

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOINGENIERÍA MÉDICA

DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



**EFEECTO DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR SNEDDS/siRNA EN
TRATAMIENTO QUIMIOFOTODINÁMICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOINGENIERÍA MÉDICA**

PRESENTA:

P.L.B.M LESLIE VIANEY AGUILAR PEÑA

DIRECTORES:

DRA EN C.S. LILIANA ARANDA LARA

DIRECTORA EXTERNA:

DRA. EN C. CLARA LETICIA SANTOS CUEVAS

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO 2023

EFECTO DEL SILENCIAMIENTO
GÉNICO INDUCIDO POR SNEDDS/
siRNA EN TRATAMIENTO
QUIMIOFOTODINÁMICO

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
TERANÓSTICA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MÉXICO COMO PARTE DE
LAS ACTIVIDADES DEL PROYECTO CONACYT
263397 Y DE LA RED DE INVESTIGACIÓN EN
FARMACIA Y TERANÓSTICA.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	4
IV.	MARCO TEÓRICO	7
1.	Terapia génica	7
2.	Silenciamiento génico mediante ARN de interferencia (ARNi).	7
2.1	miRNA (microRNA)	7
2.2	siRNA (pequeños ARN de interferencia)	8
3.	Liposomas	10
3.1	Liposomas catiónicos	11
3.2	Lipofectamina	12
4.	Nuevas perspectivas para la entrega de siRNA	13
5.	Sistemas auto-nanoemulsionantes de liberación de fármacos (SNEDDS)	13
6.	Componentes de los SNEDDS	14
7.1	Fase de aceite	14
7.2	Surfactantes	14
7.3	Cosurfactantes / Codisolventes	14
7.	Resistencia de las células a los tratamientos	15
8.1	Reparación por escisión de nucleótidos	15
8.2	Reparación de bases	16
8.3	Reparación de extremos no homólogos	16
8.4	Reparación por recombinación homóloga (RH)	17
8.	RAD51	18
9.	SIRTUINAS	19
10.1	SIRT3	19
10.	Tratamientos combinados	20
11.	Terapia fotodinámica	21
12.1	Radicales libres	22

12.2	Especies reactivas de oxígeno (ROS)	22
12.3	Agentes fotosensibilizadores	22
12.	Doxorrubicina	25
13.1	Mecanismo de acción de DOX	25
13.2	Cardiotoxicidad de DOX	27
13.	Doxorrubicina como agente fotosensibilizador	27
14.	Fuentes de luz empleadas en la terapia fotodinámica	28
15.	Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica	29
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
VI.	JUSTIFICACIÓN	33
VII.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	35
VIII.	HIPÓTESIS	35
IX.	OBJETIVOS	36
1.	OBJETIVO GENERAL	36
2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
X.	METODOLOGÍA	37
1.	Reactivos y preparación de soluciones	37
1.1	Preparación de Opti-Mem	37
1.2	Preparación de Doxorrubicina	37
1.3	Preparación 1: SNEDDS/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-RAD51	37
1.4	Preparación 2: poliplejo liposomas/siRNA (lipofectamina 2000)	38
2.	Cultivo celular	38
3.	Ensayo de viabilidad celular.	38
4.	Evaluación intracelular de ROS	39
5.	Ensayo clonogénico	40
XI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1.	Evaluación de la viabilidad celular	41
2.	Evaluación de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	51
3.	Ensayo clonogénico	53
XII.	CONCLUSIONES	55
XIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

I. RESUMEN

El siRNA se usa en terapia génica y/o para mejorar la respuesta terapéutica a la quimio o radioterapia. En este trabajo, se evaluó la posibilidad de utilizar SNEDDS cargados con siRNA-RAD51, como pre-tratamiento para evaluar y comparar la sensibilización inducida por siRNA-RAD51 cuando se combina con un tratamiento quimiofotodinámico (irradiación de Doxorubicina con 450 nm). Se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo con XTT, la capacidad clonogénica mediante ensayo de proliferación y la producción de ROS.

La transfección de siRNA-RAD51 dada por los SNEDDS, disminuyó la viabilidad y capacidad de proliferación celular cuando este se combina con la irradiación de DOX con 450 nm. Los resultados demuestran que los SNEDDS son un vehículo eficaz para sensibilizar a las células de cáncer mediante la liberación de siRNA-RAD51. Se concluye que el efecto del silenciamiento génico de siRNA RAD51 mediante SNEDDS mejora el efecto de la terapia fotodinámica basada en la excitación de DOX con láser de 450 nm por lo que representa una alternativa para ser utilizado como tratamiento contra el cáncer.

II. INTRODUCCIÓN

Las células de cáncer presentan cierta resistencia ante los tratamientos administrados, esto se da debido a los múltiples mecanismos que tienen las células para contrarrestar tales efectos (1). Se han utilizado tratamientos combinados, los cuales se dirigen a diferentes vías para generar una actividad anticancerígena favorable (2). El agente quimioterapéutico doxorubicina (DOX) presenta cierto grado de cardiotoxicidad, una de las alternativas para reducirla es disminuir la dosis de doxorubicina, sin embargo, el efecto terapéutico se compromete (3). En un estudio realizado por Quintos-Meneses et al., (2020) se demostró que la fotoactivación de DOX, disminuye la viabilidad de las células significativamente en comparación con las células que se trataron únicamente con DOX (3).

La terapia génica consiste en introducir ADN o ARN al interior de la célula con el propósito de modular la expresión de ciertos genes (4). El ARN pequeño (siRNA) se utiliza para silenciar genes de manera transitoria mediante la degradación del ARNm (5). Sin embargo, el paso de siRNA a través de la membrana es un reto para una liberación intracelular eficiente. Para facilitar el ingreso de siRNA a las células se utilizan vectores. (6). Las nanopartículas se utilizan como vehículos de fármacos, las cuales se clasifican en 1) NP lipídicas, 2) NP constituidas por emulsiones, 3) NP constituidas en vesículas, 4) NP conformadas por estructuras misceláneas, y 5) nanofibras (7).

Dentro de las nanopartículas constituidas por vesículas se encuentran los liposomas catiónicos, estos se han convertido en la herramienta más utilizada para transfección. Están constituidos por lípidos catiónicos los cuales interactúan con las cargas negativas del ADN o ARN y lo condensan para formar complejos llamados lipoplex o lipoplejos (8). Estos se unen a las proteínas de membrana plasmática mediante enlaces electrostáticos, facilitando el paso de siRNA a través de la membrana (9).

Por otro lado, los sistemas de administración de fármacos auto-nanoemulsionantes (SNEDDS) son mezclas de aceite, fármaco, tensoactivo y co-tensoactivo, que forman nanoemulsiones cuando entran en contacto con el agua y cuando existe una agitación suave como los movimientos peristálticos del intestino. Se prefiere su uso por la mejora de entrega de siRNA en la célula y su alta capacidad de carga de fármacos (10).

Las terapias utilizadas en el tratamiento de cáncer provocan daño en el ADN, como rupturas de cadena sencilla y de doble cadena. Las rupturas de cadena sencilla son reparadas por las vías de reparación por escisión de nucleótidos (REN) y por reparación de bases (REB). En cambio, las roturas de doble cadena se reparan mediante extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (RH) (11). La proteína RAD51 se activa para iniciar la RH y así reparar las roturas de doble cadena. Este es uno de los mecanismos que utilizan las células de cáncer para evitar la muerte celular. Es por ello que la inhibición de la acción de RAD51 se ha utilizado como estrategia para mejorar el efecto terapéutico (12).

La proteína SIRT3 regula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) manteniendo a la célula sin estrés oxidativo, mediante enzimas como isocitrato deshidrogenasa o manganeso superóxido dismutasa. En algunos estudios se considera como una proteína supresora de tumores ya que favorece la muerte celular en condiciones de estrés oxidativo (13).

Considerando la efectividad de los liposomas catiónicos y los SNEDDS para la entrega de siRNA, en este proyecto se utilizarán a los SNEDDS cargados con siRNA-RAD51 como pretratamiento para evaluar la sensibilización inducida por siRNA-RAD51 cuando se combina con un tratamiento quimiofotodinámico basado en la fotoactivación de DOX con 450 nm.

III. ANTECEDENTES

En las últimas décadas se han desarrollado nuevos métodos para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, debido a la toxicidad asociada a la dosis, la resistencia que presentan las células a los fármacos y la farmacocinética aún hay desafíos que superar para mejorar el efecto terapéutico. El desarrollar un nuevo fármaco supone costos y mayor tiempo de investigación, por lo que; se ha optado por combinar las terapias existentes, con el objetivo de afectar a varias rutas celulares y al mismo tiempo; manejar dosis de fármacos seguras que resultan en menores costos (14). Las terapias combinadas asistidas por nanotecnología pueden diseñarse para controlar la liberación de fármacos, para dirigirse selectivamente a los tejidos diana, así como para responder a un estímulo externo o interno (14).

El efecto fotodinámico fue descrito en 1900 por Raab y en 1966 Lipson informó por primera vez una respuesta terapéutica en cáncer de mama (15). La terapia fotodinámica está aprobada por la *Federal Food and Drug Administration* (FDA) desde 1995 en los Estados Unidos para el tratamiento paliativo de cánceres de esófago y en lesiones bronquiales desde 1998 (16).

En un estudio realizado por Quintos Meneses, et al (2020) se observó que al fotoactivar un agente quimioterapéutico (DOX) con luz láser de 450 nm o radiación Cherenkov se producían especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales favorecían el efecto terapéutico (3).

El silenciamiento génico por ARNi es una nueva estrategia para silenciar genes específicos a nivel postranscripcional con el objetivo de reducir o bloquear la expresión de genes alterados o sobre expresados (17). Este mecanismo fue observado en 1990 cuando intentaban sobre expresar a la enzima que produce el color púrpura de las petunias y para ello introdujeron varias copias del gen que codificaba para esa enzima, sin embargo, obtuvieron flores sin color (18). Esto debido a que los niveles de la enzima eran 50 veces menores en comparación con las flores originales, concluyendo que tanto los genes que introdujeron como el gen natural no se expresaban (19).

En 1998 Andrew Fire y Craig Mello observaron que al inyectar dsRNA (ARN de doble cadena) se producía un silenciamiento de la expresión de genes que era específico de secuencia (20). Más adelante, en el 2001 se demostró que si el dsRNA era de 21-25

nucleótidos (siRNA) inducía un silenciamiento específico en células de mamíferos, por lo que; hubo interés particular por esta metodología como herramienta terapéutica (21).

La aplicación terapéutica de siRNA para silenciamiento de genes, es prometedora. Sin embargo, para que sea eficaz es necesario superar barreras intracelulares y extracelulares, como por ejemplo la presencia de enzimas que pueden degradar el siRNA. La vida media de los siRNA oscila entre varios minutos y una hora (22). Para ser eficaces, los siRNA deben llegar a las células diana que expresan el gen de interés, y una vez situados en la célula diana, aún deben enfrentar barreras para que el gen sea silenciado (23).

Debido a esto, los avances en nanotecnología han dado lugar a innovaciones en el campo de la nanomedicina mejorando los tratamientos mediante el desarrollo de nanopartículas que contienen agentes de diagnóstico o tratamiento y proporcionan una estrategia de nanomedicina con un gran potencial (24).

En un estudio realizado por Chen-Hua, et al (2015) utilizaron nanopartículas de lípidos, calcio y fosfato para administrar el siRNA HIF1 α (factor 1-alfa inducible por hipoxia) al citoplasma de células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (SCC4 y SAS) que expresan el receptor sigma, las cuales también se sometieron a terapia fotodinámica. Las nanopartículas de siRNA HIF1 α redujeron la expresión de HIF1 α , aumentaron la muerte celular e inhibieron el crecimiento celular mediante la terapia fotodinámica. En este estudio se concluyó que el siRNA HIF1 α formulado en nanopartículas en combinación con terapia fotodinámica tiene el potencial de emerger como un tratamiento eficaz para el cáncer de cabeza y cuello (25).

Por otro lado, Chuan Ma, et al (2017) utilizó nanopartículas de polietilenglicol-polietilenimina-clorina e6 (PEG-PEI-Ce6) para administrar siRNA de Wnt-1 al citoplasma de células KB (carcinoma de células escamosas orales) que se sometieron a terapia fotodinámica. El siRNA de Wnt-1 redujo la expresión de Wnt-1 y en combinación con terapia fotodinámica inhibió el crecimiento celular y mejoró el efecto de eliminación de células de cáncer (26).

Así mismo, Lecaros Rumwald combinó terapia fotodinámica con nanopartículas de fosfato de calcio y lípidos (LCP NP) para administrar siRNA específico de VEGF-A (factor de

crecimiento endotelial vascular) a modelos de xenoinjerto de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humano donde la terapia combinada mostró una disminución significativa del volumen tumoral a ~70% y ~120%, concluyendo que esta combinación tiene el potencial de mejorar la eficacia terapéutica de la terapia fotodinámica (27).

Los liposomas representan la primera generación que revolucionaron la administración parenteral de fármacos. La palabra liposoma deriva de dos palabras griegas: lipos (grasa) y soma (cuerpo o estructura), estos están conformados por una o más bicapas lipídicas que rodean las unidades acuosas, lo cual los hace ideales para la administración de fármacos tanto lipófilos como hidrófilos (28). Las formulaciones de liposomas que se usan actualmente tienen tiempos de circulación prolongados, estos se alteran mediante: modificaciones en la composición lipídica de la membrana liposomal, adición de lípidos cargados positiva o negativamente y unión de proteínas (29).

Por otro lado, las formulaciones basadas en lípidos mejoran la absorción y, por lo tanto, la biodisponibilidad oral de los fármacos lipofílicos (30). Dentro de esta categoría los SNEDDS ofrecen una fuerte alternativa a las formulaciones orales, ya que la liberación del fármaco es más rápida en todo el tracto gastrointestinal (GI) (31). Estos han surgido como una estrategia vital para la administración de fármacos con poca solubilidad acuosa (32).

Recientemente, Morales-Becerril desarrolló y optimizó una formulación basada en SNEDDS con estabilidad termodinámica suficiente para el transporte de siRNA, con un adecuado tamaño nanométrico y hemocompatibilidad (33).

IV. MARCO TEÓRICO

1. Terapia génica

La terapia génica consiste en introducir material genético en la célula, ADN o ARN para modificar sus funciones. El efecto puede ser la activación o la supresión de alguna función que se esté produciendo incorrectamente o para introducir modificaciones que puedan resultar benéficas en el tratamiento de enfermedades (34).

La terapia génica con relación al cáncer propone reemplazar o alterar la expresión de ciertos genes que participan en la progresión tumoral. Para llevar a cabo esta terapia se requiere de un gen terapéutico, un método para introducirlo a las células y la expresión de este en las células blanco (35).

Existen muchas maneras de regular la expresión de los genes en las células, una de ellas es mediante el silenciamiento génico, el cual consiste en inhibir la expresión de estos. Tiene lugar en el núcleo y en el citoplasma de la célula y es capaz de participar regulando la transcripción y la traducción (36).

2. Silenciamiento génico mediante ARN de interferencia (ARNi).

Recientemente para el tratamiento de cáncer se han aplicado ARN de interferencia (ARNi), estos constituyen un mecanismo de silenciamiento génico en el que moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) regulan la expresión de un gen específico. El ARNi ejerce su acción a distintos niveles: inhibición de la traducción, remodelación de la cromatina y degradación e inhibición del ARNm (37).

Los ARNi consisten en pequeños ARN reguladores llamados microARN (miRNA) y pequeños ARN de interferencia (siRNA) que actúan silenciando los ARN mensajeros (ARNm) diana mediante una secuencia específica (5).

2.1 miRNA (microRNA)

Los microARN son pequeños ARN no codificados para proteína. Los genes que codifican para microARN se transcriben en forma de precursores largos en el interior del núcleo,

llamados miRNAs primarios (38). El miRNA primario es cortado en una o más moléculas con forma de horquilla por las ribonucleasas Drosha y Pasha/DGCR8 formando pre-miRNAs de 60-70 nucleótidos (39).

Los pre-miRNAs son procesados y llevados al citoplasma, los cuales se convierten en miRNAs maduros y así realizan su función. Una vez en el citoplasma los miRNAs se integran en un complejo denominado RISC, formado por la proteína Dicer, la proteína quinasa activadora dependiente de ARN (PKRKA) y la proteína Ago2. Este complejo genera dos cadenas, una cadena madura de miRNA y su complementaria (40).

La cadena complementaria es eliminada y la cadena madura se une al complejo RISC. Posteriormente, el complejo se une a la secuencia del ARNm (ARN mensajero) diana, el cual contiene la secuencia complementaria al componente miRNA y corta el ARNm, induciendo su degradación e inhibiendo así la traducción a proteína (41).

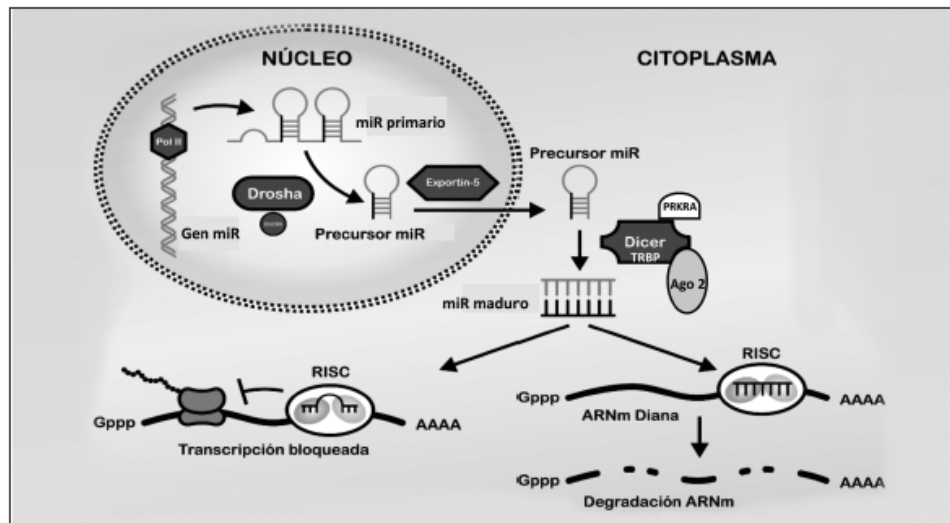


Figura 1. Biogénesis del micro-ARN. Figura obtenida de (39).

2.2 siRNA (pequeños ARN de interferencia)

Los siRNAs se originan de un ARN de doble cadena (ARNdc) que se produce de manera endógena o exógena. Una enzima ARNasa de tipo III denominada Dicer los reconoce y los transforma en siRNA de aproximadamente 21-23 nucleótidos (42).

Una vez formados los siRNA son reconocidos por un complejo enzimático llamado complejo RISC. El complejo RISC está formado por proteínas argonautas 1 y 2 (Ago1 y Ago2) y dominios PIWI denominadas proteínas slicer dada su actividad endonucleasa (17).

Una vez que el siRNA se ensambla con el complejo RISC la actividad helicasa asociada al complejo desenrolla la doble hélice del siRNA, una de esas hebras se denomina hebra guía y la otra hebra pasajera (43).

La hebra guía es la que permanece asociada al complejo mientras que la hebra pasajera es degradada por la proteína Ago 2 la cual tiene actividad endonucleasa. La hebra guía se distingue de la hebra pasajera por ser termodinámicamente más inestable lo que facilita su unión al complejo RISC (17).

El complejo RISC reconoce al ARN mensajero (ARNm) diana que contiene la secuencia complementaria del siRNA y guía el corte del ARNm, suprimiendo de esta manera la expresión del gen (44).

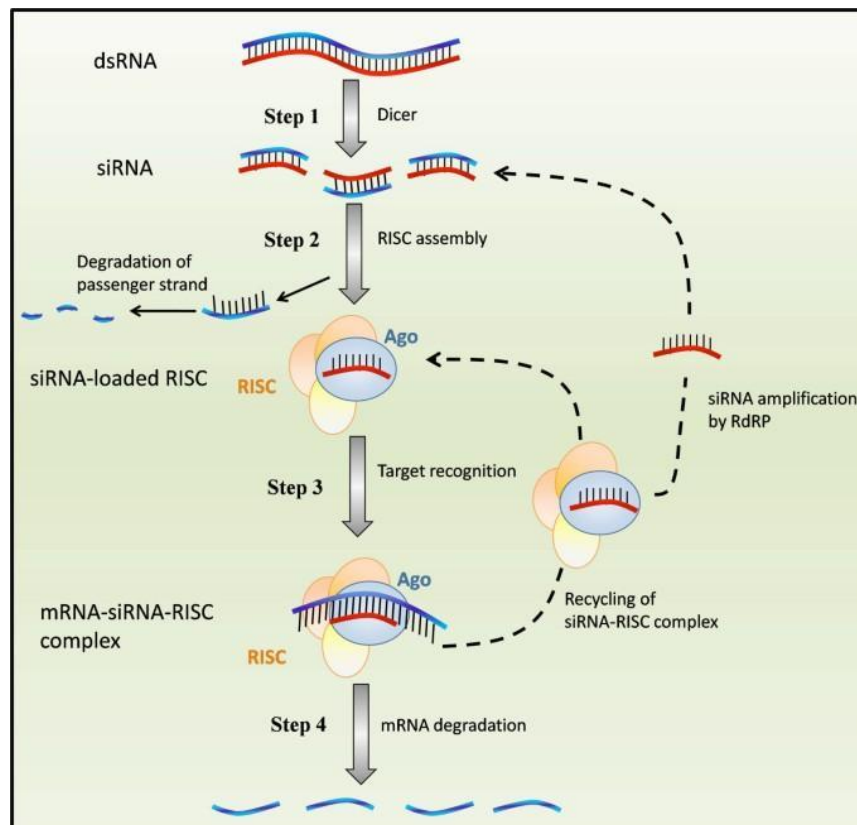


Figura 2. Mecanismo de degradación de ARNm. Figura tomada de (45).

Cabe mencionar que los siRNA son altamente susceptibles a la degradación enzimática que se encuentra en el suero y los tejidos. La vida media de los siRNA en el suero oscila entre varios minutos y una hora (22).

Los siRNA deben sobrevivir en el suero para llegar a las células diana y aun ahí deben enfrentar una serie de obstáculos para silenciar el gen de interés (46).

Es por ello que se han desarrollado sistemas de administración no virales, formulaciones de liposomas, nanopartículas, fracciones de direccionamiento e incluso la modificación de química directa del siRNA (46).

3. Liposomas

Los liposomas facilitan la internalización eficiente del siRNA mediante la fusión de la membrana con la célula huésped (47).

Los liposomas son vesículas esféricas constituidas por bicapas de fosfolípidos que encierran un compartimento acuoso. Estos se caracterizan por presentar una región polar de carácter hidrofílico (afinidad por el agua) y una región apolar hidrofóbica (repele moléculas de agua) formada por cadenas hidrocarbonadas alifáticas (48).

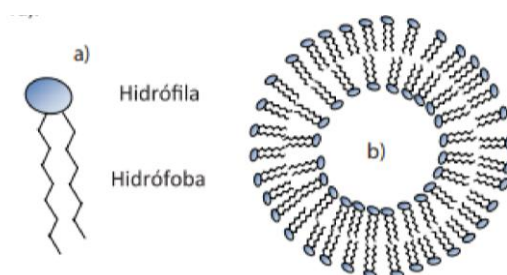


Figura 3. a) Fosfolípido, b) Liposoma esférico en medio acuoso. Figura tomada de (49).

Los liposomas pueden fusionarse con las membranas celulares y mejorar la administración de fármacos a las células (50). El liposoma protege a los ácidos nucleicos de la degradación enzimática y administra ácidos nucleicos en las células al interactuar con la membrana celular, la cual posee carga negativa (51).

Existen dos tipos de liposomas: material lipídico neutro y catiónico (52).

3.1 Liposomas catiónicos

Los liposomas catiónicos se han convertido en la herramienta más utilizada para transferir el ADN in vitro, están constituidos por lípidos catiónicos, los cuales interaccionan con el material genético a transferir y con las membranas celulares que atravesaran para que el gen transfectado se exprese (8).

Los lípidos catiónicos interaccionan con las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN y lo condensan. Esta interacción ocurre por las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN y la carga positiva de los lípidos catiónicos, de esta manera los lípidos catiónicos condensan el ADN y en forma de complejos llamados lipoplex o lipoplejos, se unen a las proteínas de la membrana plasmática mediante enlaces electrostáticos (9). Los complejos con carga positiva utilizan las proteínas de la membrana plasmática para fijarse en la célula facilitando su introducción por endocitosis (9).

En la endocitosis, en la mayoría de los casos se forma un endosoma el cual dirige el complejo hacia los lisosomas (vesículas) los cuales contienen enzimas hidrolíticas que tienen la capacidad de degradar al ADN, es por ello que es conveniente que el complejo permanezca poco tiempo en el endosoma y se libere en el citoplasma. La liberación puede ocurrir mediante dos mecanismos: fusión con la membrana endosómica o por la desestabilización de esta (53).

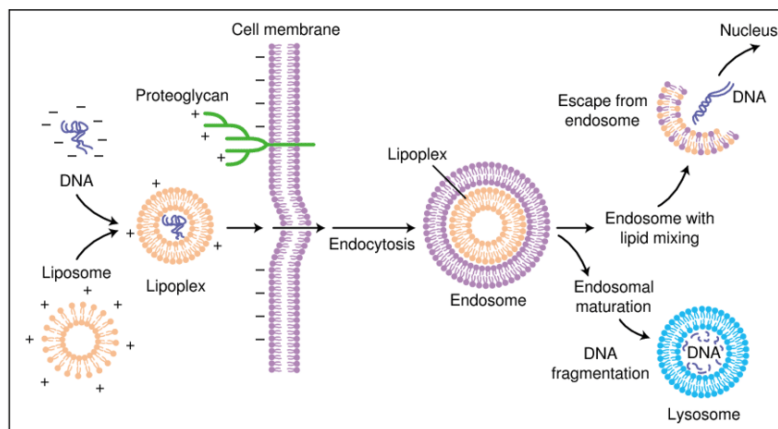


Figura 4. Transfección y endocitosis mediada por lipoplex. Figura obtenida de (54).

Así, la primera barrera que debe atravesar el complejo ADN-liposoma es la membrana plasmática, posteriormente debe atravesar las membranas de los lisosomas para que el ADN

llegue al citoplasma y por último para llegar al núcleo tiene que atravesar la membrana nuclear (8).

3.2 Lipofectamina

La lipofectamina 2000 es un reactivo basado en liposomas catiónicos que proporciona una alta eficiencia de transfección y altos niveles de expresión transgénica en varios tipos de células *in vitro*. Funciona formando complejos con moléculas de ácido nucleico, lo que les permite superar la repulsión electrostática de la membrana celular y ser absorbidos por la célula (55).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los liposomas.

Ventajas	Desventajas
La estabilidad aumenta si el liposoma se prepara mediante encapsulación.	Vida media corta
Los liposomas aumentan la eficacia y el índice terapéutico del fármaco (actinomicina-D)	Baja solubilidad
Los liposomas reducen la toxicidad del agente encapsulado (anfotericina B, Taxol)	Fugas y fusión de fármacos / moléculas encapsulados
Los liposomas ayudan a reducir la exposición de tejidos sensibles a fármacos tóxicos.	El costo de producción es alto
Efecto de evitación del sitio	Menor estabilidad
Los liposomas son flexibles, no tóxicos, biocompatibles, completamente biodegradables y no inmunogénicos para administraciones sistémicas y no sistémicas.	En ocasiones, los fosfolípidos pasan por una reacción similar a la oxidación y la hidrólisis.
Flexibilidad para acoplarse con ligandos específicos del sitio para lograr una focalización activa	Rápida absorción por las células de RES(sistema reticuloendotelial)

Datos tomados de Sharma, D. 2018 (56)

4. Nuevas perspectivas para la entrega de siRNA

La vía oral es la ruta preferida para la administración de fármacos ya que presentan comodidad de administración, flexibilidad en el ajuste de dosis y condiciones de seguridad, etc. (57). Las formulaciones basadas en lípidos han mostrado un aumento en la biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles por lo que se ha prestado especial interés en ellos (58). Estas formulaciones consisten en mezclas de aceites, tensioactivos y en ocasiones cosolventes, entre las que se encuentran emulsiones, microemulsiones, dispersiones sólidas, nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas y los sistemas autoemulsificables (59).

5. Sistemas auto-nanoemulsionantes de liberación de fármacos (SNEDDS)

Son mezclas isotrópicas en las que los fármacos se disuelven en la fase oleosa en presencia de tensioactivos y cotensioactivos que, al diluirse con agua o fluido gastrointestinal, forman finas emulsiones o microemulsiones. Este proceso de emulsificación requiere poca agitación, la cual es proporcionada por la motilidad del estómago y el intestino delgado (60). Este sistema evita la disolución y, tras la dispersión, forma glóbulos de aceite de tamaño micro/nano, permitiendo una rápida absorción, mejorando así la biodisponibilidad del fármaco (30).

Recientemente, Morales-Becerril desarrolló y optimizó una formulación basada en SNEDDS con estabilidad termodinámica suficiente para el transporte de siRNA, con un adecuado tamaño nanométrico y hemocompatibilidad (33).

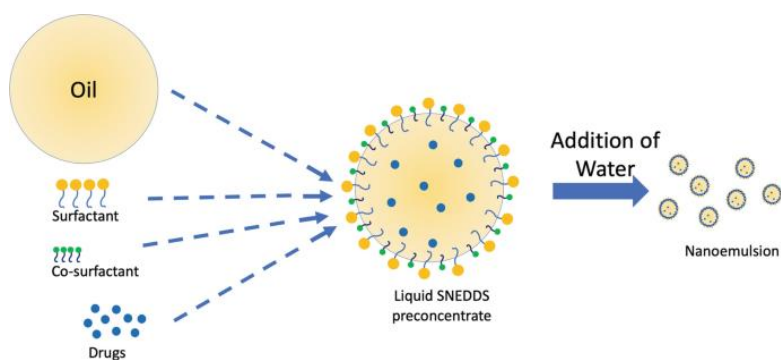


Figura 6. Diagrama de flujo esquemático de la preparación de la formulación SNEDDS con la posterior formación de nanoemulsión (61).

Los SNEDDS muestran mejores propiedades farmacéuticas frente a los demás sistemas de administración de fármacos, debido a sus características para penetrar la mucosa intestinal. Tras formar auto-nanoemulsiones en el tracto gastrointestinal, sufren un mecanismo de lipólisis inducida por enzimas (lipasas), descomponiendo los lípidos y surfactantes de la formulación para poder ser absorbidos principalmente por la vía linfática intestinal (16).

6. Componentes de los SNEDDS

7.1 Fase de aceite

Se utilizan aceites que contienen triglicéridos de cadena media y larga, los cuales presentan diversos grados de saturación. Los aceites con la mayor capacidad de solubilización presentan mayor capacidad de carga de la formulación y absorción del fármaco (30). Los triglicéridos de cadena media modificados y los de cadena larga se emplean para mejorar la solubilidad del fármaco en la formulación (62).

7.2 Surfactantes

Debido a sus propiedades anfífilas los surfactantes se encuentran en la interfase aceite-agua y ayudan a estabilizar la nanoemulsión al reducir la tensión superficial. Los tensioactivos se clasifican de acuerdo a la carga y valor de equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB). En cuanto a su carga se clasifican en tensioactivos iónicos (aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos) y no iónicos. Los tensioactivos iónicos se utilizan más debido a que presentan menor toxicidad y capacidad para estabilizar la emulsión en un rango más amplio de pH y fuerza iónica de nanoemulsión. En cuanto a su valor HLB se clasifican en tensioactivos lipofílicos ($HLB < 10$) e hidrofílicos ($HLB > 10$) (63). Para seleccionar el tensioactivo para los SNEDDS se debe tomar en cuenta: la capacidad de emulsión del tensioactivo, su valor de HLB y la máxima solubilidad del fármaco (30).

7.3 Cosurfactantes / Codisolventes

Para tener una tensión interfacial baja es necesaria la adición de otro tensioactivo (cotensioactivo) o codisolvente. La combinación de los tensioactivos mejora la solubilidad del fármaco y la dispersabilidad del tensioactivo en el aceite, promoviendo la estabilidad y homogeneidad de las nanoemulsiones (64).

Se ha informado que la proporción en peso de surfactante/codisolvente impacta en la distribución del tamaño y la extensión del área de la nanoemulsión (65). El codisolvente

migra fácilmente hacia la fase acuosa después de la dispersión acuosa, lo que lleva a la precipitación del fármaco (66). Cabe mencionar que se pueden agregar antioxidantes, potenciadores de la viscosidad, e ingredientes para la liberación modificada de fármacos (67).

7. Resistencia de las células a los tratamientos

La mayoría de las terapias para el tratamiento del cáncer presentan cierta resistencia por parte de las células, lo cual limita el efecto terapéutico. La resistencia permite la progresión tumoral y la reaparición del cáncer. Ha sido de gran interés el estudio de la resistencia en la quimioterapia y radioterapia, en cambio existe un escaso estudio en la terapia fotodinámica. Sin embargo, las causas de resistencia se asocian a las implicadas en los fármacos en general (1).

La capacidad que tienen las células tumorales para reparar los daños al ADN genera el desarrollo de resistencia y tumores más agresivos. Para proteger la estabilidad del genoma, las células activan varios mecanismos para reparar el daño al ADN (68).

Algunos tipos de daño al ADN causan rupturas de cadena sencilla, así como de doble cadena. Las rupturas de cadena sencilla son reparadas por las vías de reparación por escisión de nucleótidos (REN) y por reparación de bases (REB). En cambio, las roturas de doble cadena son reparadas mediante reparación de extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (RH) (69).

8.1 Reparación por escisión de nucleótidos

Repara los daños causados en el ADN por la radiación UV, agentes mutagénicos, quimioterapia, entre otros. En este mecanismo participan proteínas como UvrA, UvrB, UvrC y UvrD en procariontes y en mamíferos más de 30 (70).

UvrA se une y reconoce el daño en el ADN, el cual no es específico, ya que identifica una distorsión en la molécula del ADN y no la secuencia errónea de nucleótidos, por lo que corrige varios daños (71). La lesión es reconocida por un complejo de heterodímeros (UvrB y UvrA₂) que causa la desnaturalización local de la lesión. Posteriormente, UvrB se adhiere a la lesión y se desconecta de UvrA₂ (72). UvrC se une a la cadena que presenta el daño y realiza dos escisiones en ella (71). Finalmente, UvrD remueve el segmento de oligonucleótidos lesionados y la ADN polimerasa I sintetiza los correctos (73).

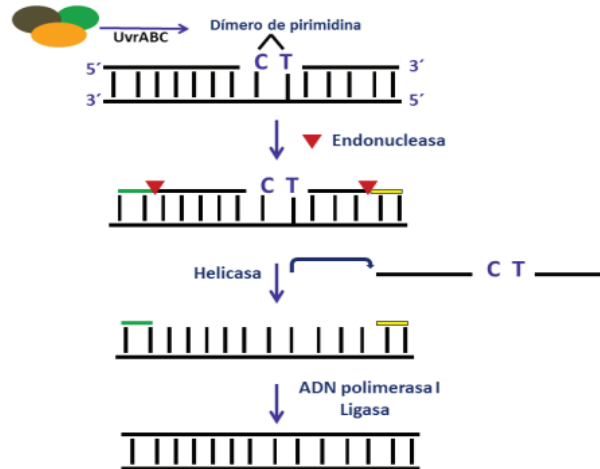


Figura 7. Reparación por escisión de nucleótidos. Figura tomada de (74)

8.2 Reparación de bases

Es utilizada para la protección contra daños y pérdidas de bases generando sitios apurínicos apirimidínicos (sitios AP) (75), los cuales pueden ser mutagénicos y citotóxicos si no son reparados, convirtiéndose en una amenaza para la viabilidad celular y para la estabilidad genómica, ya que pueden bloquear la replicación o la transcripción (76).

Consiste en retirar la base alterada del ADN mediante enzimas llamadas glicosilasas, que reconocen el daño y remueven la escisión de bases (77). Posteriormente, el sitio AP es reconocido por una AP-endonucleasa, la cual elimina el resto del nucleótido produciendo un corte (78). Finalmente, una exonucleasa degrada el corte dejando un espacio en la cadena, el cual es reparado por la ADN polimerasa y sellado por la ligasa, restaurando así la integridad de la molécula (79).

8.3 Reparación de extremos no homólogos

8.31 Fase de reconocimiento de daño

Inicia con la unión del complejo KU70/KU80 en los extremos rotos de la cadena, al unirse al ADN recluta y activa a la proteína ADN-PKcs (80). Posteriormente el complejo KU70/KU80 se desliza al interior de la hebra permitiendo la unión ADN-PKcs con la cadena de ADN y forma un puente molecular entre las dos cadenas rotas (81).

8.32 Fase de procesamiento

Una nucleasa llamada ADN-PKcs-Artemis se recluta al sitio de daño e interactúa con ADN-PKcs asegurando que los extremos queden alineados (82). Una vez procesados los extremos pueden generar huecos que tienen que rellenarse con la acción de la ADN polimerasa (83).

8.33 Fase de finalización

El complejo XRCC4/ligasa/ IV/ XLF se encarga de unir los extremos. XRCC4 estabiliza la actividad de LigIV, ya que sirve como andamiaje e interactúa con el complejo KU (84).

8.4 Reparación por recombinación homóloga (RH)

Este mecanismo repara daños generados por agentes químicos, físicos y radicales libres derivados de un rompimiento de doble cadena (DSB) especialmente en la fase G₂ del ciclo celular (85). Es indispensable para mantener la integridad del genoma, ya que para reparar el daño utiliza una cadena con homología a la que se dañó, evitando así la pérdida de nucleótidos y aumentando la fidelidad y exactitud del proceso. Se basa en el uso de una cadena de ADN molde para realizar la síntesis y con ello la reparación del ADN (86).

En este sistema están involucrados los siguientes genes RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11-RAD50-NBS, NBS1/XRS2, RAD59 y RDH54/TIDI, así como DNA nucleasas (Exo1, Sae2, Rad1-Rad10), helicasas (Sgs1, Srs2), topoisomerasas (Top3), polimerasas (Pol32) y ligasas, las cuales son necesarias para unir la región recién sintetizada con la región que no fue modificada durante la HR (87).

En levaduras los DSB son reconocidos por un complejo proteico llamado MRN (RAD50/MRE11/NBS1) (88), este actúa junto a la nucleasa Mre11 el cual degrada el ADN produciendo cadenas sencillas (89). Posteriormente RAD52 se une a los extremos de las cadenas protegiendo al ADN de las exonucleasas. La proteína RAD51 en presencia de ATP sintetiza un filamento nucleoproteico, el cual busca la secuencia homóloga y cataliza el intercambio y apareamiento de las cadenas en conjunto con RAD52 (90). En esta etapa RAD54 estimula a RAD51 alineando las cadenas y de esta manera se sintetiza la cadena, empleando como molde la secuencia homóloga que repara la información que se pierde en el DSB (91).

Por último, se forma una estructura de cadenas entrecruzadas conocida como intermediario de Holliday, este liga el proceso de reparación evitando rearrreglos cromosomales (92). (Figura 8).

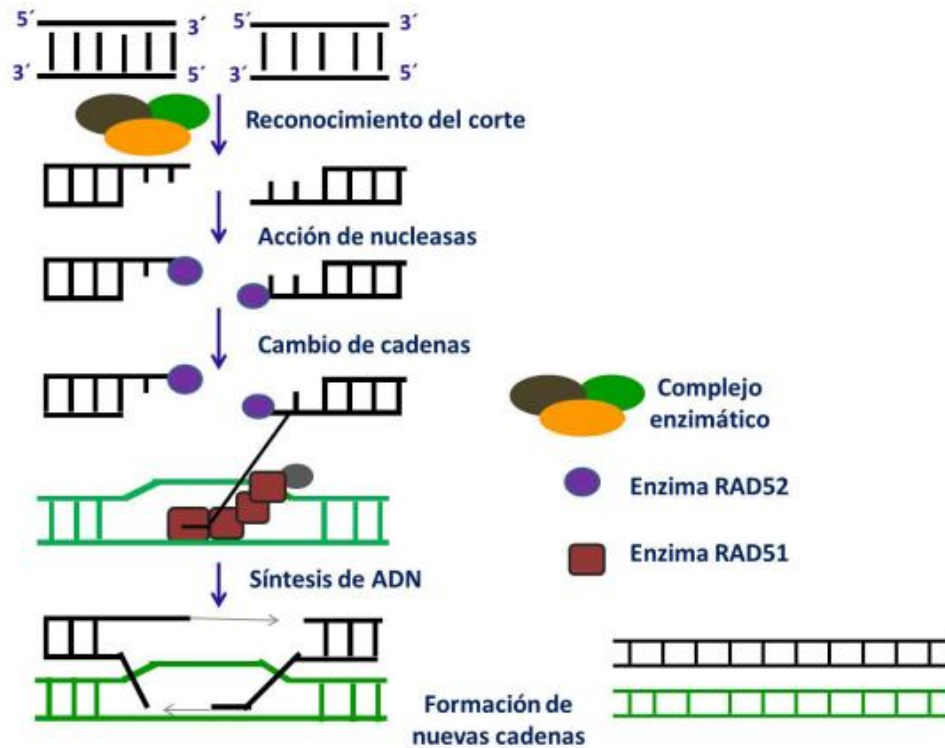


Figura 8. Reparación por recombinación homóloga - HR (Homologous Recombinarian). Figura tomada de (74).

8. RAD51

El complejo RAD51 está formado por cinco proteínas (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 y XRCC3) las cuales envuelven las hebras de ADN en los puntos de ruptura, convirtiéndose en transductor de la señalización del daño celular (93).

Los niveles de expresión del gen juegan un papel central en la regulación de la recombinación homóloga. Las mutaciones que reducen la actividad de RAD51, aumentan la sensibilidad al daño del ADN, reduciendo las tasas de reparación y aumentando la inestabilidad genómica

(94). De igual manera se han descrito alteraciones en la concentración de RAD51 debido a la resistencia a la quimioterapia en los tumores de ovario de alto grado (12).

9. SIRTUINAS

Las sirtuinas son proteínas que necesitan como cofactor metabólico al dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) para regular la función de proteínas mitocondriales. Entre las funciones que desempeñan se encuentran la regulación de vías de señalización relacionadas con la longevidad, diferenciación celular, proliferación, metabolismo, reparación del ADN, estabilidad cromosómica, modulación de la expresión de genes y cáncer (95).

El estudio de las sirtuinas en la tumorigénesis y la terapia del cáncer es un área prometedora en la investigación del cáncer. SIRT3 es de particular interés, ya que regula tanto la muerte como la supervivencia celular, por lo que es considerada como una proteína supresora tumoral y promotora tumoral (96).

10.1 SIRT3

La sirtuina 3 desacetilasa es una proteína que en humanos está codificada por el gen SIRT3. Esta sirtuina es la principal desacetilasa de la mitocondria, participa en la regulación de su metabolismo, así como en la modulación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) limitando el daño que provoca en los demás compartimentos. Además de otras funciones regula la oxidación de ácidos grasos e hipertrofia cardiaca (97).

Una de las principales funciones de la mitocondria es la obtención de energía en forma de ATP, esto lo hace mediante el proceso de fosforilación oxidativa, el cual conlleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS estimulan la proliferación celular cuando se encuentran en un nivel controlado, pero en niveles elevados puede causar estrés oxidativo en la célula y dañar al ADN dando lugar a la carcinogénesis y a la disfunción mitocondrial (98). Para que la célula se proteja de este estado de estrés oxidativo y mantenga el equilibrio, la célula utiliza sistemas antioxidantes. SIRT3 activa enzimas antioxidantes como la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y la isocitrato deshidrogenasa (IDH) para regular la cantidad de ROS (97).

La MnSOD ejerce su acción como antioxidante convirtiendo el ion superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual a su vez se convierte en agua por la catalasa para evitar el daño oxidativo (98). La isocitrato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación del isocitrato en 2-oxoglutarato a través de la generación de Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato (NADPH) (99).

Estudios recientes muestran cómo el silenciamiento de la SIRT3 puede contribuir a reducir la proliferación celular y aumentar la eficacia de la quimioterapia en distintos tipos de cáncer (96) (100)(101). Por lo tanto, la modulación de la actividad de la SIRT3 en algunos tumores podría ser una diana terapéutica, en especial para combatir la resistencia adquirida a las terapias antitumorales (13).

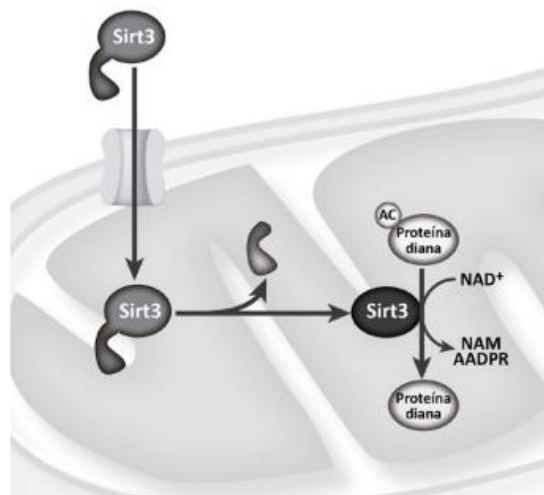


Figura 9. *Bajo condiciones de estrés, la SIRT3 es translocada a las mitocondrias y es escindida, dando lugar a la forma activa capaz de desacetilar numerosas proteínas dianas con el NAD⁺ como cofactor. Figura tomada de (13).*

10. Tratamientos combinados

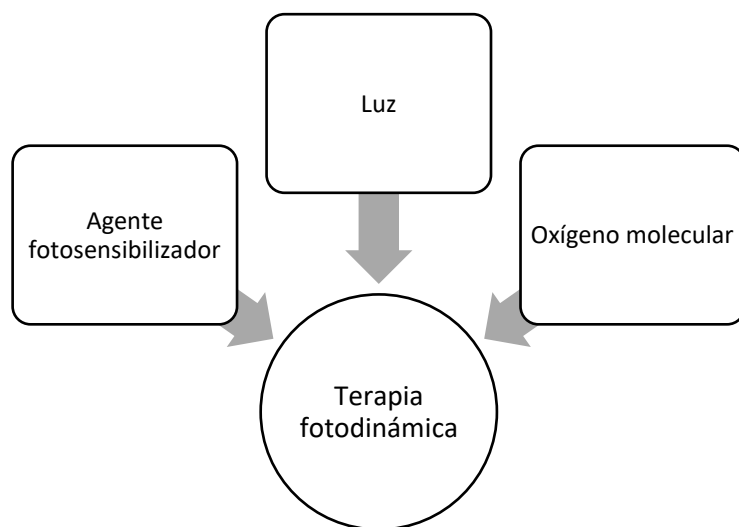
Una de las alternativas que se han utilizado para disminuir la resistencia de las células ante los tratamientos es la aplicación de terapias combinadas. Las terapias combinadas han sido utilizadas con el objetivo de afectar a varias rutas celulares, dificultando que las células de cáncer se adapten al tratamiento y generen resistencia a la muerte celular (2).

Reportes indican que la combinación de quimioterapia y terapia fotodinámica produce una mejor respuesta que las terapias individuales, los autores sugirieron que esta mejora se debe a un aumento de la actividad de la doxorubicina, un fármaco utilizado como agente quimioterapéutico debido a una reacción fotoquímica de este durante la terapia fotodinámica (102).

11. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (PDT) es un tratamiento que involucra la administración de agentes fotosensibilizadores (PS), la presencia de luz y oxígeno molecular con el propósito de desencadenar la muerte de células específicas mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, por lo que; se requiere la combinación de estos tres componentes para lograr el efecto terapéutico deseado (103)

Una de las principales ventajas que ofrece esta terapia en comparación con las demás modalidades es la alta selectividad, ya que los fotosensibilizadores se acumulan preferentemente en el tumor de las células, es decir, aun cuando el fármaco se incorpore a células sanas, solo el área irradiada será afectada, reduciendo de esta manera los efectos secundarios (104).



La terapia fotodinámica consiste en la administración de un agente fotosensibilizador, el cual se acumula en las células a tratar, después de un periodo de incubación se irradia la zona con luz cuya longitud de onda debe estar dentro del espectro de absorción del agente fotosensibilizador para ser activado. Una vez que interacciona con oxígeno molecular se

generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno y radicales libres, los cuales llevan al daño celular (105).

12.1 Radicales libres

En los átomos, los electrones se encuentran ubicados en los orbitales y cada orbital puede albergar un máximo de dos electrones. Un radical libre contiene uno o más electrones no apareados, lo que significa que un electrón se encuentra solo en el orbital. Dicho esto, los electrones son más estables cuando se encuentran apareados en los orbitales, en cambio los radicales libres son reactivos frente a otras especies (106).

Para lograr la estabilidad un radical puede donar su electrón a otra molécula o puede robar un electrón de otra molécula para formar un par electrónico, sin embargo, si esto pasa, la otra molécula se convierte en un radical libre. Es por ello que los radicales libres tienden a causar reacciones en cadena, es decir, un radical genera otra radical y así sucesivamente (107).

Existen diversas sustancias reactivas que reaccionan con diferentes moléculas celulares, las cuales son: especies reactivas del oxígeno (ROS), especies reactivas del nitrógeno (RNS) y las especies reactivas del cloruro. Una especie reactiva puede ser radical o no serlo (108).

12.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyen radicales de oxígeno, como superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-), peróxido (RO_2^-) e hidroperóxido (HO_2^-) y agentes oxidantes no radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCL$) y ozono (O_3) los cuales se pueden convertir en radicales (109).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen por el metabolismo fisiológico aeróbico normal. Las fuentes donde se producen las ROS principalmente son: peroxisomas, NADPH oxidasas, óxido nítrico sintasa desacoplada (**NOS**), cadena de transporte de electrones en las mitocondrias y el sistema del citocromo P450 (108).

12.3 Agentes fotosensibilizadores

El agente fotosensibilizador (PS) es un componente de la terapia fotodinámica, se caracteriza por no presentar actividad citotóxica. Al ser excitados con luz de longitud de onda apropiada desencadenan una serie de reacciones intracelulares que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) ocasionando la muerte de las células (103).

Un FS ideal debe presentar lo siguiente (110) (111):

- Caracterizarse por altos coeficientes de absorción entre 600-800 nm, ya que en este intervalo la luz tiene buena capacidad de penetración en los tejidos y energía suficiente para excitar el O₂.
- Ser de composición química conocida, elevada estabilidad tanto química como fotoquímica y presentar alto grado de pureza.
- Mínima citotoxicidad en la oscuridad y elevada fototoxicidad.
- Alta reactividad fotoquímica con rendimientos de formación del estado triplete siendo capaz de producir ¹O₂ y rendimiento sustancial de ROS.
- Localización y retención selectiva en las células blanco
- Penetración profunda en el tejido diana
- Elevada solubilidad en tejidos biológicos
- Adecuada lipofilia que permita la difusión a través de membranas biológicas

12.31 Fotosensibilizadores de primera, segunda y tercera generación

Los agentes fotosensibilizadores de primera generación son compuestos que manifiestan eficacia como agentes fotodinámicos, tienen estructuras basadas en la porfirina y entre sus ventajas se encuentran la destrucción efectiva del tumor, despreciable toxicidad en un ambiente oscuro y puede ser formulado en preparaciones acuosas para su administración intravenosa (111). Uno de los primeros fotosensibilizadores fue Fotofrin, el cual fue aprobado por la FDA y utilizado en la terapia fotodinámica por Canadá, Holanda, Japón, Francia, Italia y Estados Unidos para el tratamiento del cáncer de esófago y pulmón (112).

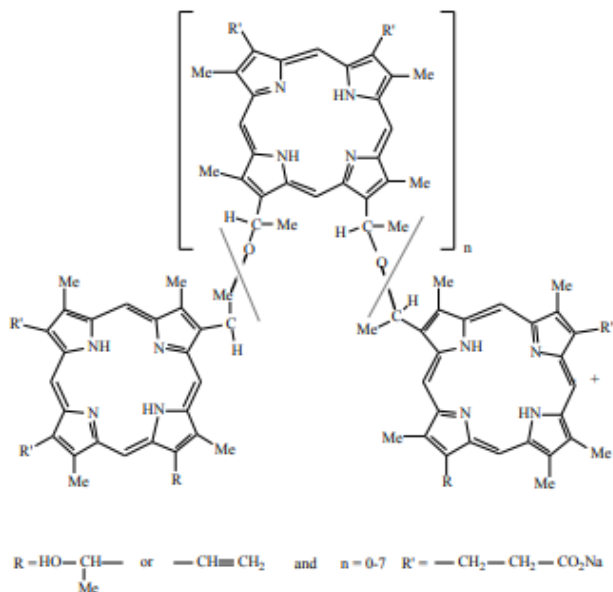


Figura 11. Estructura del Photofrin. Figura tomada de (112)

Los fotosensibilizadores de primera generación presentaban baja intensidad de absorción en la ventana terapéutica y una fotosensibilidad cutánea prolongada, lo que conllevaba a una baja eficacia del tratamiento, por lo que se pretendía encontrar fotosensibilizadores más potentes, eficaces, con mayor penetración y absorción para una mayor efectividad y menores efectos adversos (113).

Fue así como surgieron los fotosensibilizadores de segunda generación, en ellos se incluyen porfirinas, clorinas, feoforbides y ftalocianinas. Estos PS son compuestos puros y de estructura química conocida, presentan máxima absorción a longitudes de onda superiores a 630 nm, contribuyen a la formación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y refieren selectividad por las células anormales. A pesar de ello, la mayoría de ellos son altamente lipofílicos lo cual dificulta su biodisponibilidad e implica un desafío para la elaboración de una forma de administración endovenosa (114).

Con la finalidad de superar las deficiencias se desarrolló el ácido 5-aminolevulínico (ALA) y su derivado 5-aminolevulinato de metilo (MAL) ambos dan origen a la protoporfirina que se acumula en los tejidos tumorales y se metabolizan en un periodo más corto que los PS de primera generación conduciendo a una menor fotosensibilidad cutánea después del tratamiento (115).

La mayoría de los fotosensibilizadores de primera y segunda generación son de naturaleza hidrófoba, por lo que tienen limitada solubilidad en agua. Existen fotosensibilizadores hidrofílicos, sin embargo, estos no son selectivos entre las células blanco y las normales (116). Es por ello que surgen los agentes fotosensibilizadores de tercera generación, los cuales utilizan nanopartículas como sistemas transportadores tales como liposomas, micelas o partículas poliméricas que aumentan la captación del PS por el tejido blanco (117).

12. Doxorrubicina

La doxorrubicina (DOX) es un agente quimioterapéutico de la familia de las antraciclinas utilizado para el tratamiento de diversas neoplasias entre las que se incluyen el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, leucemia y linfoma (118).

La DOX está conformada por restos aglicona y una azúcar llamada daunosamina. La aglicona, responsable del color rojo de las antraciclinas, consta de un anillo tetracíclico con grupos quinona-hidroquinona adyacentes en los anillos C-B, un sustituyente metoxi en C-4 en el anillo D y una cadena lateral corta en C-9 con un grupo carbonilo en C-13. El azúcar daunosamina, se une mediante un enlace glucosídico al C-7 del anillo A mediante un enlace glucosídico (119).

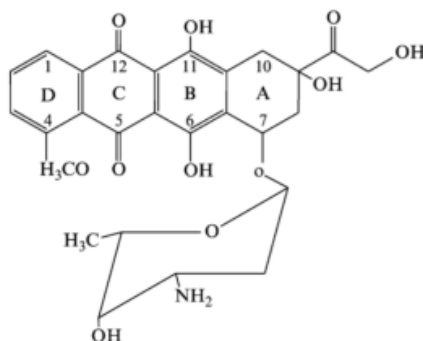


Figura 12. Estructura química de DOX. Figura tomada de (119).

13.1 Mecanismo de acción de DOX

La configuración planar de las antraciclinas les permite intercalarse entre las hebras de ADN, acción que se consideró como determinante de su efecto inhibitor de la síntesis de ADN (120).

Las antraciclinas tienen cuatro mecanismos de acción (121).

1. Intercalación en el ADN con alteración de la replicación, la transcripción del ARN e inhibición de la síntesis de proteínas
2. Formación de radicales libres, inducción de la peroxidación lipídica y de las ROS
3. Alquilación, reticulación e interferencia con el ADN
4. Anulación y separación de la cadena ADN por parte de la helicasa
5. Daño directo de la membrana con una interrupción de la estructura de la bicapa, debido a la oxidación de los lípidos
6. Iniciación de daño en el ADN a través de la inhibición de la topoisomerasa II

De estos, los principales mecanismos son la formación de ROS y la acción sobre la topoisomerasa II (122).

- Intercalación entre los pares de bases de las cadenas de ADN. La doxorubicina se intercala entre las bases del ADN inhibiendo la acción de la enzima topoisomerasa II interrumpiendo así la síntesis de ADN y ARN mediante el bloqueo de los procesos de replicación y transcripción e interrupción de la reparación de ADN mediada por topoisomerasa II [Figura 6].
- Generación de radicales libres. La estructura quinona de DOX participa en reacciones redox como aceptor de electrones, debido a esto se convierte en un metabolito inestable el cual puede provocar lesiones en el ADN por sí mismo o puede volver a su forma de quinona produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como superóxido, radicales hidroxilo o peróxido (120).

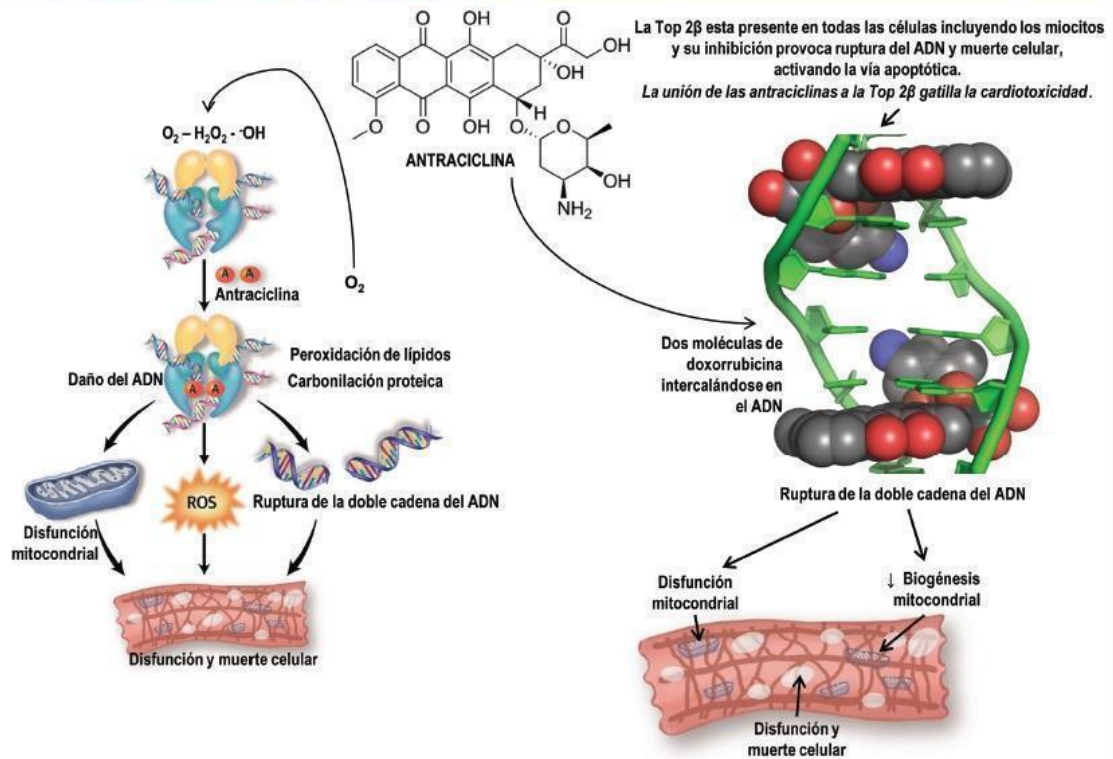


Figura 13. Mecanismo de acción de DOX con el ADN. Figura tomada de (123).

13.2 Cardiotoxicidad de DOX

Aunque la DOX es reconocida como un potente agente antineoplásico, presenta efectos cardiotoxícos por lo que se administra con dosis limitada. Las manifestaciones clínicas de la cardiotoxicidad se clasifican en agudas y crónicas. Se ha informado que los efectos agudos en el corazón pueden controlarse y con frecuencia son reversibles y ocurren ~11% de los pacientes después de la terapia. Entre los efectos agudos se encuentran: arritmias, hipotensión y diversas alteraciones electrocardiográficas que desaparecen al concluir el tratamiento. Por otro lado, los efectos crónicos inducidos por DOX dependen de la dosis y los pacientes suelen presentar insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) (124).

13. Doxorubicina como agente fotosensibilizador

Una alternativa para disminuir los efectos secundarios de DOX es aplicar una dosis más baja de esta, sin embargo, la respuesta antitumoral se vería comprometida. Una alternativa es el uso de terapia adyuvante, como la terapia fotodinámica (TFD) (3). Cabe mencionar que los

espectros de emisión y excitación de DOX han permitido su aplicación como PS para PDT (125).

La DOX tiene un máximo de absorción de 480 nm y dado que las moléculas excitadas pueden ser muy reactivas, la fotoactivación de este fármaco puede aumentar la citotoxicidad. Recientemente, Quintos-Meneses et al., (2020) encontró que al fotoactivar doxorubicina con luz láser de 450 nm y con radiación Cerenkov se producían ROS. La mayoría de ROS que se produjeron en ambos casos fue oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (3).

14. Fuentes de luz empleadas en la terapia fotodinámica

Las fuentes de luz utilizadas en la terapia fotodinámica deben presentar ciertas características que logren el efecto terapéutico deseado. La longitud de luz a utilizar depende de la longitud de onda de máxima absorción del agente fotosensibilizador (PS), la cual logrará la producción adecuada de especies reactivas de oxígeno (ROS) que actuaran para producir un efecto citotóxico en las células de cáncer (126).

La fuente de luz ideal debe ser capaz de lograr lo siguiente (105):

- Capacidad de absorción por el agente fotosensibilizador.
- Capacidad de penetración en la piel para alcanzar los tejidos diana
- Ser capaz de generar reacciones citotóxicas en la célula.
- Administrarse en un periodo de tiempo breve para conseguir el efecto terapéutico.
- Producir efectos secundarios mínimos.

Las primeras fuentes de luz aplicadas en TFD fueron de luz no coherentes, como lámparas de filamento de tungsteno, halógeno de cuarzo, arco de xenón, haluro metálico y lámparas de sodio revestidas de fosforo. Estos sistemas son adecuados para el tratamiento de grandes áreas, siendo seguros, fáciles de utilizar y de menor costo (127).

Los diodos emisores de luz (LED) son sistemas emergentes para la aplicación de luz en terapia fotodinámica. Se caracterizan por ser sistemas compactos, livianos, no emiten calor y requieren poca energía para producir irradiaciones a diferentes longitudes de onda, dependiendo de la profundidad de la patología a tratar pueden implantarse en el extremo de diferentes catéteres formando pantallas para irradiar grandes superficies (128).

Las fuentes más utilizadas en los tratamientos fotodinámicos son los láseres, estos producen luz monocromática de alta energía, a una longitud de onda específica para cada agente fotosensibilizador. La luz láser puede transmitirse a través de una fibra óptica para suministrarse directamente al sitio de acción (129).

15. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica

Los dos aspectos más importantes de la terapia fotodinámica (PDT) son los procesos de transferencia de energía y absorción de luz. Cuando el agente fotosensibilizador (PS) se encuentra en su estado basal tiene dos electrones con espines opuestos en un orbital molecular de baja energía (estado singlete). Después de la absorción de luz en forma de fotones pueden producirse dos posibles estados excitados (126).

- Uno de estos estados sucede cuando uno de los electrones es excitado y pasa a un orbital de mayor energía manteniendo su espín dando lugar al primer estado excitado del fotosensibilizador (PS^1), este estado es inestable y por tanto de corta duración con una vida media entre 10^{-6} a 10^9 segundos.
- El segundo estado posible es cuando existe un cambio de espín del electrón excitado, el cual es nombrado estado triplete. Este estado tiene mayor tiempo de duración lo que favorece la interacción con otras moléculas del entorno y además incrementa el potencial del agente fotosensibilizador (129).

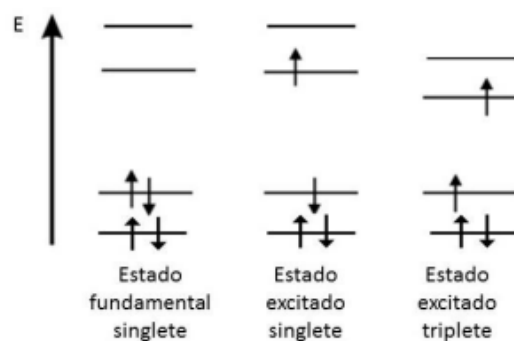


Figura 14. Estados singlete y triplete. Figura tomada de (129).

Cabe mencionar que estos estados pueden volver a su estado fundamental mediante procesos de desactivación radiactivos como la fluorescencia y fosforescencia, así como por procesos de desactivación no radiactivos entre los que se encuentran la relajación vibracional,

conversión interna y el cruzamiento intersistema (130). Estos procesos de desactivación son representados en el diagrama de Jablonski [Figura 9].

En el fenómeno de fluorescencia, la luz absorbida incita a que los electrones pasen a un estado más excitado, los electrones antes de liberar la energía en forma de luz pierden un poco de energía dándose el fenómeno de la fluorescencia. La fosforescencia tiene un tiempo de vida de 10^{-4} s, el cual es un tiempo mayor en comparación con el proceso de fluorescencia como consecuencia del cambio de spin del electrón excitado (131).

El proceso de relajación vibracional se da cuando existe una colisión entre las moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Durante estas colisiones se produce un exceso de energía vibracional que se transfiere a las moléculas del disolvente para regresar al estado basal. En la conversión interna la energía de emisión se convierte en calor y no hay presencia de fotones liberados, esto se da cuando la molécula pasa a un estado electrónico de igual multiplicidad, pero de menor energía. Por último, el cruzamiento intersistema se presenta cuando se invierte el espín de un electrón excitado y ocurre la transformación de un estado singlete a triplete o viceversa (132).

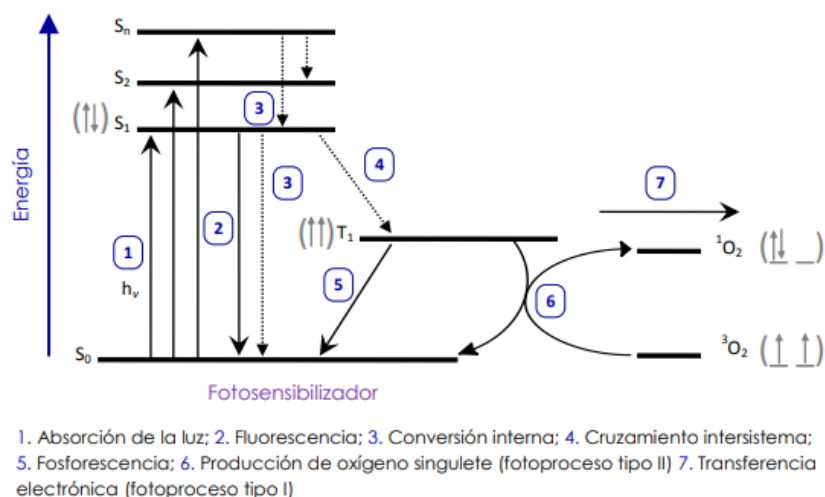


Figura 15. Diagrama de Jablonski. Figura tomada de (112)

El estado triplete excitado (PS^3) puede dar lugar a dos tipos de reacciones: una reacción de tipo I o una reacción de tipo II. La reacción de tipo I involucra una reacción química en la que se producen radicales libres por la interacción del fotosensibilizador con el sustrato, los radicales al reaccionar con el oxígeno forman anión superóxido (O_2^-) que por muchos

mecanismos oxida al sustrato. Por otro lado, en una reacción de tipo II el fotosensibilizador transfiere su energía directamente al oxígeno para formar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) el principal causante del daño durante la terapia fotodinámica (133).

El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) presenta alta reactividad química y participa en los procesos de fotooxidación biológicos y químicos, daña biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN que pueden desencadenar la muerte celular. Los lípidos son alquenos que contienen hidrógenos alílicos y reaccionan produciendo hidroperóxidos lipídicos lo que ocasiona severas consecuencias en la membrana celular. Cabe mencionar que debido a que el oxígeno singlete tiene una vida media corta solo se ven afectadas las áreas donde se localiza el fotosensibilizador para la muerte celular. Pueden ocurrir las dos reacciones simultáneamente, pero esto depende del tipo de fotosensibilizador utilizado y de las concentraciones de sustrato y oxígeno empleadas (134).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las cifras de morbilidad y mortalidad por año y habitante en cáncer han ido en continuo crecimiento a nivel mundial, la falta de respuesta al tratamiento y la resistencia de las células tumorales inicialmente sensibles a la quimioterapia son causa de un número importante de muertes en pacientes con cáncer (135).

Las células tumorales son capaces de generar cierta resistencia a la terapia debido a la existencia de factores tanto extrínsecos como intrínsecos. Las causas de la resistencia que presentan las células están siendo estudiadas, pero al ser multifactoriales el problema aún no se resuelve completamente (136). La resistencia intrínseca ha conducido al desarrollo de estrategias que permitan modular la respuesta celular con la finalidad de aumentar el daño o la muerte celular.

El silenciamiento génico mediado por siRNA ha mostrado ser una estrategia viable para sensibilizar a las células de cáncer. Para la liberación de siRNA en el sitio diana se requiere la utilización de sistemas de transporte y entrega en el sitio deseado. Los sistemas de transporte de fármacos como los liposomas y los SNEDDS son nanosistemas con capacidad de liberación citosólica. Sin embargo, hasta la fecha son limitados los estudios que los han utilizado para el transporte de siRNA-RAD51 o para sensibilizar a las células en terapia fotodinámica.

Considerando que RAD51 y SIRT3 participan en la reparación de roturas de doble cadena mediante RH o en la activación de sistemas de defensa antioxidantes, respectivamente; son considerados como blancos para el tratamiento. En este proyecto se analiza la posibilidad de utilizar SNEDDS cargados con siRNA-RAD51 y/o SIRT3 como pre-tratamiento para evaluar y comparar la sensibilización inducida por el silenciamiento de RAD51 y/o SIRT3 en un tratamiento quimiofotodinámico.

VI. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo al Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Cáncer de Mama, Instituto de Salud del Estado de México, el cáncer es la tercera causa de muerte, fallecen por esta enfermedad 14 de cada 100 mexicanos y la expectativa de vida de quienes la padecen es de alrededor de 63 años. Los tumores malignos más frecuentes son: el cáncer de mamá, con 20 mil casos, cáncer de próstata con 14 mil y cervicouterino, de colón y pulmón con 8 mil casos. La tendencia de la mortalidad es ascendente debido a una mayor incidencia de la enfermedad y la poca capacidad de respuesta por partes de los sistemas de salud (137).

En el Estado de México la tasa de mortalidad por cáncer de mama en el año 2007 fue de 7.63 mujeres por cada 100 mil habitantes. La tasa de mortalidad más alta dividida por regiones, se encontró en la zona de Valle de Bravo con 17.99, Coatepec Harinas con 15.93, Toluca con 11.46, Atlacomulco con 9.36. Zumpango con 8.09 y Texcoco con 4.80 (138).

Las terapias que actualmente se emplean individualmente para el tratamiento de cáncer presentan diversas limitaciones como resultado de algunos mecanismos de resistencia por parte de las células cáncer, tales como la alta inactivación de especies reactivas de oxígeno mediante enzimas antioxidantes y mayor reparación del daño inducido a membranas, proteínas y ADN (139) (13). La presente investigación surge de la necesidad de combatir dicha resistencia que desarrollan las células de cáncer a la terapia fotodinámica.

Estudios demuestran que SIRT3 reduce el estrés celular generado por ROS, al activar sistemas antioxidantes para mantener los niveles de ROS por debajo de un umbral crítico y producir resistencia al estrés oxidativo, incluyendo el inducido por la quimioterapia y/o terapia fotodinámica. Esto conduce a una menor producción de ROS y mayor supervivencia celular (140).

Se ha observado que los niveles de Mn-SOD, enzima antioxidante, disminuyen de un 50 a un 90% lo que provoca el aumento de ROS, esto a su vez se relaciona con la disminución de la actividad de SIRT3 proteína necesaria para la activación de Mn-SOD (141). Además, se ha encontrado que la proteína RAD51 participa reparando las roturas de doble cadena mediante recombinación homóloga, uno de los mecanismos que utilizan las células de cáncer

para evitar la muerte celular. Es por ello que la inhibición de la acción de RAD51 se ha utilizado como una estrategia para mejorar el efecto terapéutico deseado (139).

La presente investigación busca inhibir la expresión de RAD51 y/o SIRT3 mediante siRNA transportado en SNEDDS con el objetivo de desarrollar una estrategia para mejorar la respuesta terapéutica ante las células de cáncer cuando son sometidas a un tratamiento quimiofotodinámico, particularmente cuando se fotoactiva a DOX con luz láser.

VII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El silenciamiento génico de RAD51 y/o SIRT3 mediante siRNA transportado en SNEDDS mejora el efecto fotodinámico?

VIII. HIPÓTESIS

Dado que RAD51 y/o SIRT3 participan en la reparación de daño al ADN, silenciar génicamente estas proteínas a través de SNEDDS/siRNA mejoraría el efecto de la terapia fotodinámica basada en la excitación de DOX con 450 nm.

IX. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del silenciamiento génico inducido por SNEDDS/ siRNA en un tratamiento quimiofotodinámico basado en la excitación de DOX con 450 nm.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la viabilidad celular después de la irradiación de la doxorubicina con luz láser de 450 nm en células pre-incubadas con siRNA-SIRT3 y siRNA-RAD51
2. Evaluar la producción intracelular de ROS después de la irradiación de la doxorubicina con luz láser de 450 nm en células pre-incubadas con siRNA-SIRT3 y siRNA-RAD51.
3. Evaluar las curvas de supervivencia después de la irradiación de la doxorubicina con luz láser de 450 nm en células pre-incubadas con siRNA-SIRT3 y siRNA-RAD51.

X. METODOLOGÍA

1. Reactivos y preparación de soluciones

- Doxorubicina 98.0-102.0% (HPLC)
- siRNA-SIRT3
- siRNA-RAD51
- Lipofectamina 2000
- Opti-Mem Reduced Serum Medium
- Soluciones: Doxorubicina tenía una concentración de 1 μM respectivamente, siRNA-SIRT3 una concentración de 50 μM , siRNA-RAD51 una concentración de 50 μM .

1.1 Preparación de Opti-Mem

Se prepararon 30ml de Opti-Mem diluyendo 0.4077 g de Opti-Mem y 0.072 g de NaHCO_3 en 1 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.3 agregando gota a gota NaOH y HCl con agitación constante monitoreando el pH. Una vez que el pH final fue de 7.3 ± 0.1 se completó el volumen final de 30 ml con agua destilada.

1.2 Preparación de Doxorubicina

Se tomaron de Doxo HCL 0.001g y se diluyeron en 1 ml de agua destilada para alcanzar una concentración de 1.034 mM. Posteriormente se tomaron 9.67ul de la doxorubicina concentrada y se diluyó en 10 ml para obtener una concentración 1 μM (1000 nM).

1.3 Preparación 1: SNEDDS/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-RAD51

Para la incorporación del siRNA en los SNEDDS primeramente se preparó el poliplexo de siRNA/quitosano (siRNA-CS) con 2500 pmoles de siRNA re-suspendidos en 25 μL de agua libre de RNasa en una proporción 5:4. La solución se agitó por 5 min y se mantuvo en agitación a 120 rpm por 30 min. La mezcla se centrifugó a 1500 rpm por 30 min y 4 °C. El poliplexo siRNA-CS se formó después de 30 min ¿de reposo o de agitación? a temperatura ambiente. Una vez formado el poliplexo siRNA/CS, se prepararon los SNEDDS al añadir siRNA-CS a una mezcla formada con 80 μL del cosolvente PC90 (A: 21%), 148 μL del

excipiente lipídico Labrafil (B: 39 %) y 152 μL del surfactante Cremophor RH 40 (C: 40 %). Se agitó durante 2 min para obtener la fase oleosa del SNEDDS y a continuación se añadieron 10 mL de agua libre de RNasa. El SNEDDS se obtuvo luego de agitar a temperatura ambiente.

1.4 Preparación 2: poliplejo liposomas/siRNA (lipofectamina 2000)

Para formar el poliplejo liposomas /siRNA (siRNA-RAD51 o siRNA-SIRT3 o siRNA-Cy3) se prepararon dos mezclas. La primera se preparó con 1 μl (1 picomol) de siRNA diluido en 25 μL de Medio Opti-MEM e incubando por 5 min a temperatura ambiente. La segunda mezcla se preparó con 0.25 μL de Lipofectamina 2000 diluidos en 25 μL de medio Opti-MEM. Ambas preparaciones se mezclaron suavemente e incubaron por 20 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agregó a los pozos y se completó con un volumen final a 101.25 μL medio Opti-MEM. Esta mezcla se incubó por 24 horas antes del tratamiento fotodinámico con Doxo +luz láser de 450 nm.

2. Cultivo celular

Se utilizaron células T4TD las cuales son una línea celular de cáncer de mama, estas se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma-Adrich Co) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de anfotericina B y antibióticos (estreptomomicina y penicilina). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

Las células se trabajaron con los mismos tiempos y a las mismas concentraciones según correspondía en cada tratamiento administrado. Estas concentraciones se propusieron de acuerdo con el protocolo Lipofectamine 2000.

3. Ensayo de viabilidad celular.

Para este ensayo se sembraron células T47D (8×10^3 células/pozo) en una placa de 96 pozos e incubaron a 37°C en CO₂ al 5% ($n = 4$) con 100 μL de medio RPMI suplementado con 10% de FBS y 1% de antibióticos (100 U/ mL penicilina, 100 μg / mL estreptomomicina) por 24 h. Posteriormente, se agregaron los nanosistemas SNEDDS/siRNA-RAD51 (*Preparación 1*) y liposomas/siRNA-RAD51 (*Preparación 2*) considerando 1pmol de siRNA en cada pozo. Como control negativo se usó 1 pmol de liposomas/siRNA-Cy3 o siRNA-Cy3. El siRNA-Cy3 es una secuencia que no tiene homología con genes de células de mamíferos y está marcada con el fluoróforo Cy3. Después de la transfección con SNEDDS/siRNA-RAD51 o

liposomas/siRNA-RAD51, se agregó doxorubicina (DOX) a una concentración 10 nM e incubó durante 30 min a 37°C y 5% de CO₂. Seguidamente, se irradió con luz láser de 450 nm por 5 min (diodo laser de 1 400 mW). Como grupos control se usaron: DOX (10 nM), irradiación con 450 nm, DOX+450 nm, siRNA-RAD51, liposomas, liposomas/siRNA-RAD51; liposomas/siRNA-RAD51+DOX, liposomas+Dox+450nm, siRNA-RAD51+DOX+450 nm, SNEDDS/siRNA-Cy3, SNEDDS/siRNA-Cy3+450nm, SNEDDS/siRNA-Cy3+DOX+450nm, SNEDDS/siRNA-RAD51, SNEDDS/siRNA-RAD51+DOX, SNEDDS/siRNA-RAD51+450nm. Después de la irradiación con láser se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS 1x estéril. Se colocaron 100 µL de PBS 1x en cada pozo y se agregaron 50 µL de la mezcla de reacción XTT (50 µL de XTT + 1 µL electrón coupling). Por último, después de 24 h, se midió la viabilidad celular por absorbancia (450 nm y 690 nm) en el espectrofotómetro Epoch 2 (BioTek Instruments). Para obtener el porcentaje de viabilidad celular se tomó como referencia la absorbancia del grupo sin tratamiento (grupo control). Los resultados se representaron como promedio y desviación estándar en los diferentes grupos. Se realizaron pruebas t student para muestras independientes para comparar si había diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de tratamiento.

4. Evaluación intracelular de ROS

Para este ensayo se sembraron células T47D (8 x 10³ células/pozo) en una placa de 96 pozos e incubaron a 37°C en CO₂ al 5% (n = 4) con 100 µL de medio RPMI suplementado con 10% de FBS y 1% de antibióticos (100 U/ mL penicilina, 100 µg / mL estreptomina) por 24 h. Posteriormente, se agregaron los nanosistemas SNEDDS/siRNA-RAD51 (Preparación 1) y liposomas/siRNA-RAD51 (Preparación 2) considerando 1pmol de siRNA en cada pozo. Después de la transfección con SNEDDS/siRNA-RAD51 o liposomas/siRNA-RAD51, se agregó doxorubicina (DOX) a una concentración 10 nM e incubó durante 30 min a 37°C y 5% de CO₂. Seguidamente, se irradió con luz láser de 450 nm por 5 min (diodo laser de 1 400 mW). Como grupos control se usaron: células sin tratamiento, liposomas/siRNA-RAD51; liposomas+DOX, liposomas+450nm, siRNA-RAD51+DOX+450 nm, SNEDDS/siRNA-Cy3, SNEDDS/siRNA-Cy3+450nm, SNEDDS/siRNA-Cy3+DOX+450nm, SNEDDS/siRNA-RAD51, SNEDDS/siRNA-RAD51+DOX, SNEDDS/siRNA-RAD51+450nm. Se agregó el CellROX a una concentración 5µM e

incubó por 30 minutos a 37°C. Se retiró el medio y lavó dos veces con PBS 1x. Se fijaron las células con 100 µl de paraformaldehído al 2% por 15 min. Se analizó la intensidad de fluorescencia en el lector de microplacas VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader. Los resultados se representaron como promedio y desviación estándar en los diferentes grupos. Se realizaron pruebas t student para muestras independientes para comparar si había diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de tratamiento.

5. Ensayo clonogénico

La apoptosis en las células de cáncer se evaluará con el kit Annexin V and Dead Cell Kit (Merck Millipore; Burlington, MA, USA). Las células se cultivarán con una densidad de 1×10^6 en placas de 6 pozos. Se agregará el complejo siRNA-SIRT3/lípido en cada pozo e incubarán por 24 h a 37°C.

Posteriormente, se incubará doxorubicina a una concentración de 62.5 µg/mL durante 30 min e irradiará con luz láser de 450 nm por 20 min. Células sin tratamiento se usarán como grupo control. Las células serán tripsinizadas y re-suspendidas en 100 µL de BSA al 1% (1×10^6 células/mL).

Posteriormente, se agregarán 100 µL de Anexina (Annexin V and Dead Cell reagent) a células en suspensión. Estas se incubarán en la oscuridad por 20 min. La intensidad de fluorescencia se examinará por citometría de flujo usando el analizador Muse cell (Merck Millipore; Burlington, MA, USA).

XI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Evaluación de la viabilidad celular

Las células de cáncer presentan cierta resistencia ante los tratamientos debido a que en la célula existen diversos mecanismos de reparación de daño en el ADN (68). Uno de los mecanismos que utilizan las células para reparar tales daños es la recombinación homóloga, la cual actúa reparando las roturas de doble hebra causadas en el ADN, en este proceso participa la proteína RAD51(139). De igual manera se ha reportado que la proteína SIRT3 tiene relación con la resistencia debido a que activa proteínas antioxidantes que protegen a las células contra las ROS manteniendo a las células en homeostasis (13).

La terapia génica propone reemplazar o alterar la expresión de ciertos genes que participan en la progresión tumoral, para ello se han aplicado siRNA ya que silencian genes específicos mediante la degradación del ARNm diana (35).

Como estrategia terapéutica se han utilizado las terapias combinadas para reducir tal resistencia y hacer más sensibles a las células; Quintos Meneses, et al (2020), demostró que la Doxorubicina al ser irradiada con luz láser y radiación Cerenkov produce radicales libres, demostrando el potencial uso de Doxorubicina como agente fotosensibilizador; asimismo demostró que la combinación de quimioterapia y terapia fotodinámica incrementa la muerte celular (3). El agente quimioterapéutico DOX actúa intercalándose en las bases del ADN, interrumpiendo la reparación del ADN mediada por la topoisomerasa II β y la síntesis de ADN y ARN (47).

En el presente estudio se analizó el efecto del silenciamiento génico de RAD51 y SIRT3 inducido por siRNA/nanopartícula en tratamientos quimiofotodinámicos. Se evaluó tanto la viabilidad celular, la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la capacidad clonogénica mediante un ensayo de proliferación en una línea celular de cáncer de mama *T47D*.

Como tratamiento fotodinámico se usó el agente quimioterapéutico doxorubicina (DOX), el cual fue irradiado con luz láser de 450 nm. En la figura 1, se observa tal efecto, donde existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la viabilidad celular cuando se combinó DOX y láser

de 450 nm (91.37 ± 4.38) % en comparación con las células tratadas únicamente con DOX (98.2 ± 12.6) % o láser de 450 nm (106 ± 10) %. Este resultado coincide con el reportado en el estudio de Quintos Meneses et al., (2020), donde se observó que al irradiar DOX con láser de 450 nm hubo mayor muerte celular (3).

Se ha demostrado que los liposomas catiónicos (lipofectamina) permiten el ingreso de siRNA a la célula y además reducen la expresión de las proteínas (142). En la figura 1, se observa el efecto sobre la viabilidad de la transfección de siRNA SIRT3 con la lipofectamina (Lipo + siRNA SIRT3) obteniendo un 96.2 ± 1.2 % en comparación al grupo control siRNA SIRT3. Este resultado indica que la transfección en liposomas ayuda a la internalización celular de siRNA SIRT3.

Estudios previos, han demostrado el beneficio de la terapia combinada de quimioterapia convencional y terapia génica la cual puede superar la quimioresistencia, reducir los efectos secundarios y mejorar el efecto terapéutico, lo que garantiza una práctica prometedora en la terapia contra el cáncer (143). Es por ello que se combinó Lipo + siRNA SIRT3 + DOX.

Este efecto también se muestra en la figura 1 donde la combinación de Lipo + siRNA SIRT3 + DOX (94.3 ± 1.2) % presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto al porcentaje de viabilidad celular en comparación con el grupo Lipo + siRNA SIRT3 (96.2 ± 1.2) %, donde a las células no se les administró DOX. Este efecto pudo darse debido a que al ser silenciada SIRT3 más el daño celular inducido por DOX provocó mayor muerte celular.

Al igual que en la quimioterapia y radioterapia, en terapia fotodinámica es posible obtener diferencias en el nivel de resistencia cuando este se expresa en términos de la concentración de PS y/o cantidad de luz, algunos autores han aumentado la dosis del fármaco o la exposición a la dosis del fármaco (144).

Es por ello, que al combinar Lipo + siRNA SIRT3+DOX+450 nm se observó una reducción de la viabilidad celular del 15% (85.7 ± 1.7) %, comparado con los grupos DOX+450 nm, Lipo + siRNA SIRT3, Lipo + siRNA SIRT3 + DOX, Lipo + DOX + 450 nm, y siRNA SIRT3 + DOX + 450 nm. Este efecto sugiere que hubo una poca probabilidad de activación de sistemas de defensa antioxidantes por parte de SIRT3 ya que fue silenciada y al fotoactivar

a DOX con luz láser de 450 nm las células fueron más sensibles a daño celular por lo que hubo mayor muerte celular.

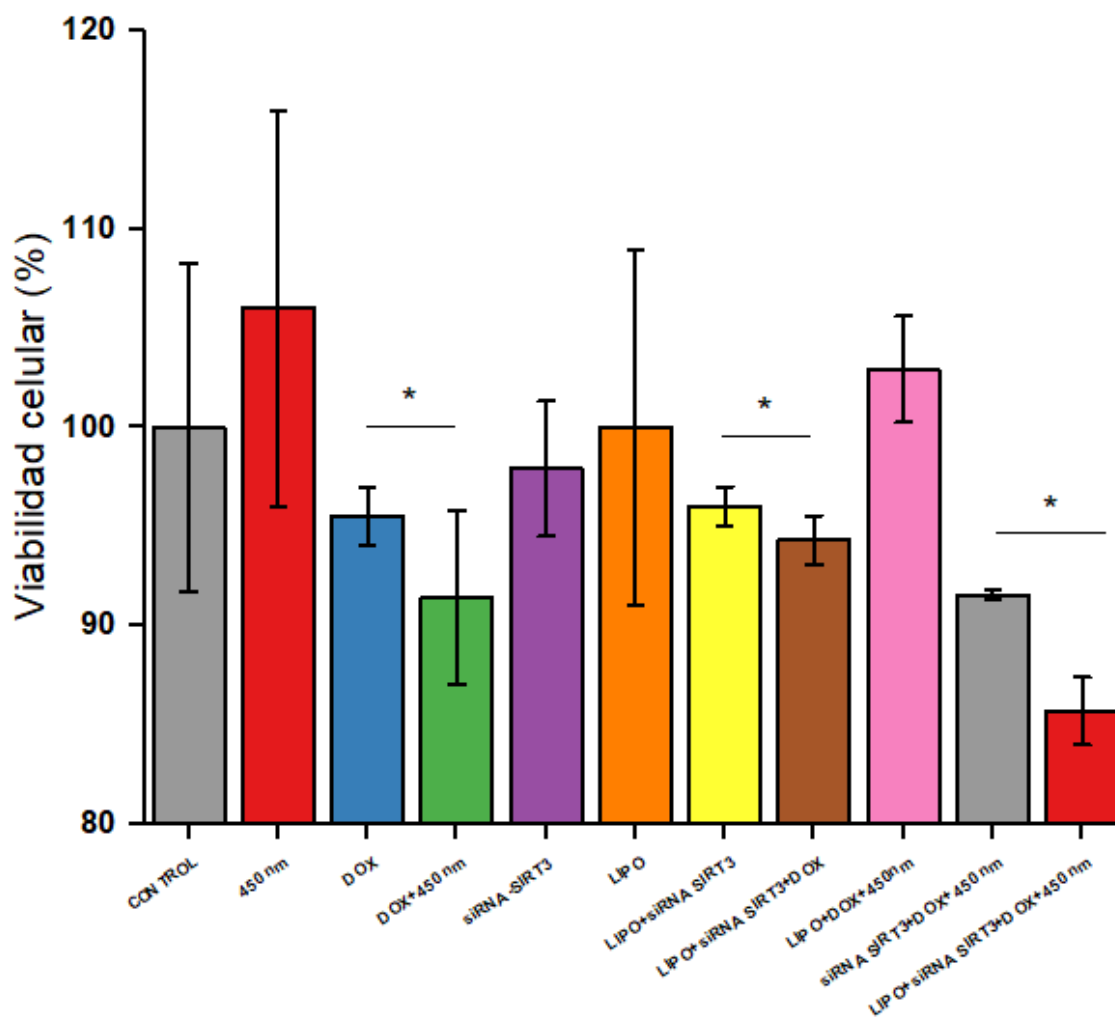


Figura 1. Viabilidad celular del efecto del silenciamiento génico del gen SIRT3, (* = $P < 0.05$).

Sin embargo, debido a que el porcentaje obtenido por el complejo Lipo + siRNA SIRT3+DOX+450 nm es mayor al 80%, el efecto de silenciar esta proteína no tiene un impacto significativo para mejorar la sensibilización de las células en el tratamiento quimiofotodinámico.

Por otro lado, como se comentó anteriormente también se silenció a RAD51, esta proteína participa en la reparación de roturas de doble cadena de ADN mediante el mecanismo de recombinación homóloga, lo que implica que es un objetivo diana para la terapia contra el cáncer (139).

La vía de reparación por recombinación homóloga (RH) es importante para mantener la estabilidad del genoma y la función de toda la vía puede comprometerse por la mutación de uno o más de los genes que participan en este proceso de reparación (145).

La sobreexpresión de RAD51 ocurre con frecuencia en varios tipos de cáncer, se supone que el aumento de la expresión de RAD51 en las células tumorales mejora la reparación del ADN y aumenta la resistencia a los fármacos que dañan el ADN (146). Debido a la relación que tiene RAD51 con la resistencia se inhibió su expresión con el objetivo de hacer más sensibles a las células.

En la figura 2, se observa la eficiencia de siRNA RAD51 transportado en liposomas (Lipo + siRNA RAD51) con menos del 90% en la viabilidad celular (87.58 ± 2.92) % comparado con el grupo control siRNA RAD51 (97.54 ± 7.023) %, tal efecto indica que siRNA RAD51 transportado en liposomas mejora la internalización del siRNA en la célula.

En un estudio realizado por Hannay, et al (2007) se encontró que la inhibición de la actividad de RAD51 utilizando siRNA aumentó la quimiosensibilidad a la doxorrubicina en dosis bajas (147). Este efecto también se muestra en la figura 2, la combinación de Lipo + siRNA RAD51 + DOX mostró menor porcentaje de viabilidad celular (78 ± 3) % en comparación al tratamiento sin DOX (Lipo + siRNA RAD51) con un $87.58 \pm 2.92\%$, ya que al ser una terapia combinada provocó mayor sensibilización de las células tumorales.

Por otro lado, estudios han demostrado que la combinación del silenciamiento de la expresión de RAD51 mediado por vectores y el tratamiento con radiación ionizante resulta en una reducción pronunciada de la supervivencia de las células (148). En un estudio realizado por Monga Jiang, et al (2022), diseñó un fotosensibilizador (CeOla) para daño del ADN amplificado por terapia fotodinámica para la inhibición de PARP (enzima catalítica que responde rápidamente para iniciar la reparación del ADN), en el cual se encontró que el fotosensibilizador CeOla mostro un efecto inhibitorio sobre las expresiones de PARP1 y

RAD51, lo que confirma que la combinación de la terapia génica y terapia fotodinámica mejoran la eficacia del daño en el ADN (149).

En la figura 2 se muestra la combinación de Lipo + siRNA RAD51+ DOX + 450 nm, donde se observó un menor porcentaje de viabilidad celular ($71.37\% \pm 9.75$) comparado con el grupo Lipo + siRNA RAD51 + DOX (78 ± 3) % donde DOX no fue irradiada (Figura 2). Este resultado indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre Lipo + siRNA RAD51 + DOX + 450 nm y Lipo + siRNA RAD51 + DOX. La razón principal de esto es que RAD51 al ser silenciado no reparó las roturas de doble cadena en el ADN de las células provocadas por la acción de DOX y esta al ser irradiada con 450 nm provocó mayor daño en el ADN y como consecuencia mayor muerte celular.

Tal efecto nos indica que silenciar génicamente a RAD51 transportado en liposomas en tratamiento quimiofotodinámico provoca un efecto significativo ($p < 0.05$) de daño en el ADN haciendo más sensibles a las células.

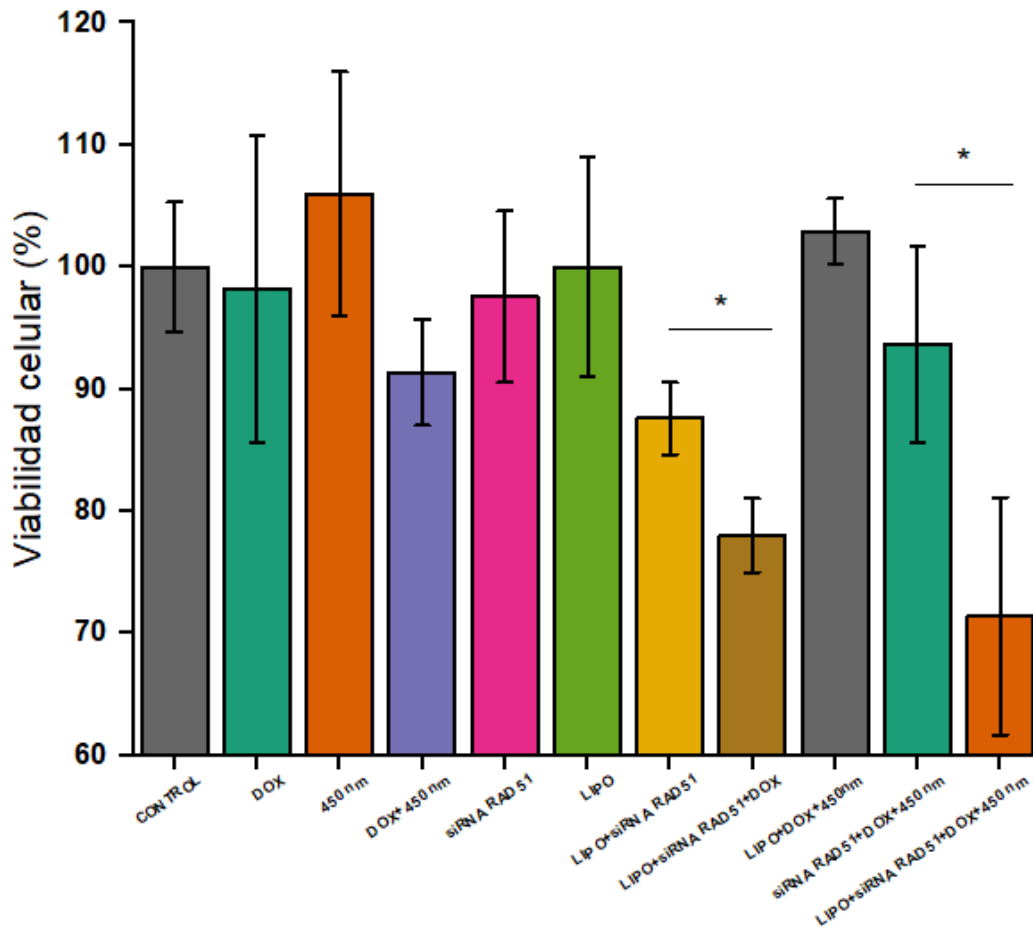


Figura 2. Viabilidad celular del efecto del silenciamiento génico del gen RAD51, (* = $P < 0.05$).

En la figura 3, se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) del efecto de silenciamiento génico sobre el porcentaje de viabilidad celular entre Lipo + siRNA RAD51 + DOX + 450 nm (71.37 ± 9.75) % en comparación con Lipo + siRNA SIRT3 + DOX + 450 nm (85.68 ± 1.70) %. Tal efecto nos indica que silenciar génicamente a RAD51 transportado en liposomas hace más sensibles a las células en tratamientos quimiofotodinámicos.

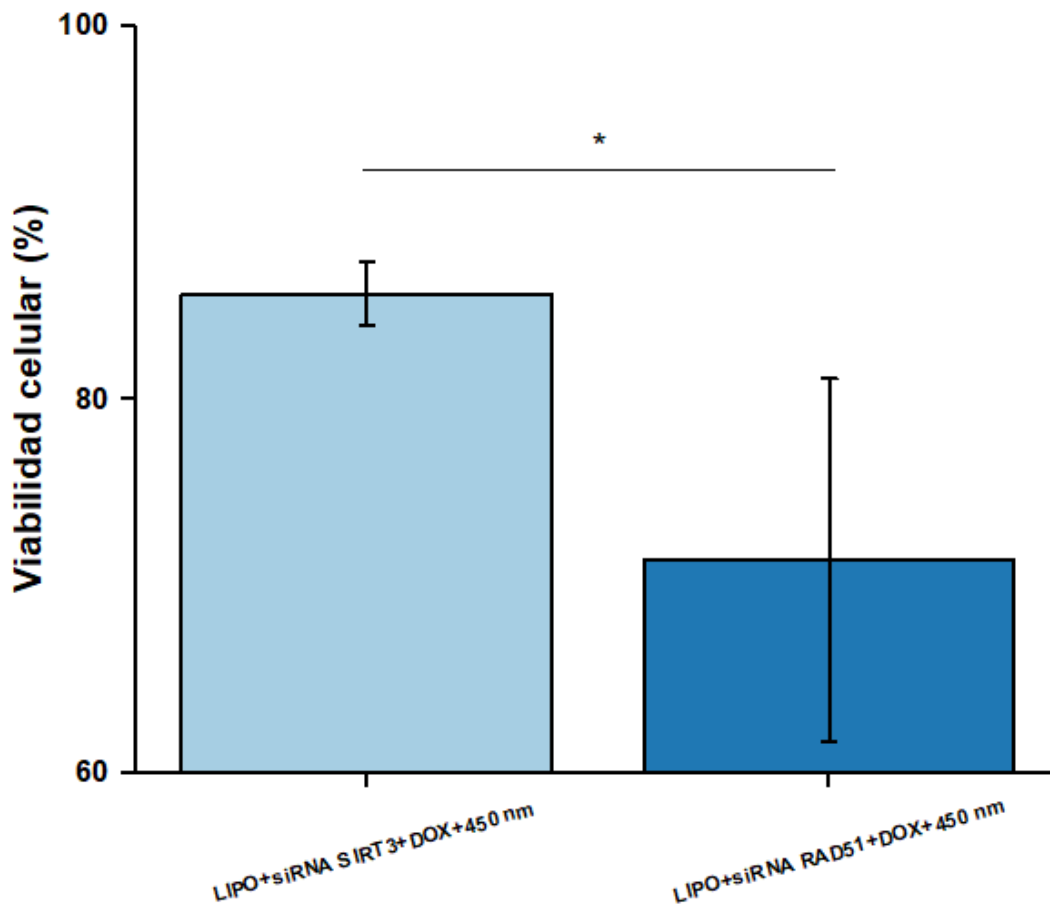


Figura 3. Viabilidad celular del efecto del silenciamiento génico de liposomas + siRNA SIRT3 y liposomas + siRNA RAD51, (* = $P < 0.05$).

Estos resultados sugirieron que era posible cargar siRNA RAD51 en SNEDDS debido al impacto que tuvo RAD51 vehiculizado en liposomas sobre la viabilidad celular. Los SNEDDS son mezclas de aceite, fármaco, tensoactivo y co-tensoactivo, que forman nanoemulsiones cuando entran en contacto con el agua y cuando existe una agitación suave como los movimientos peristálticos del intestino (150).

Los SNEDDS muestran mejores propiedades farmacéuticas frente a los demás sistemas de administración de fármacos, debido a sus características para penetrar la mucosa intestinal. Tras formar auto-nanoemulsiones en el tracto gastrointestinal, sufren un mecanismo de lipólisis inducida por enzimas (lipasas), descomponiendo los lípidos y surfactantes de la formulación para poder ser absorbidos principalmente por la vía linfática intestinal (16).

Recientemente Morales Becerril (2021), desarrollo una formulación basada en SNEDDS para el transporte de siRNA la cual presento estabilidad termodinámica. Derivado de estos antecedentes, se cargó siRNA RAD51 en SNEDDS con el propósito de silenciar su expresión.

Para la comparación del efecto de silenciamiento de RAD51 transportado en SNEDDS se utilizó SNEDDS Cy3 como control. SiRNA Cy3 es una secuencia de siRNA que no conduce a la degradación específica de ningún mensaje celular. Está destinado a servir como control negativo para experimentos que utilizan transfección de siRNA dirigida. Además, este siRNA conjugado con Cy3 permite la evaluación de la eficiencia de la transfección mediante microscopía de fluorescencia.

En la figura 4, se observa que la transfección de siRNA RAD51 en SNEDDS (SNEDDS + siRNA RAD51) disminuyó el porcentaje de viabilidad celular con menos del 50% en comparación con el grupo control siRNA RAD51. Esto debido a que los SNEDDS están conformados por lípidos homólogos a los componentes de las membranas celulares, los cuales mejoran la estabilidad del siRNA y realizan una entrega eficaz y segura de este (151).

Al combinar SNEDDS + siRNA RAD51 + DOX + 450 nm (35.1 ± 3.3) % se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación al grupo de tratamiento sin irradiación, SNEDDS + siRNA RAD51 + DOX (46.1 ± 1.9) %.

Este resultado indica que la transfección de siRNA RAD51 con SNEDDS en un tratamiento fotodinámico provoca mayor muerte celular.

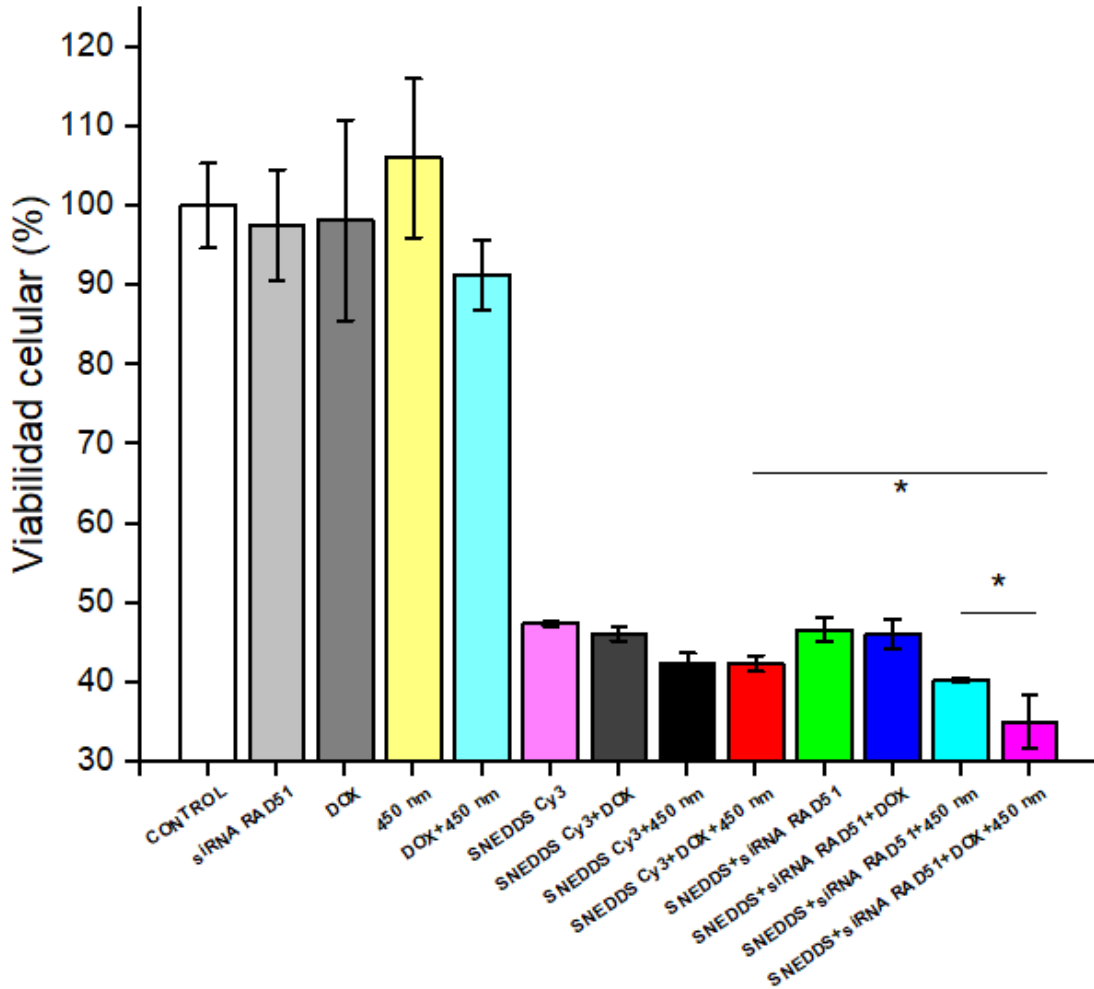


Figura 4. Viabilidad celular del efecto del silenciamiento génico de SNEDDS/siRNA-RAD51, (* = $P < 0.05$).

En la figura 5 se observa un mayor efecto en el porcentaje de viabilidad celular utilizando SNEDDS como vehículos para la entrega de siRNA RAD51 en comparación con los liposomas catiónicos en un tratamiento quimiofotodinámico, ya que Lipo + siRNA RAD51 + DOX + 450 nm obtuvo un porcentaje de $(71.37 \pm 9.75) \%$ y SNEDDS + siRNA RAD51 + DOX + 450 nm $(35.1 \pm 3.3) \%$.

También se observa en la Figura 5 una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo donde se aplicó tratamiento quimiofotodinámico (Lipo + siRNA RAD51 + DOX + 450 nm) en comparación al tratamiento solo con el agente quimioterapéutico DOX (Lipo + siRNA RAD51 + DOX). Este mismo resultado se repitió cuando se utilizaron SNEDDS como

vehículos de siRNA RAD51, donde el tratamiento quimiofotodinámico presento menor porcentaje de viabilidad celular.

Este resultado indica que siRNA RAD51 vehiculado en SNEDDS para silenciar la acción de RAD51 en un tratamiento quimiofotodinámico induce mayor muerte celular, por lo que este sistema puede ser utilizado para tratamiento contra el cáncer.

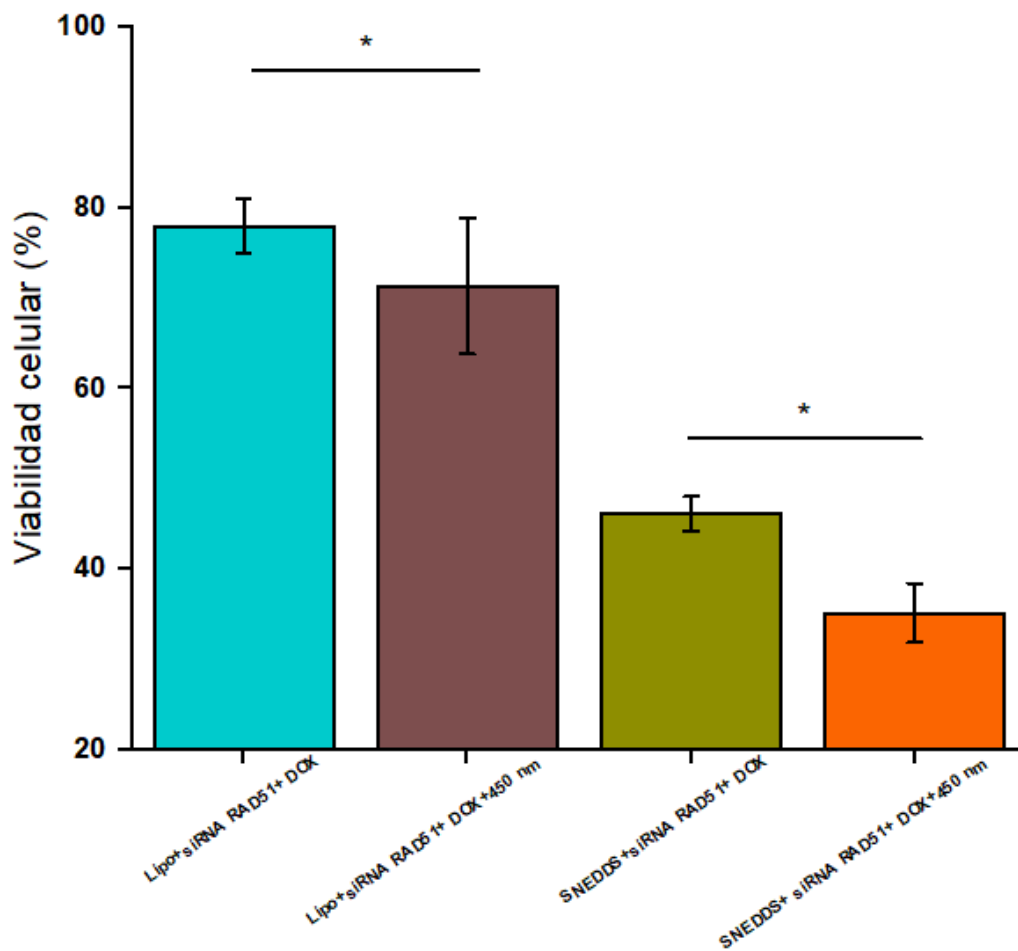


Figura 5. Efecto del silenciamiento génico inducido por siRNA RAD51 en liposomas y SNEDDS.

2. Evaluación de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La terapia fotodinámica está basada en la administración de un fotosensibilizador, seguido de su activación con luz visible. Esta activación en presencia de oxígeno intracelular promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) induciendo la muerte de las células tumorales (152). El daño en el ADN inducido por ROS entre las que se incluyen las rupturas de doble cadena pueden causar la inactivación funcional y la detención del crecimiento de las células tumorales (153).

El agente fotosensibilizador al absorber luz pasa de su estado basal a un estado singlete excitado, el cual es muy inestable y puede regresar al estado fundamental o generalmente pasa a un estado triplete excitado más estable. En el estado triplete excitado, el agente fotosensibilizador reacciona con biomoléculas formándose radicales que interaccionan con el O₂ generándose ROS como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno (reacción fotoquímica tipo I) o transferir su energía al O₂ generándose oxígeno singlete (¹O₂). Cabe mencionar que el oxígeno singlete es el principal responsable de la muerte celular por terapia fotodinámica (129).

En la figura 6 se observa que la activación de DOX con 450 nm generó producción de ROS (1.1926 ± 0.0444) en comparación con el grupo control (CELL ROX). Este resultado confirma el estudio realizado por Quintos Meneses, et al (2020), donde se determinó que 450 nm y radiación Cerenkov producen como ROS al oxígeno singlete en mayor medida (3).

Los resultados también indicaron que el complejo Lipo/siRNA RAD51 en combinación con DOX + 450 nm generó un incremento de ROS (1.3576 ± 0.3576) en comparación con los demás tratamientos (Figura 6), tales como Lipo + 450 nm, Lipo + DOX (), Lipo + siRNA-RAD51+DOX. En este mismo sentido, para los SNEDDS/siRNA-RAD51 en combinación con DOX + 450 nm se observó un incremento en los niveles de ROS en comparación con SNEDDS Cy3 + siRNA RAD51 + DOX + 450 nm (Figura 7). Esta tendencia, indica que la transfección de siRNA-RAD51 dada por SNEDDS y/o liposomas tiene un impacto sobre el estrés oxidativo celular después de un tratamiento quimiofotodinámico. Se sabe que el silenciamiento génico mediado por siRNA genera un cambio en la homeostasis celular (estrés celular).

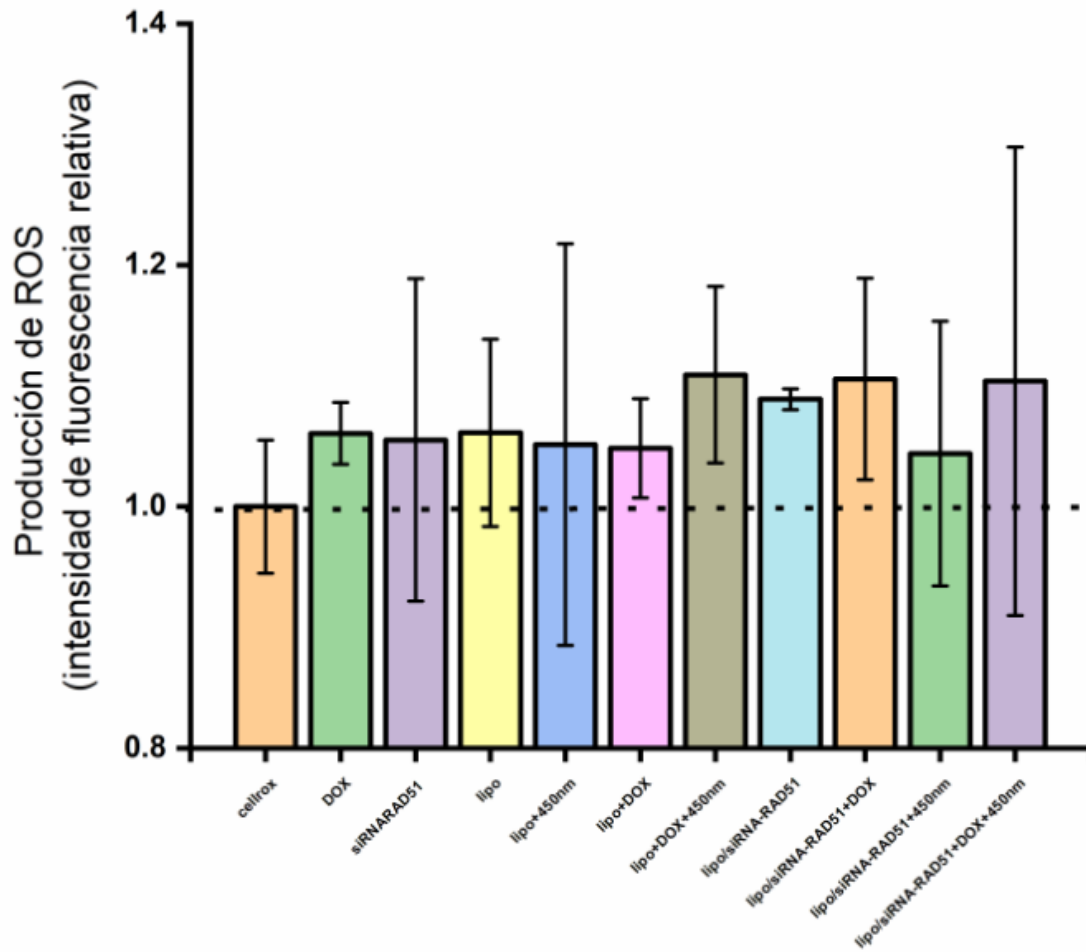


Figura 6. Producción de ROS por siRNA RAD51 en liposomas.

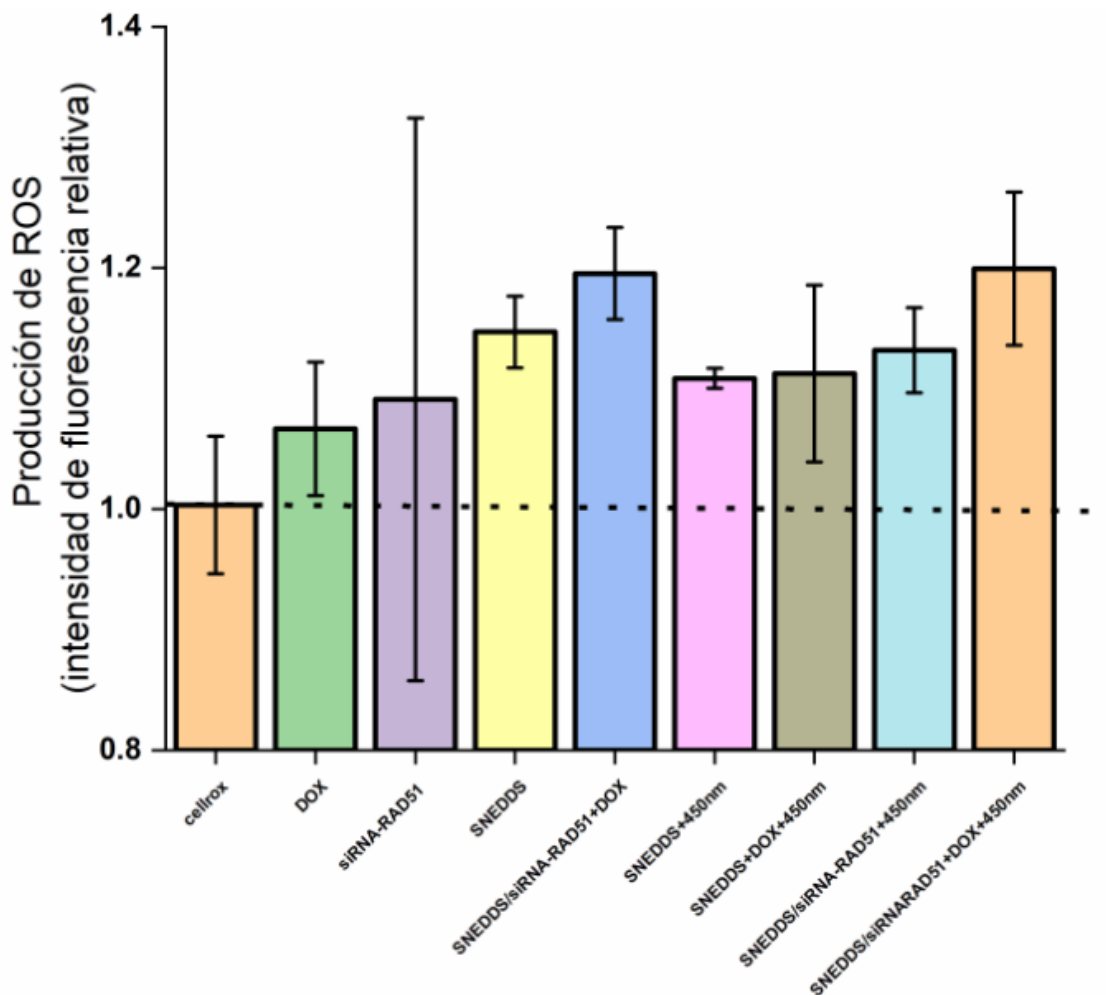


Figura 7. Producción de ROS por siRNA RAD51 en SNEDDS

3. Ensayo clonogénico

De acuerdo con la forma de la curva de sobrevivencia (Figura 8), las células de cáncer de mama expuestas a una pre-incubación de 24 h con SNEDDS/siRNA-RAD51 en combinación con DOX+450 nm sugiere la reparación de daños subletales. Estos daños son aquellos que se relacionan con rompimientos sencillos en el ADN, así como el efecto producido por ROS. Así mismo, la combinación de SNEDDS/siRNA-RAD51 con DOX+450 nm presenta una fracción de sobrevivencia celular menor que la producida por los liposomas/siRNA-RAD51 con DOX+450 nm, indicando que esta estrategia es más efectiva, debido a la sensibilización inducida por SNEDDS/siRNA-RAD51.

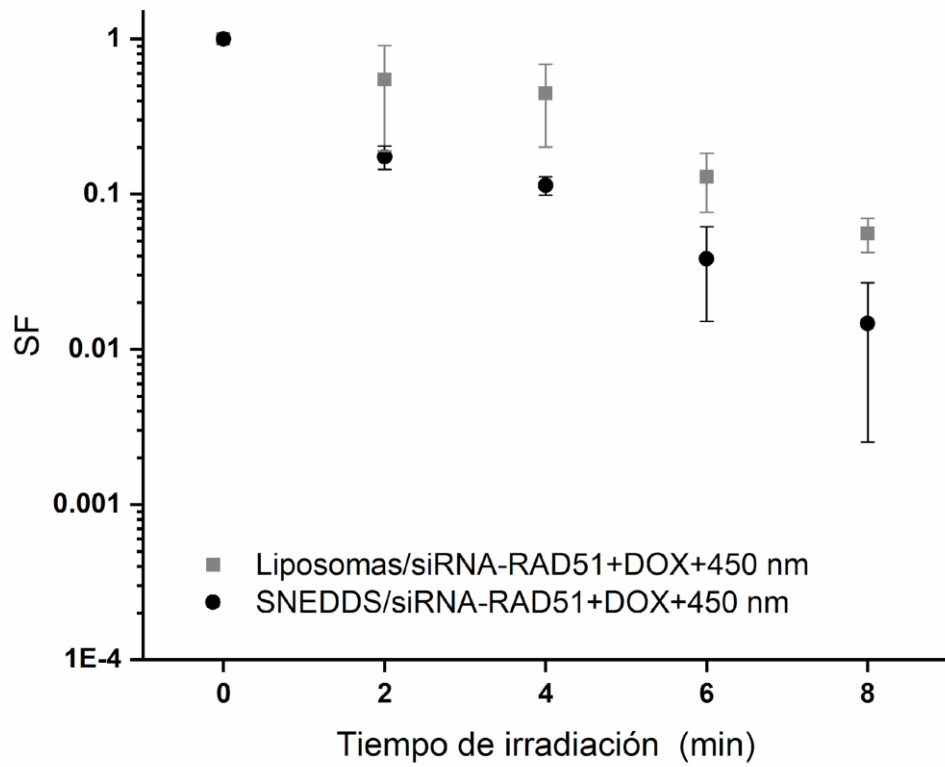


Figura 8. Curvas de supervivencia de SNEDDS/siRNA-RAD51+DOX+ 450 nm y liposomas siRNA-RAD51+DOX+ 450 nm.

XII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestra que los SNEDDS son un vehículo eficaz para sensibilizar a las células mediante la liberación de siRNA-RAD51. La transfección de siRNA-RAD51 dada por los SNEDDS, disminuyó la viabilidad y capacidad de proliferación celular cuando este se combina con la irradiación de DOX con 450 nm.

Se concluye que el efecto del silenciamiento génico de siRNA RAD51 mediante SNEDDS mejora el efecto de la terapia fotodinámica basada en la excitación de DOX con láser de 450 nm por lo que representa una alternativa para ser utilizado como tratamiento contra el cáncer.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Batlle A. Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy. *Curr Med Chem*. 2011;18(16):2486–515.
2. Li M, Luo Z, Peng Z, Cai K. Cascade-amplification of therapeutic efficacy: An emerging opportunity in cancer treatment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2019;11(5):1–15.
3. Quintos-Meneses HA, Aranda-Lara L, Morales-Ávila E, Torres-García E, Camacho-López MÁ, Sánchez-Holguín M, et al. In vitro irradiation of doxorubicin with 18F-FDG Cerenkov radiation and its potential application as a theragnostic system. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2020;210(April):111961. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111961>
4. Izquierdo M. Terapia genica. *Revis en Cancer*. 1999;13(1):9–15.
5. Mahmoodi Chalbatani G, Dana H, Gharagouzloo E, Grijalvo S, Eritja R, Logsdon CD, et al. Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:3111–28.
6. Ferber D. Gene therapy: safer and virus free? *Sci* 23. 2001;294(5547):1638.
7. Luna-Herrera J, Pérez-Martínez DE, Barradas-Hernández VM, Zenteno-Cuevas R. Nanoparticles as drug transporters: A promising tool against tuberculosis | Nanopartículas como transportadores de fármacos: Una herramienta prometedora contra la tuberculosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021;38(1):143–52.
8. Rocha A. Estudios sobre translocación de complejos DNA-liposomas a través de membranas celulares para mejorar la transfección en células eucariontes (Revisión). *Invest Agr Prod Sanid Anim*. 2002;17(2):5–20.
9. Darwin C. Terapia génica. Vectores de expresión. 2003;22.
10. Rehman FU, Shah KU, Shah SU, Khan IU, Khan GM, Khan A. From nanoemulsions to self-nanoemulsions, with recent advances in self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS). *Expert Opin Drug Deliv*. 2017;14(11):1325–40.

11. Fleck O NO. DNA repair. *J Cell Sci.* 2004;117(4):515–7.
12. Klein HL. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(5):686–93.
13. Torrens-Mas M, Roca P, Sastre-Serra J, Margalida Torrens-Mas. Importancia de la sirtuina 3 en el estrés oxidativo y el cáncer Role of sirtuin 3 in oxidative stress and cancer. *Med Balear* [Internet]. 2017;32(2):47–52. Available from: http://ibdigital.uib.cat/greenstone/collect/medicinaBalear/index/assoc/Medicina/_Balear_/2017_vol/32_n2p04.dir/Medicina_Balear_2017_vol32_n2p047.pdf
14. Shrestha B, Tang L, Romero G. Nanoparticles-Mediated Combination Therapies for Cancer Treatment. *Adv Ther.* 2019;2(11).
15. CAVIEDES, I., BADÍNEZ, L., CÓRDOVA, A., GOSET, K., & ZELADA G. Terapia fotodinámica: aplicación en dos pacientes con metástasis endobronquiales de adenocarcinoma extrapulmonar. *Rev Chil enfermedades Respir.* 2003;19(1):38–42.
16. Zhang Z, Lu Y, Qi J, Wu W. An update on oral drug delivery via intestinal lymphatic transport. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(8):2449–68.
17. Correa de Adjounian MAHSH. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia. Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *SciELO.* 2008;27(1):4–7.
18. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* [Internet]. 1990 Apr 1 [cited 2023 Feb 12];2(4):279–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12354959/>
19. Dallas A, Vlassov A V. RNAi: A novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit.* 2006;12(4):67–75.
20. Fire, Andrew., Xu, SiQun., Montgomery, Mary., Kostas, Steven., Driver, Samuel., Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(1234):806–11.
21. Zou GM, Wu W, Chen J, Rowley JD. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA

- interference in differentiated mouse ES cells. *Biol Cell*. 2003;95(6):365–71.
22. Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther* [Internet]. 2006;13(4):644–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.01.001>
 23. Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoeprich S, Guo S, et al. Engineering rna for targeted sirna delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(6):650–66.
 24. Namiki Y, Fuchigami T, Tada N, Kawamura R, Matsunuma S, Kitamoto Y, et al. Nanomedicine for cancer: Lipid-based nanostructures for drug delivery and monitoring. *Acc Chem Res*. 2011;44(10):1080–93.
 25. Chen WH, Lecaros RLG, Tseng YC, Huang L, Hsu YC. Nanoparticle delivery of HIF1 α siRNA combined with photodynamic therapy as a potential treatment strategy for head-and-neck cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2015;359(1):65–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.052>
 26. Ma C, Shi L, Huang Y, Shen L, Peng H, Zhu X, et al. Nanoparticle delivery of Wnt-1 siRNA enhances photodynamic therapy by inhibiting epithelial-mesenchymal transition for oral cancer. *Biomater Sci*. 2017;5(3):494–501.
 27. Lecaros RLG, Huang L, Lee TC, Hsu YC. Nanoparticle delivered VEGF-A siRNA enhances photodynamic therapy for head and neck cancer treatment. *Mol Ther*. 2016;24(1):106–16.
 28. Akbarzadeh A, Rezaei-sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N. Liposome : classification , prepNew aspects of liposomesaration , and applications. *Nanoscale Res Lett* [Internet]. 2013;8(102):1–9. Available from: <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
 29. Shapira I, Budman DR, Bradley T, Gralla R. Evolving lipid-based delivery systems in the management of neoplastic disease. *Oncol Rev*. 2009;3(2):113–24.
 30. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(3):173–82.
 31. Shahba AAW, Mohsin K, Alanazi FK. Novel self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of cinnarizine: Design, optimization, and in-vitro assessment. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(3):967–77.
 32. Tran T, Xi X, Rades T, Müllertz A. Formulation and characterization of self-nanoemulsifying

- drug delivery systems containing monoacyl phosphatidylcholine. *Int J Pharm.* 2016;502(1–2):151–60.
33. Morales A. “Desarrollo y caracterización de un sistema auto-nanoemulsionante de liberación de siRNA”. Universidad Autónoma del Estado de México; 2021.
 34. Lidia O, Lastra V. Artículo de revisión Terapia Génica. *Medigraphic [Internet]*. 2006;231–45. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2006/mim065j.pdf>
 35. Rodríguez, Josefa; Martínez Lina; Cruz, Nataly; Cómbita A. Terapia génica para el tratamiento del cáncer. *Rev Colomb Cancerol.* 2014;18(1):27–40.
 36. Sánchez ML. El silenciamiento génico. Revisión. *Bioquímica y Patol Clínica [Internet]*. 2017;81-Nº3:42–51. Available from: www.aba-online.org.ar
 37. López, Y; Esparza, M; Gariido, L; Palomar, V; Gallardo J. Aplicaciones terapéuticas del ARN de interferencia. *Bioquímica [Internet]*. 2009;34(5552):26–36. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2009/bq091e.pdf>
 38. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(12):1097–101.
 39. Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Miranda MJ, Pérez-Cano R. ¿Qué son los microARNs? Posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Rev Osteoporos y Metab Miner.* 2016;8(1):40–4.
 40. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011–6.
 41. Díaz Carrasco I, Guisado Rasco A, Ordoñez Fernández A. ¿Qué son los micro-RNA? ¿Para qué sirven? ¿Qué potenciales beneficios podrían tener en el contexto asistencial? *Cardiocre.* 2016;51(4):161–6.
 42. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409(6818):363–6.
 43. Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature.* 2009;457(7228):405–12.

44. Alshaer W, Zureigat H, Al-karaki A, Al-kadashb A, Awidi A. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol.* 2021;905.
45. Cuccato G, Polynikis A, Siciliano V, Graziano M, di Bernardo M, di Bernardo D. Modeling RNA interference in mammalian cells. *BMC Syst Biol.* 2011;5:1–12.
46. Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: Principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med.* 2012;85(2):187–200.
47. Gao Y, Liu XL, Li XR. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:1017–25.
48. Charles Tanford JW & S, Somerset. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes.* 2nd ed. New York; 1980.
49. Arteaga A, Valenzuela L, Fontes A, López R. Polimorfismo de liposomas. *Epistemus.* 2007;18(9):90–5.
50. Soriano P, Dijkstra JAN, Legrand A, Spanjert H, Londos-gagliardi D, Roerdink F, et al. Targeted and nontargeted liposomes for in vivo transfer to rat liver cells of a plasmid containing the preproinsulin I gene *Biochemistry* : 1983;80(December):7128–31.
51. Spagnou S, Miller AD, Keller M. Lipidic Carriers of siRNA : Differences in the Formulation , Cellular Uptake , and Delivery with Plasmid DNA †. 2004;13348–56.
52. Peer, D., Park, Eun., Morishita, Yoshiyuk., Carman, Christopher., Shimaoka M. Systemic Leukocyte-Directed siRNA Delivery Revealing Cyclin D1 as an Anti-Inflammatory Target. *Science (80-).* 2008;319(5863):627–30.
53. Faneca H, Simões S, Pedroso de Lima MC. Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2002;1567(SUPPL.):23–33.
54. Parker AL, Newman C, Briggs S, Seymour L, Sheridan PJ. Nonviral gene delivery: Techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2003;5(22).
55. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent : primary neurons , siRNA , and high-throughput applications. 2023;33(2004):95–103.

56. Sharma D, Ali AAE, Trivedi LR. An Updated Review on : Liposomes as drug delivery system. 2018;6(2):50–62.
57. Nekkanti V, Rueda J, Wang Z, Betageri G V. Comparative evaluation of proliposomes and self micro-emulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of nisoldipine. *Int J Pharm* [Internet]. 2016;505(1–2):79–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.065>
58. Borkar N, Holm R, Yang M, Müllertz A, Mu H. In vivo evaluation of lipid-based formulations for oral delivery of apomorphine and its diester prodrugs. *Int J Pharm* [Internet]. 2016;513(1–2):211–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.024>
59. Williams HD, Anby MU, Sassene P, Kleberg K, Bakala-N’Goma J-C, Calderone M, et al. Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations. 2. The effect of bile salt concentration and drug loading on the performance of type. *Mol Pharm* [Internet]. 2013;446(1–2):3286–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.005>
60. Charman S.A., Charman W. N., Rogge M. C., Wilson T.D., Dutko F. J. PCW. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: Formulation and Biopharmaceutic Evaluation of an Investigational Lipophilic Compound. Vol. 9, Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: Formulation and Biopharmaceutic Evaluation of an Investigational Lipophilic Compound. 1992. p. 87–93.
61. Sailor G. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS): an innovative approach to improve oral bioavailability. In: *Nanocarriers: Drug Delivery System: An Evidence Based Approach*. 2021. p. 255–80.
62. Date AA, Desai N, Dixit R, Nagarsenker M. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: Formulation insights, applications and advances. *Nanomedicine*. 2010;5(10):1595–616.
63. Li L, Hui Zhou C, Ping Xu Z. Self-Nanoemulsifying Drug-Delivery System and Solidified Self-Nanoemulsifying Drug-Delivery System. *Nanocarriers Drug Deliv Nanosci Nanotechnol Drug Deliv*. 2018;421–49.
64. Zvonar A. Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the b.pdf. 2013;63:427–45.
65. Hua L, Weisan P, Jiayu L, Ying Z. Preparation, evaluation, and NMR characterization of

- vinpocetine microemulsion for transdermal delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2004;30(6):657–66.
66. Memvanga PB, Coco R, Pr at V. An oral malaria therapy: Curcumin-loaded lipid-based drug delivery systems combined with β -arteether. *J Control Release* [Internet]. 2013;172(3):904–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.001>
67. Jain S, Garg T, Kushwah V, Thanki K, Agrawal AK, Dora CP. α -Tocopherol as functional excipient for resveratrol and coenzyme Q10-loaded SNEDDS for improved bioavailability and prophylaxis of breast cancer. *J Drug Target* [Internet]. 2017;25(6):554–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/1061186X.2017.1298603>
68. Ghosal G, Chen J. DNA damage tolerance: A double-edged sword guarding the genome. *Transl Cancer Res*. 2013;2(3):107–29.
69. Díaz Ch avez J, Domínguez G mez G. Artículo de revisión V as de reparación del ADN: nuevos blancos en la terapia contra el cáncer [Internet]. Vol. 15, *Revista de Especialidades M dico-Quir rgicas*. 2010. p. 221–7. Available from: www.nietoeditores.com.mx
70. Leibel D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol*. 2006;37(5–7):225–38.
71. Truglio JJ, Croteau DL, van Houten B, Kisker C. Prokaryotic nucleotide excision repair: The UvrABC system. *Chem Rev*. 2006;106(2):233–52.
72. Truglio JJ, Karakas E, Rhau B, Wang H, Dellavecchia MJ, Van Houten B, et al. Structural basis for DNA recognition and processing by UvrB. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(4):360–4.
73. Kad NM, Wang H, Kennedy GG, Warshaw DM, Van Houten B. Collaborative Dynamic DNA Scanning by Nucleotide Excision Repair Proteins Investigated by Single-Molecule Imaging of Quantum-Dot-Labeled Proteins. *Mol Cell* [Internet]. 2010;37(5):702–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.003>
74. Cardona YT, Marin M. Principales mecanismos de reparación de da os en la molécula de ADN. *Rev Biosalud*. 2015;13(2):95–110.
75. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;411(6835):366–74.

76. Brooks B, O'Brien TJ, Ceryak S, Pierce Wise J, Wise SS, Wise JP, et al. Excision repair is required for genotoxin-induced mutagenesis in mammalian cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(5):1064–9.
77. Schärer OD, Jiricny J. Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *BioEssays*. 2001;23(3):270–81.
78. Kazak L, Reyes A, Holt IJ. Minimizing the damage: Repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;13(10):659–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3439>
79. Wiederhold L, Leppard JB, Kedar P, Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Weinfeld M, et al. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell*. 2004;15(2):209–20.
80. D'Andrea AD. DNA repair pathways and human cancer. *Mol basis cancer*. 2015;47–66.
81. Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BPC, Chen DJ, Chatterjee A, et al. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(5):575–90.
82. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*. 2002;108(6):781–94.
83. Ramsden DA. Polymerases in nonhomologous end joining: Building a bridge over broken chromosomes. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;14(12):2509–19.
84. Rossner P, Uhlirova K, Beskid O, Rossnerova A, Svecova V, Sram RJ. Expression of XRCC5 in peripheral blood lymphocytes is upregulated in subjects from a heavily polluted region in the Czech Republic. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2011;713(1–2):76–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.06.001>
85. Thompson LH, Schild D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2001;477(1–2):131–53.
86. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:229–57.

87. Krogh BO, Symington LS. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.* 2004;38:233–71.
88. Iijima K, Ohara M, Seki R, Tauchi H. Dancing on damaged chromatin: Functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J Radiat Res.* 2008;49(5):451–64.
89. D’Amours D, Jackson SP. The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):317–27.
90. Conway AB, Lynch TW, Zhang Y, Fortin GS, Fung CW, Symington LS, et al. Crystal structure of a Rad51 filament. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(8):791–6.
91. Li X, Heyer WD. RAD54 controls access to the invading 3’-OH end after RAD51-mediated DNA strand invasion in homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(2):638–46.
92. Constantinou A, Davies AA, West SC. Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. *Cell.* 2001;104(2):259–68.
93. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet.* 2010;42(5):406–9.
94. Suwaki N, Klare K, Tarsounas M. RAD51 paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2011;22(8):898–905. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.019>
95. Donmez G. The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2012;33(9):494–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.05.007>
96. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. SIRT3 and cancer: Tumor promoter or suppressor? *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2011;1816(1):80–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.04.004>
97. Chen J, Wang A, Chen Q. SirT3 and p53 Deacetylation in Aging and Cancer. *J Cell Physiol.* 2017;232(9):2308–11.
98. Bause AS, Haigis MC. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp Gerontol*

[Internet]. 2013;48(7):634–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.08.007>

99. Lee SM, Koh HJ, Park DC, Song BJ, Huh TL, Park JW. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(11):1185–96.
100. Torrens-Mas M, Pons DG, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. SIRT3 Silencing Sensitizes Breast Cancer Cells to Cytotoxic Treatments Through an Increment in ROS Production. *J Cell Biochem*. 2017;118(2):397–406.
101. Papa L, Germain D. SirT3 Regulates the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol*. 2014;34(4):699–710.
102. Zuluaga M-F, Lange N. Combination of Photodynamic Therapy with Anti-Cancer Agents. *Curr Med Chem*. 2008;15(17):1655–73.
103. Allison RR, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2013;10(4):331–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.03.011>
104. Enk CD. Cryotherapy In The Treatment Of Cutaneous Leishmaniasis. *Cryobiology*. 2020;92(574):273.
105. Mordon S, Martínez-Carpio PA, Vélez M, Alves R, Trelles MA. Terapia fotodinámica (PDT) en piel y estética: Procedimiento, materiales y método en base a nuestra experiencia. *Cir Plast Ibero-Latinoamericana*. 2012;38(3):287–95.
106. Korc ' DI, Bidegain M, Martell M. Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. *REVISIÓN Rev Med Uruguay*. 1995;11:121–35.
107. Paredes Salido F, Roca Fernández J. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm Farm y Soc*. 2002;21(7):96–100.
108. Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Med Leg Costa Rica* [Internet]. 2019;36(1):91–100. Available from: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091
109. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*. 2005;33(12 SUPPL.).

110. Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, Kelleher DP, Reynolds J V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2011;8(1):14–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.12.001>
111. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem Rev*. 2015;115(4):1990–2042.
112. Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S, et al. Porphyrins in photodynamic therapy - A search for ideal photosensitizers. *Curr Med Chem - Anti-Cancer Agents*. 2002;2(2):187–207.
113. Banerjee SM, MacRobert AJ, Mosse CA, Periera B, Bown SG, Keshtgar MRS. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. *Breast* [Internet]. 2017;31:105–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2016.09.016>
114. Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2002;66(2):89–106.
115. Zhu CF, Battah S, Kong X, Reeder BJ, Hider RC, Zhou T. Design, synthesis and biological evaluation of 5-aminolaevulinic acid/3-hydroxypyridinone conjugates as potential photodynamic therapeutical agents. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2015;25(3):558–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.018>
116. Lim CK, Heo J, Shin S, Jeong K, Seo YH, Jang WD, et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2013;334(2):176–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.09.012>
117. Yao L, Xiao S, Dan F. Boron-fluorine photosensitizers for photodynamic therapy. *J Chem*. 2013;2013.
118. Rojas-aguirre Y. *Q uímica*. 2016;286–91.
119. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologie developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):185–229.
120. Chabner B, Lynch T LD. *Manual de oncología*. 1st ed. México: Mc Graw Hill; 2009.
121. Alexieva, B., Sainova, I., Pavlova, V., Markova, TZ., Valkova, I., Nikolova E. Insights into

- mechanisms of doxorubicin cardiotoxicity. *J Physiol Pharmacol*. 2014;4(3):342–8.
122. Lyu YL, Lin C-P, Azarova AM, Cai L, Wang JC, Liu LF. Role of Topoisomerase II β in the Expression of Developmentally Regulated Genes. *Mol Cell Biol*. 2006;26(21):7929–41.
123. Villasmil Camacho JK, Escudero E. Evaluación ecocardiográfica de la función ventricular derecha para la detección temprana de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas TT - Avaliação ecocardiográfica da função ventricular direita para a detecção precoce de cardiotoxicidade induzida p. *Insuf card* [Internet]. 2017;12(2):62–88. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-38622017000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-38622017000200003%0Ahttp://fi-admin.bvsalud.org/document/view/pcp6z
124. Lefrak EA, Piřha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*. 1973;32(2):302–14.
125. Lanks KW, Gao JP, Sharma T. Photodynamic enhancement of doxorubicin cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1994;35(1):17–20.
126. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2009;96(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>
127. Zheng H. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2005;4(3):283–93. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2005263033>
128. Opel DR, Hagstrom E, Pace AK, Sisto K, Hirano-Ali SA, Desai S, et al. Light-emitting diodes: A brief review and clinical experience. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2015;8(6):36–44.
129. Therapy P, Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. 2013;7–23.
130. Domínguez Capitaine BP, Cerecedo Núñez HH, Padilla Sosa P, García Ramírez JI. La interacción de la luz con moléculas. *Rev Digit Univ*. 2020;21(5):1–10.

131. Joseph L. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. USA: Springer; 2006.
132. Skoog D, Holler J NT. Principios de analisis instrumental. Madrid: Mc Graw Hill; 2001.
133. 46. Sharman W, Allen C van LJ. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods in enzymology*. 2000;319(1645):1–76.
134. Miller JD, Baron ED, Scull H, Hsia A, Berlin JC, McCormick T, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;224(3):290–9.
135. Astudillo-De La Vega H, Ruiz-García E, Martínez-Cedillo J, Ochoa-Carrillo FJ. El papel de la quimiorresistencia en los tumores sólidos. *Gac Mex Oncol*. 2010;9(3):117–26.
136. Yin, Q. Shen, J., Zhang, Z. Yu, H., Li Y. Reversión de la resistencia a múltiples fármacos mediante sistemas de administración de fármacos que responden a estímulos para la terapia de tumores. *Revsiones Av entrega Medicam*. 2013;65:1699–715.
137. Salud S de. Cáncer, tercera causa de muerte en México [Internet]. Secretaría de Salud. 2017. p. 1. Available from: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
138. Del Socorro Romero-Figueroa M, Santillán-Arreygue L, Miranda-García M, Del Pilar Torres-Arreola L, Pérez-Espejel IM, Duarte-Mote J, et al. Patrón epidemiológico de la mortalidad por cáncer de mama en el Estado de México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2010;48(3):253–8.
139. Chen Q, Cai D, Li M, Wu X. The homologous recombination protein RAD51 is a promising therapeutic target for cervical carcinoma. *Oncol Rep*. 2017;38(2):767–74.
140. Hirschey MD, Shimazu T, Huang JY, Schwer B, Verdin E. SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:267–77.
141. Chen Y, Fu LL, Wen X, Wang XY, Liu J, Cheng Y, et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death Dis*. 2014;5(2):1–7.
142. Mo RH, Zaro JL, Ou JHJ, Shen WC. Effects of Lipofectamine 2000/siRNA complexes on

- autophagy in hepatoma cells. *Mol Biotechnol.* 2012;51(1):1–8.
143. Li D, Zhang Y, Xie Y, Xiang J, Zhu Y, Yang J. Enhanced tumor suppression by adenoviral PTEN gene therapy combined with cisplatin chemotherapy in small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther.* 2013;20(4):251–9.
 144. Mayhew S, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Brown SB. Investigation of Cross-resistance to a Range of Photosensitizers, Hyperthermia and UV Light in Two Radiation-induced Fibrosarcoma Cell Strains Resistant to Photodynamic Therapy In Vitro. *Photochem Photobiol.* 2001;73(1):39.
 145. Chernikova SB, Game JC, Brown JM. Inhibiting homologous recombination for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 2012;13(2):61–8.
 146. Makino E, Fröhlich LM, Sinnberg T, Kosnopfel C, Sauer B, Garbe C, et al. Targeting Rad51 as a strategy for the treatment of melanoma cells resistant to MAPK pathway inhibition. *Cell Death Dis* [Internet]. 2020;11(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-2702-y>
 147. Hannay JAF, Liu J, Zhu QS, Bolshakov S V., Li L, Pisters PWT, et al. Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: A role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(5):1650–60.
 148. Saydam O, Saydam N, Glauser DL, Pruschy M, Dinh-Van V, Hilbe M, et al. HSV-1 amplicon-mediated post-transcriptional inhibition of Rad51 sensitizes human glioma cells to ionizing radiation. *Gene Ther.* 2007;14(15):1143–51.
 149. Kong RJ, Li XY, Huang JQ, Zhou X, Deng FA, Li YM, et al. A self-delivery photodynamic sensitizer for enhanced DNA damage by PARP inhibition. *Biomater Sci.* 2022;11(1):162–9.
 150. Alarcon F, Riquelme A, Peralta J, Cruz J, Vargas A, Valero W. Fluidos Complejos Portadores De Farmacos En La Medicina: Composición De Micelas Y Aplicaciones. 2019;(April).
 151. Cherniakov I, Domb AJ, Hoffman A. Self-nano-emulsifying drug delivery systems: An update of the biopharmaceutical aspects. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(7):1121–33.
 152. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, De Las Heras ME, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, Benvenuto-Andrade C, et al. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermosifiliogr*

[Internet]. 2006;97(2):83–102. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-7310\(06\)73359-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-7310(06)73359-2)

153. Ogrunc M, Di Micco R, Liontos M, Bombardelli L, Mione M, Fumagalli M, et al. Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death Differ.* 2014;21(6):998–1012.