



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS**  
**LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD**  
**(HDL)**

Autor: Juan José Retuerta Rodríguez-Vilariño

Tutor: Dr. Marco Filice

Fecha: Junio 2019

## ABREVIATURAS

NLPs: Nanopartículas lipídicas  
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad  
IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia  
LDL: Lipoproteínas de baja densidad  
HDL: Lipoproteínas de alta densidad  
rHDL: Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas  
d-rHDL: Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas discoidales  
c-d-rHDL: Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas discoidales modificadas  
TAG: Triglicéridos o triacilglicéridos  
FL: Fosfolípidos  
Apo A: Apoproteína A  
Apo C: Apoproteína C  
Apo E: Apoproteína E  
GPx: Glutación peroxidasa 1  
PON1: Paraoxonasa 1  
PAF-AH: Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa  
LCAT: Lecitin-colesterol aciltransferasa  
KDa: Kilodalton  
CD: Conversión directa  
SPION: Nanopartículas super paramagnéticas de óxido de hierro  
AuNPs: Nanopartículas de oro  
PTX: Paclitaxel  
siRNA: ARN (Ácido ribonucleico) de corta interferencia  
BHE: Barrera Hematoencefálica  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RMI: Resonancia magnética

## ÍNDICE

• <b>Resumen/Abstract</b> .....	3
• <b>Introducción</b> .....	4
¿Qué son las HDL?.....	5
• <b>Objetivos</b> .....	6
• <b>Material y métodos</b> .....	7
• <b>Resultados y discusión</b> .....	7
HDL sintéticas.....	7
Eficacia de las rHDL: Liposomas vs rHDL.....	9
Protocolo de producción de las rHDL.....	10
Aplicaciones de las HDL reconstituidas.....	13
• <b>Conclusión</b> .....	16
• <b>Bibliografía</b> .....	17

## **Resumen**

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son unas estructuras de tamaño nanométrico que juegan un papel importante en la vía de transporte inverso del colesterol que lo lleva desde las arterias y los distintos tejidos del organismo hasta el hígado. Antes de su maduración definitiva, las pre- $\beta$ -HDL o HDL nacientes existen como bicapas de fosfolípidos en forma de disco cuyo perímetro está estabilizado por distintas clases e isoformas de apolipoproteínas que tienen carácter anfipático.

Debido a los múltiples problemas que puede tener un fármaco tras su entrada al organismo, pudiendo producir toxicidad o falta de efectividad, se han llevado a cabo estudios de administración de moléculas terapéuticas usando una gran variedad de nanovectores sintéticos que engloban el fármaco como por ejemplo, los liposomas, las nanocápsulas, las nanoesferas, etc. Sin embargo, como no son de carácter biológico, aunque mejoran la selectividad del fármaco, pueden producir cierta toxicidad. Por esa misma razón, y al ver la semejanza de estas nanopartículas sintéticas con las lipoproteínas de nuestro organismo, se pensó que las HDL podían ser buenos vectores y además ya no existía el problema de la biocompatibilidad y la biodegradabilidad, al ser moléculas orgánicas de nuestro organismo [17] [30]

En consecuencia se empezaron a desarrollar métodos para generar lipoproteínas reconstituidas (rHDL). Al principio eran rHDL con apolipoproteínas extraídas de suero humano hasta que se consiguieron obtener mediante técnicas moleculares de edición genética y expresión de proteínas. Esta revisión bibliográfica describe áreas de investigación actuales que se han desarrollado a partir del concepto básico de la estructura de las HDL endógenas hasta la síntesis de rHDL discoidales modificadas para aplicaciones diversas, en las que los elementos fundamentales, como la forma discoidal, el tamaño nanométrico y la bicapa no cambian. Así, las rHDL sirven como una estructura con capacidad de empaquetar proteínas y lípidos y englobar moléculas, permitiendo la solubilización y administración de medicamentos hidrofóbicos, biomoléculas y la presentación de agentes de contraste para diagnóstico.

## **Abstract**

High-density lipoproteins play an important role in the inverse route of cholesterol. Before maturation, the prebeta-HDL or HDL are first formed as disc-shaped phospholipid bilayers. Their perimeter is stabilized by different classes and isoforms of apolipoproteins that have an amphipathic character.

Due to the multiple problems that a drug can have inside the body, which can produce toxicity or make it less effective, we have carried out studies using the drug with different synthetic nanoparticles like liposomes, nanocapsules, nanospheres, etc. Although they improve the selectivity of the drug, they can as well produce toxicity because they are not biological molecules. For that reason, and given the similarity of these synthetic nanoparticles with human lipoproteins, it was thought that lipoproteins could represent a good drug carrier class. In addition, as they are organic molecules, they would not be rejected by the organism.

Since then, methods to produce reconstituted lipoproteins (rHDL) have been developed. At the beginning, they used rHDL with apolipoproteins extracted from human serum until they were achieved by molecular techniques of genetic editing and protein expression. This bibliographic review describes the current research areas that have been developed from basic structural and endogenous HDL to the synthesis of modified HDL for the most diverse applications, in which basic elements such as the discoid shape, the nanometric size and the bilayer, remain. rHDL serve as a structure capable of packaging proteins and lipids and encompassing molecules, allowing the solubilization and administration of hydrophobic drugs, biomolecules and the presentation of contrast agents for diagnosis.

## **Introducción**

La rápida detección de enfermedades de una forma no invasiva, el tratamiento precoz de forma personalizada y el posterior seguimiento de su evolución son los principales retos a los que nos enfrentamos en la medicina actual. Hoy en día, el diagnóstico necesita nuevas herramientas que puedan ofrecer un resultado rápido de forma precisa, con una molestia mínima para el paciente. Una identificación temprana de la enfermedad mejoraría la capacidad de respuesta y la rapidez en la aplicación del tratamiento específico, aumentando la probabilidad de que el enfermo se recupere.

La administración de terapias en el sitio específico es complicada debido a las barreras biológicas que el fármaco encuentra tras la administración intravenosa. Estas barreras incluyen la opsonización y el secuestro mediante la fagocitosis, la distribución inespecífica, las limitaciones de flujo de vasos sanguíneos, los gradientes de presión, la internalización celular, las bombas de salida como la glicoproteína P, enzimas capaces de degradar el fármaco, etc. Sin embargo, algunos de estos problemas podrían solucionarse utilizando nanopartículas de origen. [20]

La nanomedicina es un área de la medicina cuyas características diferenciales son el diagnóstico no invasivo y la terapéutica basadas en nanopartículas que transportan principios activos específicos marcados para su entrega a nivel de la célula, permitiendo el tratamiento terapéutico y el monitoreo en tiempo real. Por eso se también se les conoce como vectores teranósticos (terapéutico y diagnóstico). [17] [20]

Los nanotransportadores son estructuras nanométricas con una función central en la nanomedicina: transportar fármacos o materiales biológicos a sitios específicos, como células, tejidos u órganos. Dependiendo de la clase de nanomaterial, se pueden identificar tres elementos característicos: [17][15]

- a) el núcleo, donde pueden encapsularse los principios activos
- b) la superficie, donde pueden unirse determinadas moléculas para su posterior liberación
- c) los poros, de tamaños diferentes para permitir la introducción o liberación de moléculas específicas.

Además, en la gran mayoría de los casos. los nanotransportadores no producen inmunogenicidad, en otras palabras, no provocan reacción inmune al ser introducidos en el organismo. [17]

El posible uso de lipoproteínas y específicamente de las HDL en terapéutica fue pensado hace más de 30 años. Y hace no mucho, Kader y Pater en 2002 analizaron las partículas de HDL específicamente con la función de ser transportadores de fármacos. Y encontraron que los fármacos incorporados en las HDL eran de 2.5 a 23 veces más citotóxicos para las células cancerosas que el fármaco libre no encapsulado. Desde entonces, se ha ido investigando más en esta área utilizando nanopartículas sintéticas similares a las HDL o Lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL). [15]

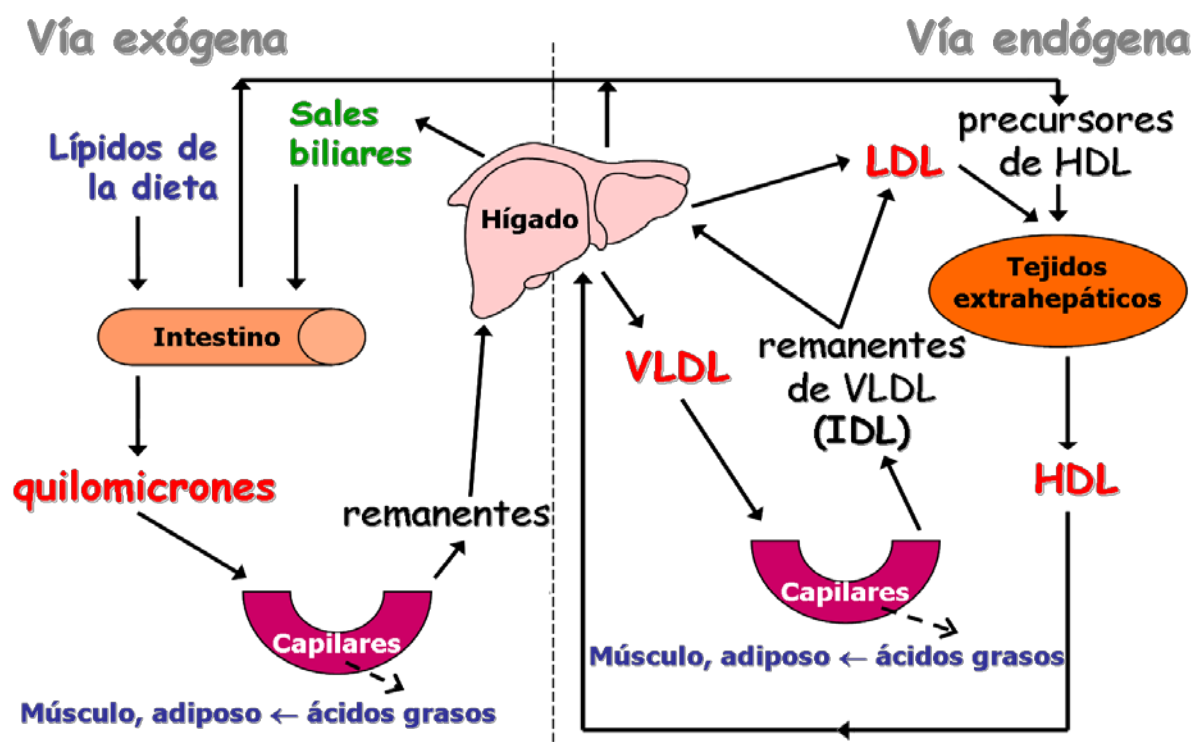
El objetivo principal de este proyecto es el estudio de la aplicación de dichas lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) discoidales como vectores de administración de fármacos, especialmente para enfermedades como el cáncer. De hecho, debido a la falta de especificidad de los fármacos comercializados hacia las células malignas, se producen un gran número de reacciones adversas siendo a veces mayor el riesgo que el beneficio que se le puede aportar al paciente.

Estas aplicaciones tan novedosas y esperanzadoras son debidas a que las propias HDL poseen unas características ventajosas que hacen que sean buenos transportadores de agentes diagnósticos y/o terapéuticos. Estas características, fundamentalmente son [17]:

- capacidad de biocompatibilidad
- biodegradabilidad,
- capacidad para almacenar en su interior distintas moléculas,
- larga vida media en circulación,
- orientación selectiva y controlada de liberación.

Las HDL se pueden reconstituir de una manera sencilla in vitro a partir de los componentes las nanopartículas. Durante este procedimiento, el fármaco puede ser añadido fácilmente a las HDL, sobre todo si es anfipático o hidrófobo. Aunque, es posible lograr biocompatibilidad y biodegradabilidad como las otras nanopartículas (por ejemplo, las nanopartículas poliméricas, las micelas y los liposomas), ha habido problemas utilizando nanopartículas sintéticas debido a su posible toxicidad e inmunogenicidad. Por lo tanto, al ser partículas de origen biológica y formadas por las lipoproteínas con sus propiedades de transporte naturales, ha hecho pensar que las HDL sintéticas podrían mejorar sus resultados como vectores y mejorar la biocompatibilidad,

Las lipoproteínas son macromoléculas cuya función es almacenar y transportar los lípidos insolubles en el plasma desde el intestino y el hígado a los tejidos periféricos y, desde éstos, devolver el colesterol al hígado para su eliminación del organismo mediante su transformación en ácidos biliares principalmente [1].



Más en detalles, las lipoproteínas plasmáticas forman un sistema polidisperso y heterogéneo de partículas de morfología esférica o discoidal, que presentan un núcleo hidrófobo formado por lípidos apolares, es decir, colesterol esterificado y triglicéridos (TAG), una capa superficial hidrófila que contiene colesterol no esterificado, fosfolípidos de membrana (FL) y unas proteínas específicas denominadas apolipoproteínas (APO). Las APO no solo cumplen un papel

estructural, sino que también intervienen en su metabolismo, ejerciendo diversas funciones: actuando como activadoras e inhibidoras de enzimas e interaccionando con receptores celulares específicos. Actualmente las APO que se conocen son: A, B, C, D, E, F y G. Algunas de estas presentan distintas isoformas y se diferencian entre sí por la cantidad de carbohidratos superficiales que contienen. A su vez, las partículas lipoproteicas se diferencian según la proporción de colesterol, TAG y FL y por las distintas apoproteínas que contienen y su nombre se basa en las diferentes densidades que presentan [20]

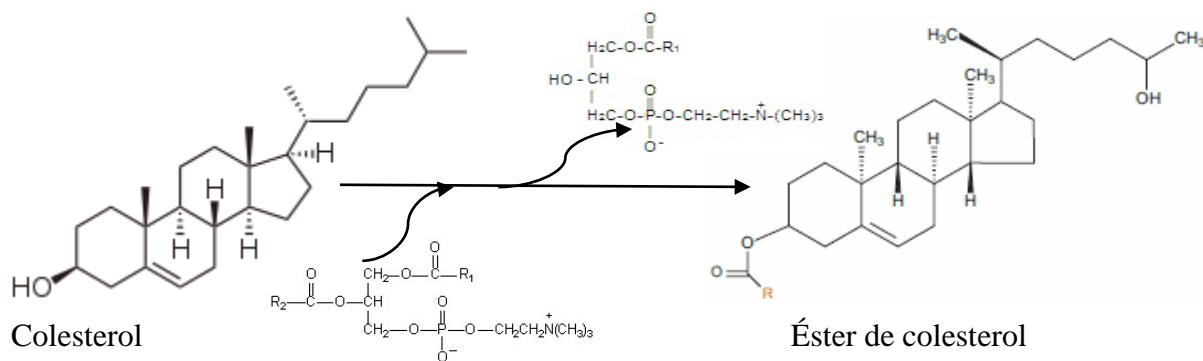
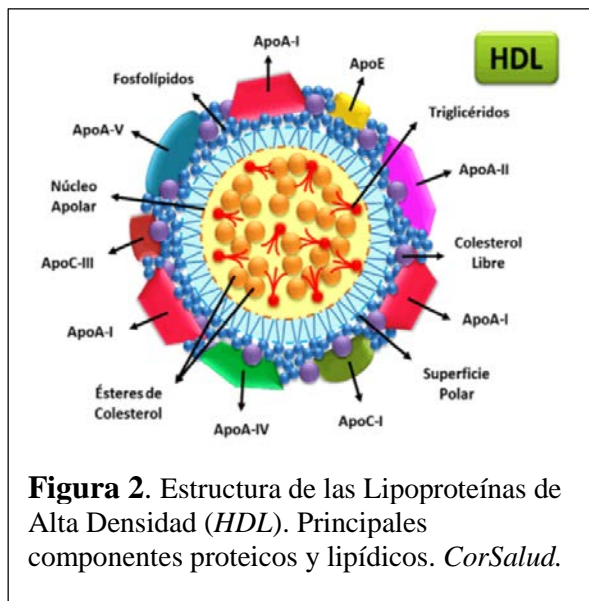
- Quilomicrones: Están formados por TG exógenos de la dieta.
- VLDL. Están formadas por TG endógenos sintetizados por el organismo.
- IDL. Están formadas por TG y colesterol. Son lipoproteínas intermedias entre VLDL y LDL.
- LDL. También conocido como el “colesterol malo”. Se dirige hacia los tejidos y puede depositarse en las arterias formando placas de aterosclerosis.
- HDL. También conocido como el “colesterol bueno”. que va desde las arterias hasta el hígado.

### **¿Qué son las HDL?**

Como explicado anteriormente, las HDL son lipoproteínas englobadas dentro de una población heterogénea con tamaños, contenido de proteínas, y composición lipídica diversos. Una de las principales funciones de las HDL es recoger el colesterol de los tejidos periféricos y el transporte de este nuevo colesterol en el hígado, sitio en el que se puede excretar después de la conjugación con ácidos biliares. Esta función se denomina como el transporte de colesterol inverso (ECA). Además de ECA, las HDL ejercen otras funciones: anti-inflamatorias, antioxidantes, y vasodilatadoras. Todas estas funciones hacen que las HDL se consideren ateroprotectoras. [6][20]

Las HDL son sintetizadas por el hígado y en menor medida por el intestino en forma de HDL nacientes (HDLn) también llamadas pre- $\beta$  HDL. Son partículas de tamaño nanométrico con forma de disco compuestas por una bicapa de fosfolípidos y colesterol libre rodeada de apo-A (principalmente AI), apo-E y apo-C, estas HDL recién formadas están casi desprovistas de colesterol y las HDLn intestinales no contienen apo-C ni apo-E. La apo A-I es la proteína más abundante en las HDL constituyendo más del 70% de la proteína en masa. La apo A-I, como la mayoría de las apolipoproteínas, tiene una estructura  $\alpha$ -helicoidal anfipática, con su región hidrofóbica incrustada en los fosfolípidos y la región hidrófila orientada hacia el medio acuoso. Se sugiere que la apolipoproteína se pliegue en diferentes conformaciones tipo "cinturón" en la partícula HDL, y por lo tanto se cree que reduce significativamente la presión superficial sobre las lipoproteínas, estabilizando así la partícula. Además de las apoproteínas, las HDL transportan numerosas enzimas que participan en la liberación o captación del colesterol o de la actividad anti-oxidante. Estas enzimas son principalmente: glutatión peroxidasa 1 (GPx), paraoxonasa 1 (PON1), factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH,) y lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT). [6] [30]

El mecanismo por el cual el colesterol presente en las HDL lo adquieren los tejidos periféricos es mediante una interacción con monocitos y macrófagos en los espacios subendoteliales de los tejidos. Los monocitos y los macrófagos se unen a las pre-β HDL mediante la interacción con el transportador ABC y produciéndose la transferencia de colesterol. El colesterol libre que ha sido transferido es esterificado por la enzima LCAT. LCAT es una enzima sintetizada en el hígado que actúa transfiriendo un ácido graso de la posición C-2 de la lecitina a la C-3-OH del colesterol, obteniéndose un éster de colesterol y lisofosfatidilcolina. La actividad de la LCAT requiere la interacción con apo AI, localizada en la superficie de las HDL. Y las moléculas de colesterol al esterificarse, se internalizan en el núcleo hidrofóbico de la pre-β HDL. [6][30]



Las pre-β HDL aumentan de tamaño y pasan a ser α-HDL maduras. Con la absorción progresiva de colesterol las HDL maduras se van haciendo más grandes y pasan de tener una forma discoidal a tener una forma esférica. [30]

### Objetivos

- Llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre el empleo de las HDL reconstituidas como vehículo de moléculas utilizadas para el tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad.
- Profundizar el análisis de la composición y estructura de las HDL sintéticas
- Comparar la eficacia de las rHDL discoidales respecto del fármaco libre por vía IV o respecto de otras nanopartículas sintéticas utilizadas en la actualidad y analizar las ventajas que tienen sobre las otras.
- Detallar los distintos protocolos de obtención de las rHDL discoidales que existen y ver cual/es se obtienen con una facilidad y con un rendimiento mayores
- Analizar las diversas aplicaciones que tienen actualmente o que podrían tener estas macromoléculas sintéticas.



## **Material y métodos**

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los estudios publicados en diversas bases de datos:

ResearchGate: <https://www.researchgate.net/>

PubMed (NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/>

Google académico: <https://scholar.google.es/>

Microsoft academic: <https://academic.microsoft.com/home>

DialNet: <https://dialnet.unirioja.es/>

Scielo: <https://www.scielo.org/es/>

También se han consultado páginas web como la de la fundación Roche (<https://www.institutoroche.es/>) y el grupo de biofísica teórica y computacional de la universidad de Illinois (<https://www.ks.uiuc.edu/>).

Se han incluido aquellos artículos publicados a partir de 2008, buscando los avances de las HDL más novedosos en el campo de la biomedicina.

Las HDL reconstituidas son conocidas desde finales del siglo XX y en este tiempo se han llevado a cabo multitud de investigaciones sobre ellas. Por eso mismo, hemos descartado todos los artículos que aunque hayan tenido relevancia en su momento o hayan sido la base para las investigaciones que se están llevando en la actualidad, se hayan quedado obsoletos.

Las palabras clave utilizadas en dicha investigación han sido "reconstituted HDL", "lipid nanoparticles", "theranostics", "synthetic high density lipoprotein", "new application of rHDL", "synthesis", "new HDL therapies".

## **Resultados y discusión**

### **rHDL sintéticas**

Las HDL pueden ser aisladas a partir de plasma humano o reconstituidas (rHDL) a partir de apoproteínas y lípidos. [16] Con el fin de reducir el riesgo de agentes infecciosos y para asegurar la reproducibilidad, la mayoría de las investigaciones se centran en el uso HDL reconstituidas.

Las rHDL pueden incorporar fármacos tanto hidrófobos como hidrófilos, ya que los hidrófobos pueden situarse en el núcleo de la rHDL mientras que los hidrófilos pueden adsorberse o conjugarse con la superficie hidrófila.

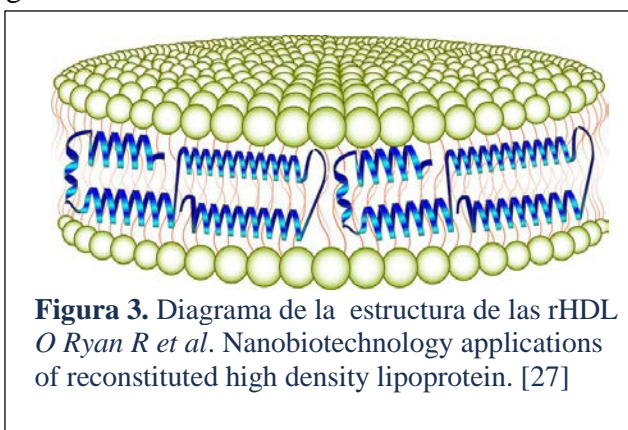
Además, las rHDLs pueden interactuar con algunos receptores celulares, por ejemplo, SR-B1, pudiendo dirigirse hacia aquellas células que tengan una mayor expresión de esos receptores. [18]

El componente principal de las HDL endógenas y de las rHDL es la apolipoproteína AI, proteína anfipática cuya masa molecular es de 28.000 KDa y que interactúa con fosfolípidos, triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol. [23]

En los últimos años estas investigaciones han avanzado y han ido aumentando las aplicaciones en el ámbito de la biomedicina de este tipo de nanopartículas mediante la incorporación de diferentes materiales a estas rHDL.

En más detalles, se pueden distinguir:

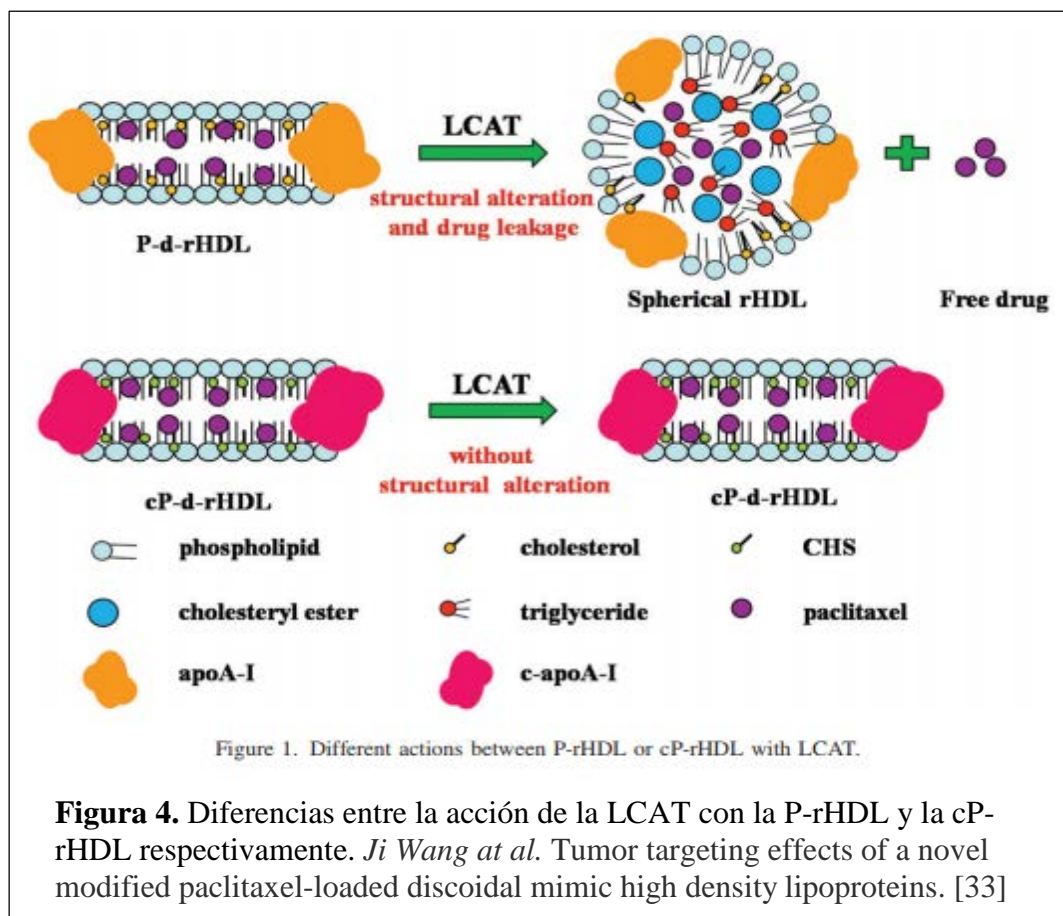
- Las d-rHDL, son las rHDL discoidales con las mismas propiedades que las HDL nativas. El problema que tiene es que hay estudios en los que se ha visto que la tasa de liberación



**Figura 3.** Diagrama de la estructura de las rHDL  
*O Ryan R et al. Nanobiotechnology applications of reconstituted high density lipoprotein. [27]*

del fármaco (en este caso era Paclitaxel) fue más rápida al añadirse LCAT, atenuándose además la captación celular y la citotoxicidad. Esto podría deberse a que después de la activación de la apo A-I, la LCAT cataliza la transferencia del grupo acilo sn-2 de la lecitina al grupo hidroxilo del colesterol, formando los ésteres de colesterol. [12]

- Las c-d-rHDL son como las anteriores pero con algunas modificaciones para evitar que se produzca ese cambio de conformación en la estructura en presencia de LCAT. Para ello en vez de utilizar solo la molécula de colesterol, utilizan colesterol esterificado (CHS) y una apo A-I modificada a la que se le había unido covalentemente moléculas de CHS. Y esos colesteril ésteres se posicionan en el centro de las partículas discoidales formando un núcleo hidrófobo convirtiéndose en partículas con forma esférica. [18] [33]



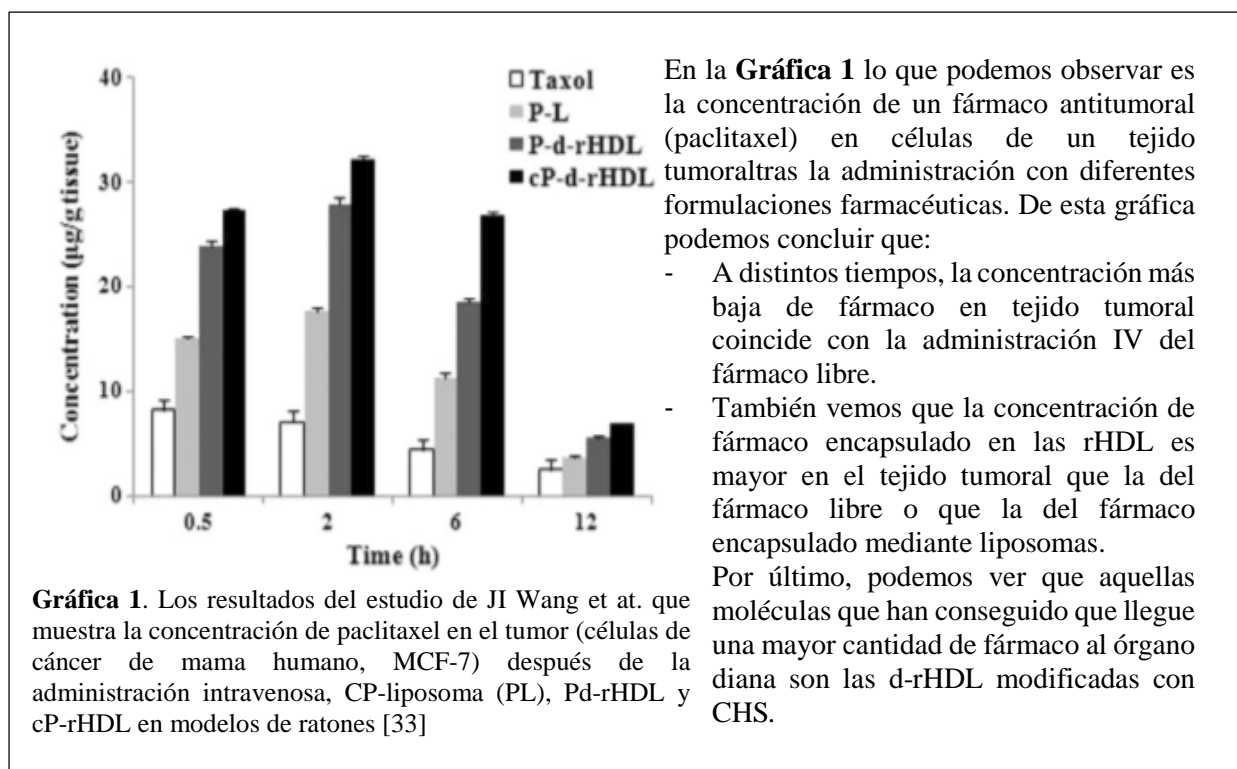
- Otras. A partir de estas lipoproteínas podemos obtener variantes dependiendo de las aplicaciones que les queramos dar. Por ejemplo, podemos tener rHDL que contengan en el núcleo nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) o con nanopartículas de oro (AuNPs), ambas hidrófobas, con ARN de interferencia corto (RNAsi), precargadas con un colorante infrarrojo (IR-780) o las rHDL con nanocristales de Punto Cuántico. [15] [24].
- Por último, además de las reconstituidas, se han obtenido  $\mu$ HDL con mismas funciones que las HDL nativas o las rHDL pero obtenidas mediante un proceso más simple gracias a la utilización de un dispositivo microfluídico a gran escala, que permite una mezcla rápida y efectiva de las soluciones, obteniéndose casi de forma instantánea las  $\mu$ HDL con un tamaño de 7.6–8.5 nm y manteniéndose el rendimiento de la síntesis de las rHDL.

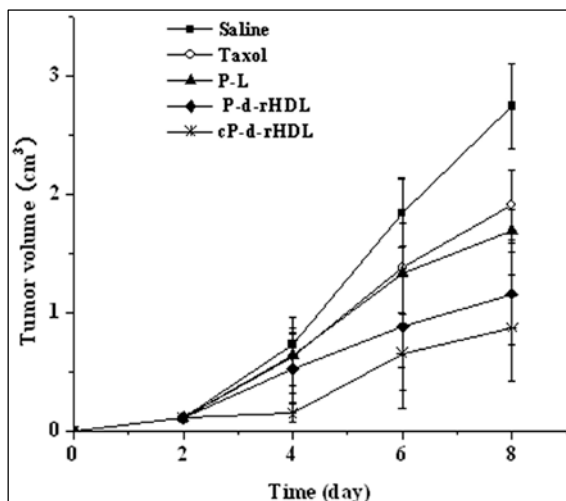
Al igual que en las rHDL, se les puede incorporar oro, óxido de hierro, nanocristales de punto cuántico o fluoróforos para permitir su detección por tomografía computarizada, imágenes de resonancia magnética o microscopía de fluorescencia endosomal. [15]

### Eficacia de las rHDL: Liposomas vs rHDL

Los liposomas son los vectores de administración de fármacos más utilizados hoy en día, especialmente en el tratamiento quimioterápico contra el cáncer. [16][33] Por esa razón y sobre todo considerando su similitud estructural con las HDLs, merece la pena comparar los liposomas con los nanovectores de administración de fármacos basados en lipoproteínas (rHDL). Los liposomas son bicapas esféricas basadas en lípidos, generalmente con un diámetro de 100 a 200 nm, con la capacidad de mejorar la administración y la eficacia terapéutica de las formulaciones de fármacos por vía intravenosa. Las lipoproteínas, y particularmente las HDL, tienen dos ventajas principales con respecto a los liposomas como vectores.

1. Las HDL, incluyendo las rHDL, tienden a ser mucho más pequeñas (entre 10 y 50 nm de diámetro) que los liposomas. Esto puede ser una ventaja significativa, ya que las nanopartículas portadoras de fármacos están diseñadas con el objetivo de penetrar de manera efectiva en el entorno del tumor.
2. Las LDL y las HDL interactúan con los receptores de la superficie celular a través de sus componentes de superficie y, por lo tanto, pueden tener la capacidad de alcanzar tejidos celulares selectivos en función del grado de expresión de los receptores específicos (tropismo).
3. Los liposomas deben conjugarse con anticuerpos u otras moléculas que hacen que su síntesis sea más compleja, aumentando así el coste.
4. Por último, los liposomas pueden tener cierta toxicidad, a diferencia de las lipoproteínas, que estas al tener un origen biológico, no tienen este problema.





**Gráfica 2.** Las curvas de crecimiento del tumor para diferentes grupos de tratamiento (n = 6). [12]

En la **Gráfica 2** podemos observar las curvas de crecimiento del tumor tras el tratamiento con taxol libre, encapsulado con liposomas, con las d-rHDL y con las c-d-rHDL y vemos como el tejido tumoral ha disminuido de manera significativa con el fármaco que estaba encapsulado en rHDL, especialmente en aquel con rHDL modificadas. Por tanto, al igual que en la Gráfica 1, podemos concluir que llega más fármaco al lugar de acción, optimizándose el tratamiento quimioterápico, en aquellas nanopartículas formadas por rHDL modificadas con CHS.

### Protocolo de producción de las rHDL

La forma inicial o "naciente" de las rHDL, es decir, el disco de 10 nm, se puede sintetizar de forma sencilla in vitro mezclando proteínas de apoA-I recombinantes con varios fosfolípidos.[27][35] La partícula de lipoproteína de alta densidad naciente se reconstituye de forma natural mediante fosfolípidos que se encuentran formando una bicapa en forma de disco con dos o más moléculas de apolipoproteínas alrededor.

Hay varias formas de sintetizar HDL reconstituidas, tanto en su forma esférica como discoidal. Sin embargo, en este trabajo solo se van a mencionar aquellas en las que se obtienen las rHDL discoidales que son las de interés.

Los estudios a fondo de la estructura de las apolipoproteínas han dado lugar a dos métodos generales para la formación de rHDL discoidales: diálisis con detergente y conversión directa.

- **DIÁLISIS CON DETERGENTE**

Ventaja: se puede emplear un amplio espectro de fosfolípidos formadores de la bicapa. Desventaja: la eliminación del detergente es potencialmente problemática.

1. *Producción de proteína ApoA-I recombinante.*

Antes las apoproteínas que se utilizaban para obtener las rHDL las obtenían por extracción del plasma humano pero actualmente se obtiene mediante recombinación genética, ya que el rendimiento de la técnica es significativamente mayor. La apoA-I humana se expresa en *Escherichia coli* utilizando el vector de expresión bacteriano pET-20b. Las proteínas expresadas se purificaron mediante columnas quelantes de níquel Hi-Trap. La proteína recombinada se dializó ampliamente contra solución salina tamponada con TBS 8,2 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4, complementada con benzamidina 1 mM. Se añadió el conjunto de cóctel de inhibidores de la proteasa III, diluyendo 200 veces la solución madre, y la proteína se filtró esterilizada.

2. *Preparación de complejos de Apo A-I-POPC.*

Se usó el Palmitoyloleophosphatidyl choline (POPC). Se prepararon dos formas diferentes de rHDL mediante el procedimiento de diálisis con colato, manteniendo una relación molar POPC / apoAI de 100: 1: rHDL que contiene POPC y apoAI y rHDL con la adición de S1P con una relación molar POPC / apo AI / S1P de 1600/16/1. Para preparaciones que contienen S1P, se secaron partes alícuotas de una solución madre (1,0 mg / ml en metanol) en tubos de vidrio y la mezcla de POPC / colato, y luego se agregaron apoAI sucesivamente, según lo

prescrito por el procedimiento de diálisis con colato. las preparaciones se dializaron 4 días contra Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl, 0,15 M. La concentración de S1P en rHDLB fue de 74,8 ng / mg de apo AI, ligeramente más alta que la S1P contenida en HDL nativo (59 ng / mg de apo AI). La cantidad de S1P inyectada corresponde a una concentración final estimada de 1.2 $\mu$ M.

### 3. Purificación y aislamiento de las rHDL

Las mezclas de lipidación se purificaron primero de cualquier proteína no reaccionada y estructuras vesiculares residuales mediante ultracentrifugación de densidad de gradiente discontinuo. Las fracciones que contenían proteínas y lípidos, que supuestamente representaban partículas de lipoproteínas reconstituidas, se agruparon y se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión de tamaño. Partículas HDL reconstituidas de diferentes tamaños se separaron en una columna Superdex 200 grado de preparación XK 16/100, a un caudal de 1.5 ml / min en TBS, pH 8.0. Las fracciones se analizaron en 4 a 20% de geles como se describe a continuación. Las fracciones correspondientes a las subclases de partículas rHDL se concentraron usando dispositivos de ultrafiltración Vivaspín-6 10000 MWCO antes del análisis adicional. No se detectaron diferencias en el tamaño de partícula de rHDL por NDGGE antes y después de la concentración de giro hasta un factor de concentración de 15 (de 0,1 a 1,5 mg / ml en concentración de proteína).

### 4. Caracterización de partículas rHDL

Se realizaron ensayos de fosfolípidos y proteínas para determinar la composición final de los complejos rHDL. La concentración de proteína se analizó mediante el kit de ensayo MicroBCA de Pierce utilizando albúmina de suero bovino como estándar. La concentración de POPC se midió con el kit de fosfolípidos B de Wako Chemicals GmbH y se volvió a confirmar con el ensayo Fiske-SubbaRow. La concentración de colesterol se obtuvo mediante un ensayo enzimático utilizando el kit de colesterol E de Wako Chemicals GmbH. La DC residual se midió semicuantitativamente mediante espectrometría de masas (MS). La MS con el tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz. Se realizó utilizando un sistema Voyager-DE STR. Usando una cantidad conocida de CD como estándar externo, el análisis de MS confirmó que no había diferencias de tamaño de rHDL en el CD residual

La D-HDL también puede generarse por microsólubilización directa (DM) de vesículas de fosfolípidos a la temperatura de transición de fase gel / líquido, un proceso mecánicamente similar a la lipidación apo AI "in vivo" a través de ABCA1. Pero la forma más común de síntesis es la de colato.

#### • CONVERSIÓN DIRECTA

Ventaja: el método de conversión directa no emplea detergentes.

Desventaja: el espectro utilizado de fosfolípidos es bastante limitado a diferencia del método anterior.

Los fosfolípidos que mas se utilizan en este método son los glicerofosfolípidos de cadena acilo saturados sintéticos, como la dimiristoilfosfatidilcolina o el dimiristoilfosfatidilglicerol. Estos lípidos se someten a una transición de fase cristalina líquida a gel en el intervalo de 23°C.

Normalmente, el sustrato de fosfolípido se hidrata y se induce para formar vesículas, mediante extrusión de membrana o sonicación. La incubación del sustrato de vesículas de fosfolípidos con una proteína adecuada (por ejemplo, apoA-I) induce el autoensamblaje de rHDL.

### **Preparación de cP-d-rHDL**

Los núcleos de cP-d-rHDL se prepararon mediante el método de dispersión de película delgada descrito por *Jia et al.*[33] Se disuelve fosfatidilcolina de soja, CHS y PTX en etanol absoluto y se seca a presión reducida. Luego se añade una solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,4, que contenía NaCl 0,113 M y KCl 0,0027 M) para hidratar la película lipídica seca a temperatura ambiente mediante agitación con vórtex. A continuación se realiza una ultrasonicación (200 W, 300 s) en hielo con un Ultra-Homogeneizador. Las suspensiones se extruyeron a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y luego de 0,22  $\mu\text{m}$  varias veces para homogeneizar las partículas. Así se obtienen los liposomas cargados con paclitaxel modificados con CHS (cP-liposoma).

2. Se sintetiza c-apoA-I, una lipoproteína de alta densidad recombinante discoidal cargada con paclitaxel modificada. Primero, CHS se mezcla con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino) propilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida para obtener ésteres activos de CHS-NHS. En segundo lugar, el éster activo se añade a la solución de apoA-I, después de agitar durante la noche a 4 ° C, las mezclas se dializan y se centrifugan para eliminar los ésteres activos adicionales. Finalmente, se adquiere la c-apoA-I.

3. A continuación, los liposomas cP se incuban con c-apoA-I para formar cP-d-rHDL. Se incuban 2 ml de cP-liposoma con una solución de PBS que contenía 30 mg de c-apoA-I y colato de sodio (relación molar SPC 1: 1,6) con agitación magnética a 4°C. Después de incubarse durante 10h, las mezclas se someten a diálisis con PBS durante 48 h para eliminar el colato sódico.

### **Preparación de $\mu$ HDL**

En un estudio *YongTae Kim et al.* consiguieron producir unas nanopartículas similares a las rHDL, a las que llamaron  $\mu$ HDL, pero de una forma más sencilla. Para la reconstitución utilizaron un método de autoensamblaje en un solo paso mediante un dispositivo de entrada de microfluidos. Este dispositivo microfluídico a gran escala genera microvortices dobles sintonizables lo que permite una mezcla rápida y efectiva de las soluciones en el centro. El proceso de autoensamblaje con esta forma de preparación se produce debido a: la transición del lípido de una solución orgánica a una acuosa, que inicia la formación de agregados de lípidos, mientras que apoA- I se incorpora rápidamente en los agregados nacientes, dando como resultado la formación instantánea de pequeñas nanopartículas  $\mu$ HDL con una variabilidad mínima del producto y manteniéndose el mismo rendimiento que el de la síntesis convencional. La síntesis multietapa convencional de 120 mg (peso total) de rHDL normalmente requeriría primero formación de película lipídica (2 h), seguida de hidratación de película lipídica (3 h), 1 h de sonicación y finalmente 16 h de incubación con apoA – I. [15]

### **Aplicaciones de las HDL reconstituidas.**

Las nanopartículas rHDL pueden tener muchas aplicaciones en clínica, especialmente en el tratamiento del cáncer porque se consigue que las células normales estén protegidas del efecto tóxico de los fármacos.

El concepto de administración selectiva de fármacos para el tumor puede tener una especial relevancia para la terapia pediátrica del cáncer donde los efectos secundarios inmediatos y retardados del tratamiento farmacológico inducen consecuencias particularmente graves.

### **rHDL para la terapia del cáncer**

Se deben tener en cuenta los siguientes requisitos para lograr un suministro eficaz de fármacos dirigidos a tumores.

1. El nanotransportador debe ser estable durante su paso por la circulación y acumularse eficientemente en el tumor.
2. Debe tener la capacidad de penetrar en las regiones tumorales y ser absorbido en concentraciones suficientes por las células tumorales. Además, debe liberar el fármaco una vez que las células tumorales lo hayan absorbido. Las rHDL mantienen las proporciones adecuadas de fosfolípidos y apolipoproteínas y aprovechan la ventaja de HDL para tener una alta biocompatibilidad y un tiempo de circulación relativamente largo. Dada la alta expresión de SR-B1 y LDLR en tumores en comparación con los tejidos normales, rHDL puede ser captada de manera eficiente por las células tumorales a través del mecanismo mediado por el receptor y así mediar la liberación eficiente de la carga, proporcionando una plataforma perfecta para la terapia del cáncer. [15]

Por ejemplo, para el cáncer de ovario, se han utilizado las rHDL para transportar el fármaco valcubicina altamente hidrófobo y así superar los obstáculos de solubilidad.

Otro ejemplo serían las rHDL-SPION unidas a antitumorales como una terapia farmacológica guiada magnéticamente al tejido diana. Además, debido a sus propiedades de mejora del contraste, las partículas de rHDL-SPION también se podrían utilizar en nanomedicina teranóstica como agentes de contraste, obteniendo imágenes de resonancia magnética útiles en para el diagnóstico rápido de ciertos cánceres, algo que es vital en muchas ocasiones para poder encontrar el tumor en estadios tempranos. [24]

### **rHDL para la terapéutica de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica**

Actualmente, La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular que se ha convertido en una de las principales causas de muerte y discapacidad a nivel mundial. [16] Esta enfermedad crónica se caracteriza por el desarrollo de placas de ateroma en las paredes arteriales y requiere nuevas estrategias terapéutica. [18][32]

Se sabe que los macrófagos están involucrados en la progresión de la aterosclerosis y se consideran marcadores específicos de la enfermedad. *Sigalov et al.* desarrollaron rHDL con apoA-I y metionina para cargar agentes de contraste basados en Gd y poder obtener imágenes de macrófagos eficientes in vitro e in vivo .

En cuanto al suministro de fármacos terapéuticos a las placas ateroscleróticas, muchos materiales poliméricos han sido utilizados en nanopartículas para lograr la administración dirigida y la liberación controlada de los fármacos terapéuticos. *Sánchez-Gaytán et al.* desarrolló una nanopartícula mimética de HDL con su núcleo hidrofóbico que incorpora ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) combinando las ventajas de la propiedad intrínseca a la dilatación de la placa aterosclerótica de HDL y el perfil de liberación sostenida del fármaco de PLGA.

También se ha visto que las rHDL cargadas estatinas son eficaces para el tratamiento de la placa aterosclerótica La inflamación es una característica clave de la aterosclerosis y un objetivo para la terapia. Las estatinas poseen potentes propiedades antiinflamatorias, pero no pueden explotarse completamente debido a su baja biodisponibilidad sistémica. Como alternativa se ha visto que las nanopartículas rHDL cargadas con estatinas las protegieron de la degradación, se acumularon en las lesiones ateroscleróticas y produjeron citoquinas inflamatorias para inhibir eficazmente la inflamación de la placa sin ejercer efectos tóxicos en los riñones, el hígado y los miocitos.

### **rHDL para terapia de enfermedades cerebrales.**

Las enfermedades de degenerativas como el Alzheimer, los accidentes cerebrovasculares y los tumores cerebrales se han convertido en graves problemas de salud pública y necesitan nuevas estrategias terapéuticas. [11] [13] [18] [21] [28] Una de las principales limitaciones para la terapia de la enfermedad cerebral es la administración restringida de fármacos, ya que estos tienen que pasar la Barrera Hematoencefálica (BHE) para poder ejercer su acción y esta barrera tiene una permeabilidad muy selectiva, complicándose la entrada de fármacos. Muchos estudios preclínicos recientes demostraron que la rHDL tiene un gran potencial para la administración eficiente de medicamentos y, por lo tanto, vale la pena explorar su potencial en la terapia de enfermedades cerebrales.

Por ejemplo, el glioblastoma es el tipo de tumor cerebral primario más invasivo. Muchos medicamentos para el tratamiento del glioblastoma están limitados por la entrega ineficiente del cerebro. Recientemente se han desarrollado unas nanopartículas de apoE-rHDL con siRNA atrapado por fosfato cálcico en el núcleo, consiguiendo transportar la molécula de forma eficaz al tumor.

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo con una alta prevalencia en nuestro país y en el cual faltan estrategias terapéuticas efectivas. Se ha demostrado que la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide en el cerebro es crucial en la patogénesis, y la aceleración del aclaramiento de  $\beta$ -amiloide es una estrategia modificadora de la enfermedad. Por ejemplo, GM1- apoE-rHDL se ha comprobado que presenta una buena distribución cerebral.

Además de la apoE-rHDL, también se ha demostrado que la apoA-I-rHDL disminuye los niveles del péptido  $\beta$ -amiloide. *Robert et al.* demostraron que las rHDL formadas por apoA-I humana disminuían los niveles del péptido  $\beta$ -amiloide cerebral soluble después de una dosis única dentro de las 24 h. Además, *Handattu et al.* descubrieron que D-4F, un péptido mimético de la apoA-I, tenía la capacidad de unirse al péptido  $\beta$ -amiloide e inhibirlo después de su administración oral. D-4F rHDL ofrece una alternativa prometedora para la reparación de la función cognitiva y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

### **Diagnóstico por imagen**

Mientras que las LDL han sido muy estudiadas como agentes diagnósticos, las HDL no. De hecho, la idea de utilizar esta lipoproteína como agente de imágenes es bastante novedosos.[29]

La resonancia magnética es una de las técnicas de imagen más versátiles. Hace imágenes buenas de tejidos blandos y con una gran resolución espacial.

Hay dos tipos de agentes de contraste, los cuales son necesarios para la formación de imágenes moleculares en la RMI. Los de contraste positivo, que dan lugar a un contraste brillante (son principalmente los complejos de iones de manganeso y gadolinio) y los que tienen un contraste menos brillante que son los de contraste negativo, que son principalmente los SPION. [24]

Las técnicas de imagen óptica muestran una buena resolución espacial y temporal, son muy sensibles. Son entre otras la multifotón y las técnicas de imagen del infrarrojo cercano y se utilizan en células in vitro y en animales de laboratorio in vivo. El problema que tienen estas técnicas es que la mayoría son invasivas.

*Ejemplos de rHDL utilizadas en diagnóstico de imagen:*

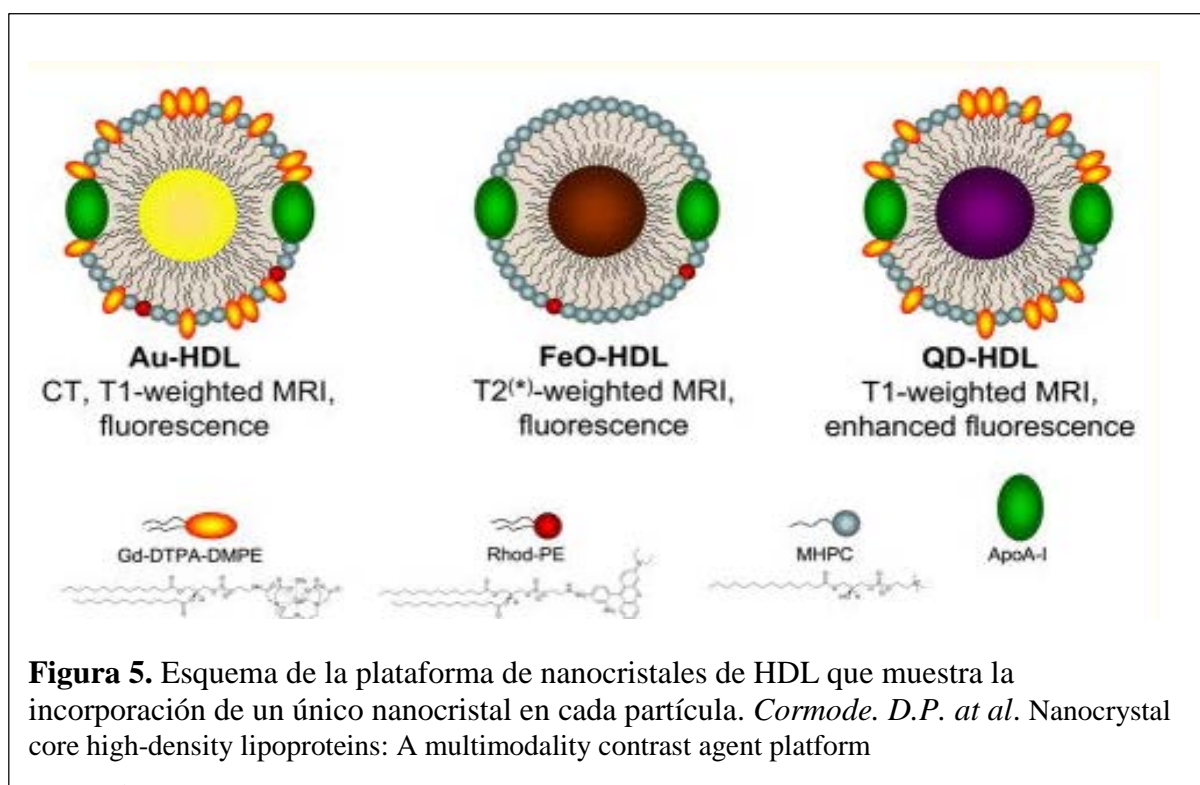
rHDL con IR-780, un colorante infrarrojo. Mediante ultrasonido pueden aumentar la permeabilidad de los vasos tumorales y aumentar también la acumulación de fármacos en el tejido tumoral de manera reversible. Esta molécula tiene una fuerte absorción y emisión óptica, y después de la irradiación con luz NIR, puede producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y aumentar la temperatura corporal, por esa razón su principal aplicación es como parte de la terapia fotodinámica y fototérmica. [16] [34]



Otros ejemplos son las rHDL con nanocristales inorgánicos en el núcleo de oro (AuNPs) [15] [16], hierro (SPION) [23] y de punto cuántico. La aplicación en el diagnóstico de los tres tipos tiene el mismo fundamento, por ello a continuación se detalla solo uno de los tres.

diferentes mediante la modificación tanto del núcleo como de la capa fosfolipídica de las rHDL. Las rHDL con nanocristales de punto cuántico son cristales coloidales semiconductores con una estructura esférica, más estables y brillantes que los fluorocromos y tienen una alta sensibilidad. Las ventajas que tienen es que necesitan intensidades de excitación láser y ultravioleta menores, permiten identificar a la vez varios componentes y tipos celulares dentro de un mismo tejido y también permiten diferenciar entre células normales y tumorales de una misma estirpe.

Los nanocristales inorgánicos encapsulados en rHDL pueden tener aplicación en el diagnóstico de aterosclerosis mediante la identificación de las placas ateroscleróticas y en el diagnóstico del cáncer mediante marcaje diferencial de células normales y cancerígenas pudiendo así identificar la velocidad de proliferación y la capacidad migratoria y metastásica de las células malignas. La limitación de esta técnica es debido a que este tipo de nanopartículas presentan el problema de ser útil únicamente para el tratamiento de enfermedades muy localizadas y concretas. [19]



### Teranosis

Podemos unir el uso de las nanopartículas de rHDL para el diagnóstico de enfermedades como el cáncer y su aplicación como vector de administración de fármacos, lo que se conocen como nanovectores teranósticos, al cumplir esas nanopartículas las funciones tanto de tratamiento como de diagnóstico.

Un ejemplo de esto son las nanopartículas lipídicas de porfirina Apo E3. Utilizadas para la formación de imágenes. Las porfirinas son moléculas orgánicas heterocíclicas con unas propiedades físicas que favorecen la formación de imágenes de fluorescencia del cáncer y la terapia fotodinámica. Su integración en la superficie de las rHDL producen estructuras supramoleculares estables con imágenes intrínsecas multimodales únicas. [14] [29]

## **Conclusiones**

En enfermedades como el cáncer, los tratamientos consisten en técnicas muy invasivas e incómodas y en un gran porcentaje de los pacientes conducen a la alteración de su salud y calidad de vida por los efectos secundarios que producen. Por ello, actualmente, una de las principales herramientas en biomedicina es el uso de nanotecnología aplicada.

Los estudios que se han realizado han demostrado que la utilización de nanopartículas permite una localización selectiva por el órgano diana, siendo capaces de atravesar barreras biológicas para la liberación de fármacos y conseguir que se alcancen altas concentraciones de los mismos. Además, mejoran los problemas de solubilidad, la estabilidad química y la farmacocinética disminuyendo también la aparición de resistencias.

Sin embargo, a raíz de la utilización de formulaciones a base de nanopartículas, se ha visto la posible toxicidad debida a que no son moléculas endógenas. Por ello, esta revisión bibliográfica pretende recopilar las últimas investigaciones que se han hecho sobre el empleo de las HDL reconstituidas discoidales (nanopartículas de origen biológico) como vehículo de moléculas y su potencial para el tratamiento y/o diagnóstico de una determinada enfermedad. Demostrando la eficacia de la administración de las rHDL discoidales unidas al fármaco respecto a la administración del fármaco en forma libre por vía IV o de otras nanopartículas como los liposomas utilizadas en la actualidad.

Las HDL reconstituidas son una prometedora herramienta dentro del campo de la nanomedicina gracias a las características intrínsecas de estas moléculas entre las que cabe destacar su capacidad de "targeting" activo y de liberación del fármaco que contiene como respuesta a ciertos estímulos, su biocompatibilidad y biodegradabilidad y su aplicación junto a diversas moléculas y nanocristales inorgánicos presentes en otro tipo de nanopartículas. Haciendo que las HDL reconstituidas permitan un tratamiento más eficaz y más localizado que las nanopartículas clásicas. Además, entre los diferentes tipos de estas HDL reconstituidas, se ha observado que todas tienen un rendimiento similar. Lo que las diferencia realmente es la velocidad de síntesis, siendo las  $\mu$ HDL las que se sintetizan con mayor rapidez casi de forma instantánea gracias a que todo el proceso se lleva a cabo en un solo paso.

Aun así, todavía deben llevarse a cabo muchas investigaciones antes de que estos nanovectores terapéuticos se conviertan en una realidad .

## **Bibliografía**

Página web:

1. Giraldo R, Rivas G. (2016). Biología Sintética "bottom-up": Reconstitución e ingeniería de dispositivos macromoleculares funcionales. Fundación Instituto Roche.  
[https://www.institutoroche.es/biotecnologia/104/biologia\\_sintetica\\_bottom\\_up\\_reconstitucion\\_e\\_ingenieria\\_de\\_dispositivos\\_macromoleculares\\_funcionales](https://www.institutoroche.es/biotecnologia/104/biologia_sintetica_bottom_up_reconstitucion_e_ingenieria_de_dispositivos_macromoleculares_funcionales)

Revista científica

2. Castagnino J.M. Nanobiotecnología. Nanomedicina y terapéutica. Bioq. Clin. Lat.am. 2013, 47 (4) ISSN: 0325-2957

Artículos científicos:

3. Brulhart-Meynet MC, Braunersreuther V, Brinck J., Montecucco F, Prost J.C, Thomas A., Frias MA (2015). Improving reconstituted HDL composition for efficient post-ischemic reduction of ischemia reperfusion injury. 10 (3), doi: 10.1371 / journal.pone.0119664
4. Cormode DP, Briley-Saebo KC, Mulder WJ, Aguinaldo JG, Barazza A, Ma Y, Fisher EA, Fayad ZA. An ApoA-I mimetic peptide high-density-lipoprotein-based MRI contrast agent for atherosclerotic plaque composition detection. *Small*. 2008 Sep;4(9):1437-44. doi: 10.1002/sml.200701285
5. Cuellar Rodriguez L.A, Prieto E.D, Cabaleiro L.V, Garda H.A. Apolipoprotein A-I configuration and cell cholesterol efflux activity of discoidal lipoproteins depend on the reconstitution process; Elsevier; *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*; 1841; 1; 05-11-2013; 180-189
6. Didichenko SA, Navdaev AV, Cukier AM, Gille A, Schuetz P, Spycher MO, Thérond P, Chapman MJ, Kontush A, Wright SD. Enhanced HDL Functionality in Small HDL Species Produced Upon Remodeling of HDL by Reconstituted HDL, CSL112: Effects on Cholesterol Efflux, Anti-Inflammatory and Antioxidative Activity. *Circ Res*. 2016 Sep 2;119(6):751-63. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308685.
7. Fiddymont S, García A.L, Pocovi M. Síntesis y caracterización de la variante de la Apolipoproteína A-I (Apo A-I Zaragoza). 2011. 159 (1)
8. Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2010 Jan 1;85(1):118-26. doi: 10.1093/cvr/cvp289.
9. González-Fernández Y, Brown HK, Patiño-García A, Heymann D, Blanco-Prieto MJ. Oral administration of edelfosine encapsulated lipid nanoparticles causes regression of lung metastases in pre-clinical models of osteosarcoma. *Cancer. Lett*. 2018 Aug 430 (28)193-200. doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.030.
10. Guada M, Lasa-Saracibar B, Lana H, Dios-Viéitez Mdel C, Blanco-Prieto MJ. Lipid nanoparticles enhance the absorption of cyclosporine A through the gastrointestinal barrier: In vitro and in vivo studies. *Int J Pharm*. 2016 Mar 16;500(1-2):154-61. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.01.037.
11. Huang JL, Jiang G, Song QX, Gu X, Hu M, Wang XL, Song HH, Chen LP, Lin YY, Jiang D, Chen J, Feng JF, Qiu YM, Jiang JY, Jiang XG, Chen HZ, Gao XL. Lipoprotein-biomimetic nanostructure enables efficient targeting delivery of siRNA to Ras-activated glioblastoma cells via macropinocytosis. *Nat Commun*. 2017 May 10;8:15144. doi:10.1038/ncomms15144.Ji
12. Kadiyala P, Li D, Nuñez FM, Altshuler D, Doherty R, Kuai R, Yu M, Kamran N, Edwards M, Moon JJ, Lowenstein PR, Castro MG, Schwendeman A. High-Density Lipoprotein-Mimicking Nanodiscs for Chemo-immunotherapy against Glioblastoma Multiforme. *ACS Nano*. 2019 Feb 26;13(2):1365-1384. doi: 10.1021/acsnano.8b06842.
13. Kaylin M. McMahan, Linda Foit, Nicholas L. Angeloni, Francis J. Giles, Leo I. Gordon, C. Shad Thaxton. Synthetic High-Density Lipoprotein-Like Nanoparticles as Cancer Therapy *Cancer Treat Re*. 2015; 166: 129–150. doi: 10.1007/978-3-319-16555-4\_6
14. Kim Y, Fay F, Cormode DP, Sanchez-Gaytan BL, Tang J, Hennessy EJ, Ma M, Moore K, Farokhzad OC, Fisher EA, Mulder WJ, Langer R, Fayad ZA. Single step reconstitution of multifunctional high-density lipoprotein-derived nanomaterials using microfluidics. *ACS Nano*. 2013 Nov 26;7(11):9975-83. doi: 10.1021/nn4039063.Sabnis S, Sabnis NA,
15. Lacko AG, Sabnis NA, Nagarajan B, McConathy WJ. HDL as a drug and nucleic acid delivery vehicle. *Front Pharmacol*. 2015 Oct 26;6:247. doi:10.3389/fphar.2015.00247.
16. Lasa-Saracibar B, Estella-Hermoso de Mendoza A, Guada M, Dios-Vieitez C, Blanco-Prieto MJ. Lipid nanoparticles for cancer therapy: state of the art and future prospects. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012 Oct;9(10):1245-61.

17. Pedersbæk D, Simonsen J.B, Petersen E, Andresen T.L. Application of Reconstituted High-Density Lipoproteins for Cancer Immunotherapy. 2017. 83 (1)
18. Pérez-Méndez O. High density lipoproteins (HDL). A therapeutic objective in the atherosclerosis prevention? Arch Cardiol Mex. 2004 Jan-Mar;74(1):53-67.
19. Pombo V, Goyanes V. Puntos cuánticos: Nueva aportación de la nanotecnología en investigación y medicina. 2011. Rev. Complut. Cienc. Vet. (5)1:69-102. ISSN: 1988-2688
20. Pownall HJ, Rosales C, Gillard BK, Ferrari M. Native and Reconstituted Plasma Lipoproteins in Nanomedicine: Physicochemical Determinants of Nanoparticle Structure, Stability, and Metabolism. Methodist Deakey Cardiovasc J. 2016 Sep;12(3):146-150.
21. Rajora, M. A., Ding, L., Valic, M., Jiang, W., Overchuk, M., Chen, J., & Zheng, G. (2017). Tailored theranostic apolipoprotein E3 porphyrin-lipid nanoparticles target glioblastoma. Chemical science, 8(8), 5371–5384. doi:10.1039/c7sc00732a
22. Rajora MA, Zheng G. Targeting SR-BI for Cancer Diagnostics, Imaging and Therapy. Front Pharmacol. 2016 Sep 27 (7) 326.
23. Raut S, Dasseux JL, Sabnis NA, Mooberry L, Lacko A. Lipoproteins for therapeutic delivery: recent advances and future opportunities. Ther Deliv. 2018 Mar 1;9(4):257-268. doi: 10.4155/tde-2017-0122.
24. Raut S, Lacko AG. Superparamagnetic reconstituted high-density lipoprotein nanocarriers for magnetically guided drug delivery. Int J Nanomedicine. 2017 Feb 22;12:1453-1464. doi: 10.2147/IJN.S122036.
25. Raut S, Mooberry L, Sabnis N, Garud A, Dossou AS, Lacko A. Reconstituted HDL: Drug Delivery Platform for Overcoming Biological Barriers to Cancer Therapy. Front Pharmacol. 2018;9:1154. Published 2018 Oct 15. doi:10.3389/fphar.2018.01154
26. Rodriguez-Nogales C, Noguera R, Patrick C, Blanco-Prieto MJ. Therapeutic opportunities in neuroblastoma using nanotechnology. J Pharmacol Exp Ther. 2019 Jan 11. doi: 10.1124/jpet.118.255067.
27. Ryan RO. Nanobiotechnology applications of reconstituted high density lipoprotein. J Nanobiotechnology. 2010 Dec 1;8-28. doi: 10.1186/1477-3155-8-28.
28. Shahzad MM, Mangala LS, Han HD, Lu C, Bottsford-Miller J, Nishimura M, Mora EM, Lee JW, Stone RL, Pecot CV, Thanapparasr D, Roh JW, Gaur P, Nair MP, Park YY, Sabnis N, Deavers MT, Lee JS, Ellis LM, Lopez-Berestein G, McConathy WJ, Prokai L, Lacko AG, Sood AK. Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles. Neoplasia. 2011 Apr;13(4):309-19.
29. Skajaa T, Cormode DP, Falk E, Mulder WJ, Fisher EA, Fayad ZA. High-density lipoprotein-based contrast agents for multimodal imaging of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Feb;30(2):169-76. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179275.
30. Tsujita M, Wolska A, Gutmann DAP, Remaley AT. Reconstituted Discoidal High-Density Lipoproteins: Bioinspired Nanodiscs with Many Unexpected Applications. Curr Atheroscler Rep. 2018 Nov 5;20(12):59. doi: 10.1007/s11883-018-0759-1.
31. Upadhyay RK. Lipoproteins as drug delivery vehicles for cancer and tumor therapeutics. J Stem Cell Res Ther. 2018;4(3):52–62. DOI:10.15406/jsrt.2018.04.00115
32. Valanti E. K., Dalakoura-Karagkouni K, & Sanoudou, D. (2018). Current and Emerging Reconstituted HDL-apoA-I and HDL-apoE Approaches to Treat Atherosclerosis. Journal of personalized medicine, 8(4), 34. doi:10.3390/jpm8040034
33. Wang, J.J, Jianping L, Hongliang H, Wenli Z & Zhenghua L (2013) Tumor targeting effects of a novel modified paclitaxel-loaded discoidal mimic high density lipoproteins, Drug Delivery. 20:8, 356-363, doi: 10.3109/10717544.2013.834418
34. Xiong F, Nirupama S, Sirsi SR, Lacko A, Hoyt K. Ultrasound-Stimulated Drug Delivery Using Therapeutic Reconstituted High-Density Lipoprotein Nanoparticles. Nanotheranostics. 2017 Nov 1;1(4):440-449. doi: 10.7150/ntno.21905

35. Zhang F, Wang X, Xu X, Li M, Zhou J, Wang W. Reconstituted high density lipoprotein mediated targeted co-delivery of HZ08 and paclitaxel enhances the efficacy of paclitaxel in multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci.* 2016 Sep 20; 92:11-21. doi: 10.1016/j.ejps.2016.06.017.