....	16
Figura 3. Tipos de nanosistemas.....	21
Figura 4. Estructura química de la Doxorubicina y su metabolito Doxorubicinol.....	24
Figura 5. Mecanismos de citotoxicidad de la DOX.....	27
Figura 6. Propiedades radiactivas de ¹⁷⁷ Lu.....	32
Figura 7. Funcionamiento de la Terapia Fotodinámica.....	33
Figura 8. Diagrama de Jablonsky.....	34
Figura 9. Terapia Fotodinámica usando ¹⁸ F como fuente de excitación (efecto Cerenkov) y doxorubicina como fluoróforo.....	36
Figura 10. Líneas celulares empleadas obtenidas de ATCC.....	40
Figura 11. Nanocápsulas simples.....	46
Figura 12. Tipos de nanocápsulas obtenidas.....	53

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimiento para los estudios <i>in vitro</i> con T47D.....	44
Esquema 2. Procedimiento general del estudio.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones estándar preparadas para obtener el coeficiente de extinción molar de la DOX.....	42
Tabla 2. Soluciones irradiadas con láser de 450 nm.....	43
Tabla 3. Soluciones irradiadas con luz Cerenkov proveniente del ¹⁸ F-FDG.....	43
Tabla 4. Descripción de los experimentos de evaluación de la citotoxicidad de los sistemas preparados.....	55
Tabla 5. Efecto citotóxico <i>in vitro</i> en células T47D.....	63

Nanocápsulas de lipoproteínas de alta densidad marcadas con ^{177}Lu y cargadas con doxorubicina para terapia multimodal de tumores que sobreexpresan receptores SR-B1

Resumen.

La doxorubicina (DOX) es uno de los medicamentos más eficaces para el tratamiento de neoplasias sólidas y hematológicas. Sin embargo, al igual que otros quimiofármacos, provoca efectos adversos en la mayoría de los pacientes debido a su baja especificidad por las células tumorales, lo que induce severa toxicidad en diferentes órganos, en particular el corazón. Una de las líneas actuales de investigación sobre el cáncer se enfoca en el desarrollo de nuevos productos terapéuticos, que interactúen a escala molecular o celular, para diagnosticar, prevenir y tratar la enfermedad. Muchos de estos productos, como las nanocápsulas, emplean terapias combinadas para generar una sinergia positiva mayor a la suma de los tratamientos separados, con menor toxicidad y mayor eficacia.

Las células tumorales, tienen una alta demanda de colesterol y ésteres de colesterol para mantener la integridad y proliferación de la membrana celular, por lo que sobreexpresan el receptor SR-B1, encargado de internalizar el colesterol contenido en la lipoproteína de alta densidad (HDL) mediante el transporte inverso de colesterol.

La presente tesis se centra en el desarrollo de nanocápsulas para el transporte de DOX basadas en HDL reconstituidas (rHDL) a partir de lípidos sintéticos. Similar a la HDL endógena, estas nanocápsulas de rHDL se dirigen de manera específica al receptor SR-B1 lo que permite disminuir los efectos secundarios de la DOX. Se decidió utilizar la capacidad de carga multimodal de la rHDL para preparar nanocápsulas de rHDL/DOX cargadas con lutecio-177 (^{177}Lu). Este radionúclido emite radiación β^- y γ por lo que además de su excelente efecto radiotóxico permite adquirir imágenes *in vivo* del sitio en que se acumula (radionúclido teranóstico). Como todo emisor β^- , cuando el ^{177}Lu se encuentra en un medio dieléctrico como el tejido, produce radiación Cerenkov (CR por sus siglas en inglés *Cerenkov Radiation*) capaz de fotosensibilizar la DOX. De esta forma, se puede utilizar también como fuente de luz en terapia fotodinámica (TFD) y obtener un sistema teranóstico multimodal *quimioterapia-radioterapia-TFD* cuyo sitio de acumulación se puede visualizar mediante imagen óptica o nuclear.

Los resultados obtenidos indican que las nanocápsulas de rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu tienen un gran potencial para aplicar terapia multimodal ya que mantienen el reconocimiento específico por los receptores SR-B1 presentes en células tumorales, permiten disminuir la dosificación de DOX (lo que induce menor cardiotoxicidad), y muestran un efecto terapéutico superior a la aplicación de los tratamientos por separado.

Palabras clave:

Nanocápsulas, lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL), receptor SR-B1, ¹⁷⁷Lu, doxorubicina, teranóstico, multimodal, radiotóxico, fotodinámico, cardiotoxicidad.

1.2. Lipoproteínas de alta densidad (HDL): Origen y funciones.

Entre las lipoproteínas plasmáticas, las HDL son las de menor tamaño (entre 5 y 12 nm) y mayor densidad (entre 1.063 y 1.121 g/mL) (Sathyajith y Pharm, 2018). Sus funciones son diversas, entre ellas (Rothblat y Phillips, 2010):

- a) Mantener la integridad de la célula endotelial y el fortalecimiento de mecanismos reparadores: Estimular la presencia y migración de células sanas al endotelio dañado.
- b) Antioxidante: Inhibe la oxidación de las LDL.
- c) Antiinflamatoria: Reduce la sobreexpresión de los receptores endoteliales. Mediante inducción de inflamación local de conejos, Nicholls *et al.* (2005) demostraron que una mezcla de rHDL y ApoA-I reducía la infiltración leucocitaria en la íntima arterial debido a la inhibición de la expresión endotelial de receptores como VCAM-1 e ICAM-1.
- d) Antiapoptótica: Inhibe los estímulos de LDL oxidadas y TNF- α sobre células endoteliales para producir apoptosis.
- e) Promoción de la función endotelial: Induce la expresión de la enzima eNOS, lo que reduce el estrés oxidativo endotelial, favorece la relajación arterial y las propiedades antioxidantes, antitrombóticas y antiinflamatorias.

Cabe destacar que cualquier alteración en la estructura o composición de la HDL, produce cambios en su funcionalidad. Carnuta *et al.* (2017) identificaron HDL maduras disfuncionales en pacientes con enfermedades arteriales coronarias. Estos pacientes mostraban un aumento y sobreexpresión de mieloperoxidasa, ApoC-III, así como modificación oxidativa de ApoA-I.

Una de las funciones principales de la HDL, es el llamado “Transporte Inverso de Colesterol” (Figura 2) que consiste en la captación del colesterol excedente desde los tejidos periféricos y su traslado al hígado (hepatocito) para su eliminación, reciclaje o catabolismo a ácidos biliares (Lacko *et al.*, 2015; März *et al.*, 2017).

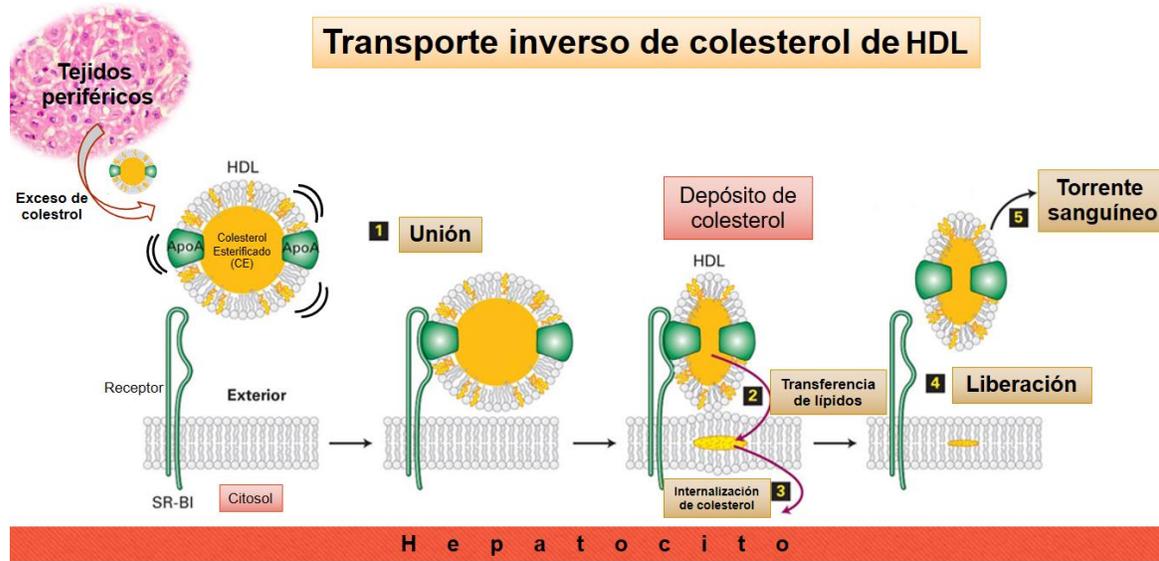


Figura 2. Transporte inverso de colesterol. La HDL capta el exceso de colesterol libre de los tejidos periféricos, lo esterifica en el plasma y lo transporta al hígado. El depósito e internalización del colesterol en el hepatocito para su posterior eliminación se produce a partir de su unión al receptor SR-B1 (1,2,3). Finalmente, la HDL vacía se libera por el receptor (4) y regresa al torrente sanguíneo para reiniciar el proceso (5) (Modificado de Lacko *et al.*, 2015, basado en el artículo de Counsell y Pohland, 1982).

La HDL se produce en el organismo a partir de la apolipoproteína A-1 (ApoA-1). El hígado produce aproximadamente el 70% de la ApoA-1 y el intestino el 30% restante. La ApoA-1, principal proteína de HDL, está constituida por 243 aminoácidos (peso molecular 28 kDa). Su función radica en servir de estructura de andamiaje para lípidos y, además, proporciona la interacción con otras enzimas plasmáticas tales como mieloperoxidasa, LCAT, PON1 y CETP. Los principales componentes lipídicos de la HDL son fosfatidilcolina y esfingomielina (März *et al.*, 2017).

La ApoA-I es una proteína pobre en lípidos. Adquiere fosfolípidos y colesterol no esterificado gracias a la proteína transportadora ABCA1 presente en el hígado y el intestino. Cuando la ApoA-1 adquiere nuevos componentes, se origina una partícula discoidal denominada HDL naciente, también conocida como pre β -HDL (peso molecular 60-85 kDa) (Woudberg *et al.*, 2018). El estado de la ApoA-I pobre en lípidos es compacto, plegado y sin una estructura terciaria bien definida. Cuando se une a los lípidos adopta una estructura más ordenada de α hélices. La capacidad de la ApoA-I para “encogerse” o “estirarse” y unir lípidos es crítica para la formación de la partícula pre β -HDL, así como también para la remodelación continua de la HDL madura durante su vida media (Carvajal Carvajal, 2019).

En el plasma la pre β -HDL forma partículas esféricas y de mayor tamaño denominadas HDL maduras; éstas son heterogéneas, pues tienen subfracciones (HDL₃ y HDL₂) de diferente densidad y tamaño que contienen entre dos y siete moléculas de ApoA-I (Woudberg *et al.*, 2018), aunque el modelo más aceptado es que contiene dos moléculas de ApoA-1 alineadas de forma antiparalela y estabilizadas mediante enlaces iónicos. La maduración de la HDL se realiza mediante un proceso de lipidación, específicamente de colesterol, que se lleva a cabo por la enzima LCAT (del inglés “*Lecithin-Cholesterol Acyltransferase*”) que esterifica el colesterol presente en la partícula naciente por la acción de la proteína transportadora ABCG1 y el receptor SR-B1 (Carvajal Carvajal, 2019).

Estudios realizados por Rothblat y Phillips (2010) y respaldados por Farbstein y Levy (2012), señalan que existen preferencias de los receptores por su partícula blanco. ABCA1 acepta principalmente a la pre β -HDL, ABCG1 no tiene predilección entre HDL₂ y HDL₃, y SR-B1, al parecer, prefiere más la HDL₂ que la HDL₃.

1.3. Receptor SR-B1: características y su sobreexpresión.

El receptor SR-B1 (del inglés “*Scavenger Receptor class B type I*”) pertenece a la superfamilia de receptores “*scavenger*”, formada por glucoproteínas integrales de membrana. Está compuesto por 509 aminoácidos y tiene un peso molecular predicho de 56,9 kDa, aunque debido a modificaciones postraduccionales, se detecta generalmente como una proteína con peso molecular de 82-85 kDa (Acton *et al.*, 1994). Tiene dos dominios intracelulares cortos en los extremos N- (aa 1-11) y C-terminal (aa 462-509) de la proteína, así como dos dominios transmembrana (aa 12-32 y 441-461).

La mayor parte del SR-B1 se encuentra extracelularmente como un ectodominio anfipático de hélice α , que es el responsable de su unión con la HDL madura (Connelly *et al.*, 1999). Su gen codificante en humanos es el SCARB1. En los mamíferos el SR-B1 se expresa en muchos tejidos y tipos de células como intestino, células endoteliales, músculo liso, queratinocitos, adipocitos, placenta e incluso macrófagos (Shen *et al.*, 2014). Su principal función radica en conectar la HDL y las células donde se expresa, particularmente en el hígado. A nivel de la membrana plasmática el receptor SR-B1 capta a la HDL madura que contiene colesterol (libre o esterificado) y le facilita su “descarga” pasiva sin alterar sus componentes proteicos (Shen *et al.*, 2018). Las partículas de HDL más grandes tienen mejor unión y mayor entrega selectiva de colesterol, lo que demuestra que las alteraciones en

la conformación de la superficie de HDL influyen en su capacidad para interactuar con el SR-B1. (Thuahnai *et al.*, 2004).

Se ha comprobado que el SR-B1 se sobreexpresa en diversas líneas celulares de cáncer (Li *et al.*, 2016). Un análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa realizado por Shahzad *et al.* (2011), comparó muestras de cáncer con muestras de tejidos normales, demostrando un aumento considerable de la expresión de SR-B1 en la mayoría de las muestras tumorales de cáncer de mama, ovario, colorrectal y pancreático. Tal resultado coincide con la idea de Rigotti *et al.* (2003), quienes habían señalado que la sobreexpresión del SR-B1 le permite a las células cancerosas reconocer a la HDL. Posteriormente, Schörghofer *et al.* (2015) demostraron que la alta expresión de SR-B1 estaba asociada con el cáncer de próstata, y que el tiempo de supervivencia libre de enfermedad se reducía en pacientes con altos niveles intratumorales de SR-B1.

Asimismo, se ha demostrado que la expresión anormal de SR-B1 está asociada con mayor riesgo, progresión y menor supervivencia en pacientes con cáncer de próstata y mama (Gutierrez-Pajares *et al.*, 2016). Estudios realizados por Cao *et al.* (2004) y apoyados posteriormente por Yuan *et al.* (2016) en pacientes con cáncer de mama, mostraron también que la sobreexpresión de SR-B1 está asociada con un mayor riesgo de cáncer de mama, mayor agresividad y tamaño del tumor, metástasis en los ganglios linfáticos y ausencia de receptores de estrógenos. Derivado de estos ejemplos, se ha considerado el uso potencial del SR-B1 como un biomarcador para el diagnóstico, así como para desarrollar inhibidores en condiciones específicas de cáncer (Zheng *et al.*, 2013).

SR-B1 puede promover la progresión tumoral a través de tres mecanismos diferentes:

El primer mecanismo se basa en su papel directo como transportador de lípidos. Al aumentar el colesterol tumoral y el contenido de lípidos, contribuye a la nutrición y el crecimiento del tumor (Zhuang *et al.*, 2005; Baranova *et al.*, 2016).

El segundo mecanismo se basa en la capacidad de SR-B1 para desencadenar una cascada de señalización intracelular que conduce a una mayor proliferación de células tumorales. En este sentido, la activación de la vía PI3K / AKT por los ligandos SR-B1 proporciona una señal de supervivencia esencial para las células tumorales (Baranova *et al.*, 2016; Danilo *et al.*, 2013).

Un tercer mecanismo de SR-B1 para promover el crecimiento tumoral es la inhibición de la inflamación aguda, debido a que ha sido implicado en varios procesos de apoptosis, sepsis, la unión e internalización de proteínas y patógenos endógenos y, en la mayoría de los casos, su vía de señalización está asociada con respuesta antiinflamatoria (Murphy *et al.*, 2008; Umemoto *et al.*, 2013). En el estado estacionario, la interacción de HDL con SR-B1 inhibe la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales que activan la óxido nítrico sintasa (Wei *et al.*, 2019). Durante las infecciones, los microorganismos aprovechan esta actividad antiinflamatoria de SR-B1 usándola como correceptor en procesos de internalización multimolecular (Pfeiler *et al.*, 2016; Vasquez *et al.*, 2017).

1.4. Nanocápsulas y su aplicación en células tumorales.

El cáncer es una de las principales causas de muerte y una barrera importante en la esperanza de vida a nivel mundial. Las estimaciones de incidencia y mortalidad de GLOBOCAN (2020) realizadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, indican que en el año 2020 se produjeron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10,0 millones de muertes por la enfermedad; se espera que para el año 2040 la incidencia mundial del cáncer sea de 30,2 millones de casos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como una enfermedad caracterizada por un crecimiento y diseminación incontrolada de células que puede afectar a cualquier parte del organismo (metástasis); involucra una serie de interacciones como factores genéticos y factores externos (carcinógenos) de tipo físicos, químicos o biológicos (Floor *et al.*, 2012).

Se ha definido a la nanomedicina como una nueva disciplina médica, cuyo objetivo, según la organización “The European Science Foundation”, radica en el desarrollo de herramientas nanotecnológicas para el estudio, diseño, creación, manipulación, síntesis y aplicación de materiales, a nanoescala necesarios para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades tales como el cáncer, ofreciendo así posibilidades novedosas de curación, mejorar la calidad de vida y promover el desarrollo humano (Misra *et al.*, 2010; Duncan y Gaspar, 2011; Urrejola *et al.*, 2018).

Las nanocápsulas (del latín *nanus* (enano): mil millonésima parte de 1 metro) son estructuras capaces de interactuar a escala molecular o celular que pueden dirigirse de manera específica a los tejidos y

órganos enfermos, sin dañar las células sanas circundantes. De esta manera, se disminuyen los efectos secundarios adversos de los tratamientos actuales (Mallakpour y Behranvand, 2016).

Las nanocápsulas se emplean con 3 objetivos principales:

1. Liberación de fármacos e ingeniería de tejidos: Las nanocápsulas pueden incorporar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos y son capaces de liberarlos de manera controlada. Transportan el fármaco hasta el tejido, órgano o zona dañada y, únicamente cuando reconocen esta zona por los receptores presentes, liberan el fármaco como respuesta a un cierto estímulo. Para lograrlo, se encapsula el fármaco en el nanosistema y de esta manera, se evita su captación por los macrófagos antes de que alcance la zona afectada y genere una respuesta inmune contraproducente para el organismo (Urrejola *et al.*, 2018). Una vez que el nanosistema cargado con el fármaco llega a su destino, para alcanzar la efectividad deseada debe liberarlo a una velocidad apropiada y controlada la cual se determina: (a) Mediante el estudio de condiciones en la zona dañada (pH, temperatura, etc), o (b) Mediante el establecimiento preciso de la velocidad de degradación del material encapsulante (Eifler y Thaxton, 2011). Cabe destacar, que la efectividad del fármaco se puede incrementar mediante el control de la dosis, tamaño, morfología y propiedades fisicoquímicas (en particular de la superficie) de la nanocápsula (Gendelman *et al.*, 2014). En la ingeniería de tejidos la aplicación de las nanocápsulas se enfoca en la medicina regenerativa, a fin de reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados (Duncan y Gaspar, 2011).
2. Diagnóstico: Nanodispositivos de diferente naturaleza se emplean con el objetivo de identificar una enfermedad a nivel celular e incluso molecular. Para ello se incorporan sistemas de imagen o se adaptan moléculas o materiales de origen biológico al nanodispositivo (nanobiosensores) para detectar la enfermedad en tiempo real y con alta sensibilidad (Urrejola *et al.*, 2018).
3. Terapia y diagnóstico (teranósticos): Se diseñan y aplican nanomateriales capaces de identificar la patología y, al mismo tiempo, liberar moléculas terapéuticas de manera controlada (Janib *et al.*, 2010; Kemp *et al.*, 2016).

Para desarrollar nanocápsulas es importante considerar sus características morfológicas y fisicoquímicas, en particular, la biocompatibilidad, estabilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad, antigenicidad limitada y capacidad de funcionalización de la superficie (Bollhorst *et al.*, 2017).

Las nanocápsulas pueden aplicarse *in vivo* o *in vitro*. El uso *in vivo* requiere que la nanoestructura penetre directamente en el organismo; de este modo, se puede identificar y cuantificar el daño en un órgano o tejido. El uso *in vitro*, ofrece mayor flexibilidad de diseño, ya que se pueden aplicar a muestras reducidas de tejidos o fluidos y conocer el daño de manera específica con gran sensibilidad y precisión en un tiempo menor, en comparación con el uso *in vivo* (Bobo *et al.*, 2016).

Se han propuesto diferentes tipos de nanosistemas o nanoplataformas (Figura 3). Todos ellos permiten la liberación controlada del fármaco de manera poco invasiva, pues tienen la capacidad de atravesar poros y membranas celulares (Torchilin, 2014).

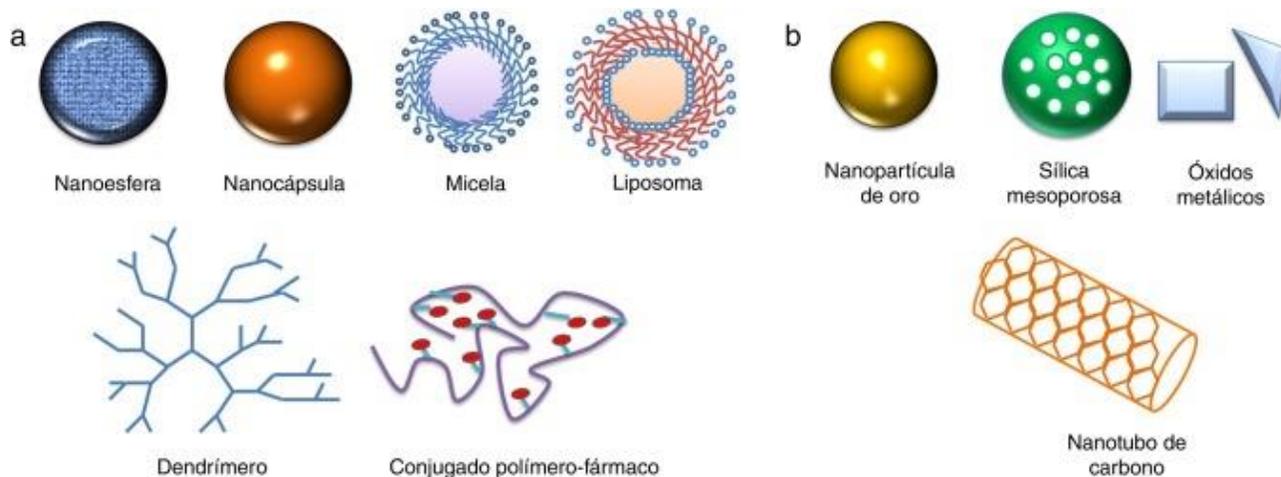


Figura 3. Tipos de nanosistemas (a) Nanosistemas orgánicos; (b) Nanosistemas inorgánicos (Torchilin, 2014; Rojas-Aguirre *et al.*, 2016).

El tamaño de los nanosistemas (especialmente de las nanocápsulas), desempeña un papel importante en el tiempo de residencia en la circulación sanguínea. Se sabe que nanocápsulas más grandes (> 200 nm) tienden a acumularse en el hígado y el bazo, mientras que las más pequeñas (<10 nm) tienden a ser eliminadas por el riñón (He *et al.*, 2010).

1.5. Nanocápsulas de rHDL dirigidas al receptor SR-B1 expresado en células tumorales.

El uso de nanocápsulas de rHDL “dirigidas” y asociadas con SR-B1 para la administración de quimiofármacos en células tumorales, ofrece muchas ventajas por su pequeño tamaño, biocompatibilidad, estabilidad, biodegradabilidad, larga vida media en circulación, baja toxicidad, baja o nula inmunogenicidad y principalmente, la entrega selectiva del fármaco (Farokhzad y Langer, 2009; Lacko *et al.*, 2015). Además, su estructura favorece las propiedades anteriores, pues, por una parte, el núcleo actúa como reservorio de múltiples agentes y está rodeado por lípidos anfifílicos y la cubierta, es muy estable gracias a las apolipoproteínas que la envuelven. De esta forma, se ofrece una protección eficaz del medicamento encapsulado ante la degradación (Abeylath *et al.*, 2011).

Diversos estudios demuestran que el SR-B1 tiene un gran potencial como puerta de entrada para el suministro de agentes terapéuticos encapsulados en partículas de rHDL. Esto es posible debido a la demostrada capacidad del SR-B1 de formar dentro de la membrana plasmática celular, un túnel hidrofóbico que deposita directamente al citosol las moléculas hidrofóbicas encapsuladas, evadiendo el procesamiento lisosómico (Raut *et al.*, 2018).

Se ha comprobado que las nanocápsulas de rHDL imitan o “mimetizan” la HDL endógena y se dirigen también al SR-B1, y otros receptores de HDL, para entregar de manera específica la carga que acarrean (similar a un caballo de Troya). Esto ha motivado el desarrollo de estudios enfocados a demostrar que los agentes anticancerígenos encapsulados en la rHDL pueden acumularse eficientemente en las células cancerosas (Mooberry *et al.*, 2016).

La estrategia de dirigir la rHDL a las células tumorales, a través del SR-B1, se propuso por primera vez por Counsell y Pohland (1982) en su estudio titulado “Las lipoproteínas como posibles sistemas de administración específica de agentes de diagnóstico y terapéuticos”; y el primer uso informado, fue un estudio sistemático llevado a cabo por Kader y Pater (2002), quienes investigaron si la VLDL, la LDL y la HDL podían utilizarse para incorporar eficazmente cuatro fármacos citotóxicos contra el cáncer: 5-fluorouracilo (5-FU), 5-yododesoxiuridina (IUdR), doxorubicina (DOX) y vindesina. En el trabajo, caracterizaron los complejos y examinaron el efecto de la incorporación sobre la citotoxicidad del fármaco en células de carcinoma de mama (MCF-7) y cervical (HeLa). La reconstitución de las lipoproteínas tuvo un efecto mínimo sobre sus propiedades, y los fármacos

encapsulados mostraron una citotoxicidad mejorada hacia las células de carcinoma humano. Otro ejemplo es el fármaco antineoplásico, aclacinomicina, que mostró citotoxicidad preferencial hacia las células tumorales cuando estaba encapsulado en rHDL (Lou *et al.*, 2005).

Mooberry *et al.* (2010), empaquetaron el paclitaxel (PTX) en rHDL y expusieron las nanocápsulas a células de cáncer de próstata que sobreexpresaban SR-B1; los resultados mostraron que el 82% del paclitaxel se incorporó a las células tumorales. Por su parte, Sabnis *et al.* (2012), demostraron que cuando la valrubicina se encapsulaba en rHDL, era más eficaz, contra las células de cáncer de próstata y de ovario que el fármaco libre; las concentraciones inhibitorias mínimas fueron 1.8 y 2.6 veces más bajas respectivamente. En otro estudio, se demostró que nanocápsulas conjugadas de rHDL-oro, se dirigían a los receptores SR-B1 sobreexpresados en las células de linfoma de una manera relativamente rápida, lo que inducía la apoptosis en esas células (Yang *et al.*, 2013).

Los estudios descritos demuestran, claramente, que nanocápsulas de rHDL que emplean la vía de sobreexpresión SR-B1, pueden servir como un potencial biomarcador para el diagnóstico y pronóstico del cáncer, así como para administrar agentes terapéuticos (Shen *et al.*, 2018).

1.6. Doxorrubicina: Generalidades y cardiotoxicidad.

La doxorrubicina (DOX) es un agente anticancerígeno empleado en distintos tipos de cáncer, incluidos mama, pulmón, gástrico, ovárico, tiroideo, vejiga, linfoma no Hodgkin y de Hodgkin, leucemias, sarcoma de tejidos blandos, mieloma múltiple, entre otros (Mitry y Edwards, 2016; Pugazhendhi *et al.*, 2018). Es un antibiótico antitumoral de amplio espectro perteneciente a la familia de las antraclíclinas, descubierto a partir de una cepa mutada de *Streptomyces peucetius* (*Streptomyces peucetius* var. *caesius*). Consiste en una aglicona quinoide tetracíclica unida a un aminoglucósido (daunosamina) (Figura 4). La aglicona está compuesta por grupos quinona-hidroquinona adyacentes en los anillos C-B, un sustituyente metoxi en el C-4 del anillo D, y una cadena lateral corta en C-9 con un carbonilo en C-13. Estos sustituyentes son los responsables del color de la DOX. La daunosamina se une mediante un enlace glucosídico al C-7 del anillo A y se compone de un resto de 3-amino-2, 3, 6- tridesoxi-L-fucosiltransferasa. Finalmente, la cadena lateral termina con un alcohol primario (Minotti *et al.*, 2004; Kubeček *et al.*, 2015).

La DOX se considera un glicósido anfótero, ya que por un lado posee un carácter ácido derivado de los grupos fenólicos del anillo de antraciclina y, por otro, presenta una función básica en el anillo de amino-azúcar. A su vez, el anillo de antraciclina le aporta un carácter lipofílico (Minotti *et al.*, 2004).

Se puede decir entonces que la DOX, es una molécula versátil, ya que tiene regiones hidrofílicas e hidrofóbicas que le permiten unirse a las proteínas plasmáticas, así como a las membranas celulares; además, se reduce intracelularmente a doxorubicinol, metabolito con actividad biológica importante pues contribuye al estrés oxidativo en las células (Octavia *et al.*, 2012).

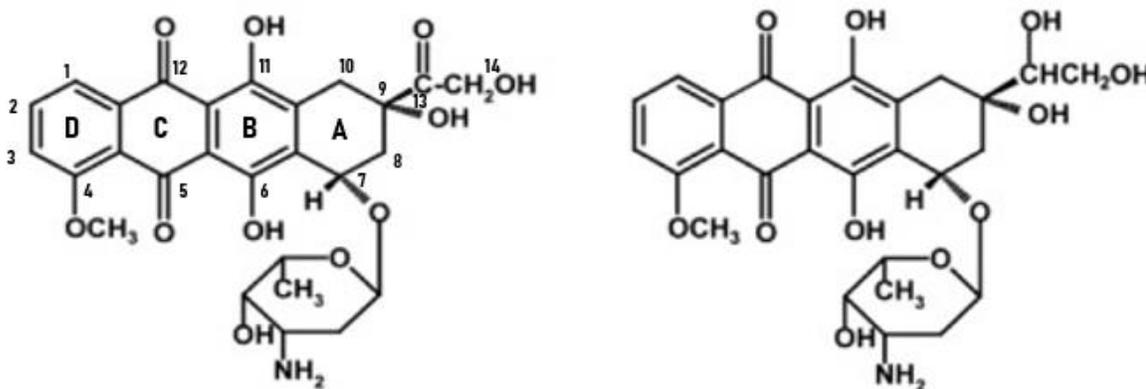


Figura 4. Estructura química de la Doxorubicina (izquierda) y su metabolito Doxorubicinol (derecha)
(Wang *et al.*, 2001).

La estructura de la DOX tiene consecuencias importantes en sus propiedades. Se excita a 480 nm y emite a 600 nm (Heger *et al.*, 2013). Su semivida es de 30-40 horas y su excreción principal es a través del sistema hepatobiliar (bilis 40-50%) y sistema renal (orina 5%) (Flórez Beledo *et al.*, 2014).

La DOX se utilizó por primera vez en ensayos clínicos en la década de 1960 y continúa siendo un agente quimioterapéutico de primera línea. Actúa de manera sistémica en el organismo y en dependencia de la susceptibilidad individual, provoca efectos adversos tales como náuseas, vómitos, alopecia, supresión de la médula ósea, supresión inmune, nefrotoxicidad, cansancio inusual, debilidad, coloración roja de la orina y toxicidad cardiovascular dosis-dependiente irreversible. La cardiotoxicidad de la DOX provoca desde arritmias hasta paros cardíacos, incluso años después de haber concluido el tratamiento. Existen reportes que indican una mortalidad de hasta el 60% de los casos a 2 años de haber usado DOX, lo cual ha limitado su uso (Wakharde *et al.*, 2018).

Von Hoff *et al.* (1979), registraron que el 2.2% de los pacientes que recibían tratamiento mayor o igual a una dosis acumulada de 350-550 mg/m² de DOX, manifestaban signos y síntomas de insuficiencia cardiaca congestiva, caracterizados por una disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), así como por cambios histopatológicos en el endomiocardio, incluso horas después de la administración del fármaco. Estos cambios histológicos se manifestaban en alteración de la estructura mitocondrial, contracción de la cromatina e indicios de apoptosis. También informaron una incidencia de insuficiencia cardiaca crónica convencional inducida por DOX del 3% a una dosis acumulada de 400 mg/m², que aumentó al 7% a 550 mg/m² y al 18% a 700 mg/m².

La DOX altera la matriz extracelular de las células tumorales. Esto sugiere que la matriz extracelular cardiaca también puede ser alterada, lo que compromete la función cardiaca en general y provoca disfunción diastólica (Octavia *et al.*, 2012; Mitry y Edwards, 2016). Varios estudios de cohorte en diferentes poblaciones de pacientes (incluidos niños) han reportado disfunción diastólica y, mayormente sistólica, debido a tratamientos con DOX. Hasta el 65% de los niños expuestos a DOX han experimentado algún tipo de disfunción cardíaca al menos un año después del tratamiento (Lipshultz *et al.*, 2012). En 2010, Sawyer *et al.*, hicieron un estudio en 14,358 pacientes con una supervivencia de 5 años de malignidades durante la infancia. Los que recibieron dosis de DOX, incluso menores de 250 mg/m², tuvieron un riesgo 2.4 veces mayor de padecer insuficiencia cardiaca, que aumentó 5.2 veces con prescripciones mayores de 250 mg/m².

La cardiotoxicidad de la DOX es dosis-dependiente y su daño es irreversible. Aunque no está totalmente dilucidado, se supone que es multifactorial. Se piensa que el estrés oxidativo provocado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) genera la destrucción de las mitocondrias y muerte del miocito (Meza-Cejudo, 2017). Las ROS también afectan las proteínas, los ácidos nucleicos, los transportadores y canales de iones (Paradies *et al.*, 2019). Tienen alta afinidad por la cardiolipina, un glicerofosfolípido aniónico que se localiza en la membrana interior de la mitocondria y que desempeña un importante papel en la fosforilación oxidativa y la apoptosis (Sterba *et al.*, 2013; De Angelis *et al.*, 2018; Guven *et al.*, 2018; Paradies *et al.*, 2019). Aunque se encuentra en todas las mitocondrias, la concentración de cardiolipina en el tejido cardiaco es particularmente abundante (Paradies *et al.*, 2019) por lo que se produce una acumulación de DOX en el interior de las células cardiacas que produce estrés oxidativo celular con tendencia a la cronicidad (Velásquez *et al.*, 2016).

1.7. Mecanismos de citotoxicidad de la doxorubicina.

Existen dos mecanismos principales por los cuales la DOX actúa en la célula cancerosa:

- 1) La intercalación en el ADN: Que inhibe la biosíntesis macromolecular, la función del ADN y la transcripción a través de la inhibición de la ARN polimerasa dependiente de ADN. Se interrumpe la reparación del ADN mediada por topoisomerasa-II, que conduce a eventuales roturas de ADN y, por lo tanto, detiene el proceso de replicación (Thorn *et al.*, 2011; Yurtcu *et al.*, 2015).
- 2) La generación de ROS y su daño a las membranas celulares, el ADN y las proteínas: Las ROS son radicales libres, definidos como moléculas químicas que incluyen un átomo al que le falta un electrón en su orbital más externo y, por lo tanto, son muy electrofílicas, es decir, pueden reaccionar mediante oxidación-reducción con un elevado número de moléculas ya que para obtener electrones deben oxidar otros átomos (Wakharde *et al.*, 2018).

De manera general, el mecanismo citotóxico de la DOX (Figura 5) ocurre como sigue: Las enzimas presentes en la mitocondria como NADPH-citocromo P450 reductasa convierten a la DOX en una semiquinona (metabolito inestable) al reducir la quinona del anillo central. Esto provoca en las mitocondrias una elevada transferencia de electrones hacia el O₂ molecular, que conduce a reoxidación de la semiquinona y formación ROS (Sterba *et al.*, 2013; Alves de Lima *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Guven *et al.*, 2018). En presencia de hierro se forma un complejo hierro férrico-antraciclina, que convierte el hierro ferroso (Fe⁺²) a férrico (Fe⁺³), que también origina semiquinona. Este ciclo quinona/semiquinona libera una gran cantidad de ROS como el radical superóxido (O₂^{-*}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (·OH). (Navarrete Hurtado *et al.*, 2011; Villasmil Camacho y Escudero, 2017).

La formación de ROS causa: (a) Peroxidación de los lípidos de la membrana y otros componentes celulares; (b) Inhibición de diversas enzimas relacionadas con el ADN y ARN (polimerasas, helicasas y enzimas reparadoras); (c) Inhibición de la respiración celular por daño a los componentes de la cadena de fosforilación oxidativa. Estos mecanismos desencadenan vías apoptóticas de muerte celular, deterioro de la membrana mitocondrial, nuclear y del retículo endoplásmico. El daño de éste

último produce descenso de calcio intracelular, induciendo disminución de la contractibilidad miocárdica que culmina en una disfunción diastólica precoz y sistólica tardía (Meza-Cejudo, 2017).

El H_2O_2 , por ejemplo, interacciona directamente con el miocardio, que es muy susceptible al daño pues tiene menor cantidad de superóxido dismutasa y catalasa en comparación con otros tejidos, siendo su única defensa la glutatión peroxidasa, pero que se encuentra reducida por la DOX (Navarro-Ulloa *et al.*, 2018).

Por otro lado, las citoquinas inflamatorias como histamina, factor de la necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e interleucina 2 (IL2), inducen miocardiopatía dilatada y disfunción beta-adrenérgica. Finalmente, la actividad antitumoral de la DOX, se explica por la formación de un complejo ternario conocido como “Top2a-doxorrubicina-DNA”, que produce cambios que se han asociado directamente con el aumento de la apoptosis (Velásquez *et al.*, 2016).

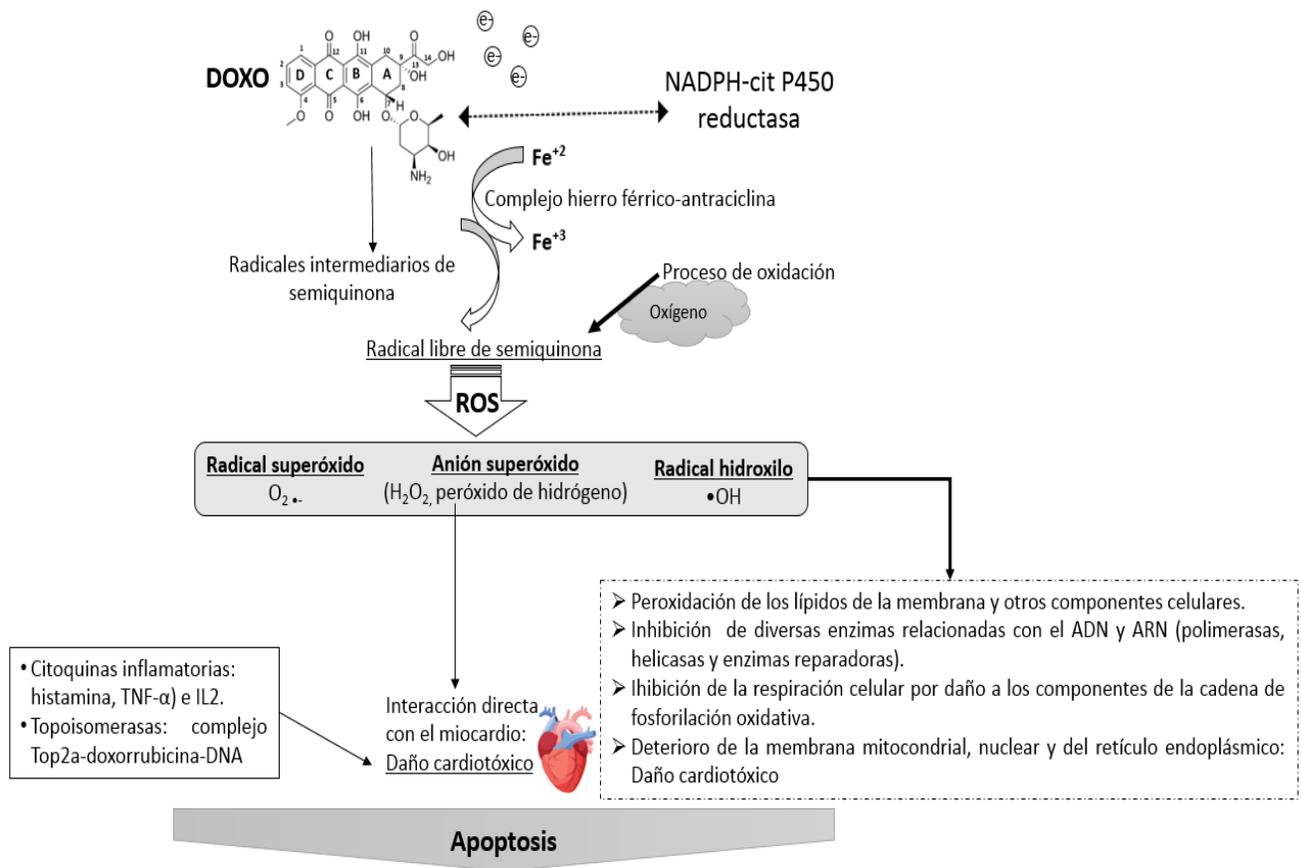


Figura 5. Mecanismos de citotoxicidad de la DOX (Construido del autor).

Dependiendo de la dosis de DOX, los radicales libres activan vías apoptóticas o producen necrosis. Se ha encontrado que a bajas concentraciones del fármaco prevalecen los mecanismos de apoptosis, mientras que a altas concentraciones, predomina la necrosis (Jiménez-Cotes *et al.*, 2015). En 2006, Neilan *et al.*, elaboraron un modelo de toxicidad aguda en el que se registró apoptosis detectable mínima en situación basal. Se evidenció un aumento de 75 veces en la apoptosis de células cardíacas tan solo 24 horas después de una sola inyección de 250 mg/m² de DOX.

Flórez Beledo *et al.* (2014), señalaron que el riesgo cardiotoxico puede disminuir si se dosifica la DOX con un ritmo semanal en infusión continua, en asociación con otros fármacos o técnicas. Lo importante, al parecer, es monitorear en detalle e impedir la sobreproducción de ROS. Esto puede lograrse, probablemente, si se interviene en la formación del complejo hierro férrico-antraciclina para impedir la transferencia de un electrón desde la DOX hasta el oxígeno molecular. Con ello podría disminuir la cardiotoxicidad y la citotoxicidad sin alterar la actividad antitumoral.

1.8. Doxorrubicina y su conjugación con nanocápsulas de rHDL.

Los efectos secundarios de la terapia convencional con DOX han motivado el desarrollo de nanocápsulas para su transporte con un tamaño de entre 50 y 450 nm (Rivankar, 2014). Entre ellas, las nanocápsulas a base de lipoproteínas han resultado exitosas debido a la capacidad de transportar fármacos hidrófobos y anfifílicos, (Yuan *et al.*, 2013; Raut *et al.*, 2018).

Se han utilizado varios métodos para obtener nanocápsulas de rHDL. Estos incluyen péptidos de autoensamblaje (Zhang *et al.*, 2010), diálisis de colato, sonicación, ciclos térmicos y microfluídos (Kuai *et al.*, 2016), adición de polímeros (Sanchez-Gaytan *et al.*, 2015) e ingredientes inorgánicos (McMahon *et al.*, 2016).

Murakami *et al.* (2010), emplearon Apo A-I fusionada genéticamente con el péptido TAT para preparar rHDL en cuyo núcleo introdujeron la DOX. La internalización de la DOX acarreada en la rHDL fusionada con TAT se confirmó por microscopía confocal. La inhibición del crecimiento tumoral de células MDA-MB-231 (cáncer de mama) y NCI-H460 (cáncer de pulmón de células no pequeñas) fue superior en las células tratadas con rHDL fusionada con TAT-DOX que con rHDL-DOX.

Yuan *et al.* (2013), encapsularon DOX en rHDL preparada con fosfolípidos de huevo y ApoA-I con el objetivo de dirigirla a las líneas celulares de carcinoma hepatocelular y hepatoma. Las nanocápsulas de rHDL-DOX manifestaron mayor citotoxicidad, inducción de apoptosis y acumulación en las células objetivo, en comparación con el fármaco libre o encapsulado en liposomas (Yuan *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

Rui *et al.* (2017), desarrollaron nanocápsulas de rHDL para la administración conjunta de PTX y DOX con el objetivo de mejorar la eficacia del tratamiento. El PTX (que es hidrofóbico) se encapsuló pasivamente y, posteriormente se adicionó la DOX, que es hidrofílica, en la misma nanopartícula, mediante un gradiente de pH transmembranal. El sistema resultante permitió dirigir ambos fármacos hacia las células cancerosas a través de la sobreexpresión del receptor SR-B1 (confirmado por imágenes confocales *in vitro* y citometría de flujo), demostrándose una mejora apreciable de la respuesta antitumoral en comparación con la mezcla de soluciones de ambos quimioterapéuticos libres. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* con células HepG2 y MCF-7, revelaron que se podían obtener varios efectos combinatorios ajustando las relaciones PTX-DOX, maximizando así la eficiencia sinérgica. Más importante aún, estas nanocápsulas de rHDL/DOX/PTX no solo transfirieron los quimiofármacos directamente al citoplasma a través del SR-BI, sino que también mostraron eficacia antitumoral *in vivo* por lo que constituyen un sistema de administración potente para una quimioterapia más eficaz.

Wei *et al.* (2019), desarrollaron un sistema mixto para la administración de DOX en células de cáncer de mama (MCF-7) compuesto por rHDL y nanocápsulas de carbonato de calcio (CC). Las nanocápsulas de CC, sirvieron como esqueleto para cargar a la DOX, mientras que la rHDL sirvió como material de recubrimiento para aumentar la estabilidad y la biocompatibilidad del sistema. Los investigadores compararon las nanocápsulas HDL/CC/DOX, y las de CC/DOX con la DOX libre. Observaron que la captación *in vitro* de DOX a partir de las nanocápsulas HDL/CC/DOX fue mayor en las células MCF-7 en comparación con las nanocápsulas CC/DOX y que su actividad anticancerígena fue más fuerte que la de las nanocápsulas de CC/DOX y la DOX libre. La capacidad de localización tumoral *in vivo* de las nanocápsulas HDL/CC/DOX, también fue superior a las de CC/DOX, con efectos secundarios tóxicos mínimos y elevada capacidad de supresión de tumores.

1.9. Radiofármacos: Generalidades y uso como agentes teranósticos.

La terapia dirigida con radionúclidos (núclidos que emiten de forma espontánea radiación ionizante) tiene el objetivo de producir un efecto terapéutico en el tejido blanco y reducir la toxicidad producida por la radiación en los tejidos sanos. Para ello se administran moléculas radiomarcadas con radionúclidos emisores de partículas cargadas (Ferro-Flores y Arteaga de Murphy, 2007). A las moléculas marcadas con radionúclidos que se usan en aplicaciones médicas se les denomina radiofármacos (RF). Un RF se define como toda sustancia que contiene un átomo radiactivo dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad, calidad y tipo de radiación, puede ser administrado con fines diagnósticos o terapéuticos (Ferro-Flores *et al* , 2006).

Los RF producen muerte celular inducida por la radiación ionizante. Cuando un tejido biológico se expone a los distintos tipos de radiación ionizante se producen afectaciones importantes en el ADN (blanco principal de la radiación), tales como fragmentaciones en su estructura molecular, enlaces cruzados de proteína, multiplicación de sitios dañados, etc. Estas lesiones dependen de la naturaleza de la partícula incidente y su energía (Kassis y Adelstein, 2005). Algunas lesiones al ADN pueden ser reparadas, pero otras, inducen mutaciones en las células y/o muerte celular mediante diferentes rutas (apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica, autofagia y senescencia). Existen estudios que señalan que las células con daño radiobiológico, pueden inducir también efectos negativos en células vecinas (Efecto Bystander), provocando incluso muerte celular en células no irradiadas debido a la liberación de citosinas y radicales libres (Kassis, 2008).

Los RF para el tratamiento del cáncer se diseñan de manera tal que transporten directamente al tumor y a su metástasis la dosis de radiación deseada con mínima afectación a los tejidos sanos. Para lograrlo, se une el átomo radiactivo a una molécula específica que determina la ruta metabólica y la afinidad con las estructuras del tumor (por ejemplo, antígenos o receptores). Al llegar a las células tumorales, la radiación ionizante altera el ADN y reduce el tumor (Krause *et al.*, 2017).

Un buen RF terapéutico debe cumplir con ciertos requisitos: (a) Alcanzar las células tumorales donde quiera que se encuentren (b) Actuar exclusivamente en las células tumorales; (c) Ser inocuo para los tejidos y órganos sanos circundantes; (d) Transportar la dosis máxima de radiación hasta el tumor y (e) Eliminar células tumorales con gran efectividad (OIEA, 2020).

La acción biológica de un RF depende, en gran medida, del tipo de radiación que emita el radionúclido. Los radionúclidos más adecuados para terapia son los que emiten radiación ionizante con poca penetración en el tejido y alta eficacia biológica relativa como los emisores α (alfa) o β (beta). De esta forma, liberan su energía cerca del sitio en que se depositan e inducen dosis más altas que los RF para diagnóstico, compuestos por radionúclidos que emiten (o provocan) radiación γ (gamma) con alta penetración en los tejidos (Krause *et al.*, 2017; OIEA, 2020) que posibilita la obtención de imágenes.

En la actualidad se utilizan RF denominados teranósticos, que integran el diagnóstico y la terapia. Para lograrlo, se combina: (a) Una molécula con un radionúclido que emite al mismo tiempo radiación útil para diagnóstico y terapia (ejemplo: MIBG- ^{131}I); (b) Una molécula que se enlaza a un radionúclido para imagen, se localiza el sitio de acumulación y luego se enlaza a un radionúclido terapéutico (ejemplo: ^{111}In -MAB, ^{90}Y -MAB). En esta variante se utilizan también moléculas químicamente diferentes, pero con una similar biodistribución; (c) Una molécula o sistema compuesto por un agente terapéutico no radiactivo y un radionúclido para imagen (Vijayakumar *et al.*, 2021).

Aunque el término teranóstico es relativamente reciente, el concepto se remonta a los inicios de la medicina nuclear, con el uso de yodo radiactivo para el diagnóstico y la terapia de la enfermedad tiroidea benigna y maligna, considerada por muchos autores la radioterapia molecular más exitosa de la historia (Ballinger, 2018).

Los agentes teranósticos con radionúclidos presentan un alto potencial para la medicina personalizada. Permiten conocer la localización y estadio de la enfermedad, estimar la dosimetría a partir de la biodistribución, optimizar la dosis terapéutica y monitorear la respuesta al tratamiento. Diversos estudios han demostrado que los radiofármacos teranósticos, son efectivos en la mayoría de los casos y con un adecuado perfil de seguridad (Ahmadzadehfar, 2016; Vijayakumar *et al.*, 2021).

1.10. Lutecio-177 (^{177}Lu).

El lutecio-177 (^{177}Lu), es un isótopo radiactivo del Lutecio ((Lu); $Z=71$, $A=174.967$ uma). El Lu es un metal de transición trivalente, de color plateado. Es el elemento más pesado, raro y caro de la serie de los lantánidos o tierras raras (Cruz *et al.*, 2012). El ^{177}Lu es un radionúclido emisor de partículas

β^- (E_{\max} 498 keV, 78%; E_{prom} 134 keV) de uso común en medicina nuclear para el tratamiento de pacientes oncológicos (Kassis, 2008). Se desintegra a ^{177}Hf con un período de semidesintegración ($T_{1/2}$) de 6.7 días. La radiación β^- del ^{177}Lu tiene una penetración máxima en el tejido de 2 mm (promedio 0.5-0.6 mm) que favorece el depósito de la energía en pequeños volúmenes como las micrometástasis y células tumorales cercanas a la superficie de cavidades. También emite fotones γ (208 keV 11%; 113 keV 6.4%) apropiados para la adquisición de imágenes *in vivo* mediante tomografía computarizada por emisión de simple fotón (SPECT) y para la estimación personalizada de la dosis previa a la terapia (Figura 6). Además, es un candidato ideal para el radiomarcado de fármacos favorables para la terapia radionuclídica con blancos moleculares específicos (Makoto *et al.*, 2018).

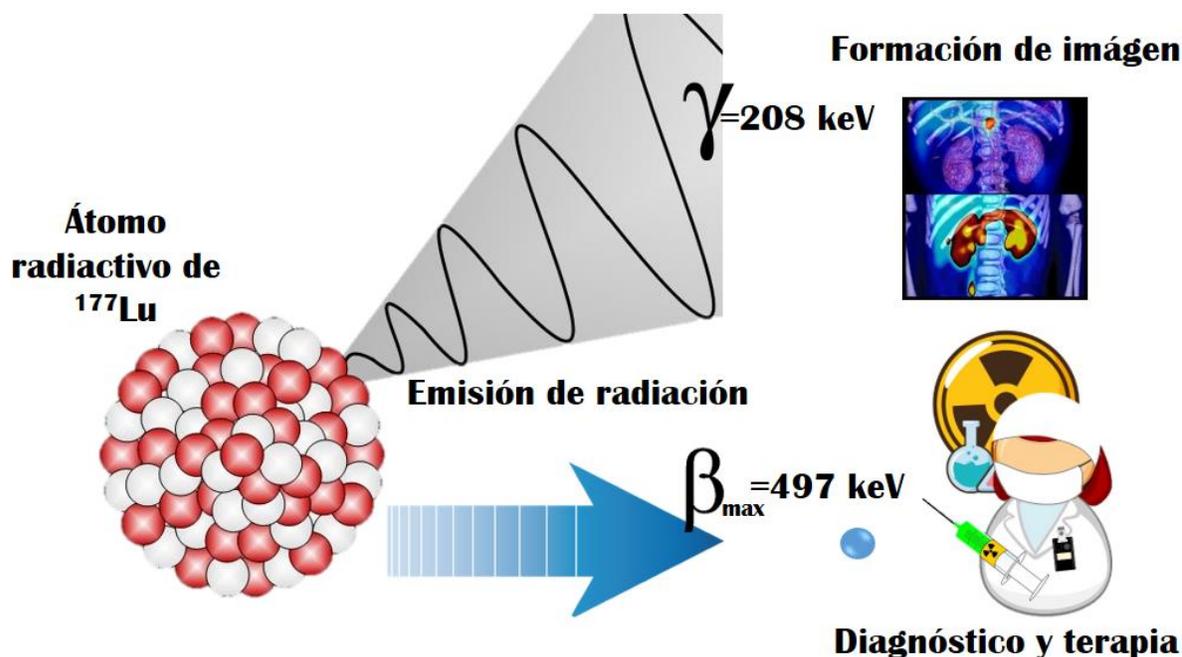


Figura 6. Propiedades radiactivas de ^{177}Lu (Construido del autor).

Para el marcaje de biomoléculas con ^{177}Lu se utiliza el agente quelante bifuncional (BFC por sus siglas en inglés *Bifunctional Chelator*) ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético (DOTA) pues forma enlaces covalentes muy resistentes desde el punto de vista metabólico con los metales trivalentes como el ^{177}Lu (Liu, 2008; Makoto *et al.*, 2018).

1.11. Terapia fotodinámica y efecto Cerenkov con radionúclidos.

La terapia fotodinámica (TFD) es una tecnología médica aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) que consiste en la administración tópica o sistémica de un compuesto con propiedades fotosensibilizadoras (por ejemplo, fármacos fotosensibles). El compuesto fotosensible (PS) se acumula en los tejidos tumorales y es expuesto a una longitud de onda específica que provoca la formación de ROS, responsables directas de la destrucción selectiva del tumor (Figura 7) (Paszko *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2019).

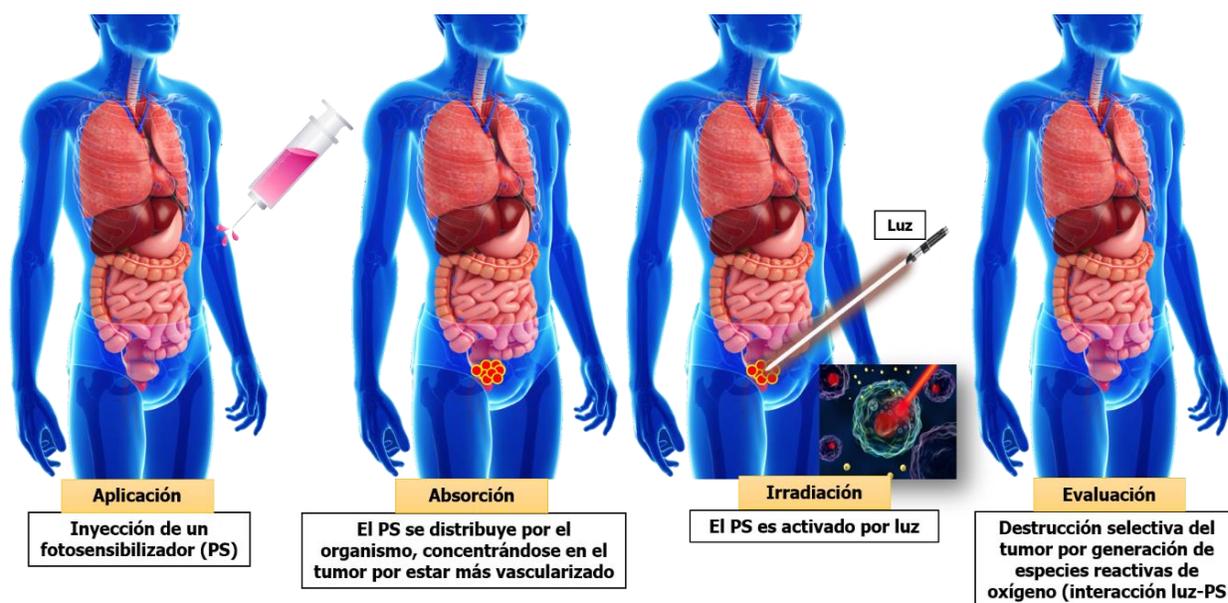


Figura 7. Funcionamiento de la Terapia Fotodinámica (Construido del autor)

Sus aplicaciones van desde el retraso en el crecimiento tumoral hasta la completa destrucción del tumor. Requiere tres componentes: (1) Una sustancia fotosensible (PS); (2) Una fuente de luz (lámpara, láser, diodo emisor de luz [LED]) y (3) Oxígeno molecular (O_2) intracelular. La interacción de estos tres elementos se detalla en el diagrama de Jablonski (Figura 8).

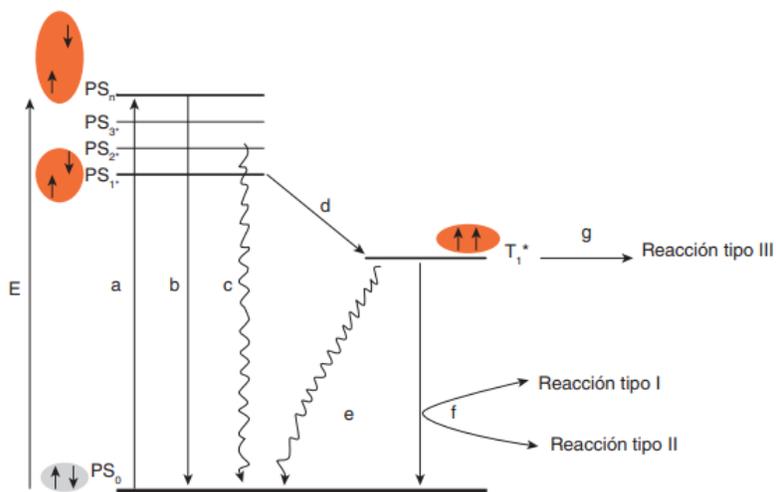


Figura 8. Diagrama de Jablonsky. Se muestran los celulares de respuesta biológica inducidos por irradiación de un PS con luz a una longitud de onda específica. Procesos fotofísicos: absorción (a), fluorescencia (b), conversión interna (c), cruzamiento intersistema (d), fosforescencia (e), formación de ROS (f), reacción del PS en estado triplete (T_1^*) con biomoléculas e independiente de oxígeno (g).

El PS en su estado electrónico basal singlete (PS_0), al absorber luz de una longitud de onda apropiada (a), alcanza un primer estado singlete excitado de vida corta (PS_{1^*}). El PS_{1^*} puede regresar al estado basal PS_0 por emisión de la energía absorbida como fluorescencia (b) o por conversión interna (c). De manera alternativa, el PS_{1^*} puede cambiar a un estado excitado triplete (T_1^*) mediante un proceso conocido como cruzamiento intersistema (d). Este estado T_1^* tiene un tiempo de vida mayor que el PS_{1^*} , por lo que puede reaccionar con las moléculas del entorno mediante reacciones foto-oxidativas de tipo I, II o III (f y g), que forman ROS capaces de producir muerte celular (Celli *et al.*, 2010). La acción fotodinámica, por tanto, es mediada por el PS en estado T_1^* que también puede regresar al estado basal (PS_0) por emisión fotónica (fosforescencia) (e).

Las reacciones foto-oxidativas pueden ocurrir simultáneamente y en competencia. La proporción en que se producen depende del tipo de PS y de la naturaleza de las moléculas con las que éste interactúa (Dolmans *et al.*, 2003; Kwiatkowski *et al.*, 2018):

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

- Reacción tipo II: El T_1^* transfiere la energía de excitación electrónica al oxígeno molecular presente en el tejido en estado normal de triplete (3O_2), dando lugar a oxígeno singlete (1O_2), que es altamente reactivo y citotóxico.

- Reacción tipo III: El T_1^* reacciona directamente con biomoléculas por una vía independiente de oxígeno.

Durante el fenómeno de la fluorescencia el PS se degrada por la luz, en un proceso conocido como fotoblanqueo (Hillemanns *et al.*, 2014; Roblero-Bartolón y Ramón-Gallegos, 2015).

La TFD es mínimamente invasiva y se lleva a cabo de la siguiente manera (Roblero-Bartolón y Ramón-Gallegos, 2015):

1. Se administra el fármaco PS al paciente por vía tópica o sistémica.
2. Se espera un tiempo para que el fármaco PS se acumule selectivamente en las células tumorales o afectadas por otra enfermedad (se puede medir por la fluorescencia).
3. Aproximadamente de 24 a 72 horas después de la inyección, cuando la mayor parte de la sustancia ha emigrado de las células normales, pero permanece en las células cancerosas, se irradia el tumor de forma localizada con un sistema láser u otra fuente de luz.

La TFD presenta una serie de ventajas respecto a otros tratamientos convencionales de cáncer como son: (a) Escasa toxicidad sistémica, debido a que el PS sólo se activa en presencia de luz; (b) La capacidad de destruir selectivamente tumores lo que disminuye, en gran medida, los efectos secundarios sobre otros tejidos y (c) La posibilidad de administrarse sola o en combinación con otras modalidades terapéuticas como quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia o cirugía (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

La primera observación sobre la fotosensibilización química de un tejido fue descrita por Raab en 1900 (McGovern, 1961). Poco tiempo después Tappeiner y Jesionek (1903) usaron eosina aplicada tópicamente y luz solar para tratar pacientes con cáncer de piel, estableciendo el concepto básico de la TFD (Lukšienė, 2003). Auler y Banzer ya habían observado en 1942 la particular afinidad moléculas PS de hematoporfirina (Hp) por el tejido neoplásico (Thaller *et al.*, 1983), confirmada más

tarde por Figge *et al.*, 1948, quienes describieron la fluorescencia de las porfirinas acumuladas en el tumor cuando se las iluminaba con la lámpara de Wood.

La primera aplicación clínica de la TFD se registró en un paciente con cáncer de vejiga, a quien se le administró el derivado de hematoporfirina (HpD), sometiéndolo luego a una irradiación transuretral. Desde entonces, ha habido un creciente interés en esta modalidad terapéutica, con una gran cantidad de estudios experimentales y clínicos en distintos tipos de tumores con localizaciones diversas (Hillemanns *et al.*, 2014; Malimonenko *et al.*, 2019).

Como fuente de luz en TFD se ha utilizado la radiación Cerenkov (CR). En la Figura 9 se presenta un esquema de TFD donde la fuente de excitación es la CR que produce el ^{18}F . Cuando la CR incide en un fluoróforo como la DOX, este se excita a estado T_1^* y puede producir reacciones foto-oxidativas que dan lugar a oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) o a radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Nakamura *et al.*, 2017). Estas especies pueden ser detectadas por ABMA (9,10- antracenedil-bis (metileno) ácido dimalónico) o por DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) respectivamente.

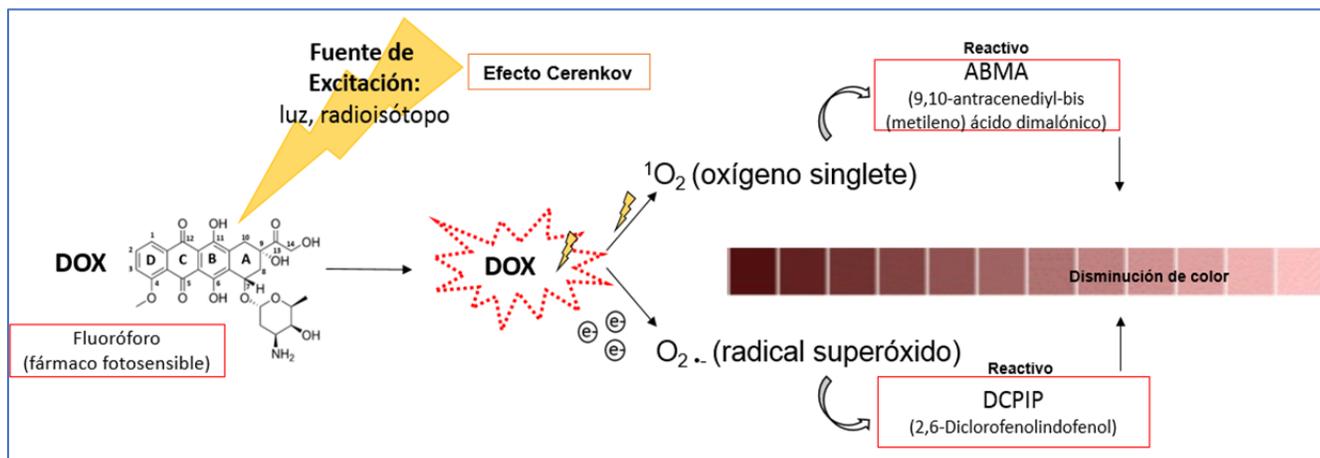


Figura 9. Terapia fotodinámica usando ^{18}F como fuente de excitación (efecto Cerenkov) y doxorubicina como fluoróforo (Construido del autor).

La muerte celular inducida por TFD puede ocurrir por apoptosis, necrosis o autofagia. Si el PS se localiza dentro del retículo endotelial o en la mitocondria, la muerte celular ocurre por apoptosis, mientras que si se localiza en la membrana plasmática ocurre por necrosis y si se encuentra en el retículo endoplásmico ocurre por autofagia (Lanks *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 2020).

2. Planteamiento del problema.

Existen más de 100 tipos de cáncer divididos en categorías de acuerdo con la zona de afectación y el tipo de célula que los forma (epitelial o escamosa). La incidencia de los distintos tipos de cáncer en los últimos años ha ido en aumento, lo que constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial. Por ello, la generación de nuevos conocimientos que coadyuven en su detección, prevención o tratamiento es de gran relevancia.

El uso de nanosistemas teranósticos *in vitro* o *in vivo* para el estudio del cáncer, es un enfoque actual en el área de las ciencias de la salud, debido a la demostrada capacidad de interacción a nivel celular o molecular de estos sistemas para la identificación temprana de la enfermedad. Esto posibilita la aplicación inmediata de tratamientos con mayor probabilidad de éxito.

Las nanocápsulas como elementos teranósticos se han propuesto para el transporte de fármacos hasta la zona afectada y su liberación controlada una vez que han reconocido receptores celulares específicos. Para ello, es importante diseñar sistemas que mantengan intactas sus propiedades fisicoquímicas y no desaten una respuesta inmunológica en el organismo que pueda resultar contraproducente.

En la actualidad se emplean fármacos para el tratamiento del cáncer a base de nanocápsulas de diversa naturaleza (Eifler y Thaxton, 2011). Sin embargo, existe poca evidencia del uso de nanocápsulas de HDL transportadoras al unísono de DOX y ^{177}Lu para su uso en terapia bimodal de tumores que sobreexpresen al receptor SR-B1.

2.1. Pregunta de Investigación.

¿Se pueden diseñar nanocápsulas de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) cargadas simultáneamente con doxorubicina y ^{177}Lu aptas para aplicar en terapia multimodal de tumores que sobreexpresen receptores SR-B1?

3. Justificación.

Una de las estrategias actuales de las investigaciones en cáncer es el desarrollo de terapias multimodales que mejoren la efectividad de las terapias existentes. Uno de los agentes quimioterapéuticos más eficaces es la DOX, pero genera efectos adversos en el organismo, en particular alta cardiotoxicidad. El desarrollo de terapias multimodales que contribuyan a disminuir la dosificación de la DOX y sus efectos adversos, sin perder eficacia, es una línea de investigación conveniente.

El presente proyecto está dirigido a sintetizar nanocápsulas de rHDL cuyo reconocimiento específico por una gran variedad de células tumorales es conocido. Si estas nanocápsulas se cargan al unísono con DOX y ^{177}Lu se podría obtener un sistema teranóstico multimodal en el que la DOX actúe como quimioterapéutico y PS para TFD, y el ^{177}Lu actúe como radioterapéutico y fuente de CR para producir efecto fotodinámico en la célula tumoral. Este sistema rHDL/DOX/ ^{177}Lu podría disminuir la cardiotoxicidad de la DOX. Cabe destacar que hasta el momento no se han reportado estudios de nanocápsulas rHDL que combinen las opciones multimodales que se proponen en esta tesis.

Se presupone que las nanocápsulas de rHDL radiomarcadas con ^{177}Lu y cargadas con DOX puedan:

- Dirigir la DOX a la célula tumoral con mayor especificidad, debido al reconocimiento específico de la rHDL por los receptores SR-B1.
- Disminuir los efectos adversos de la administración sistémica del DOX, en particular su elevada cardiotoxicidad.
- Disminuir la dosificación de DOX en el tratamiento del cáncer, sin atenuar su efecto terapéutico.
- Potenciar el uso de nuevos agentes teranósticos para el tratamiento del cáncer mediante combinaciones quimioterapia, radioterapia y terapia fotodinámica.

4. Hipótesis.

4.1. Hipótesis de trabajo.

Si se obtienen nanocápsulas de rHDL que puedan transportar simultáneamente DOX y ^{177}Lu sin perder el reconocimiento específico por los receptores SR-B1 expresados en varios tipos de células cancerosas, se podrá obtener un sistema teranóstico multimodal (quimioterapia-radioterapia-TFD) con mayor toxicidad que las nanocápsulas de rHDL cargadas individualmente con DOX o con el radionúclido, y que podrá ser rastreado mediante imagen nuclear.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo general.

Desarrollar un sistema teranóstico multimodal que pueda visualizarse por imagen nuclear, basado en DOX y ^{177}Lu encapsulados en lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL).

5.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar las propiedades fotosensibilizadoras de la DOX al irradiar con CR
2. Obtener nanocápsulas de rHDL/DOX/ ^{177}Lu y determinar sus principales propiedades físicoquímicas.
3. Evaluar la citotoxicidad del sistema rHDL/DOX/ ^{177}Lu frente a líneas celulares de cáncer que expresen el receptor SR-B1.
4. Obtener la biodistribución *in vivo* y *ex vivo* del sistema rHDL/DOX/ ^{177}Lu .

6. Diseño metodológico.

6.1. Diseño del estudio.

Diseño experimental con casos y controles dividido en dos partes. En la primera, se estudiaron las propiedades fotosensibilizadoras de la DOX al irradiar con CR (objetivo específico 1) y en la segunda, se obtuvieron nanocápsulas de rHDL/DOX/ ^{177}Lu y se evaluó su potencial como sistema nanoteranóstico para impartir terapia multimodal (objetivos específicos 2-4).

6.2. Universo y Muestra.

Líneas celulares: Células T47D (cáncer de mama humano de subtipo luminal hormonodependiente A); células PC3 (cáncer de próstata humano independiente de andrógenos); cardiomiocitos embrionarios de rata H9C2 (comúnmente usados para ensayos de cardiotoxicidad de fármacos) y fibroblastos humanos (como células control) (Figura 10).

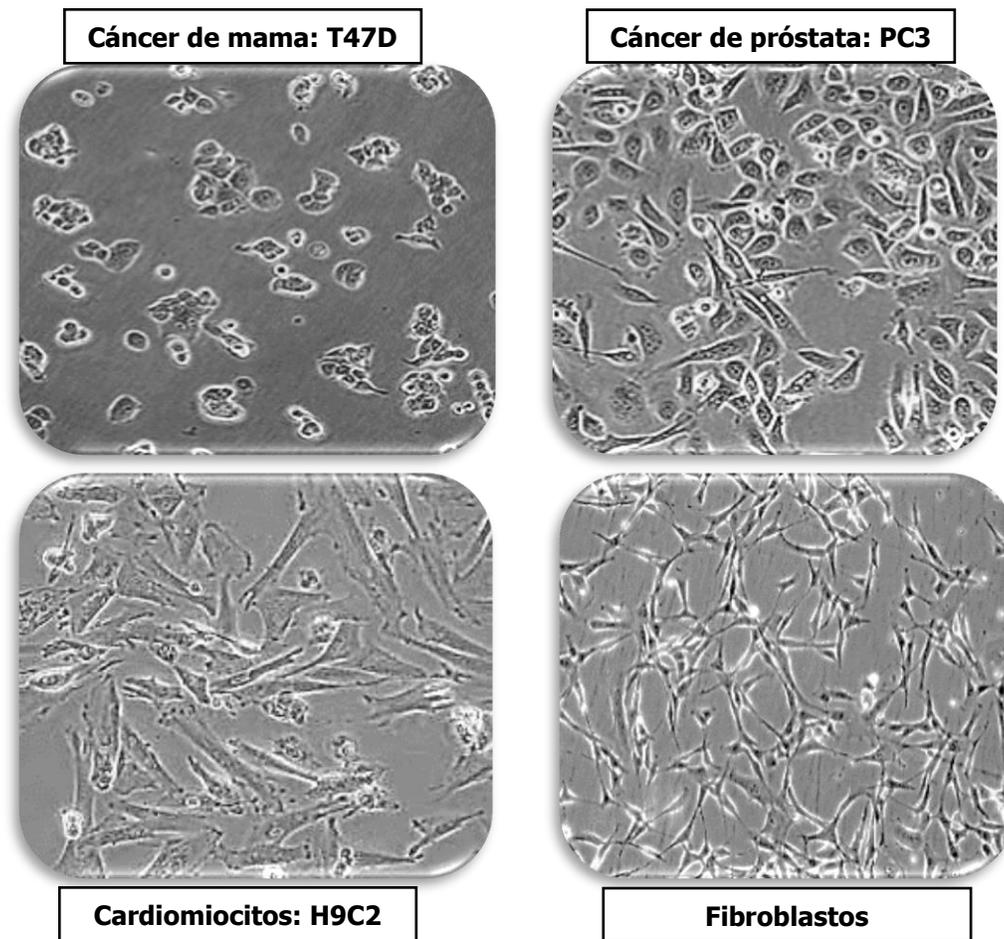


Figura 10. Líneas celulares empleadas obtenidas de ATCC. (Escala 100µm).

Las células se obtuvieron originalmente de ATCC (*American Type Culture Collection*, Atlanta, GA, USA) a través del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Se cumplieron todas las normas vigentes de bioseguridad para su adquisición, y se cultivaron a 37°C en CO₂, al 5%, humedad del 85% en medio suplementado RPMI (*medio “Roswell Park Memorial Institute”*) con 10% de suero bovino fetal y antibióticos (100 unidades /mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina).

Ratones sanos y con tumores inducidos: Con células cancerígenas PC3 de 20 a 22 gramos de 6-7 semanas de edad que se mantuvieron en cajas estériles de acrílico, con cama de aserrín estéril, condiciones de temperatura, humedad y ruido constantes desde el nacimiento, bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Consumieron agua y comida (standard PMI 5001 feed) a libre demanda.

6.3. Criterios de inclusión y exclusión

6.3.1. Criterios de inclusión

- Pureza radioquímica de los conjugados de rHDL-DOX/¹⁷⁷Lu mayor de 90%
- Peso de los ratones entre 20 y 22 gramos.

6.3.2. Criterios de exclusión

- Líneas celulares sin proliferación o contaminadas.
- Ratones con sospecha de inexistencia de tumor.

6.4. Variables del estudio.

6.4.1. Variables independientes.

- Nanocápsulas.

6.4.2. Variables dependientes.

- Generación de ROS.
- Efecto citotóxico *in vitro*
- Biodistribución *ex vivo* e *in vivo*

6.4.3. Variables intervinientes.

- Capacidad de carga de las nanocápsulas
- Pureza radioquímica.
- Expresión de receptores SR-B1.

6.5. Procedimientos.

6.5.1. Estudio de las propiedades fotosensibilizadoras de la DOX al irradiar con láser y CR

6.5.1.1 Determinación del coeficiente de extinción molar de DOX.

El coeficiente de extinción molar de la DOX se calculó como la pendiente de la curva de calibración construida con la absorbancia de soluciones estándar preparadas a partir de una solución madre de 1000 ppm (Tabla 1). La absorbancia de cada solución se midió de 380 a 680 nm. Se realizaron 3 medidas independientes para cada solución y las absorbancias obtenidas se promediaron al valor máximo de absorbancia (480 nm). Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer de doble haz (Lambda 650) con resolución de 1 nm y 0.5 s de tiempo de integración. En todos los casos se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Tabla 1. Soluciones estándar preparadas para obtener el coeficiente de extinción molar de la DOX

TIPO DE SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN
Solución madre de DOX	1000 ppm
Soluciones estándar con diferentes concentraciones de DOX disuelta en agua destilada desionizada (DDW)	50 ppm (8.6E-05 M) 33.30 ppm (5.7E-05 M) 25 ppm (4.3E-05 M) 16.70 ppm (2.9E-05 M) 12.50 ppm (2.2E-05 M) 8.35 ppm (1.4E-05 M) 6.25 ppm (1.1E-05 M) 3.125 ppm (5.4E-06 M).

6.5.1.2. Irradiación con luz láser de 450 nm y registro por espectrofotometría UV-Vis.

Se realizó con un diodo láser de potencia 1400 mW. La cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y 2 mL de capacidad se localizó en el camino del haz de luz. Para garantizar la irradiación de toda la solución contenida en la cubeta el haz de luz se dispersó con una lente divergente de manera tal que toda la solución contenida en la cubeta quedara en el camino del haz. Todas las soluciones (Tabla 2) se irradiaron en la misma posición y distancia del diodo. Los cambios espectrofotométricos se registraron durante 35 minutos a intervalos de 5 minutos entre irradiaciones. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. La presencia de $^1\text{O}_2$ se evaluó mediante ácido 9,10-antracendiil-bis metilen dimanólico (ABMA) y la de O_2^\bullet mediante 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP).

Tabla 2. Soluciones irradiadas con láser de 450 nm.

SOLUCIÓN	PREPARACIÓN
Solución control de DOX (sin irradiar)	62,5 µg/mL de DOX sin irradiación
Soluciones solas: DOX, ABMA (Ácido 9,10-antraceni-9,10-diol-bis metileno dicarboxílico) y DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol)	<ul style="list-style-type: none"> • 62,5 µg/mL de solución DOX: 125 µL de DOX (1 mg/mL) + 1875 µL de DDW • 50 µM de solución ABMA: 1000 µL de ABMA (100 µM) + 1000 µL de DDW) • 140 µM de solución DCPIP: 300 µL de DCPIP (932 µM) + 1700 µL de DDW)
Solución de DOX+ABMA+ luz láser	DOX (62,5 µg/mL) + ABMA (50 µM) + luz láser de 450 nm
Solución de DOX + DCPIP + luz láser	DOX (62,5 µg/mL) + DCPIP (140 µM) + luz láser de 450 nm
Solución de DOX + ABMA + DCPIP + luz láser	DOX (62,5 µg/mL) + ABMA (50 µM) y DCPIP (140 µM) + luz láser de 450 nm

6.5.1.3. Irradiación con luz Cerenkov proveniente de ¹⁸F-FDG y registro por espectrofotometría UV-Vis.

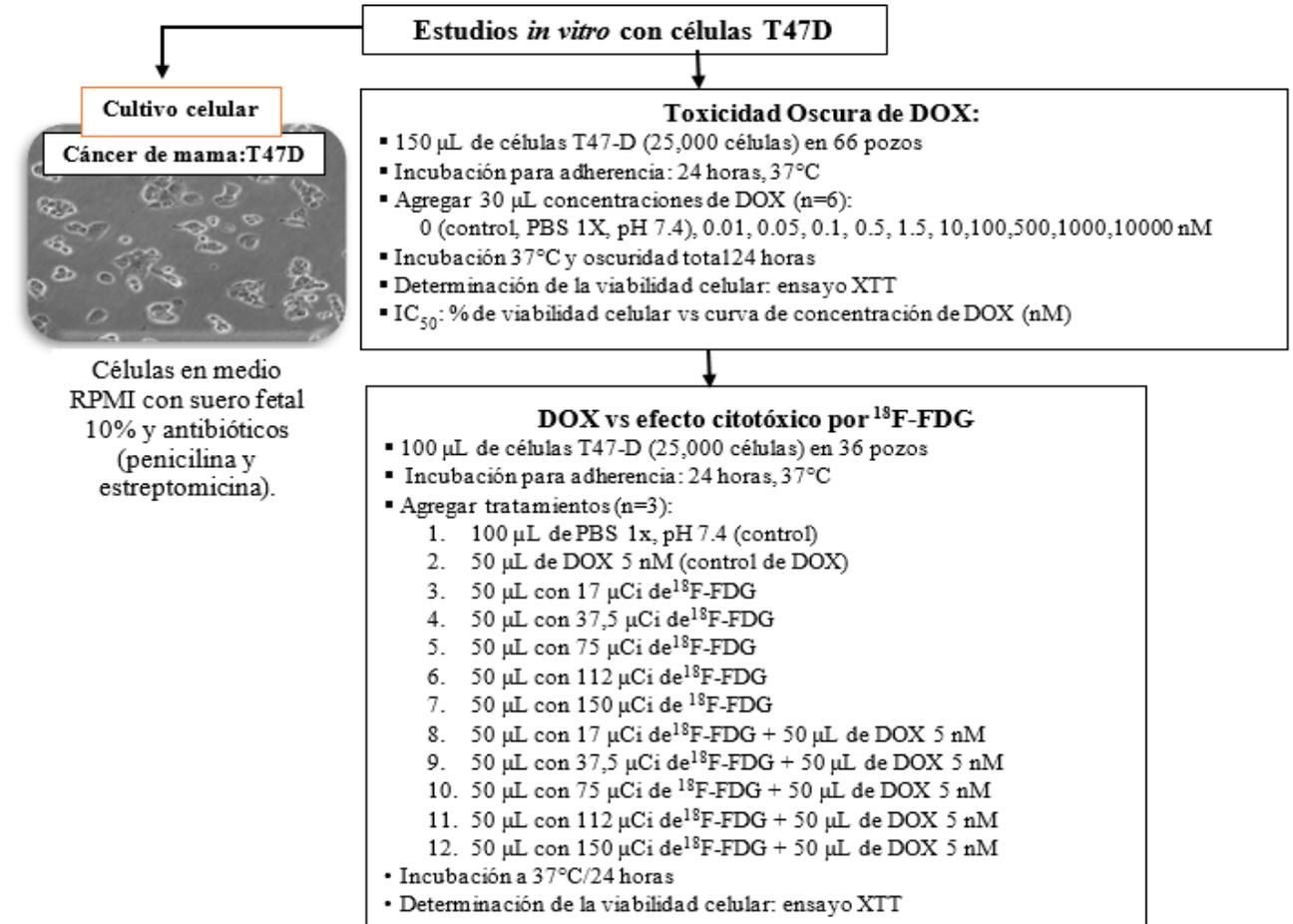
Para evaluar el efecto fotosensibilizador de la CR sobre la DOX se agregó ¹⁸F-FDG a las soluciones de DOX-ABMA y DOX-DCPIP (Tabla 3); se mantuvieron durante 24 horas en oscuridad total y seguidamente se registraron los cambios en el espectro UV-Vis. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado:

Tabla 3. Soluciones irradiadas con luz Cerenkov proveniente del ¹⁸F-FDG.

SOLUCIONES	PREPARACIÓN
DOX + ABMA + ¹⁸F-FDG	6 soluciones con 0, 350, 450, 650, 750 y 1000 µCi de ¹⁸ F-FDG + 62,5 µg/mL de DOX + 50 µM de ABMA
DOX + DCPIP + ¹⁸F-FDG	6 soluciones con 0, 450, 650, 750, 900 y 1000 µCi de ¹⁸ F-FDG + 62,5 µg/mL de DOX + 50 µM de DCPIP.

6.5.1.4. Estudios *in vitro*.

Para los estudios *in vitro* se utilizaron células T47D que se trataron de acuerdo con el Esquema 1.



Esquema 1. Procedimiento para los estudios *in vitro* con T47D.

Para poder cuantificar el número de células por mililitro, las células fueron despegadas de la caja de cultivo utilizando 2 mL de tripsina/EDTA y se dejaron incubar en la caja de cultivo por tres minutos a 37 °C con 5 % de CO₂. Transcurrido este tiempo, se agregaron 2 mL de medio RPMI+SFB (suero fetal bovino) para neutralizar a la tripsina/EDTA. Se transfirieron las células a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió en 1 mL de medio RPMI y se realizó un conteo de células utilizando una cámara de Neubauer.

Para realizar el conteo celular se tomaron 10 µl de la suspensión celular y se mezclaron con solución de azul de tripano (10 µl), posteriormente se colocó la mezcla en la cámara Neubauer (10 µl); las

células vivas se visualizaron en la cámara con un color brillante, mientras que las células muertas se visualizaron de color azul oscuro. La cámara está dividida en cuatro cuadrantes C1, C2 C3, y C4. Se cuenta la cantidad de células vivas en cada cuadrante: El cálculo de células vivas por mililitro de solución se realiza usando la siguiente ecuación:

$$\text{Número de células/mililitro} = \text{Promedio de células} \cdot 2 \cdot 10,000$$

(El 2 corresponde al factor de dilución).

6.5.1.5. Determinación del índice de combinación DOX / ¹⁸F-FDG.

A partir de los valores de IC₅₀ en células T47D en presencia de DOX, ¹⁸F-FDG y la combinación 5nM DOX/¹⁸F-FDG se determinó el índice de combinación mediante la ecuación:

$$CI = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

Donde:

a: IC₅₀ en células T47D en la combinación DOX/¹⁸F-FDG

A: IC₅₀ en células T47D en ¹⁸F-FDG

b: Valor de DOX en el sistema de combinación DOX/¹⁸F-FDG (5 nM)

B: IC₅₀ de DOX en células T47D

6.5.2. Obtención de las nanocápsulas de rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu y determinación de sus propiedades como posibles agentes para terapia multimodal.

6.5.2.1. Cuantificación relativa de la expresión del receptor SR-B1.

La expresión relativa del receptor SR-B1 en células T47D y PC3 se determinó mediante la técnica Western Blot: Células T47D y PC3 (entre 1x10⁶ y 5x10⁶ células) se lisaron con el buffer de lisis (Tris 0,5 M a pH 6,8, EDTA 0,2 M a pH 8,0, EGTA 50 mM a pH 7,9, β-mercaptoetanol) suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptin, aproptinin, PMSF). El lisado de células se recolectó por centrifugación. La proteína total se cuantificó por el método de Bradford. Iguales cantidades de las proteínas totales extraídas de ambas células se separaron por electroforesis SDS-PAGE. La separación se transfirió a una membrana de PVDF que se incubó con anticuerpos primarios específicos para el SR-B1. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario α-anti-rabbit biotin. El nivel de expresión de la proteína SR-B1 se determinó con relación al nivel de expresión de actina. La imagen de la membrana se analizó con el software *Image J*.

6.5.3. Preparación general de las nanocápsulas y liposomas.

Las nanocápsulas (Figura 11) se prepararon y cargaron con DOX en el laboratorio de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México y posteriormente se radiomarcaron con ^{177}Lu en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (CONACYT-LANIDER) radicado en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). La preparación de las nanocápsulas de rHDL se realizó por el método reportado por el grupo de investigación UNTHSC Sabnis *et al.*, (2012) con ligeras modificaciones. Se prepararon nanocápsulas de rHDL: (a) Vacías, (b) Cargadas con ^{177}Lu , (c) Cargadas con DOX y (d) Cargadas con DOX y ^{177}Lu . Los liposomas (a) vacíos y (b) cargados con ^{177}Lu se prepararon según la metodología de Toro-Córdova *et al.*, 2016.

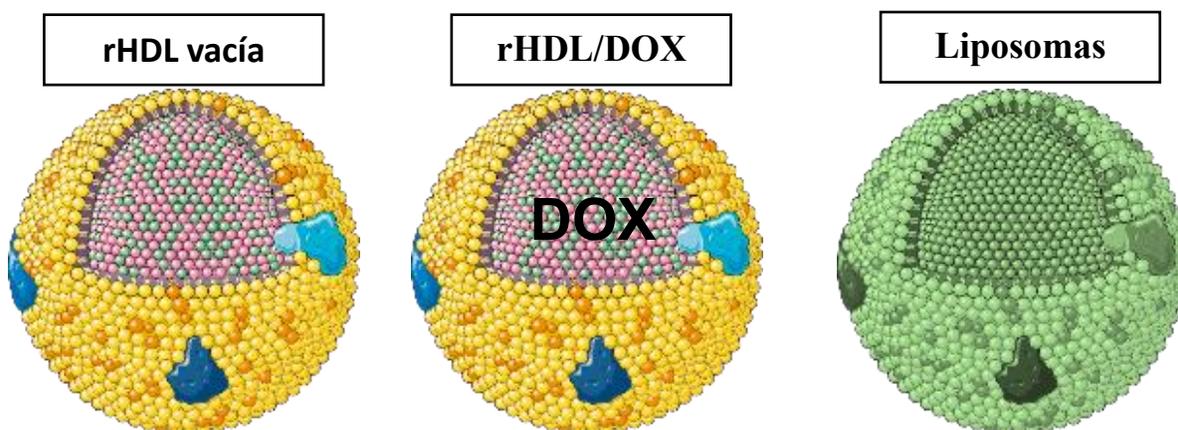


Figura 11. Nanocápsulas simples.

6.5.3.1. Preparación de nanocápsulas de rHDL.

En un vial de vidrio conteniendo 300 μL de fostatidil colina de yema de huevo (EYPC, *Egg Yolk Phosphatidil Cholina*), 7 μL de colesterol libre (FC, *Free Cholesterol*) y 7,5 μL de éster de colesterol (CE, *Cholesterol Ester*); todo disuelto en 200 μL de cloroformo:

- 1) Se añadieron, para preparar la rHDL/DOX, 200 mg de clorhidrato de doxorubicina (DOX.HCl) disueltos en el menor volumen posible de cloroformo. En el caso de la rHDL vacía, se omitió este paso.
- 2) Se homogenizó la mezcla en un vórtex durante 15 segundos y se evaporó el solvente por flujo de N_2 (g) o al vacío en baño ultrasónico a 4°C. Al eliminar el solvente se observó una fina película de “polvillo” en las paredes del vial que corresponde a los lípidos resultantes.
- 3) Esta película lipídica se dispersó con 60 μL de DMSO.

- 4) Se añadió al vial un mg de Apo-A1 y 140 μ L de colato de sodio (20 mg / mL, en tampón) y se completó el volumen hasta 2 mL con un tampón de Tris compuesto por Tris 10 mM, KCl 0,1 M y EDTA 1 mM ajustado a pH 8.
- 5) El vial se cerró y se selló con parafilm y la mezcla se homogeneizó agitando en vórtex durante 15 segundos.
- 6) La mezcla homogeneizada se transfirió a una membrana de diálisis de celulosa de 14 kDa y se dializó en un agitador a 4°C durante 48 horas con 3-4 cambios de la solución de diálisis.
- 7) Después de la diálisis, se filtró el contenido de la membrana, primero usando un filtro Millipore de 0,45 μ m y luego otro de 0,22 μ m.
- 8) El filtrado final se transfirió a un vial de vidrio oscuro.

6.5.3.2. Preparación de los liposomas.

- 1) Se preparó una mezcla (60:5:35) % de soybean 1- α -phosphatidylcholine (HSPC);1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N- [methoxy (polyethylene glycol)-2000] (DSPE-mPEG2000); y colesterol, disueltos todos en cloroformo:metanol (2:1).
- 2) Esta mezcla se añadió, gota a gota, a agua bidestilada a 70°C para producir una emulsión de agua / aceite.
- 3) Los liposomas se formaron tras evaporar los disolventes en un evaporador rotatorio bajo sonicación.
- 4) La suspensión de liposomas coloidales se transfirió a una membrana de diálisis de celulosa de 14 kDa y se dializó en un agitador a 4°C durante 48 horas con 3-4 cambios de la solución de diálisis.
- 5) Tras la diálisis, el contenido de la membrana se filtró, primero con un filtro Millipore de 0,45 μ m y luego con otro de 0,22 μ m.
- 6) El filtrado final se transfirió a un vial de vidrio oscuro.
- 7) Las muestras de rHDL y liposomas se disolvieron en Triton X-100 al 1% y el contenido de fosfolípidos se determinó espectrofotométricamente mediante un kit de ensayo de fosfolípidos.
- 8) El contenido de proteínas de la rHDL se determinó mediante un kit BCA para determinación de proteínas.

6.5.4. Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas.

Se llevó cabo en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). Se realizaron los siguientes análisis:

6.5.4.1. Caracterización por espectrofotometría UV-Vis.

Los espectros UV-Vis de las suspensiones de rHDL vacía, rHDL/DOX, liposomas vacíos, solución farmacéutica comercial de DOX.HCl (2 mg / mL) y de la suspensión farmacéutica comercial de DOX liposomal (2 mg / mL), se obtuvieron a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Perkin Elmer (*Lambda-Bio*) con una resolución de 1 nm en el rango de 300 a 700 nm. En todos los casos se utilizó una cubeta de cuarzo de volumen reducido con 2 caras transparentes (capacidad de 0,5 mL) y un camino óptico de 1 cm.

6.5.4.2. Tamaño por dispersión dinámica de luz (DLS).

El tamaño de las partículas de las suspensiones de rHDL/DOX, rHDL vacías y liposomas vacíos, se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DLS) (analizador de ondas *Nanotrak*). Se colocó una muestra de 100 µL de cada solución coloidal en la celda de prueba y se completó el volumen de la celda con PBS 1X a pH 7,4.

6.5.4.3. Tamaño por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se utilizó un microscopio JEOL-EMDSC-U10A (JEOL, Japón), que se operó a 200 kV. Las muestras se dejaron caer gota a gota sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y se evaporaron al vacío antes de realizar la medición.

6.5.4.4. Estabilidad de las suspensiones coloidales de las nanocápsulas

La estabilidad de las suspensiones coloidales de las nanocápsulas de rHDL, rHDL/DOX y liposomas vacíos se evaluó mediante la determinación del tamaño de las partículas a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas) mediante DLS (analizador de ondas *Nanotrak*).

6.5.4.5. Eficiencia de carga de las nanocápsulas de rHDL/DOX.

La eficiencia de carga se determinó de acuerdo con el método reportado por Yuan *et al.*, 2013:

- 1) Se preparó una curva de calibración (0-3000 μM) a temperatura ambiente a partir de la suspensión farmacéutica comercial de DOX liposomal (2 mg/mL).
- 2) Se tomaron diferentes volúmenes de DOX liposomal (2 mg/mL) y se disolvieron en Tritón X-100 al 1% antes de la medición de la absorbancia a 480 nm.
- 3) La curva de calibración se utilizó para determinar la concentración final de DOX.HCl en el nanosistema
- 4) Las muestras de la suspensión coloidal de rHDL/DOX también se disolvieron en una solución de Triton X-100 al 1% antes de medir la absorbancia. En todos los casos, se utilizó Triton X-100 como blanco.
- 5) Conociendo la concentración inicial de DOX.HCl (200 mg/2 mL) utilizada en la preparación de rHDL-DOX y de DOX.HCl incorporada en la rHDL/DOX (calculada a partir de la curva de calibración), se calculó la eficiencia de carga (%) utilizando la siguiente relación:

$$\frac{\text{Concentración de DOX. HCl incorporada en la rHDL/DOX}}{\text{Concentración inicial de DOX. HCl}} \times 100$$

6.5.5. Evaluación *in vitro* del efecto fotodinámico de rHDL/DOX en células T47D.

6.5.5.1. Variación del tiempo de irradiación a concentración constante de nanocápsulas rHDL/DOX.

Para esta evaluación se irradió con un diodo láser de 450 nm (potencia de 1400 mW) un cultivo de células T47D en presencia de nanocápsulas de rHDL/DOX (concentración 1 nM) a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos). Como control se utilizó PBS. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. A continuación, se describe a detalle el procedimiento:

En tres placas de 48 pocillos, se sembraron las células de forma alterna (18 pocillos/placa) para garantizar que ningún pozo recibiera luz dispersa de los pozos adyacentes durante la irradiación. En cada pozo se sembraron 4×10^4 células T47D en 200 μL de medio RPMI suplementado con 1% de antibióticos y 10% de suero bovino fetal. Las tres placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 85% de humedad.

A las células de la placa 1 se les aplicó 60 μL de PBS 1X a pH 7,4 (control). A las células de la placa 2 se les aplicó 60 μL de solución 1 nM de DOX.HCl y a las células de placa 3 se les aplicó 60 μL de una suspensión de rHDL/DOX, que contenía 1 nM de DOX.HCl. Las placas se irradiaron con el láser a los tiempos ya señalados (3 pozos para cada tiempo). Para la irradiación el láser se colocó a una distancia de las placas tal que su punto coincidía perfectamente con el diámetro de cada pozo. Inmediatamente después de los tratamientos, las células se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 85% de humedad. Tras la incubación, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo XTT.

6.5.5.2. Variación de la concentración de rHDL/DOX para un tiempo de irradiación constante.

En esta evaluación se mantuvo constante el tiempo de irradiación (3 min) y se varió la concentración de las nanocápsulas de rHDL/DOX en el cultivo de células T47D (4×10^4 en 200 μL de RPMI). El procedimiento empleado fue similar al anterior. Se utilizaron concentraciones de rHDL/DOX de 0,01, 0,1, 1, 10, 50, 500 y 5 000 nM). A continuación, se describe a detalle el procedimiento:

Las células T47D se sembraron alternativamente en una placa de 48 pocillos, cubriendo un total de 24 pocillos. En cada pozo, se cultivaron 4×10^4 células T47D en 200 μL de medio RPMI suplementado con 1% de antibióticos y 10% de suero bovino fetal. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% y 85% de humedad. Después de la incubación, se aplicaron 60 μL de los siguientes tratamientos por triplicado ($n = 3$): (i) PBS 1X a pH 7,4 (control); rHDL/DOX, con las siguientes concentraciones de DOX.HCl: (ii) 0,01 nM, (iii) 0,1 nM, (iv) 1 nM, (v) 10 nM, (vi) 50 nM, (vii) 500 nM y (viii) 5000 nM. Cada pocillo se irradió durante 3 min con el diodo láser en las condiciones ya descritas. Inmediatamente después de los tratamientos las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5% y 85% de humedad. Después de la incubación, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo XTT. La curva de supervivencia celular obtenida se comparó con la curva de toxicidad oscura de DOX.HCl (Esquema 1).

6.5.5.3. Captación celular de nanocápsulas rHDL/DOX y evaluación intracelular de ROS.

Se sembraron $2,5 \times 10^5$ de células T47D en un portaobjetos de 5 cámaras y se incubaron en CO_2 al 5% y 85% de humedad durante 24 horas. Tras la incubación se aplicaron los siguientes tratamientos (uno por portaobjetos):

(i) 30 μ L de medio RPMI (control 1), (ii) 30 μ L de rHDL/DOX, (iii) 30 μ L de rHDL/DOX tras 30min de pretratamiento con 200 μ L Apo-A1 (1 mg/mL), (iv) 30 μ L de medio RPMI (control 2), (v) 30 μ L de rHDL/DOX. En cada tratamiento, las células se incubaron durante 1 hora.

Después de este tiempo, en los tratamientos (i), (ii) y (iii), se decantó el medio, y las muestras se lavaron tres veces con PBS 1X (pH 7,4) y se fijaron después. Las células del tratamiento (v) se irradiaron a 450 nm durante 15 minutos. Tras la irradiación, se añadió el reactivo CellROX Green (485/520 nm), a una concentración de 5 μ M. Las células del tratamiento (iv) no fueron irradiadas, pero también se añadió el reactivo CellROX Green a la misma concentración. Los tratamientos (iv) y (v) se incubaron durante 30 minutos a 37°C tras la adición de CellROX. A continuación, se decantó el medio y las muestras se lavaron tres veces con PBS 1X (pH 7,4) y se fijaron con formaldehído al 2% durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron de nuevo con PBS 1X. A excepción del tratamiento (i), se añadió el marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) al resto de las muestras. Todas las muestras se cubrieron con un cubreobjetos y se incubaron a 37°C durante 5 minutos en la oscuridad antes de la adquisición de imágenes con el microscopio de fluorescencia *Nikon Eclipse*.

6.5.6. Preparación del complejo $^{177}\text{Lu-p-SCN-Bn-DOTA}$ ($^{177}\text{Lu-DOTA}$).

El complejo se preparó añadiendo una solución de $^{177}\text{LuCl}_3$ (15-18 MBq en 10 μ L) a una solución de p-SCN-Bn-DOTA (500 μ L de 1 mg/mL en tampón acetato 0,2 M, pH 5,0). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. El rendimiento de la reacción se determinó por ITLC-SG, utilizando NaCl al 0,9% como fase móvil, y por RP-HPLC. En la separación por RP-HPLC se utilizó una columna C18 (μ Bondapak C18 column; 125 Å, 10 μ m, 3.9 mm \times 150 mm, Waters) en un sistema Waters Empower acoplado a un detector UV-Vis (matriz de diodos) y a un detector de radiactividad. La separación se realizó durante 35 min, a un flujo de 1 mL min⁻¹, utilizando un gradiente de agua/acetonitrilo que contenía 0,1% de TFA de 95/5 (v/v) a 20/80 (v/v).

En el ITLC-SG, el $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ($R_f = 1$) se desplazó con el disolvente (NaCl 0,9%) y el $^{177}\text{Lu-DOTA}$ permaneció en el origen ($R_f = 0$). En el sistema RP HPLC, $^{177}\text{Lu}^{3+}$ tuvo un tiempo de retención de 3 minutos y $^{177}\text{Lu-DOTA}$ tuvo un tiempo de retención de 13,98 minutos.

6.5.7. Radiomarcado de nanocápsulas rHDL/DOX, rHDL y liposomas con ^{177}Lu (^{177}Lu -DOTA-p-Bz-SCN).

El radiomarcado se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

- 1) Se preparó el compuesto hidrofóbico de ^{177}Lu , ^{177}Lu -DOTA-p-Bz-SCN, el cual se internalizó de manera pasiva en el núcleo de la rHDL.
- 2) Se añadió un volumen de 100 μL de ^{177}Lu -DOTA a 1 mL de cada una de las nanocápsulas previamente preparadas (rHDL vacías, rHDL/DOX, y liposomas vacíos).
- 3) Las mezclas se incubaron a 40°C durante 1 h. Tras la incubación, se transfirieron a tubos de centrífuga de membrana (MWCO 30.000 Da) y se centrifugaron a 500 g durante 15 minutos.
- 4) Las fracciones que migraron de las membranas representan los compuestos con un peso molecular inferior a 30.000 Da, mientras que los compuestos con un peso molecular superior a 30.000 Da permanecieron en las membranas.
- 5) Todas las fracciones se midieron con un detector de centelleo de cristal de tipo pozo (Auto In-v-tron 4010; NML Inc., Houston, Texas, USA).

La actividad de las fracciones que migraron de las membranas se debe a la actividad del ^{177}Lu -DOTA no internalizado por la nanocápsula, mientras que la actividad de las fracciones que permanecieron en las membranas se debe al ^{177}Lu asociado a la nanocápsula en forma del complejo ^{177}Lu -DOTA. A partir de las actividades encontradas, tanto fuera como dentro de las membranas, se determinaron las eficiencias de radiomarcado de las nanocápsulas de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Actividad de la membrana}}{\text{Actividad de la membrana} + \text{Actividad fuera de la membrana}}$$

El contenido de las membranas se extrajo y se almacenó en viales de vidrio oscuros. A partir de este momento se tuvieron listas para pruebas subsiguientes 5 tipos de nanocápsulas (Figura 12):

- Las rHDL vacías
- Las rHDL cargadas con doxorubicina (rHDL/DOX)
- Las rHDL radiomarcadas con lutecio (rHDL/ ^{177}Lu)
- Las rHDL cargadas con doxorubicina y radiomarcadas con lutecio (rHDL/DOX/ ^{177}Lu)
- Los liposomas radiomarcados con lutecio

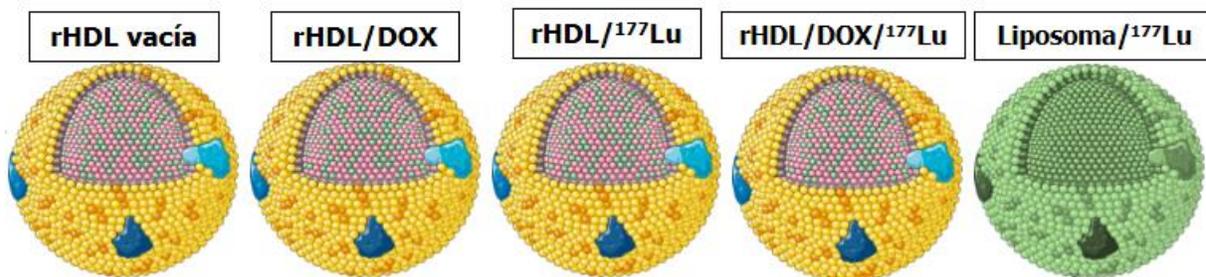


Figura 12. Tipos de nanocápsulas obtenidas.

6.5.8. Experimentos *in vitro* con las nanocápsulas.

6.5.8.1. Captación celular de rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu, rHDL/¹⁷⁷Lu y liposomas ¹⁷⁷Lu.

Se recolectaron células T47D, PC3 y H9C2 y se diluyeron en PBS 1X (pH 7,4). Se añadió una suspensión de $1,5 \times 10^5$ células a 27 tubos de 3 mL de capacidad (9 tubos para cada línea celular), y el volumen del contenido de cada tubo se ajustó a 1 mL añadiendo PBS 1X (pH 7,4). A los 9 tubos de cada línea celular se les añadió 40 kBq de los siguientes tratamientos (n = 3): (i) rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu, (ii) rHDL/¹⁷⁷Lu, y (iii) ¹⁷⁷Lu-DOTA.

Las células se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de este tiempo, cada tubo se midió en un detector de pozo de centelleo de cristal (*Auto In-v-tron* 4010; NML Inc., Houston, Texas, USA) para determinar la actividad inicial del ¹⁷⁷Lu-DOTA añadido. Los tubos se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón se lavó 2 veces con PBS 1X (pH 7,4). Posteriormente, se añadió 1 mL de una mezcla de ácido acético 0,2 mol/L/ NaCl 0,5 mol/L, y se dispersó el botón obtenido. Esta suspensión se midió también en el detector de centelleo de cristal de pozo (*Auto In-v-tron* 4010; NML Inc., Houston, Texas, USA). La actividad encontrada correspondió a la actividad del total de ¹⁷⁷Lu captado por la célula (actividad internalizada y unida a la membrana celular).

Los tubos se centrifugaron de nuevo a 500 g durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón 2 veces con PBS 1X (pH 7,4). La fracción de la actividad unida a la membrana se eliminó en el sobrenadante decantado. Finalmente, se añadió 1 mL de PBS 1X (pH 7,4) y se dispersó el botón obtenido. Esta suspensión también se midió en el detector de centelleo de cristal de pozo (*Auto In v-tron* 4010; NML Inc., Houston, Texas, USA). La actividad encontrada corresponde a la actividad

total de ^{177}Lu internalizado en la célula. A partir de los valores de actividad medidos, se calculó el porcentaje de captación e internalización total de los diferentes sistemas marcados con ^{177}Lu .

6.5.8.2. Evaluación de la saturación.

Se recolectaron células PC3 y se diluyeron en PBS 1X (pH 7,4). Se añadió una suspensión de $1,5 \times 10^5$ de células a 36 tubos de 3 mL de capacidad cada uno, y el volumen total del contenido de cada tubo se ajustó a 1 mL añadiendo PBS 1X (pH 7,4). Se añadió a los tubos un volumen de 120 μL de 12 concentraciones diferentes de rHDL/ ^{177}Lu ($n = 3$) y las mezclas se incubaron durante 1 hora a 4°C .

Después de la incubación, los tubos se midieron en el detector de centelleo de cristal tipo pozo (*Auto In-v-tron* 4010; NML Inc., Houston, Texas, USA) para determinar la actividad total de ^{177}Lu en cada uno. A continuación, se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos y se descartaron los sobrenadantes. El botón obtenido se lavó tres veces con PBS 1X frío (pH 7,4), y la actividad de ^{177}Lu asociada se midió en un detector de centelleo de cristal de tipo pozo (*Auto In-v-tron* 4010; NML Inc., Houston, Texas, USA). El porcentaje de actividad asociada a la célula se calculó como:

$$\frac{\text{Actividad del botón}}{\text{Actividad total agregada}} \times 100$$

Se repitió el mismo procedimiento con los liposomas/ ^{177}Lu .

La concentración de rHDL/ ^{177}Lu y de liposomas/ ^{177}Lu , se expresó en términos de contenido de fosfolípidos, que se determinó mediante un kit de ensayo de determinación de fosfolípidos

6.5.8.3. Evaluación de citotoxicidad.

Se realizaron 2 tipos de experimentos para evaluar citotoxicidad, que se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción de los experimentos de evaluación de la citotoxicidad de los sistemas preparados.

	Líneas celulares empleadas	Tratamientos empleados para pruebas
Experimento 1	PC3 y H9C2	<ol style="list-style-type: none"> 1. PBS 1X pH 7,4 (control) 2. Nanocápsulas de rHDL vacías 3. Nanocápsulas rHDL/DOX 4. Nanocápsulas rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu 5. DOX en solución 6. DOX 5X en solución 7. Complejo aislado de ¹⁷⁷Lu DOTA
Experimento 2	T47D y fibroblastos	<ol style="list-style-type: none"> 1. PBS 1X pH 7,4 (control) 2. Nanocápsulas rHDL vacías 3. Nanocápsulas rHDL/DOX 4. Nanocápsulas rHDL/¹⁷⁷Lu 5. Nanocápsulas rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu 6. Nanocápsulas DOX/¹⁷⁷Lu 7. Complejo aislado de ¹⁷⁷Lu DOTA

Experimento 1 de citotoxicidad: En 35 pocillos de una placa de 96 pocillos, se sembraron 1×10^4 de células PC3 por pocillo, y en otros 35 pocillos, 1×10^4 de células H9C2 por pocillo. Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibióticos y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ y 85% de humedad. Después de este tiempo, las células se sometieron a 50 µL de uno de los siguientes tratamientos (n = 5) (i) Control, PBS 1X (pH 7,4), (ii) rHDL, (iii) rHDL/DOX, (iv) rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu, (v) DOX.HCl, (vi) DOX.HCl (5X), y (vii) ¹⁷⁷Lu DOTA. Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C con un 5% de CO₂ y un 85% de humedad. Tras el periodo de incubación, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo XTT. Los tratamientos (ii), (iii) y (iv) tenían la misma concentración de rHDL. La actividad de ¹⁷⁷Lu en los tratamientos (iv) y (vii) fue la misma. La concentración de DOX.HCl en los tratamientos (iii), (iv) y (v) fue la misma. La concentración de DOX.HCl en el tratamiento (vi) fue 5 veces superior a la del tratamiento (v). En todos los casos, el ¹⁷⁷Lu estaba presente en forma de complejo ¹⁷⁷Lu-DOTA.

Experimento 2 de citotoxicidad: Se emplearon células T47D y fibroblastos. Los tratamientos en este caso fueron (n = 5) (i) PBS 1X (pH 7,4) (control), (ii) rHDL, (iii) rHDL/DOX, (iv) rHDL/¹⁷⁷Lu, (v) rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu, (vi) DOX.HCl/¹⁷⁷Lu, y (vii) ¹⁷⁷Lu-DOTA. La actividad de ¹⁷⁷Lu y la concentración de DOX.HCl para estos tratamientos fueron la mitad de las empleadas en el Experimento 1.

6.5.9. Biodistribución *in vivo* y *ex vivo*.

6.5.9.1. Biodistribución *in vivo* de rHDL/RB/¹⁷⁷Lu en ratones sanos.

Para este estudio se utilizó Rodamina B (RB) en lugar de DOX.HCl. Tres ratones sanos (6-7 semanas de edad) se inyectaron por vía intravenosa bajo anestesia (mezcla de oxígeno y 2% de isoflurano); dos de ellos, con rHDL/RB/¹⁷⁷Lu (100 µL, 8 MBq) y el tercero sólo con RB. La absorbancia del RB en los ratones inyectados fue la misma, indicando la misma concentración. Las imágenes se obtuvieron con el sistema de imágenes preclínicas *In-vivo Xtreme* (Bruker). Las imágenes radioisotópicas estáticas se adquirieron en posición prona. Se utilizó un colimador de agujeros paralelos de 10 x 6 cm para obtener la imagen 2 horas después de la inyección. Las imágenes de fluorescencia y luminiscencia se adquirieron en posición supina 2 horas después de la inyección. Los parámetros de adquisición incluyeron el FOV (10 cm), el tiempo de exposición (2 s), la parada f (1,1) y el binning (4 x 4 píxeles). Para las imágenes de fluorescencia la longitud de onda de excitación fue de 550 nm y la de emisión de 600 nm. También se adquirieron imágenes planas de rayos X. Las imágenes de fluorescencia y de rayos X *ex vivo* del hígado, los riñones y el intestino se adquirieron 24 horas después de la inyección.

6.5.9.2. Biodistribución *ex vivo* de rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu en ratones con tumor inducido.

Los ratones desnudos atímicos Balb/c (6-7 semanas de edad), portadores de tumores PC3 en la parte superior de la espalda, se inyectaron por vía intravenosa (n = 3) e intratumoral (n = 3) con el sistema rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu (100 µL, 8 MBq) bajo anestesia (mezcla de oxígeno y 2% de isoflurano). Después de 24 horas post inyección los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂ que liberó gradualmente oxígeno a 0,5 L/min durante 10 min, de modo que se durmieron antes del sacrificio, eliminando así el sufrimiento. Se extrajo la sangre, el corazón, el bazo, el intestino, el páncreas, los riñones, el hígado, los pulmones, el músculo, el hueso y el tumor y se colocaron en bolsas de nylon cuidadosamente pesadas. La actividad de ¹⁷⁷Lu de cada órgano y del tumor se midió en un detector de centelleo de cristal de tipo pozo (*Auto In-v-tron* 4010; NML Inc., Houston, Texas, EE. UU.), junto con 2 alícuotas estándar de la actividad inyectada, que representaban el 100% de la dosis inyectada. La actividad medida se utilizó para calcular el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (%ID/g).

6.6. Análisis de datos

Se utilizó la prueba t de Student, a fin de comparar los resultados de los experimentos. Las diferencias con una $p < 0,05$ para la prueba de una cola se consideraron significativas.

6.7. Aspecto ético e implicaciones bioéticas.

La investigación del presente trabajo se realizó de acuerdo con las normas NOM-012-STPS-1999 (2012) para condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se produzcan, usen, almacenen o transporten fuentes de radiación, NOM-004-NUCL-2013 (2013) de clasificación de los desechos radiactivos y NOM-36-NUCL-2001 (2001) de los requerimientos para instalaciones de tratamiento y acondicionamiento de desechos radiactivos.

Los experimentos de investigación con animales como inducción de tumores, biodistribución y adquisición de imágenes SPECT/CT en los ratones atómicos fueron realizados bajo los lineamientos, normas legales y éticas del Comité de Ética y las autoridades correspondientes de nuestra organización de investigación, así como los lineamientos para el uso de animales de laboratorio establecidos en la Norma Oficial Mexicana -NOM-062-ZOO-1999 (2001) y en las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (2011)

Los desechos biológicos tanto animales como de las células de cáncer, se manejaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (2003).

7. Resultados.

7.1. Artículos publicados.

Se publicaron dos artículos con los resultados de la presente tesis.

7.2. Títulos de los artículos publicados.

Artículo 1: “*In vitro* irradiation of doxorubicin with ^{18}F -FDG Cerenkov radiation, potential application as a theragnostic system”. (2020). Journal of Photochemistry and Photobiology B, 210, 111961. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111961>

Artículo 2: “A Multimodal Theranostic System Prepared from High-Density Lipoprotein Carrier of Doxorubicin and ^{177}Lu ”. (2021). Journal of Biomedical Nanotechnology. 17 (11):2125-2141. DOI: [10.1166/jbn.2021.3179](https://doi.org/10.1166/jbn.2021.3179).

7.3. Página frontal del Primer Artículo.

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 210 (2020) 111961



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

In vitro irradiation of doxorubicin with ^{18}F -FDG Cerenkov radiation and its potential application as a theragnostic system.



Hilda Angeline Quintos-Meneses^{a,1}, Liliana Aranda-Lara^{a,1}, Enrique Morales-Ávila^{b,*}, Eugenio Torres-García^c, Miguel Ángel Camacho-López^d, Mariana Sánchez-Holguín^e, Myrna A. Luna-Gutiérrez^f, Ninfa Ramírez-Durán^g, Keila Isaac-Olivé^{a,*}

^a Laboratorio de Investigación en Teranóstica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico.

^b Laboratorio de Investigación Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50120, Estado de México, Mexico.

^c Laboratorio de Dosimetría y Simulación Monte Carlo, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico.

^d Laboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopía Láser de Pulsos Ultracortos, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico.

^e Departamento de Medicina Nuclear, Centro Oncológico Estatal-ISSEMyM, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico

^f Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos-CONACYT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de México, Mexico.

^g Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico.

ARTICLE INFO

Keywords:

Doxorubicine-HCl
 ^{18}F -FDG
 Cerenkov radiation
 Photodynamic therapy
 Chemotherapy-PDT system
 Synergistic effect

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX), an effective chemotherapeutic agent, has a wide excitation band centred at 480 nm. Cerenkov radiation (CR) is considered an internal light source in photodynamic therapy (PDT). DOX could be photoactivated by CR and thus, enhancing its cytotoxicity. In this work, ^{18}F -FDG was used to evaluate the effect of Cerenkov radiation on DOX, in comparison to irradiation with a 450-nm laser beam, in terms of ROS production. The production of $^1\text{O}_2$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ reactive species during DOX irradiation was detected indirectly by ABMA and DCPIP bleaching, respectively. The cytotoxic effect of the DOX / ^{18}F -FDG CR system was evaluated in the T47D breast cancer cell line. The irradiation of DOX produced $^1\text{O}_2$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ species using both ^{18}F -FDG CR and a 450-nm laser beam. The majority reactive species produced in both cases was $^1\text{O}_2$; a favourable result, given the greater cytotoxicity of this species. The viability of T47D cells in presence of DOX (5 nM), ^{18}F -FDG (37.5 μCi) and DOX (5 nM)/ ^{18}F -FDG (37.5 μCi) was $(86 \pm 9)\%$, $(84 \pm 8)\%$ and $(64 \pm 5)\%$, respectively; these results suggest a synergistic cytotoxic effect derived from the cytotoxic activity of DOX and its photoactivation by ^{18}F -FDG CR. It is worth noting that the system could be optimized in terms of DOX concentration and ^{18}F -FDG activity for better results. Due to the fact that ^{18}F -FDG is widely used in nuclear imaging, the DOX/ ^{18}F -FDG system also possesses theragnostic characteristics. Thus, in this work, it is demonstrated that DOX can be used in a dual therapy system based on chemotherapy-PDT when ^{18}F -FDG CR is used as a DOX excitation source.

1. Introduction

Doxorubicin (DOX) is an anthracycline that has been used for more than 40 years as a chemotherapeutic agent in various types of haematological and solid cancers. The most-used chemical form in clinical practice is doxorubicin hydrochloride (DOX-HCl) [1]. The best-known side effect of DOX is cardiotoxicity, although myelosuppression, testicular and adipose tissue atrophy, liver damage, among others, have also been reported [1,2]. Such effects could be lessened by applying a lower

dose of DOX, but the antitumour response would be compromised. A promising alternative is the use of adjuvant therapy, such as photodynamic therapy (PDT).

PDT is based on the formation of reactive oxygen species (ROS), when a photosensitizer (PS) accumulates in a pathological tissue and is excited with an appropriate wavelength, preferably in the presence of O_2 [3,4]. The resulting ROS cause irreversible damage to target cells. However, the photoactivation is limited to surface tissues when external light sources are used, reducing the treatment of deep tissues

* Corresponding authors.

E-mail addresses: emoralesav@uaemex.mx (E. Morales-Ávila), kisaaco@uaemex.mx (K. Isaac-Olivé).

¹ Share first authorship

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111961>

Received 8 April 2020; Received in revised form 18 June 2020; Accepted 12 July 2020

Available online 18 July 2020

1011-1344/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

7.4. Página frontal del Segundo Artículo.



Copyright © 2021 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

Article

Journal of
Biomedical Nanotechnology
Vol. 17, 1–17, 2021
www.aspbs.com/jbn

A Multimodal Theranostic System Prepared from High-Density Lipoprotein Carrier of Doxorubicin and ^{177}Lu

Hilda Angeline Quintos-Meneses¹, Liliana Aranda-Lara^{1,*}, Enrique Morales-Ávila², Blanca E. Ocampo-García³, Irazú Contreras⁴, Gerardo J. Ramírez-Nava³, Clara L. Santos-Cuevas³, José A. Estrada⁴, Myrna A. Luna-Gutiérrez³, Guillermina Ferro-Flores³, Miguel A. Camacho-López⁴, Eugenio Torres-García⁵, Ninfa Ramírez-Durán⁶, and Keila Isaac-Olivé^{1,*}

¹Laboratorio de Investigación en Teranóstica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico

²Laboratorio de Toxicología y Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico

³Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos-CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de México, Mexico

⁴Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México

⁵Laboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopía Láser de Pulsos Ultracortos. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México

⁶Laboratorio de Dosimetría y Simulación Monte Carlo, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México

⁷Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México

Recently, it was demonstrated that doxorubicin (Dox.HCl), a chemotherapeutic agent, could be photoactivated by Cerenkov radiation (CR). The objective of the present work was to develop a multimodal chemotherapy-radiotherapy-photodynamic therapeutic system based on reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) loaded with Dox.HCl and ^{177}Lu -DOTA. ^{177}Lu acts as a therapeutic radionuclide and CR source. The system can be visualized by nuclear imaging. Fluorescence microscopy showed that rHDL-Dox specifically recognized cancer cells (T47D) that are positive for SR-B1 receptors. Encapsulated Dox.HCl was released into the cells and produced reactive oxygen species when irradiated with a 450-nm laser (photodynamic effect). The same effect occurred when Dox.HCl was irradiated by ^{177}Lu CR. Through *in vitro* experiments, it was confirmed that the addition of ^{177}Lu -DOTA to the rHDL-Dox nanosystem did not affect the specific recognition of SR-B1 receptors expressed in cells, or the cellular internalization of ^{177}Lu -DOTA. The toxicity induced by the rHDL-Dox/ ^{177}Lu nanosystem in cell lines with high (T47D and PC3), poor (H9C2) and almost-zero (human fibroblasts (FB)) expression of SR-B1 was evaluated *in vitro* and confirmed the synergy of the combined chemotherapy-radiotherapy-photodynamic therapeutic effect; this induced toxicity was proportional to the expression of the SR-B1 receptor on the surface of the cells used. The HDL-Dox/ ^{177}Lu nanosystem experienced uptake by tumor cells and the liver-both tissues with high expression of SR-B1 receptors-but not by the heart. ^{177}Lu CR offered the possibility of imparting photodynamic therapy where laser light could not reach.

KEYWORDS: Multimodal System, Combined Therapy, Reconstituted High-Density Lipoprotein (rHDL), Cerenkov Radiation, Theranostic System.

INTRODUCTION

Combined cancer therapies, or simultaneous co-administration of two or more cancer treatments, are

currently one of the most widely used strategies to generate a positive synergy greater than the total effect of the separate treatments, with less toxicity and greater efficacy. Recently, it was demonstrated that doxorubicin (Dox.HCl), a chemotherapeutic agent frequently used for the treatment of solid and hematological tumors, can be photoactivated by Cerenkov radiation (CR) from ^{18}F -FDG, leading to the synergistic cytotoxic effect of the combined

*Authors to whom correspondence should be addressed.

Emails: larandal@uaemex.mx, kisaaco@uaemex.mx

Received: 10 April 2021

Revised/Accepted: 1 August 2021

8. Discusión General.

El desarrollo del sistema de terapia multimodal basado en nanocápsulas de rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu capaz de dirigirse a tumores que sobreexpresan el receptor SR-B1 se basó en las siguientes consideraciones:

- a) Otros autores habían demostrado la sinergia positiva quimioterapia-TFD a partir de nanosistemas con DOX como agente quimioterapéutico (Aniogo *et al.*, 2017; Candido *et al.*, 2018; Sadeghloo *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020) pero sin tener en cuenta sus propiedades como fotosensibilizador.
- b) Uno de los mecanismos aceptados sobre el efecto antitumoral y cardiotoxico de la DOX es el estrés oxidativo (Pugazhendhi *et al.*, 2018) provocado por ROS ($O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} y H_2O_2) que se incrementa al irradiar con láser (Lanks *et al.*, 1994; Shah *et al.*, 2017). Por lo tanto, se pensó que la DOX podía utilizarse no solo como quimioterapéutico, sino también como fotosensibilizador para aumentar la producción de ROS, a pesar de su bajo *quantum yield* de fluorescencia (Motlagh *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2017).
- c) Si la DOX se acumulara en un tumor interno y se irradiara *in vivo* con un láser externo de 480 nm, la luz no llegaría al tumor debido a su escasa penetración en el tejido. Para lograr el efecto fotodinámico se tendría que utilizar una fuente de excitación lo más cercana posible al sitio de acumulación. La CR que se produce cuando la radiación β^- atraviesa el tejido, se ha utilizado como fuente interna de luz en TFD (Kamkaew *et al.*, 2016). El problema quedaría, entonces resuelto si se diseñara un nanosistema capaz de transportar al mismo tiempo la DOX y un radionúclido β^- emisor.
- d) La rHDL es una nanopartícula ideal por su capacidad de carga multimodal y propiedad de liberar la carga transportada en el núcleo a través de los receptores SR-B1 (Simonsen, 2016).

Este trabajo de tesis se encaminó a evaluar en primer lugar, la capacidad de la DOX como PS al ser irradiada con un láser. Se demostró la formación de ROS mediante fotoblanqueo de soluciones de DOX-ABMA y de DOX-DCPIP. El fotoblanqueo de la solución de DOX-ABMA indica la presencia de (1O_2) (Cáceres *et al.*, 2017; Alea-Reyes *et al.*, 2017) y el de la solución de DOX-DCPIP indica la

formación del O_2^{*-} (Ikediobi, 1977). Se calcularon las velocidades de fotoblanqueo de ambas soluciones y se demostró que la principal especie que se produce es el 1O_2 . Con este resultado se confirmó la hipótesis de que la DOX constituye un buen candidato para diseñar un sistema dual quimioterapia-TFD.

El segundo paso requirió demostrar la posibilidad de fotoactivar la DOX por CR. A partir del espectro Cerenkov construido por Jiménez-Mancilla *et al.*, (2019) y del espectro de excitación de la DOX reportado por Shah *et al.*, (2017), se contempló la posibilidad de excitar la antraciclina con esta fuente de luz. El tercio inferior de la banda de excitación de la DOX (de 380-450nm) coincide con las longitudes de onda de mayor intensidad del espectro Cerenkov en esta región. Por lo tanto, en teoría, la CR del ^{18}F debía excitar a la DOX. Los resultados demostraron que la DOX producía también ROS al irradiarse con CR provocada por ^{18}F -FDG. Las soluciones DOX+ABMA+ ^{18}F -FDG y DOX+DCPIP+ ^{18}F -FDG mostraron un fotoblanqueo proporcional a la actividad del ^{18}F -FDG presente, lo que demuestra la formación de 1O_2 y O_2^{*-} . Al igual que cuando se irradió con luz láser de 450 nm, la principal especie producida fue el 1O_2 .

El tercer paso consistió en demostrar el efecto citotóxico DOX + ^{18}F FDG. Mediante estudios *in vitro* se constató que la viabilidad de células T47D disminuía significativamente ($p < 0,01$) en presencia de DOX + ^{18}F FDG con relación a las células tratadas únicamente con DOX o con ^{18}F -FDG (resultado muy notorio a los 37,5 μ Ci) (Tabla 5). Esta disminución dosis-dependiente se debe al efecto tóxico combinado de DOX en su función dual de agente quimioterapéutico y PS y a la interacción con el tejido celular tanto de los fotones de la aniquilación positrónica del ^{18}F -FDG como de la CR producida en el medio. La sinergia de todos estos efectos aumenta la eficacia del sistema DOX + ^{18}F FDG.

Tabla 5. Efecto citotóxico *in vitro* en células T47D.

μCi	Viabilidad de células sin tratar	Viabilidad de células con DOX
0 μCi	100%	86%
	Viabilidad de células con $^{18}\text{F-FDG}$	Viabilidad de células con DOX + $^{18}\text{F-FDG}$ (50 μL)
17 μCi	98 %	84 %
37,5 μCi	84 %	64 %
75 μCi	49 %	37 %
112 μCi	31 %	20 %
150 μCi	21 %	12 %

El empleo del $^{18}\text{F-FDG}$ como fuente de CR permite emplear la TFD con DOX en tumores de localización profunda al tiempo que se pueden adquirir imágenes del sitio de acumulación por tomografía por emisión de positrones (PET), ampliamente utilizada para la detección de tumores. Sin embargo, la idea inicial era obtener un sistema multimodal que incluyera también la radioterapia.

Derivado de lo anterior, la etapa siguiente del trabajo consistió en preparar nanocápsulas de rHDL cargadas con DOX y con ^{177}Lu (rHDL/DOX/ ^{177}Lu). La selección del ^{177}Lu en lugar del ^{18}F se debió a las siguientes consideraciones:

(a) Cualquier radionúclido β^- emisor producirá CR y excitará la DOX al igual que el ^{18}F . Se sabe que en el efecto Cerenkov (una vez superada la energía umbral) la forma del espectro es la misma, independientemente de la partícula que viaja en el medio. Además, el ^{177}Lu está caracterizado como un buen emisor de CR (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2019).

(b) El ^{177}Lu tiene un período de semidesintegración mayor que el del ^{18}F , lo que constituye una ventaja para la preparación de radiofármacos terapéuticos. Califica, además, como radionúclido teranóstico debido a que emite partículas β^- y radiación γ . La radiación β^- proporciona un excelente efecto radiotóxico y la radiación γ posibilita observar el sitio de acumulación mediante imagen SPECT. Un sistema multimodal basado en DOX y ^{177}Lu en lugar de ^{18}F sumaría la ventaja de la radioterapia, por lo que resultaría más atractivo.

Se prepararon nanocápsulas de rHDL vacías, de rHDL/DOX y liposomas vacíos con el objetivo de realizar comparaciones con sistemas ya conocidos. Las nanocápsulas preparadas mostraron tamaño y homogeneidad adecuados para atravesar la vasculatura del microambiente tumoral cuyo diámetro habitual es de 40 a 200 nm (Zein *et al.*, 2020). Las nanocápsulas preparadas presentaron los siguientes diámetros: rHDL vacías: 116.5 nm; rHDL/DOX: 113.5 nm; liposomas: 130.1 nm. Estos resultados coinciden con los publicados por Zein *et al.* (2020). El índice de polidispersidad (PDI) fue de 0,311, 0,346 y 0,490 respectivamente, lo que indica una adecuada homogeneidad.

Mediante espectrofotometría UV-Vis se demostró que las nanocápsulas de rHDL se cargaron con DOX. Los espectros de los liposomas vacíos y la rHDL vacías no mostraron ningún máximo de absorción, en tanto que los liposomas cargados con DOX (Doxil comercial), las rHDL/DOX y la DOX en solución mostraron el máximo de absorción a 480 nm característico de la DOX.

Debido a la hidrofiliidad de la DOX la eficiencia de carga en la rHDL fue baja (1%), aunque similar a la reportada para micelas poliméricas con núcleo hidrofóbico (Washington *et al.*, 2018; Soltantabar *et al.*, 2020) y suficiente para demostrar el efecto combinado deseado. Según Lacko *et al.*, (2007) para lograr una alta eficiencia de carga en el núcleo de la rHDL es necesario que la molécula a incorporar tenga un coeficiente de partición *octanol:agua* (expresado como $\log P$) mayor a 1. El coeficiente de partición octanol:agua de la DOX.HCl expresado como $\log P$ es -0.28 (Manisha *et al.*, 2017), lo cual explica la baja eficiencia de carga obtenida.

Se evaluó el efecto fotodinámico *in vitro* a una concentración constante de nanocápsulas rHDL/DOX (1nM) y a distintos tiempos de irradiación (0 a 5 min) empleando un láser de 450 nm. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- a) Al irradiar las células T47D solas, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 90% durante todo el periodo de irradiación.
- b) Al irradiar las células T47D con una solución 1 nM de DOX, se observó un ligero efecto fotodinámico a los 5 minutos de irradiación, pues la viabilidad celular se redujo a un 87% (13% de muerte celular).

- c) Al irradiar las células T47D en presencia de nanocápsulas rHDL/DOX (1nM), la viabilidad celular a los 5 minutos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a un 80% lo que indica que el efecto combinado quimioterapia-TFD causó hasta un 20% de muerte celular (incluso a bajas concentraciones de DOX).

Los resultados sobre el efecto fotodinámico *in vitro* al variar la concentración de DOX libre y en el sistema rHDL/DOX (0,01, 0,1, 1, 10, 50, 500 y 5,000 nM) e irradiando con un láser de 450 nm durante 3 minutos mostraron que para observar un efecto apreciable *quimioterapia+ TFD*, cuando se utiliza DOX libre, se requieren concentraciones mínimas de 10 nM. Sin embargo, cuando la DOX se transporta en nanocápsulas de rHDL (rHDL/DOX) son suficientes concentraciones del orden de 1 nM para disminuir la viabilidad celular por debajo del 70%. Estos resultados confirman que la irradiación de DOX con luz láser de 450 nm disminuye notoriamente la viabilidad celular de T47D, debido a la producción de ROS. La mayor toxicidad del sistema rHDL/DOX, en comparación con DOX sola en solución, se debe a tres factores:

(1) El efecto quimioterapéutico propio de la DOX; (2) El efecto fotodinámico producido al irradiar DOX con el láser de 450 nm; y (3) Internalización celular de la DOX acarreada en la rHDL mediada por los receptores SR-B1 presentes en la superficie de las células T47D.

Otros autores han informado de una mayor toxicidad en células tumorales provocada por la combinación rHDL/DOX en comparación con DOX en solución y, lo más importante, que la incorporación de DOX en nanocápsulas rHDL, no produce cambios significativos en las propiedades del quimiofármaco ni en las propiedades de las nanocápsulas (Kader y Pater, 2002).

Para comprobar el mecanismo de internalización de la DOX encapsulada en la rHDL y la formación intracelular de ROS se realizó un ensayo de competencia con ApoA-1 utilizando microscopía de fluorescencia. Cuando las células T47D se trataron con 5 μ M de CellROX Green, en ausencia de rHDL/DOX, mostraron nula fluorescencia debido a una nula producción de ROS. Sin embargo, al ser tratadas durante 15 minutos con el sistema rHDL/DOX+ luz láser de 450nm y 5 μ M de CellROX Green, se obtuvo una clara imagen de fluorescencia que demuestra internalización de la DOX transportada por la rHDL y producción intracelular de ROS.

Tras comprobar que las nanocápsulas de rHDL/DOX mantenían sin variaciones significativas sus propiedades fisicoquímicas y de reconocimiento de los receptores SR-B1, se incorporó ^{177}Lu en las nanocápsulas rHDL vacías, en rHDL/DOX y en liposomas. Para ello se internalizó de manera pasiva el complejo hidrofóbico ^{177}Lu -p-Bn-DOTA-NCS (^{177}Lu -DOTA). En todos los casos, la eficiencia del radiomarcado fue alta (en el rango de 88 a 92%).

Se comprobó que la incorporación del ^{177}Lu -DOTA tampoco afectó el reconocimiento específico de los receptores SR-B1 presentes en las células T47D y PC3 y por ende, tanto la DOX como el ^{177}Lu encapsulados en la rHDL se internalizaron y fueron capaces de producir ROS. Igualmente, la captación de ^{177}Lu en células PC3 fue diferente cuando se transporta en nanocápsulas de rHDL (rHDL/ ^{177}Lu) y en liposomas (liposomas/ ^{177}Lu). Mientras que la captación del ^{177}Lu encapsulado en la rHDL (rHDL/ ^{177}Lu) mostró una curva de saturación característica de la captación celular mediada por receptores, la captación del ^{177}Lu encapsulado en liposomas aumentó monótonamente con el incremento de la concentración de liposomas/ ^{177}Lu debido a que el mecanismo de captación es por difusión pasiva.

La captación de nanocápsulas rHDL/DOX/ ^{177}Lu por las células tumorales PC3 y T47D fue mayor (4 y 5,5 veces, respectivamente) que la mostrada por cardiomiocitos H9C2, cuya expresión de receptores SR-B1 (comprobada previamente mediante ensayo por Western Blot) fue baja en comparación con las líneas tumorales. La captación del ^{177}Lu transportado por el sistema rHDL/DOX resultó directamente proporcional a la expresión de los receptores SR-B1 en las tres líneas celulares (H9C2<PC3<T47). Este resultado coincide con estudios previos de Mutharasan *et al.*, (2016) y Johnson *et al.* (2017), en los que se había demostrado que la captación celular de agentes quimioterapéuticos en células que sobreexpresan el receptor SR-B1 se incrementa significativamente en comparación con células control cuando se encapsulan en rHDL.

El reconocimiento específico de la rHDL/DOX/ ^{177}Lu por los receptores SR-B1 se confirmó también al comparar la relación de captación (rHDL/DOX/ ^{177}Lu) / (rHDL/ ^{177}Lu), con la relación (rHDL/DOX/ ^{177}Lu) / (^{177}Lu -DOTA) en células T47D, PC3 y H9C2. Independientemente de la línea celular, la relación de captación rHDL/DOX/ ^{177}Lu) / (rHDL/ ^{177}Lu) fue de 1, lo que indica idénticos mecanismos de internalización. Sin embargo, la relación de captación (rHDL/DOX/ ^{177}Lu) / (^{177}Lu -

DOTA) fue mayor a 1 lo debido a una mayor captación celular de ^{177}Lu cuando se transporta en la rHDL.

Los resultados de citotoxicidad en células H9C2 mostraron que las nanocápsulas de rHDL vacías no tienen efecto citotóxico sobre los cardiomiocitos en tanto que el sistema rHDL/DOX/ ^{177}Lu mostró 30% de muerte celular. Para las células tumorales PC3, la toxicidad de los sistemas mostró el orden: rHDL/DOX/ ^{177}Lu (80%) > rHDL/DOX (60%) > DOX 5X (40%) > ^{177}Lu -DOTA (25%) > DOX 1X (15%) > HDL (10%).

Una vez más las nanocápsulas de rHDL/DOX/ ^{177}Lu fueron más tóxicas debido al efecto combinado *quimioterapia-radioterapia-terapia fotodinámica*. La captación significativamente menor ($p < 0,05$) de DOX y ^{177}Lu en los cardiomiocitos H9C2, en comparación con las células tumorales T47D y PC3, le confiere propiedades cardioprotectoras al sistema rHDL/DOX/ ^{177}Lu , reportado previamente por Almer *et al.*, (2015).

Con el fin de evaluar los efectos individuales de DOX en solución y el ^{177}Lu en diferentes combinaciones (rHDL vacías, rHDL/ ^{177}Lu , rHDL/DOX, rHDL/DOX/ ^{177}Lu , DOX, DOX/ ^{177}Lu) se realizó un segundo experimento de citotoxicidad. Se comparó la toxicidad de estos sistemas en células T47D, (alta expresión de SR-B1) y fibroblastos como células control (nula expresión de SR-B1 y alta capacidad de absorber DOX (Lacko *et al.*, 2002). Para ello se utilizaron menores concentraciones de DOX y ^{177}Lu que las empleadas en los experimentos anteriores. Los sistemas con rHDL no afectaron la viabilidad de los fibroblastos. Sin embargo, la DOX y la DOX/ ^{177}Lu resultaron tóxicas para estas células debido a su capacidad para captar DOX (Doroshov *et al.*, 2019). Por su parte, las células T47D se afectaron con todos los sistemas, excepto con las rHDL vacías, demostrando nuevamente que la rHDL por sí sola no produce toxicidad significativa. El orden resultante de toxicidad fue: rHDL/DOX/ ^{177}Lu (35%) > DOX 1X (30%) > rHDL/DOX (25%) > DOX/ ^{177}Lu (20%) > rHDL/ ^{177}Lu (12%). Nuevamente el sistema más citotóxico fue rHDL/DOX/ ^{177}Lu .

Aunque el comportamiento celular *in vitro* proporciona una valiosa información en los estudios de citotoxicidad, los resultados obtenidos no siempre corresponden directamente con el comportamiento *in vivo*. Se realizó la biodistribución *in vivo* en ratones sanos con toma de imágenes SPECT, de

luminiscencia y de fluorescencia, así como imágenes *ex vivo* de fluorescencia y de rayos X de hígado, riñones e intestino.

Como la DOX tiene un bajo rendimiento cuántico (Shah *et al.*, 2017) y ante la posibilidad de no obtener imágenes luminiscentes y fluorescentes nítidas para este experimento, se sustituyó la DOX por Rodamina B (rendimiento cuántico 0,76) (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2021). Para ello se preparó el nanosistema rHDL-RB/¹⁷⁷Lu de forma similar al sistema rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu, (ver epígrafe 6.5.6) La RB en este caso ejerce la función de PS.

La imagen nuclear por SPECT (radiación γ del ¹⁷⁷Lu) muestra que a las 2 horas postinyección, el sistema rHDL-RB/¹⁷⁷Lu se capta principalmente en hígado, órgano diana de la rHDL por su alta expresión del receptor SR-B1 (Shen *et al.*, 2018). A medida que el nanosistema se va metabolizando en el hígado, se observa una captación gradual en intestino, órgano que expresa cierto número de receptores SR-B1 en su superficie (Rigotti *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2018). En el resto de los tejidos, incluyendo el corazón, la captación del nanosistema fue prácticamente nula. Tales resultados coinciden con la biodistribución en ratones sanos de nanocápsulas rHDL/^{99m}Tc, previamente informada por Isaac-Olivé *et al.* (2019). Se confirmó que la encapsulación de la DOX en la rHDL evita la toxicidad multiorgánica que provoca la DOX libre.

La imagen luminiscente debida a la CR del ¹⁷⁷Lu y la imagen fosforescente debida al efecto fotodinámico de la CR del ¹⁷⁷Lu sobre la RB, revelan también captación hepática preferencial a las 2 horas postinyección, lo que demuestra que tanto la RB como el ¹⁷⁷Lu estaban co-localizados en el órgano.

A las 24 horas postinyección, las imágenes de fluorescencia *ex vivo* del hígado, riñones e intestino revelan que cuando RB se inyecta sola, la acumulación hepática es insignificante; mientras que cuando se inyecta el nanosistema rHDL-RB/¹⁷⁷Lu, la acumulación es mucho mayor, debido a que la rHDL facilita la captación hepática de la RB por la alta expresión de receptores SR-B1 en el órgano. La imagen confirma claramente el papel de las nanocápsulas rHDL en el transporte y liberación de fármacos acoplados en su núcleo, demostrada también en los experimentos *in vitro*.

Cabe destacar que, aunque estas imágenes fueron obtenidas en ratones sanos, en ratones portadores de tumores la rHDL también se acumula en hígado debido a la alta expresión del receptor SR-B1 en el órgano, demostrado previamente por Isaac-Olivé et al. (2019) con el sistema rHDL/^{99m}Tc.

Se puede hipotetizar que la elevada captación del nanosistema rHDL/DOX/⁷⁷Lu en el hígado (modelada con rHDL-RB/¹⁷⁷Lu) revelada por las imágenes obtenidas, podría inducir una apreciable toxicidad en el órgano. Sin embargo, es importante señalar que la eficiencia de carga de DOX en rHDL es mucho más baja que en los liposomas por lo que, en principio, deben inducir menor hepatotoxicidad.

Finalmente, se realizó una biodistribución *ex vivo* rHDL/¹⁷⁷Lu en ratones con tumor PC3 inducido. La rHDL/¹⁷⁷Lu se aplicó tanto por vía intravenosa (IV) como intratumoral (IT). A las 24 horas postinyección el nanosistema se acumula en tumor independientemente de la vía de administración. La relación tumor/sangre fue de 30 (IV) y 97 (IT). Al igual que en los estudios *in vitro* e *in vivo*, con ratones sanos no se observó captación en el corazón ni en ningún otro tejido periférico, lo que confirma las propiedades cardioprotectoras del sistema ya mencionadas.

La posibilidad de obtener imágenes del sitio de acumulación del nanosistema rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu desarrollado, prueban sus propiedades teranósticas. El rastreo de la biodistribución de las nanocápsulas rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu, principalmente mediante imágenes SPECT, es una característica que se agrega a las propiedades quimioterapéuticas, radioterapéuticas y de TFD demostradas *in vitro*.

9. Conclusiones Generales.

- ✓ Se desarrolló un sistema terapéutico multimodal basado en nanocápsulas rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu, que combina quimioterapia, radioterapia y terapia fotodinámica. La toxicidad que induce el sistema en las células tumorales es superior a los efectos aislados de DOX (quimioterapia) y ¹⁷⁷Lu (radioterapia) ya que la CR que provoca el ¹⁷⁷Lu en el tejido es capaz de excitar la DOX para producir ROS, lo que adiciona el efecto fotodinámico al sistema quimioterapia-radioterapia.
- ✓ Las nanocápsulas rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu obtenidas manifestaron reconocimiento específico por los receptores SR-B1. La toxicidad que inducen es proporcional a la expresión del receptor SR-B1 en la superficie de las células. Esta propiedad se confirmó tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. En los estudios *in vitro* la toxicidad fue mayor en células tumorales que expresan el receptor (T47D y PC3) que en células con escasa o nula expresión de este (H9C2 y fibroblastos). Los estudios *in vivo* mostraron idéntico comportamiento.
- ✓ Las nanocápsulas rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu se acumularon principalmente en las células tumorales y el hígado y en menor proporción en intestino, sin mostrar acumulación apreciable en corazón y tejidos periféricos.
- ✓ La baja eficiencia de carga de la DOX en las nanocápsulas rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu lejos de constituir un obstáculo para su aplicación, resulta una ventaja ya que la rHDL entrega directamente al citoplasma la carga útil que transporta. De esta manera, se puede reducir de manera significativa la dosificación del fármaco y la conocida resistencia que la antraciclina induce en las células tumorales cuando se administra en dosis altas y repetidas, lo que convierten al sistema en cardioprotector.
- ✓ La elevada captación de las nanocápsulas rHDL/DOX/¹⁷⁷Lu en el hígado tampoco es una limitación para su aplicación futura. Mediante cálculos de estimaciones de dosis internas se puede determinar la actividad máxima a inyectar en función de las características individuales cada paciente. También pueden administrarse suplementos dietéticos para disminuir la captación hepática y evitar la hepatotoxicidad, que se presupone escasa debido a la baja eficiencia de carga de la DOX en la rHDL.

- ✓ Las propiedades nucleares del ^{177}Lu permiten rastrear la distribución *in vivo* de las nanocápsulas de rHDL/DOX/ ^{177}Lu mediante imágenes SPECT u ópticas lo que otorga al nanosistema una característica teranóstica muy atractiva para la terapia individualizada.

10. Referencias.

- Abeylath, S. C., Ganta, S., Iyer, A. K., & Amiji, M. (2011). Combinatorial-designed multifunctional polymeric nanosystems for tumor-targeted therapeutic delivery. *Acc Chem Res*, *44* (10), 1009–17.
- Acton, S., Scherer, P., Lodish, H., & Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.*, *269*(33), 21003–9.
- Ahmadzadehfar, H. (2016). Targeted therapy for metastatic prostate cancer with radionuclides. Prostate Cancer – Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments. In R. Mohan (Ed.), *Thyroid Cancer-Advances in Diagnosis and Therapy*. <https://doi.org/DOI: 10.5772/64016>
- Alea-Reyes, M. E., Rodrigues, M., Serrà, A., Mora, M., Sagristá, M. L., González, A., Durán, S., Duch, M., Plaza, J. A., Vallés, E., Russell, D. A., & Pérez-García, L. (2017). Nanostructured materials for photodynamic therapy: synthesis, characterization and in vitro activity. *RSC Adv*, *7*(28), 16963–16976. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C7RA01569K>
- 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>
- Alves de Lima, E. J., Yamashita, As., Duarte Pimentel, G., & De Sousa, L. G. O. (2016). Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *7*(615–625). <https://doi.org/10.1002/jcsm.12104>
- Aniogo, E. C., George, B., & Abrahamse, H. (2017). In vitro combined effect of Doxorubicin and sulfonated zinc Phthalocyanine– mediated photodynamic therapy on MCF-7 breast cancer cells. *Tumour Biol*, *39*(10). <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/1010428317727278>
- Ballinger, J. (2018). Theranostic radiopharmaceuticals: established agents in current use. *The British Journal of Radiology*, *91*(1091)(20170969). <https://doi.org/10.1259/bjr.20170969>
- Baranova, I. N., Souza, A. C., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Hu, X., Vaisman, B. L., & Amar, M. (2016). Human SR-BI and SR-BII potentiate lipopolysaccharide-induced inflammation and acute liver and kidney injury in mice. *J. Immunol*, *196*, 3135–3147.
- Bobo, D., Robinson, Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research.*, *33*(10), 2373–2387.
- Bollhorst, T., Rezwan, K., & Maas, M. (2017). Colloidal capsules: nano- and microcapsules with colloidal particle shells. *Chem. Soc. Rev.*, *46*(8), 2091–2126.
- Cáceres, J. B., Robinson-Duggon, J., Tapia, A., Paiva, C., Gómez, M., Bohne, C., & Fuentealba, D. (2017). Photochemical behavior of biosupramolecular assemblies of photosensitizers, cucurbit[n]urils and albumins. *Phys. Chem. Chem. Phys*, *19*(3), 2574–2582. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C6CP07749H>
- Candido, N. M., de Melo, M. T., Franchi, L. P., Primo, F. L., Tedesco, A. C., Rahal, P., & Calmon, M. F. (2018). Combining photodynamic therapy and chemotherapy: improving breast Cancer

- treatment with nanotechnology. *J. Biomed. Nanotechnol*, *14*, 994–1008.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2558>
- Cao, W., Murao, K., Imachi, H., Yu, X., & Abe, H. (2004). A mutant high-density lipoprotein receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res.*, *64* (4), 1515–21.
<https://doi.org/doi:10.1158/0008-5472.can-03-0675>.
- Carnuta, M., Stancu, C., Toma, L., Sanda, G., Nicolescu, L., & Deleanu, M. (2017). Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Sci Rep*, *7*(1), 7295.
- Carvajal Carvajal, C. (2019). *Lípidos, lipoproteínas y aterogénesis*. (pp. 20–51). Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).
- Celli, J., Spring, B., & I, R. (2010). Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. *Chem Rev.*, *110* (5), 2795–2838.
- Connelly, M., Klein, S., Azhar, S., Abumrad, N., & Williams, D. (1999). Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J. Biol. Chem.*, *274*, 41–47. <https://doi.org/doi:10.1074/jbc.274.1.41>.
- Counsell, R., & Pohland, R. (1982). Lipoproteins as potential site-specific delivery systems for diagnostic and therapeutic agents. *J. Med. Chem.*, *25*(10), 1115–1120.
<https://doi.org/10.1021/jm00352a001>
- Cruz, DA., Rodríguez, MC., López, JM., Herrera, VM., Orive, AG., & Creus, A. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances En Ciencia e Ingeniería*, *3*(2), 67–78.
- Danilo, C., Gutierrez-Pajares, J. L., Mainieri, M. A., Mercier, I., Lisanti, M. P., & Frank, P. G. (2013). Scavenger receptor class B type I regulates cellular cholesterol metabolism and cell signaling associated with breast cancer development. *Breast Cancer Research*, *15*(5), 2–13.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/bcr3483>
- De Angelis, A., Cappetta, D., Berrino, L., & Urbanek, K. (2018). Doxorubicin Cardiotoxicity: Multiple Targets and Translational Perspectives. *IntechOpen*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80057>
- Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *3*(5), 380–387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrc1071>
- Doroshov, J., Esworthy, R., & Chu, F. (2019). Control of doxorubicin-induced, reactive oxygen related apoptosis by glutathione peroxidase 1 in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Rep*, *26*(21), 100709. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100709>
- dos Santos, A. F., De Almeida, D. R. Q., Terra, L. F., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2019). Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *J Cancer Metastasis*, *5*, 25.
<https://doi.org/https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>.

- Duncan, R., & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8 (6), 2101–2141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/mp200394t>
- Eifler, A. C., & Thaxton, C. S. (2011). *Nanoparticle Therapeutics: FDA Approval, Clinical Trials, Regulatory Pathways and Case Study. Biomedical Nanotechnology: Methods and Protocols.* (pp. 325–338).
- Farbstein, D., & Levy, A. (2012). HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 10(3), 353–361.
- Farokhzad, O., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16–20. <https://doi.org/doi:10.1021/nn900002m>.
- Ferro-Flores, G., & Arteaga de Murphy, C. (2007). Radiofármacos de tercera generación. *Comité de Radiofarmacia. Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear. Radiofármacos Terapéuticos.*, 8–16.
- Ferro-Flores, G., Arteaga de Murphy, C., & Melendez, A. (2006). Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy. *Curr Pharm Anal*, 2(4), 339–52. <https://doi.org/10.2174/157341206778699555>
- Figge, F. H. J., Weiland, G. S., & Manganelli, L. O. J. (1948). Cancer Detection and Therapy. Affinity of Neoplastic, Embryonic, and Traumatized Tissues for Porphyrins and Metalloporphyrins. *Exp Biol Med*, 68(3), 640–641. <https://doi.org/doi:10.3181/00379727-68-16580>
- Floor, S. L., Dumont, J. E., Maenhaut, C., & Raspe, E. (2012). Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends in Molecular Medicine*, 18 (9), 509–515. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.06.005>
- Flórez Beledo, J., Armijo Simón, J., & Mediavilla Martínez, A. (2014). Farmacología humana. In *Elsevier Masson* (6th ed.).
- Gendelman, H., Mosley, R., Boska, M., & McMillan, J. (2014). The promise of nanoneuromedicine. *Nanomedicine*, 9(2), 171–176.
- GLOBOCAN. (2020). Section of Cancer Information. *Consultado En Marzo de 2021.* <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. (2011). No Title. *National Academy Press.*
- Gutierrez-Pajares, J., Ben Hassen, C., Chevalier, S., & Frank, P. (2016). SR-BI: Linking cholesterol and lipoprotein metabolism with breast and prostate cancer. *Front. Pharmacol.*, 7, 338. <https://doi.org/doi:10.3389/fphar.2016.00338>
- Guyen, C., Sevgiler, Y., & Taskin, E. (2018). Mitochondrial Dysfunction Associated with Doxorubicin. *Mitochondrial Diseases*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80284>
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., & Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31, 3657–3666. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>

- Heger, Z., Cernei, N., Kudr, J., Gumulec, J., Blazkova, I., Zitka, O., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., & Kizek, R. (2013). A novel insight into the cardiotoxicity of antineoplastic drug doxorubicin. *Int J Mol Sci*, *14*(11), 21629-46. <https://doi.org/doi: 10.3390/ijms141121629>.
- Hillemanns, P., Pretty, K., & Soergel, P. (2014). Efficacy and safety of hexaminolevulinate photodynamic therapy in patients with low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Lasers Surg Med.*, *44*(6), 468–474.
- Ikediyobi, C. (1977). Bleaching of Dichlorophenolindophenol by a Coupled Oxidation with Linoleate Catalyzed by Soybean Lipoxygenase. *Agricultural and Biological Chemistry*, *41*(12), 2369–2375. <https://doi.org/10.1080/00021369.1977.10862867>
- Isaac-Olivé, K., Ocampo-García, B. E., Aranda-Lara, L., Santos-Cuevas, C. L., Jiménez-Mancilla, N. P., Luna-Gutiérrez, M. A., & Lacko, A. G. (2019). [^{99m}Tc-HYNIC-N-dodecylamide]: a new hydrophobic tracer for labelling reconstituted high-density lipoproteins (rHDL) for radioimaging. *Nanoscale*, *11*(2), 541–551.
- Janib, S. M., Moses, A. S., & MacKay, J. A. (2010). Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *62* (11), 1052–1063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.004>
- Jiménez-Cotes, E., Meyer-Martínez, W., & Gallego-González, D. (2015). Biomarcadores en la detección temprana de Cardiotoxicidad Inducida por quimioterapia; estado actual. *Arch Med (Manizales)*, *15*(1), 126-37.
- 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 Chemistry*, *409*(113131). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113131>
- Jiménez-Mancilla, N. P., Isaac-Olivé, K., Torres-García, E., Camacho-López, M. A., Ramírez-Nava, G. J., & Mendoza-Nava, H. J. (2019). Theoretical and experimental characterization of emission and transmission spectra of Cerenkov radiation generated by ¹⁷⁷Lu in tissue. *J. Biomed. Opt.*, *24*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1117/1. JBO.24.7.076002>
- Johnson, R., Sabnis, N., Sun, X., Ahluwalia, R., Lacko, A. (2017). SR-B1-targeted nanodelivery of anti-cancer agents: a promising new approach to treat triple-negative breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, *9*, 383.
- Kader, A., & Pater, A. (2002). Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little affect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma cells. *J. Control. Release*, *80*(1-3), 23–44. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00536-3](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00536-3)
- Kamkaew, A., Cheng, L., Goel, S., Valdovinos, H. F., Barnhart, T. E., Liu, Z., & Cai, W. (2016). Cerenkov Radiation Induced Photodynamic Therapy Using Chlorin e6-Loaded Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *8*(40), 26630–26637. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsami.6b10255>
- Kassis, A. I. (2008). Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. *Seminars in Nuclear Medicine*, *38*(5), 358–366.

- Kassis, A. I., & Adelstein, S. J. (2005). Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J Nucl Med*, *46*(1), 4S-12S.
- Kemp, J. A., Shim, M. S., Heo, C. Y., & Kwon, Y. J. (2016). “Combo” nanomedicine: Co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *98*, 13–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.019>
- Kim, D. R., Lee, S. ., Kim, J. S., Kim, Y. G., Moon, J. Y., Lee, S. H., Lee, T. W., Ihm, C. G., & Jeong, K. . (2017). Ameliorating Effect of Gemigliptin on Renal Injury in Murine Adriamycin-Induced Nephropathy. *BioMed Research International*, *2017*(7275109). <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2017/7275109>
- Krause, M., Dubrovskaja, A., Linge, A., & Baumann, M. (2017). Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *109*, 63–73.
- Kuai, R., Li, D., Chen, Y. E., Moon, J. J., & Schwendeman, A. (2016). High-density lipoproteins: nature’s multifunctional nanoparticles. *ACS Nano*, *10*, 3015–3041. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07522>
- Kubeček, O., Bláha, M., Diaz-Garcia, D., & Filip, S. (2015). Extracorporeal Elimination of Circulating Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) to Enhance the Benefit of Cytostatic Therapy in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Patients. *Acta Medica (Hradec Králové) / Univ Carolina, Fac Medica Hradec Králové.*, *58*(1), 3–8.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Lacko, A. G., Nair, M., Paranjape, S., Johnson, S., & McConathy, W. J. (2002). High density lipoprotein complexes as delivery vehicles for anticancer drugs. *Anticancer Research*, *22*(4), 2045–2050.
- Lacko, A. G., Nair, M., Prokai, L., & McConathy, W. J. (2007). Prospects and challenges of the development of lipoprotein-based formulations for anti-cancer drugs. *Expert Opin Drug Deliv.*, *4*(6), 665–675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1517/17425247.4.6.665>
- Lacko, A. G., Sabnis, N. A., Nagarajan, B., & McConathy, W. . (2015). HDL as a drug and nucleic acid delivery vehicle. *Front. Pharmacol.*, *6*, 247. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00247>
- Lanks, K., Gao, J., & Sharma, T. (1994). Photodynamic enhancement of doxorubicin cytotoxicity, Cancer Chemother. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, *35*, 17–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00686279>
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger: Principles of Biochemistry* (5a ed). New York: W. H. Freeman and Company.
- Li, J., Wang, J., Li, M., Yin, L., Li, X. A., & Zhang, T. G. (2016). Up-regulated expression of scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) is associated with malignant behaviors and poor prognosis of breast cancer. *Pathol Res Pract*, *212*(6), 555–559. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.03.011>

- Lima, M. M., Balladares, N., Bermúdez, A., López, G., & Soltero, I. (2011). Bases fisiológicas del metabolismo de lipoproteínas. *INFORMED*, *13* (8), 363–370.
- Lipshultz, S., Miller, T., Lipsitz, S., Neuberg, D., Dahlberg, S., Colan, S., Silverman, L., Henkel, J., Franco, V., Cushman, L., Asselin, B., Clavell, L., Athale, U., Michon, B., Laverdiere, C., Schorin, M., Larsen, E., Usmani, N., & Sallan, S. (2012). *Continuous Versus Bolus Infusion of Doxorubicin in Children With ALL: Long-term Cardiac Outcomes*. *130* (6), 1003–1011. <https://doi.org/https://doi.org/10.1542/peds.2012-0727>
- Liu, S. (2008). Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev*, *60*(12), 1347–1370. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.04.006>
- Lou, B., Liao, X., Wu, M., Cheng, P., Yin, C., & Fei, Z. (2005). High-density lipoprotein as a potential carrier for delivery of a lipophilic antitumoral drug into hepatoma cells. *World J. Gastroenterol.*, *11*(7), 954–9. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i7.954>
- Lukšienė, Z. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *39*(12), 137–1150.
- Makoto, H., Hideharu, I., Yoshihide, N., Nobutaka, N., Takahiro, Y., Sachiko, Y., Asami, K., Kiyotaka, K., Hiroyasu, S., Seigo, K., Tomio, I., & Jun, H. (2018). Manual on the proper use of lutetium-177-labeled somatostatin analogue (Lu-177-DOTA-TATE) injectable in radionuclide therapy. *Annals of Nuclear Medicine*, *32*(6), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s12149-018-1230-7>
- Malimonenko, N., Butenin, A., Mester, I., & Kogan, B. (2019). Nonlinear photodynamic therapy using saturation of the photosensitizer triplet states. *Laser Phys. Lett*, *16* (5). <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/1612-202X/ab0a5b>
- Mallakpour, S., & Behranvand, V. (2016). Polymeric nanoparticles: Recent development in synthesis and application. *EXPRESS Polym. Lett.*, *10*(11), 895–913.
- Manisha, K., Amit, A., Mishra, T. S., Mamta, K., & Swati, B. (2017). Quantitative estimation of dextran conjugated ppi dendrimer for delivery of doxorubicin hydrochloride as an anticancer drug. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(4), 1260–1273. <https://doi.org/10.20959/wjpps20174-8893>
- März, W., Kleber, M., Scharnagi, H., Speer, T., Zewinger, S., Ritsch, A., Parhofer, K., Von Eckardstein, A., Landmesser, U., & Laufs, U. (2017). HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. . . *Clin Res Cardiol*, *106*(9), 663–675.
- McGovern, V. J. (1961). The Mechanism of Photosensitivity An Experimental Study. *Arch Dermatol*, *83*(1), 40–51. <https://doi.org/doi:10.1001/archderm.1961.01580070046006>
- McMahon, K. M., Scielzo, C., Angeloni, N. L., Deiss-Yehiely, E., Scarfo, L., & Ranghetti, P. (2016). Properties of native high-density lipoproteins inspire synthesis of actively targeted in vivo siRNA delivery vehicles. *Adv. Funct. Mater.*, *26*, 7824–7835. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.201602600>
- Meza-Cejudo, S. (2017). Cardiotoxicidad por quimioterapia; implicaciones anestésicas. *Rev Mex Anestesiol.*, *40* (1), 18–20.

- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, *56*(2), 185–229.
- Misra, R., Acharya, S., & Sahoo, S. K. (2010). Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today*, *15* (19-20), 842–850. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.006>
- Mitry, M. A., & Edwards, J. G. (2016). Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart & Vasculature*, 17–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.11.004>
- Mooberry, L., Nair, M., Paranjape, S., McConathy, W., & Lacko, A. (2010). Receptor Mediated Uptake of Paclitaxel From a Synthetic High Density Lipoprotein Nanocarrier. *J. Drug Target.*, *18*(1), 53–58. <https://doi.org/doi:10.3109/10611860903156419>.
- Mooberry, L., Sabnis, N., Panchoo, M., Nagarajan, B., & AG., L. (2016). Targeting the SR-B1 receptor as a gateway for cancer therapy and imaging. *Front. Pharmacol.*, *7*, 466. <https://doi.org/doi:10.3389/fphar.2016.00466>.
- Motlagh, N., Parvin, P., Ghasemi, F., & Atyabi, F. (2016). Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. *Biomed. Opt. Express*, *7*(6), 2400–2406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1364/BOE.7.002400>
- Murakami, T., Wijagkanalan, W., Hashida, M., & K., T. (2010). Intracellular drug delivery by genetically engineered high-density lipoprotein nanoparticles. *Nanomedicine*, *5*(6), 867-879. <https://doi.org/doi:10.2217/nmm.10.66>
- Murphy, A. J., Woollard, K. J., Hoang, A., Mukhamedova, N., Stirzaker, R. A., McCormick, S. P., & Remaley, A. T. (2008). High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *28*, 2071–2077.
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Rodwel, V., & Weil, P. (2010). *Bioquímica ilustrada* (28th ed.). McGraw Hill.
- Mutharasan, R. K., Foit, L., & Thaxton, C. S. (2016). High-density lipoproteins for therapeutic delivery systems. *J Mat Chem B*, *4*(2), 188–197. <https://doi.org/10.1039/c5tb01332a>
- Nakamura, Y; Nagaya, T; Sato, K; Okuyama, S; Ogata, F; Wong, K; Adler S; Choyke, PL; Kobayashi, H. (2017). Cerenkov radiation–induced Photoimmunotherapy with 18 F-FDG. *J. Nucl. Med.*, *58*, 1395–1400. <https://doi.org/https://doi.org/10.2967/jnumed.116.188789>
- Navarrete Hurtado, S., Castellanos Mejía, A., & Chaparro Sanabria, A. (2011). Cardiotoxicidad por quimioterapia. *Insuf Card*, *6* (3), 131–143.
- Navarro-Ulloa, O., Barranco-Camargo, L., Jurado- López, S., Zabala-Carballo, C., & Giraldo-Peniche, L. (2018). Muerte súbita debida a cardiotoxicidad aguda inducida por antraciclinas. *Rev Colomb Cardiol*, *25*(1), 80. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2017.07.009>
- Neilan, T., Jassal, D., Pérez-Sanz, T., Raheer, M., Pradhan, A., & Buys, E. (2006). Tissue doppler imaging predicts left ventricular dysfunction and mortality in a murine model of cardiac injury. *Eur Heart J.*, *27*, 1868–75.

- Nicholls, S., Dusting, G., Cutri, B., Bao, S., Drummond, G., Rye, K., & Barter, P. (2005). Reconstituted highdensity lipoprotein inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation*, *111*(12), 1543–1550.
- Norma Oficial Mexicana-NOM-004-NUCL-2013. (2013). Clasificación de los desechos radiactivos. *Diario Oficial de La Federación*. Mayo 2013. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/122284/NOM-004-NUCL-2013_Clasificaci_n_de_desechos_radiactivos.pdf
- Norma Oficial Mexicana-NOM-012-STPS-1999. (2012). Condiciones de seguridad y salud en los centros de trabajo donde se manejen fuentes de radiación ionizante. *Diario Oficial de La Federación*. Octubre 2012. <http://www.stps.gob.mx/bp/secciones/dgsst/normatividad/normas/nom-012.pdf>
- Norma Oficial Mexicana-NOM-36-NUCL-2001. (2001). Requerimientos para instalaciones de tratamiento y acondicionamiento de los desechos radiactivos. *Diario Oficial de La Federación*. Septiembre 2001. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/122329/NOM-036-NUCL-2001_26SEP01_REQUERIMIENTOS_PARA_INST_DE_TRATAMIENTO_Y_ACONDICIONAMIENTO_DE_DR.pdf
- Norma Oficial Mexicana -NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de La Federación*. Agosto 2001. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (2003). Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. *Diario Oficial de La Federación*. Febrero 2003.
- Octavia, Y., Tocchetti, C., Gabrielson, K., Janssens, S., Crijns, H., & Moens, A. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J. Mol. Célula. Cardiol*, *52* (6), 1213–1225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>
- OIEA/ (Organización internacional de Energía Atómica). (2020). *Terapia con radionucleidos*. <https://www.iaea.org/es/temas/terapia-con-radionucleidos>
- OMS/ Organización Mundial de la Salud. (n.d.). Estimaciones de salud global 2020: Muertes por causa, edad, sexo, por país y por región, 2000-2019. *Consultado En Marzo de 2021*. who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death
- Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2019). Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells*, *8*(728). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells8070728>
- Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M., Kelleher, D., & Reynolds, J. (2011). Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagn Photodyn Ther.*, *8*(1), 14–29.
- Pfeiler, S., Khandagale, A. B., Magenau, A., Nichols, M., Heijnen, H. F., Rinninger, F., & Ziegler, T. (2016). Distinct surveillance pathway for immunopathology during acute infection via

- autophagy and SR-BI. *Sci. Rep.*, 6, 34440.
- Pugazhendhi, A., Edison, T. N. J. I., Velmurugan, B. K., Jacob, J. A., & Karuppusamy, I. (2018). Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci*, 200, 26–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.023>
- Raut, S., Mooberry, L., Sabnis, N., Garud, A., Dossou, A., & A, L. (2018). Reconstituted HDL: Drug Delivery Platform for Overcoming Biological Barriers to Cancer. *Therapy. Front Pharmacol.*, 9, 1154. <https://doi.org/doi:10.3389/fphar.2018.01154>
- Rigotti, A., Miettinen, H., & Krieger, M. (2003). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, 24(3), 357–387.
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Can Res Ther*, 10 (4), 853–858. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Roblero-Bartolón, G., & Ramón-Gallegos, E. (2015). Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. *Gac Med Mex.*, 151, 85–98.
- Rojas-Aguirre, Y., Aguado- Castrejón, K., & González-Méndez, I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química/ UNAM*, 27, 286–291. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>
- Rothblat, G., & Phillips, M. (2010). High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*, 21(3), 229–238.
- Rui, M., Xin, Y., Li, R., Ge, Y., Feng, C., & Xu, X. (2017). Targeted Biomimetic Nanoparticles for Synergistic Combination Chemotherapy of Paclitaxel and Doxorubicin. *Mol. Pharmaceutics*, 14 (1), 107–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00732>
- Sabnis, N., Nair, M., Israel, M., McConathy, W., & Lacko, A. (2012). Enhanced solubility and functionality of valrubicin (AD-32) against cancer cells upon encapsulation into biocompatible nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, 7, 975–983. <https://doi.org/doi:10.2147/IJN.S28029>.
- Sadeghloo, A. Y., Khorsandi, K., & Kianmehr, Z. (2020). Synergistic effect of photodynamic treatment and doxorubicin on triple negative breast cancer cells. *Photochem Photobiol Sci*, 19, 1580–1589. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/d0pp00132e>
- Sanchez-Gaytan, B. L., Fay, F., Lobatto, M. E., Tang, J., Ouimet, M., & Y., K. (2015). HDL-Mimetic PLGA Nanoparticle To Target Atherosclerosis Plaque Macrophages. *Bioconjug. Chem.*, 26, 443–451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bc500517k>
- Sathyajith, D., & Pharm, M. (2018). *Clasificar las lipoproteínas: Tipos y metodologías*. News-Medical, Viewed. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Lipoprotein-Classification.aspx>.
- Sawyer, D., Peng, X., Pentassuglia, L., & et al. (2010). Mechanism of anthracycline cardiac injury: Can we identify strategies for cardioprotection? *Prog Cardiovasc Dis*, 53(2), 105–113.
- Schörghofer, D., Kinslechner, K., Preitschopf, A., Schütz, B., & Röhrli, C. (2015). The HDL receptor SR-BI is associated with human prostate cancer progression and plays a possible role in establishing androgen independence. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 13, 88. <https://doi.org/doi:10.1186/s12958-015-0087-z>.

- Shah, S., Chandra, A., Kaur, A., Sabnis, N., Lacko, A., Gryczynski, Z., Fudala, R., & Gryczynski, I. (2017). Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, *170*, 65–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.024>
- Shahzad, M., Mangala, L., Han, H., Lu, C., & Bottsford-Miller, J. (2011). Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles. *Neoplasia*, *13* (4), 309–19. <https://doi.org/doi: 10.1593/neo.101372>.
- Shen, W. ., Azhar, S., & Kraemer, F. B. (2018). SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol*, *80*, 95–116. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-physiol-021317-121550>
- Shen, W., Hu J, H. Z., Kraemer, F., & S, A. (2014). Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions. *Metabolism*, *63*, 875–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.03.011>
- Simonsen, J. (2016). Evaluation of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) as a drug delivery platform—a detailed survey of rHDL particles ranging from biophysical properties to clinical implications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *12*(7), 2161–2179.
- Soltantabar, P., Calubaquib, E. L., Mostafavi, E., Biewer, M. C., & Stefan, M. C. (2020). Enhancement of Loading Efficiency by Coloadng of Doxorubicin and Quercetin in Thermoresponsive Polymeric Micelles. *Biomacromolecules*, *21*(4), 1427–1436. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01742>
- Sterba, M., Popelova, O., Vavrova, A., Jirkovsky, E., Kovarikova, P., Gers, V., & Simunek, T. (2013). Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, *18*(8). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4795>
- Sun, W., Zhou, Z., Pratz, G., Chen, X., & Chen, H. (2020). Nanoscintillator-Mediated X-Ray Induced Photodynamic Therapy for Deep-Seated Tumors: From Concept to Biomedical Applications. *Teranostics*, *10*(3), 1296–1318. <https://doi.org/10.7150/thno.41578>
- Tan, H. Y., Yeong, C. H., Wong, Y. H., McKenzie, M., Kasbollah, A., Shah, M. N., & Perkins, A. C. (2020). Neutron-activated theranostic radionuclides for nuclear medicine. *Nuclear Medicine and Biology*, *90–91*, 55–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.09.005>
- Thaller, R. A., Lyster, D. M., & Dolphin, D. (1983). Potential use of Radiolabelled Porphyrins for Tumor Scanning. In: Kessel D., Dougherty T.J. (eds). *Porphyrin Photosensitization. Advances in Experimental Medicine and Biology*, *160*(Springer, Boston, MA). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4406-3_23
- Thorn, C., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T, McLeod, H., Klein, T., & TE, et al. (2011). Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenet Genomics*, *21*(7), 440–446. <https://doi.org/doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
- Thuahnai, S., Lund-Katz, S., Dhanasekaran, P., de la Llera-Moya, M., & Connelly, M. (2004). Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure. *J. Biol. Chem*, *279* (13), 12448–55. <https://doi.org/doi: 10.1074/jbc.M311718200>

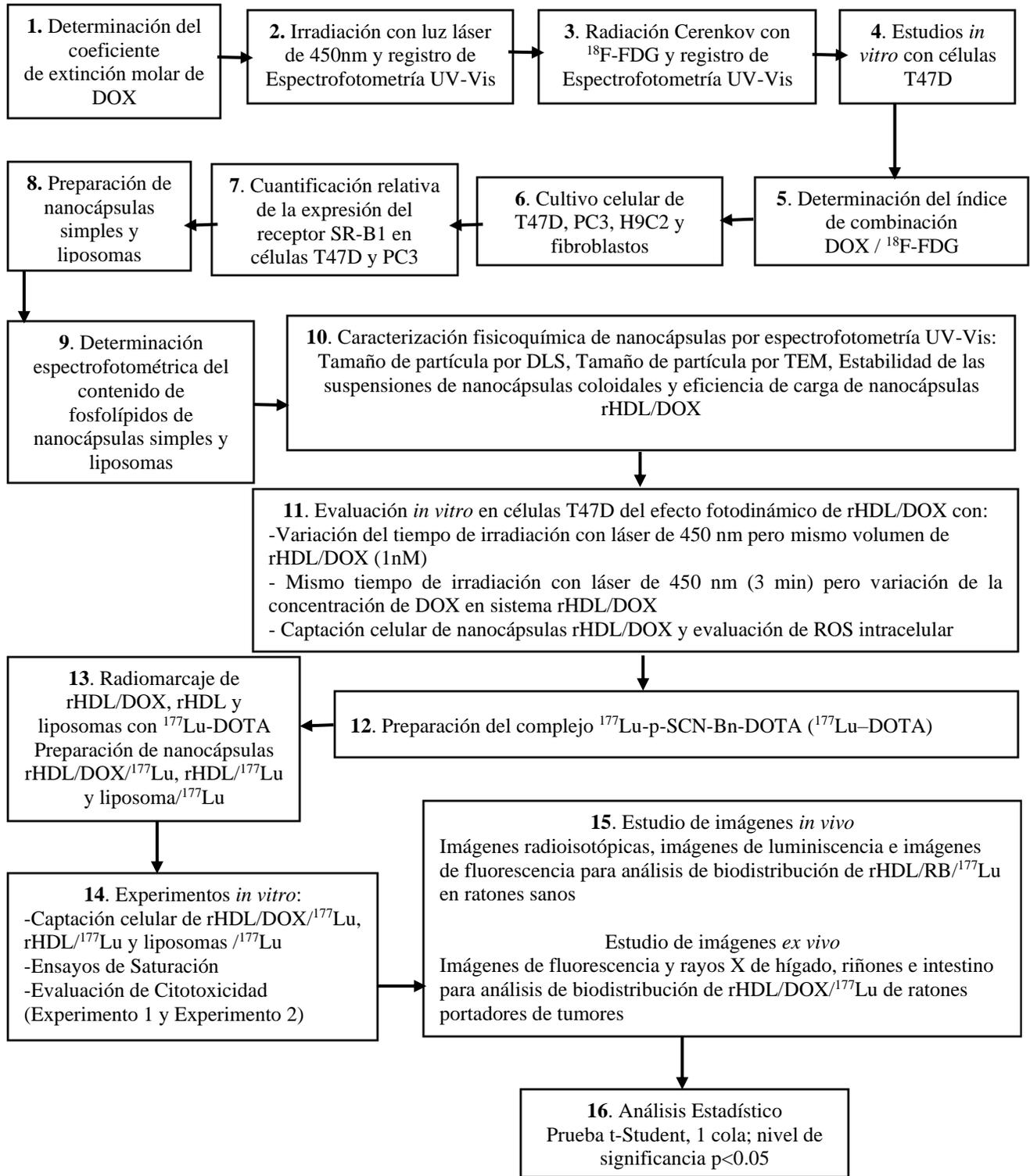
- Torchilin, V. P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, *13*, 813–827. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>
- Toro-Córdova, A., Ledezma-Gallegos, F., Mondragon-Fuentes, L., Jurado, R., Medina, L. A., Pérez Rojas, J. M., Garcia-Lopez, P. (2016). Determination of liposomal cisplatin by high-performance liquid chromatography and its application in pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatographic Science*, *54*(6), 1016–1021.
- Umemoto, T., Han, C., Mitra, P., Averill, M., Tang, C., Goodspeed, L., Omer, M., Subramanian, S., Wang, S., Den Hartigh, L., Wei, H., Kim, E., Kim, J., O'Brien, K., & Chait, A. (2013). Apolipoprotein AI and high-density lipoprotein have antiinflammatory effects on adipocytes via cholesterol transporters: ATP-binding cassette A-1, ATP-binding cassette G-1, and scavenger receptor B-1. *Circ. Res.*, *112*, 1345–1354. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300581>
- Urrejola, M., Soto, L., Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P. ., Álvarez, B., Fuentesvilla, I., & Haidar, Z. S. (2018). Polymeric Nanoparticle Systems: Structure, Elaboration Methods, Characteristics, Properties, Biofunctionalization and Self-assembly Layer by Layer Technologies. *Int. J. Morphol.*, *36*(4), 1463–1471.
- Vasquez, M., Simoes, I., Consuegra-Fernández, M., Aranda, F., Lozano, F., & Berraondo, P. (2017). Exploiting scavenger receptors in cancer immunotherapy: Lessons from CD5 and SR-B1. *Eur. J. Immunol.*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/eji.201646903>
- Velásquez, C., González, M., Berrouet, M., & Jaramillo, N. (2016). Cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia desde las bases moleculares hasta la perspectiva clínica. *Rev Colomb Cardiol.*, *23*(2), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2015.10.002>
- Vijayakumar., K., Anand., K., Boomi., P., & Surendrakumar, R. (2021). Chapter 14 - Theranostics and radiopharmaceuticals in cancer treatment. In *Handbook on Nanobiomaterials for Therapeutics and Diagnostic Applications*. Elsevier (pp. 341–360). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821013-0.00020-9>
- Villasmil Camacho, J., & Escudero, E. (2017). Evaluación ecocardiográfica de la función ventricular derecha para la detección temprana de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. *Insuf Card*, *12*(2), 62–90.
- Von Hoff, D., Layard, M., Basa, P., Davis, H. J., Von Hoff, A., & Rozenzweig, M. (1979). Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med*, *91*, 710–717.
- Wakharde, A., Awad, A., Bhagat, A., & Karuppayil, S. (2018). Synergistic Activation of Doxorubicin against Cancer: A Review. *J Clin Microbiol Antimicrob.*, *1*(2), 1009.
- Wang, B., Yuan, Y., Han, L., & Al., E. (2014). Recombinant lipoproteins reinforce cytotoxicity of doxorubicin to hepatocellular carcinoma. *Journal of Drug Targeting*, *22*(1), 76–85. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.839687>
- Wang, G. X., Wang, Y. X., Zhou, X. B., & Korth, M. (2001). Effects of doxorubicinol on excitation– contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, *423*, 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01096-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01096-2)
- Washington, KE., Kularatne, RN., Biewer, MC., & Stefan, M. (2018). Combination loading of

- doxorubicin and resveratrol in polymeric micelles for increased loading efficiency and efficacy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(3), 997-1004.
- Wei, K., Zhang, J., Li, X., Shi, P., & Fu, P. (2019). High density lipoprotein coated calcium carbonate nanoparticle for chemotherapy of breast cancer. *J Biomater Appl.*, 34(2), 178–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/0885328219850759>
- Woudberg, N., Pedretti, S., Lecour, S., Schulz, R., Vuilleumier, N., James, R., & Frias, M. (2018). Pharmacological intervention to modulate HDL: what do we target? *Front Pharmacol*, 8, 989.
- Yang, S., Damiano, M., Zhang, H., Tripathy, S., & Luthi, A. (2013). Biomimetic, synthetic HDL nanostructures for lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(7), 2511-2516. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1213657110>
- Yuan, B., Wu, C., Wang, X., Wang, D., & Liu, H. (2016). High scavenger receptor class B type I expression is related to tumor aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Tumor Biol.*, 37 (3), 3581–88. <https://doi.org/doi: 10.1007/s13277-015-4141-4>.
- Yuan, Y., Wang, W., Wang, B., Zhu, H., Zhang, B., & M, F. (2013). Delivery of hydrophilic drug doxorubicin hydrochloride-targeted liver using apoAI as carrier. *J. Drug Target*, 21, 367–374. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.757769>
- Yurtcu, E., Darcansoy Iseri, O., & Iffet Sahin, F. (2015). Effects of silymarin and silymarin-doxorubicin applications on telomerase activity of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J BOUON*, 20(2), 556–561.
- Zein, R., Sharrouf, W., & Selting, K. (2020). Physical properties of nanoparticles that result in improved cancer targeting. *Journal of Oncology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2020/5194780>
- Zhang, Z., Chen, J., Ding, L., Jin, H., Lovell, J. F., & Corbin, I. R. (2010). HDL-mimicking peptide–lipid nanoparticles with improved tumor targeting. *Small*, 6, 430–437. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/sml.200901515>
- Zheng, Y., Liu, Y., Jin, H., Pan, S., & Qian, Y. (2013). Scavenger receptor B1 is a potential biomarker of human nasopharyngeal carcinoma and its growth is inhibited by HDL-mimetic nanoparticles. *Theranostics*, 3 (7), 477–86. <https://doi.org/doi: 10.7150/thno.6617>. Print 2013.
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R. M., Solomon, K. R., & Freeman, M. R. (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J. Clin. Invest.*, 115, 959– 968.

11. Anexos.

11.1. Metodología General

Esquema 2. Procedimiento general del estudio.



11.2. Nomenclatura por orden alfabético.

ABCA1	Casetes de unión a ATP, Subfamilia A, miembro 1 (<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1</i>)
ABCG1	Casetes de unión a ATP, Subfamilia G, miembro 1 (<i>ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1</i>)
ABMA	9,10- antracenedil-bis (metileno) ácido dimalónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ApoA-I	Apolipoproteína A-1
ATCC	Colección Americana de Cultivos (<i>American Type Culture Collection</i>)
CC	Carbonato de calcio
CE	Ésteres de colesterol (<i>Cholesterol Ester</i>)
CETP	Proteína de transferencia de éster de colesterol (<i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i>)
CHCOOH	Ácido carboxílico
CI	Índice de combinación
CO₂	Dióxido de carbono
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CR	Radiación Cerenkov
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (marcador fluorescente)
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DDW	Agua destilada desionizada
DLS	Dispersión de luz dinámica
DOX	Doxorrubicina
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E_{max}	Energía máxima
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
E_{prom}	Energía promedio
EYPC	Fostatidil colina de yema de huevo (<i>Egg Yolk Phosphatidil Cholina</i>)
FC	Colesterol libre (<i>free cholesterol</i>)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (<i>Food and Drug Administration</i>)

^{18}F	Flúor-18
^{18}F-FDG	Fluorodesoxiglucosa o fluorodesoxiglucosa F-18
Gy	Gray
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HpD	Hematoporfirina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC₅₀	Concentración media inhibitoria
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia (<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>)
IL2	Interleucina-2
INCAN	Instituto Nacional de Cancerología
LANIDER	Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos
LCAT	Lecitin Colesterol Acil Transferasa (enzima)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
^{177}Lu	Lutecio-177
M	Molar
MIRD	Dosis médica de radiación interna (<i>Medical Internal Radiation Dose</i>)
MWCO	Corte de peso molecular (<i>Molecular Weight Cut-Off</i>)
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato (coenzima)
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros/nanómetro
NPs	Nanopartículas
$^1\text{O}_2$	Oxígeno siglete
O₂	Oxígeno molecular
O₂^{*-}	Radical superóxido
PBS	Buffer fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PET	Tomografía por emisión de positrones (<i>Positron Emission Tomography</i>)
PON1	Paraoxonasa-1 (enzima)
PS o FS	Fotosensible/fotosensibilizador
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
QM	Quilomicrones

RB	Rodamina B (colorante fluorescente)
rHDL	Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SFB	Suero fetal bovino
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único (<i>Single Photon Emission Computerized Tomography</i>)
SR-B1	Receptor Scavenger clase B, tipo 1 (<i>Scavenger Receptor Class B type 1</i>)
TAT	Proteínas de translocación doble de arginina (<i>Twin-Arginine Translocation</i>)
^{99m}Tc	Tecnecio- 99 metaestable
TFD	Terapia fotodinámica
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-visible
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
WB	Western Blot
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfopheny l) (método colorímetro)