

Tesis de Posgrado

Metabolismo del hemo y neoplasias

Casas, Adriana Gabriela

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Casas, Adriana Gabriela. (1996). Metabolismo del hemo y neoplasias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2842_Casas.pdf

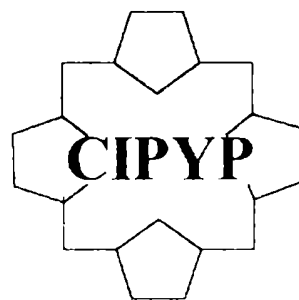
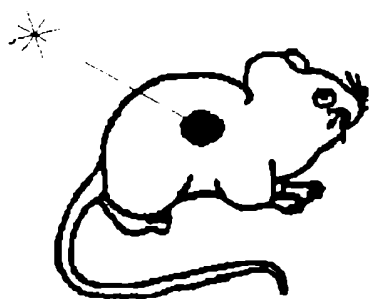
Cita tipo Chicago:

Casas, Adriana Gabriela. "Metabolismo del hemo y neoplasias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2842_Casas.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

METABOLISMO DEL HEMO Y NEOPLASIAS

ADRIANA GABRIELA CASAS



TESIS 1996

2002

g2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis doctoral

METABOLISMO DEL HEMO Y NEOPLASIAS

por

ADRIANA GABRIELA CASAS

DIRECTORA: Prof. Dra Alcira María del Carmen Batlle de Albertoni

CO-DIRECTORA: Dra Haydée Fukuda

1996

**Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP).
Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales. Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).**

A mis padres

METABOLISMO DEL HEMO Y NEOPLASIAS

RESUMEN

La Terapia Fotodinámica del cáncer (TFD) es un tratamiento que se basa en la acumulación selectiva de un fotosensibilizante en las células tumorales. Este, luego de ser excitado por acción de la luz roja, desencadena una serie de reacciones mediadas por radicales libres, que finalmente destruyen el tejido. El empleo del ácido 5-aminolevúlico (ALA) como precursor de la síntesis de porfirinas, ha cobrado especial interés en los últimos años tanto en la TFD usando las porfirinas como fotosensibilizantes, como en la fotodetección de tumores, empleando la propiedad de estos pigmentos de fluorescer con la luz UV.

Por otra parte, se ha observado que algunos tejidos neoplásicos acumulan porfirinas, por lo cual se ha postulado que el camino biosintético de los tetrapirroles se encuentra alterado en los pacientes con neoplasias.

En el presente trabajo se caracterizaron las actividades de algunas de las enzimas del camino biosintético del hemo en un adenocarcinoma mamario de ratón y en el hígado de los animales portadores de dicha neoplasia.

Se estudió la biosíntesis de porfirinas *in vitro* a partir de ALA en tumor y otros tejidos, empleando para ello la técnica de explantes tisulares, y se encontró que la acumulación de porfirinas se hace más selectiva para el tumor cuando el precursor se administra encapsulado en liposomas o cuando se agrega cinc en el medio de incubación.

Se desarrolló un modelo *in vitro-in vivo* para estudiar la efectividad de la acción fotodinámica de las porfirinas sintetizadas endógenamente a partir de ALA, en el cual se monitorea el crecimiento de los tumores irradiados, luego de su reimplantación en animales receptores.

Se encontró que los explantes incubados 2 hs con ALA, y que por lo tanto sintetizaron 4,6 µg de porfirinas/g tej., al ser irradiados sufrieron una reducción desde un 60% de la masa tumoral, hasta la falta completa de crecimiento del tumor en el ratón receptor. Además se observó una correlación entre el nivel de porfirinas acumuladas y el daño celular.

El mismo modelo fue utilizado para investigar la efectividad del daño fotodinámico inducido por ALA en combinación con los antineoplásicos 5-Fluorouracilo, Ciclofosfamida y Doxorubicina. Se encontró un aumento en la eficacia de la TFD, cuando se emplearon Ciclofosfamida y Doxorubicina; no así cuando se usó 5-Fluorouracilo.

Con nuestro modelo *in vitro-in vivo* se ha demostrado que ocurre una importante y hasta una completa destrucción de las células tumorales mediante la combinación de la síntesis endógena de porfirinas a partir de ALA y un tratamiento lumínico de baja potencia. Los resultados presentados en este trabajo indican que el empleo del ALA en la detección temprana de las células malignas y en la TFD es sumamente prometedor.

Nuestros hallazgos plantean también la posibilidad del uso combinado de antineoplásicos con la TFD inducida por ALA.

PALABRAS CLAVES: Terapia Fotodinámica, porfirinas, ácido 5-aminolevúlico, antineoplásicos, tumores.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) shows considerable promise as a treatment modality for malignant tumors. This type of therapy is based on the accumulation of a photosensitizer after its administration. Subsequent illumination with light of an appropriate wavelength provokes a photochemical reaction that results in tissue destruction. 5-aminolevulinic acid (ALA) induced photosensitisation may be a promising approach. So does the use of the fluorescence under UV light of ALA induced porphyrins on the early detection of malignancies.

The overproduction of porphyrins in tumors, in the absence of known porphyria, has also been observed by several authors. It has been suggested that porphyrin metabolism may be altered in cancer patients.

In this work we have reported some properties of ALA-D and PBG-ase, two enzymes of the porphyrin biosynthesis pathway, in a mouse mammary adenocarcinoma and liver of tumor bearing mice.

Using the tissue explant cultures technique we have studied the endogenous porphyrin biosynthesis in tumor and other organs using the ALA precursor either free or encapsulated in liposomes. It was found that the latter improved tumor selective accumulation. Porphyrin retention was further enhanced when zinc was added to the incubation media.

To assess the potential antineoplastic efficacy of ALA-based Photodynamic Therapy, we have designed a new *in vitro* - *in vivo* model. Tumor explants were incubated with ALA and, after irradiation, viability was tested by monitoring the growth of implanted tumors in receptor animals.

It was found that tumor explants incubated 2 hours with ALA, reaching a concentration of 4.6 µg porphyrin/g tissue, lead from 60% reduction of the tumoral mass to complete lack of tumor growth. These results showed a correlation between cellular destruction and the level of porphyrin content.

The same model was used to investigate the effectiveness of ALA as photosensitizer in combination with antineoplastic drugs such as 5-Fluorouracil, Cyclophosphamide and Doxorubicin. An increase in the efficacy of the photodynamic therapy was observed when Cyclophosphamide and Doxorubicin were used, but there was no improvement when 5-Fluorouracil was used.

These findings, showing an important to complete tumor cell destruction by combination of porphyrins endogenously formed from ALA and low irradiance, support our proposal on the use of ALA for early diagnosis and photodynamic treatment of malignant cells.

Furthermore, ALA-based PDT in combination with chemotherapy is a promising therapy.

KEYWORDS: Photodynamic Therapy, 5-aminolevulinic acid, porphyrins, antineoplastics, tumors.

INDICE GENERAL

	Página
Agradecimientos.....	i
Abreviaturas.....	ii
Objetivos.....	iv

INTRODUCCION

I. Las porfirinas y el camino metabólico del hemo.	
Su relación con los procesos neoplásicos.....	1
I.1 Las porfirinas. Generalidades.....	1
I.2 Biosíntesis del hemo.....	2
I.3 Regulación de la biosíntesis del hemo.....	5
I.4 Enzimas del camino biosintético del hemo y su funcionamiento en células neoplásicas.....	6
I.4.1 Acido 5- aminolevúlico dehidrasa y los modificadores de su actividad.....	6
I.4.11 Caracterización y propiedades.....	6
I.4.12 Alteraciones del ALA-D en neoplasias.....	8
I.4.2 Porfobilinogenasa.....	9
I.4.21 Caracterización y modificadores de su actividad.....	9
I.4.22 Alteraciones de la PBG-asa en neoplasias.....	11
I.5 Catabolismo del hemo.....	12
I.6 Alteraciones en el camino del hemo y su relación con los procesos de carcinogénesis.....	13
I.7 Referencias.....	17
II. Terapia Fotodinámica.....	27
II.1 Su historia.....	27
II.2 Las porfirinas en la fotodetección de tumores.....	28
II.3 Las porfirinas como fotosensibilizantes.....	30
II.3.1 Toxicidad.....	32
II.3.11 Toxicidad fotodinámica de las porfirinas.....	32
II.3.12 Toxicidad de las porfirinas en la oscuridad.....	32
II.3.2 Farmacocinética.....	33
II.3.3 Mecanismos de acumulación de las porfirinas en los tumores.....	34
II.3.4 Fotoquímica.....	35
II.3.5 Sitios celulares y subcelulares blanco de la TFD.....	39
II.4 Fuentes y sistemas de aplicación de la luz.....	42
II.4.1 Fuentes de luz.....	42
II.4.2 Sistemas de aplicación.....	43
II.4.3 Intensidad de luz.....	44
II.5 Experiencia clínica.....	45
II.6 Combinación de la TFD con otras terapias.....	47
II.7 Fotosensibilizantes de segunda generación.....	49
II.8 Referencias.....	52

III. Terapia Fotodinámica a partir de ALA.....	64
III.1 Fundamentos.....	64
III.2 Especificidad de tejidos por la PROTO IX inducida por ALA.....	64
III.3 Farmacocinética de la PROTO IX inducida a partir de ALA.....	68
III.4 Excitación de las porfirinas endógenas.....	68
III.5 Vías de administración.....	72
III.5.1 Penetración del ALA a través de la piel.....	72
III.5.2 Uso de liposomas.....	73
III.6 Sitios de acción.....	74
III.7 Experiencia clínica.....	76
III.8 Toxicidad del ALA y/o PROTO IX sintetizada a partir de ALA.....	79
III.9 Referencias.....	80
IV. Agentes antineoplásicos y sus interacciones con la TFD.....	86
IV.1 Generalidades sobre los antineoplásicos.....	86
IV.1.1 5-Fluorouracilo.....	90
IV.1.2 Ciclofosfamida.....	92
IV.1.21 Biotransformación de fármacos. Citocromo P ₄₅₀	95
IV.1.3 Doxorubicina.....	98
IV.1.31 Las antraciclinas como fotosensibilizantes.....	102
IV.2 Combinación de la TFD con agentes antineoplásicos.....	104
IV.3 Referencias.....	106
V. Radicales libres	112
V.1 Generalidades.....	112
V.2 Control biológico de los radicales libres.....	118
V.3 Radicales libres y porfirinas.....	121
V.4 Radicales libres y ALA.....	121
V.5 Radicales libres y cáncer.....	123
V.6 Referencias.....	124
VI. Metabolismo del glutation. Su relación con la TFD y las drogas antineoplásicas.....	127
VI.1 Glutation reducido y oxidado.....	127
VI.2 Enzimas involucradas en el metabolismo del glutation.....	127
VI.2.1 Interconversión de GSH Y GSSG.....	127
VI.2.11 Glutation reductasa.....	129
VI.2.12 Glutation peroxidasa.....	129
VI.2.2 Conjugación del glutation con compuestos exógenos: Glutation S-transferasas.....	129
VI.3 Rol del glutation en la TFD.....	131
VI.4 Rol del glutation en la eficacia terapéutica de la ciclofosfamida.....	133
VI.5 Referencias.....	136

MATERIALES Y METODOS

I. Drogas.....	139
II. Animales.....	139
III. Determinaciones de porfirinas.....	139
III.1 Determinación de la cantidad de porfirinas sintetizadas.....	139
III.2 Cromatografías.....	140
III.3 Determinación del contenido de porfirinas en materia fecal.....	141
III.4 Determinación de porfirinas en sangre.....	141
III.5 Índice de porfirinas plasmáticas.....	142
III.6 Determinación de porfirinas libres totales en orina empleando columnas de Bio-Rad.....	142
IV. Determinaciones de actividad de algunas enzimas del camino del hemo.....	143
IV.1 Determinación de ALA dehidrasa.....	143
IV.1.1 Fuente enzimática.....	143
IV.1.2 Sistema de incubación.....	144
IV.2 Determinación enzimática de PBG-asa.....	144
IV.2.1 Fuente enzimática.....	144
IV.2.2 Sistema de incubación.....	145
V. Determinación de ALA y PBG en hígado.....	146
VI. Cultivo de explantes tisulares.....	147
VII. Preparación de ALA encapsulado.....	148
VIII. Marcadores de integridad celular.....	148
VIII.1 Lisis celular: determinación de Láctico Deshidrogenasa en el medio de incubación.....	148
VIII.2 Integridad de membranas: determinación de potasio intracelular.....	148
IX. Antineoplásicos.....	149
IX.1 Dosis de antineoplásicos para los estudios de la TFD.....	149
IX.1.1 5-Fluorouracilo.....	149
IX.1.2 Ciclofosfamida.....	149
IX.1.3 Doxorubicina.....	150
X. Determinación de citocromo P ₄₅₀	150
XI. Metabolismo de glutatión.....	151
XI.1 Determinación de glutatión reducido y oxidado.....	151
XI.2 Determinación de actividad de la glutatión reductasa.....	151
XI.3 Determinación de actividad de glutatión S-transferasas.....	152
XII. Determinación de malondialdehído.....	153
XIII. Determinación de la concentración proteica.....	154
XIV. Tratamiento estadístico de los datos.....	154
XV. Referencias.....	155

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales y de otros tejidos.....	157
I.1 Cuantificación de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA en explantes de tumor y otros tejidos.....	157
I.2 Síntesis de porfirinas a partir de ALA libre y encapsulado.....	161
I.3 Identificación de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA.....	163
I.4 Conclusiones.....	166
II. Caracterización del ALA-D y la PBG-asa y su posible modulación en tumor e hígado de ratones portadores de neoplasias.....	168
II.1 ALA dehidrasa.....	168
II.1.1 Caracterización del ALA-D en el adenocarcinoma M2 y en en hígado de ratones portadores de tumor.....	168
II.1.11 Cantidad de proteína.....	168
II.1.12 Tiempo de incubación.....	169
II.1.13 Cinética de la reacción.....	170
II.1.2 Modulación de la actividad del ALA-D.....	173
II.1.21 Efecto de reactivos sulfhidrilicos.....	173
II.1.22 Efecto del cinc.....	174
II.1.3 Modulación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tisulares.....	177
II.2 Porfobilinogenasa.....	181
II.2.1 Caracterización de la enzima porfobilinogenasa en el adenocarcinoma M2 y en hígado de ratones portadores de tumor.....	181
II.2.11 Tiempo de incubación.....	181
II.2.12 Cinética de la reacción.....	182
II.2.13 Efecto del ácido fólico sobre la PBG-asa.....	186
II.3 Conclusiones.....	187
III. Efectividad de la Terapia Fotodinámica.....	189
III.1 Biosíntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales a tiempos cortos de incubación.....	189
III.2 Cromatografía de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA a tiempos cortos.....	190
III.3 Modelo <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i> para determinar la eficacia terapéutica de la TFD.....	191
III.4 Efectos de la irradiación en el crecimiento tumoral.....	193
III.4.1 Índice de efectividad.....	194
III.5 Citotoxicidad del tratamiento.....	195
III.6 Conclusiones.....	198
IV. Combinación de la TFD a partir de ALA con diversos agentes antineoplásicos.....	199
IV.1 Diseño experimental para determinar la eficacia de la TFD combinada con los antineoplásicos.....	199
IV.2 5-Fluorouracilo.....	201
IV.2.1 Efecto del 5-Fu sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos.....	201
IV.2.2 Efecto de 5-Fu sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales.....	201
IV.2.3 Efecto del 5-Fu sobre la efectividad de la TFD del cáncer.....	204
IV.2.4 Conclusiones.....	205

IV.3 Ciclofosfamida.....	206
IV.3.1 Efecto de la CY sobre el camino del hemo.....	206
IV.3.11 Efecto de la CY sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos.....	207
IV.3.12 Efecto de la CY sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tisulares.....	210
IV.3.121 Explantes tumorales.....	210
IV.3.122 Explantes de hígado.....	213
IV.3.13 Efecto de la CY sobre la actividad de la Porfobilinogenasa.....	215
IV.3.14 Efecto de la CY sobre la actividad del ALA dehidrasa.....	216
IV.3.15 Efecto de la CY sobre los niveles de ALA y PBG hepáticos.....	219
IV.3.16 Efecto de la CY sobre el citocromo P ₄₅₀	220
IV.3.17 Conclusiones.....	222
IV.3.2 Efecto de la Ciclofosfamida sobre la eficacia de la TFD.....	223
IV.3.21 TFD con 30 minutos de irradiación.....	223
IV.3.22 TFD con 15 minutos de irradiación.....	225
IV.3.23 Conclusiones.....	229
IV.3.3 Efecto de la CY sobre el metabolismo del glutatión.....	230
IV.3.31 Efecto de la CY sobre los niveles de glutatión intracelular.....	230
IV.3.32 Efecto de la CY sobre la actividad de la glutatión reductasa.....	237
IV.3.33 Efecto de la CY sobre la actividad de la glutatión S-transferasa.....	239
IV.3.34 Conclusiones.....	241
IV.4 Doxorubicina.....	242
IV.4.1 Efectos de la DOX sobre el camino del hemo.....	242
IV.4.11 Efecto de la DOX sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos.....	242
IV.4.12 Efecto de la DOX sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes.....	244
IV.4.13 Efecto de la DOX sobre la actividad del ALA dehidrasa.....	247
IV.4.14 Efecto de la DOX sobre la actividad de la Porfobilinogenasa.....	248
IV.4.2 Efectos de la DOX sobre la LPO.....	249
IV.4.3 Efectos de la DOX sobre la eficacia terapéutica de la ALA-TFD.....	254
IV.4.4 Conclusiones.....	259
V. Conclusiones finales.....	260
VI. Referencias.....	262

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a Alcira por haberme brindado siempre su apoyo, por su paciencia y dedicación.

También a Haydée, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de iniciarme en esta ardua tarea, a Sergio, por su valiosa colaboración en la discusión de resultados y diseño de los experimentos, y a Florencia, por su ayuda en la primera etapa de este trabajo.

Muy especialmente a Fernando por su invalorable ayuda en la confección de gráficos y en la batalla que he tenido que librar contra las computadoras, y a Marcelo, por el scaneo de los gráficos.

A mis compañeros de laboratorio Carina, Guillermo, Susana, Ana Adela, Mariana y Mónica, por haber compartido conmigo tantas horas de trabajo.

A mis padres, a Fabiana, y a mis amigos, por haber estado siempre a mi lado, y a María Belén, porque su sonrisa hace que todo sea posible.

Y muy especialmente quiero agradecer a mis amigos del CIPYP, porque sin el aliciente de su compañía, esta tarea hubiese sido imposible.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas y subsidios otorgados para la concreción de este proyecto.

ABREVIATURAS

γ -GC-S	γ -glutamil cisteinil sintetasa
γ -GT	γ -glutamil transpeptidasa
4-OH-CY	4-hidroxi-ciclofosfamida
4-OOH-CY	4-hidroperoxiciclofosfamida
5-Fu	5-Fluorouracilo
AE	Actividad específica
AIA	Alil-isopropil-acetamida
ALA	Acido 5-aminolevúlico
ALA-D	ALA dehidrasa
ALA-S	ALA sintetasa
ALA-TFD	Terapia Fotodinámica a partir de ALA
AP	Aldofosfamida
BPE	Buffer Fosfato de Sodio EDTA
CAT	Catalasa
CCB	Carcinoma basocelular
Cit P ₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀
COPRO	Coproporfirina
COPROgen	Coproporfirinógeno
CPGasa	Coproporfirinógeno oxidasa
CY	Ciclofosfamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorubicina
dTMP	Acido timidílico
DTT	Ditiotreitol
dUMP	Acido deoxiuridílico
F-dUMP	5' Fluoro-2' deoxiuridina 5-monofosfato
FC	Ftalocianinas
G-S	Glutation sintetasa
G-ST	Glutation transferasa
G6PD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GPx	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation total; glutacion reducido
GSSG	Glutation oxidado
HBM	1-Hidroximetilbilano
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Hem-O	Hemo oxigenasa
HO [·]	Radical hidroxilo
HpD	Derivado de Hematoporfirina
HpD-TFD	Terapia Fotodinámica con HpD
i. t.	Intratumoral
LDH	Láctico deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad

LPO	Peroxidación lipídica
MDA	Malondialdehído
mesna	2-mercaptoetano-sulfonato
NO [·]	Radical óxido nítrico
O ₂ ⁻	Anión superóxido
ONOO ⁻	Radical peroxinitrito
PAI	Porfiria aguda intermitente
PBG	Porfobilinógeno
PBG-asa	Porfobilinogenasa
PPGasa	PROTOgen oxidasa
PROTO	Protoporfirina
PROTOgen	Protoporfirinógeno
RL	Radicales libres
ROO [·]	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARs	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Acido tricloroacético
TFD	Terapia Fotodinámica
UE	Unidades enzimáticas
URO	Uroporfirina
URO-D	UROgen decarboxilasa
URO-I-S	Hidroximetilbilano sintetasa o PBG deaminasa
UROgen	Uroporfirinógeno
UROgen III-S	UROgen III sintetasa, isomerasa o cosintetasa

OBJETIVOS

- * Estudiar la biosíntesis de porfirinas en cultivos de explantes tisulares y su modulación con agentes que puedan estimular la producción de tetrapirroles con el propósito de potenciar la Terapia Fotodinámica (TFD) a partir de ácido 5-aminolevúlico (ALA), empleado en forma libre o encapsulado en liposomas.
- * Caracterizar las enzimas ácido 5-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D) y porfobilinogenasa (PBG-asa) en un adenocarcinoma mamario murino y en el tejido hepático normal de ratón portador de tumor. Estudiar los efectos de una posible modulación de la actividad del ALA-D con cinc y de la PBG-asa con ácido fólico.
- * Desarrollar un modelo experimental que nos permita determinar la eficacia de la TFD a partir de ALA, empleada como tal o en combinación con agentes antineoplásicos.
- * Estudiar la posibilidad de potenciar la TFD con ALA por combinación con los antineoplásicos 5-Fluorouracilo, Ciclofosfamida y Doxorubicina, para lograr la completa destrucción de las células tumorales.
- * Investigar los efectos de la administración de ciclofosfamida sobre el metabolismo del hemo y los niveles de citocromo P₄₅₀, para explicar el mecanismo responsable de la potenciación de la TFD por dicha droga.
- * Determinar las variaciones en la concentración de glutatión intracelular y enzimas relacionadas con su metabolismo y su posible manipulación para aumentar la eficiencia del tratamiento combinado TFD-Ciclofosfamida.
- * Estudiar la acción de la Doxorubicina sobre la lipoperoxidación en tumor y corazón, con el propósito de elucidar los mecanismos de potenciación de la TFD con esta droga y predecir el grado de cardiotoxicidad del tratamiento.

INTRODUCCION

CAPITULO I

LAS PORFIRINAS Y EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO. SU RELACION CON LOS PROCESOS ANTINEOPLASICOS

I.1 Las porfirinas. Generalidades.....	1
I.2 Biosíntesis del hemo.....	2
I.3 Regulación de la biosíntesis del hemo.....	5
I.4 Enzimas del camino biosintético del hemo y su funcionamiento en células neoplásicas.....	6
I.4.1 Acido 5- aminolevúlico dehidrasa y los modificadores de su actividad.....	6
I.4.11 Caracterización y propiedades.....	6
I.4.12 Alteraciones del ALA-D en neoplasias.....	8
I.4.2 Porfobilinogenasa.....	9
I.4.21 Caracterización y modificadores de su actividad.....	9
I.4.22 Alteraciones de la PBG-asa en neoplasias.....	11
I.5 Catabolismo del hemo.....	12
I.6 Alteraciones en el camino del hemo y su relación con los procesos de carcinogénesis.....	13
I.7 Referencias.....	17

I. LAS PORFIRINAS Y EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO. SU RELACION CON LOS PROCESOS NEOPLASICOS.

I.1 Las porfirinas. Generalidades.

Las porfirinas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y juegan un rol fundamental en el control de las oxidaciones biológicas, transporte de oxígeno y reacciones enzimáticas.

Su estructura biológica básica es un macrociclo formado por cuatro anillos pirrólicos (A,B,C y D), unidos por cuatro puentes meteno. La existencia de dobles enlaces alternados da lugar a una molécula plana, resonante y resistente a modificaciones químicas. Poseen, además, cadenas laterales que determinan sus características físicas (Figura I.1a).

Los metabolitos fisiológicamente activos son los derivados reducidos de las porfirinas, los porfirinógenos, que a diferencia de las anteriores, no son coloreados ni emiten fluorescencia, y se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas (Figura I.1b).

Las porfirinas pueden combinarse fácilmente con metales, dando lugar a quelatos con gran importancia biológica, como la hemoglobina y mioglobina (con hierro ferroso), las clorofilas (con magnesio), los citocromos (contienen hierro capaz de oxidarse y reducirse) y las corrinas (con cobalto).

Las hemoproteínas son aquellas proteínas que contienen como grupo prostético un quelato tetrapirrólico de hierro. Entre las hemoproteínas encontramos también enzimas como las peroxidasas, la catalasa y la triptofano pirrolasa.

Cuando cambia la valencia de los metales de transición a los que se encuentran unidos, las porfirinas pueden controlar el desplazamiento de electrones y así aumentar la eficiencia de las reacciones de óxido-reducción. Es por eso que las porfirinas han tenido un rol fundamental en la ontogénesis de la vida terrestre (Mercer Smith & Mauzerall, 1981), facilitando la aparición de formas de vida (Batlle, 1989), y han sido detectadas tanto en fósiles (Blumer, 1974) como en rocas precámbricas (Kolesnikov & Egorov, 1977).

Aunque las porfirinas y el hemo se sintetizan en todas las células de mamíferos, dicha actividad está incrementada en médula ósea e hígado.

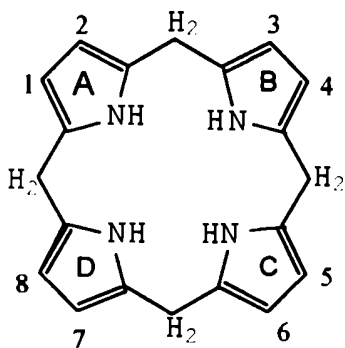


FIGURA I.1a: Núcleo de porfirina (según Fischer).

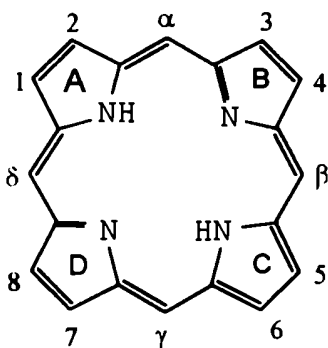


FIGURA I.1b: Núcleo de porfirinógeno.

I.2 Biosíntesis del hemo.

La secuencia de reacciones involucradas en el camino de las porfirinas fue dilucidada en una serie de estudios con marcadores isotópicos (Cookson & Rimington, 1953; Granick & Bogorad, 1953; Neuberger & Scott, 1953; Shemin & Russel, 1953; Rimington & Krol, 1955); de tal forma se determinó la existencia de ocho enzimas, de las cuales la primera y las tres últimas son mitocondriales y el resto, citosólicas (Figura I.2).

MITOCONDRIA

CITOPLASMA

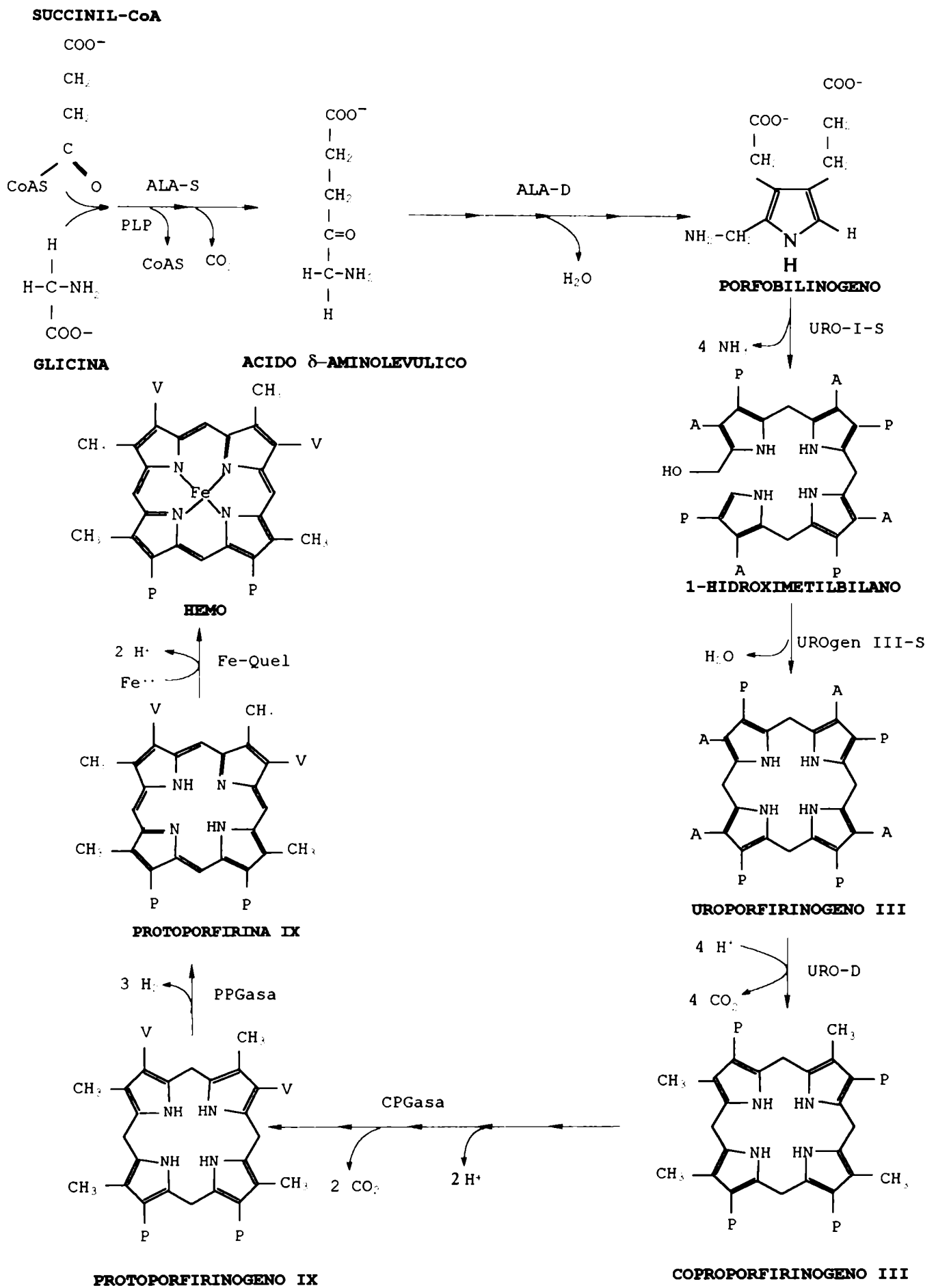


FIGURA I.2: Camino biosintético del hemo.

El primer paso es la condensación de glicina con succinil CoA, ambas moléculas derivadas del ciclo de Krebs, para formar el ácido 5-aminolevúlico (ALA), catalizado por la enzima ALA sintetasa (ALA-S), usando fosfato de piridoxal como cofactor. Esta es la reacción limitante en la biosíntesis del hemo, y es regulada por el pool de hemo libre intracelular. Este paso ocurre en la mitocondria y luego, por transporte activo, el ALA es trasladado al citoplasma (Bermúdez-Moretti et al., 1993), donde la enzima ALA dehidrasa (ALA-D) condensa y cicla dos moléculas del sustrato para dar lugar a la formación del primer intermediario aromático, el monopirrol porfobilinógeno (PBG).

En el paso siguiente se condensan cuatro moléculas de PBG, reacción catalizada por la PBG deaminasa (URO-I-S), formando el tetrapirrol lineal hidroximetilbilano, que luego es isomerizado y ciclado por la isomerasa (UROgen III-S) para formar uroporfirinógeno III (UROgen III).

En ausencia de isomerasa, el hidroximetilbilano puede ciclarse espontáneamente para dar UROgen I, que es biológicamente inactivo y sólo se acumula en el organismo en condiciones patológicas.

La última enzima citosólica es la UROgen decarboxilasa (URO-D), que cataliza la decarboxilación de las cadenas laterales de acetato del UROgen para dar grupos metilos, con la producción de intermediarios de siete, seis, cinco y cuatro carboxilos.

El producto final, de cuatro carboxilos, recibe el nombre de coproporfirinógeno (COPROgen), que reingresa a la mitocondria, y allí la coproporfirinógeno oxidasa (CPGasa) cataliza la decarboxilación oxidativa de dos de los cuatro grupos propionatos de las cadenas laterales, ubicados en las posiciones 2 y 4 de los anillos pirrólicos A y B para dar dos grupos vinilos, formándose el protoporfirinógeno IX (PROTOgen IX).

La PROTOgen oxidasa (PPGasa), que también es mitocondrial, oxida el PROTOgen IX a protoporfirina IX (PROTO IX). El paso final en el camino del hemo es la inserción del hierro en estado ferroso en la PROTO IX, catalizada por la enzima ferroquelatasa (Fe-Quel), para formar hemo.

Para la uroporfirina (URO) y la coproporfirina (COPRO), pueden encontrarse cuatro isómeros posibles: I, II, III y IV, según las posiciones relativas de los sustituyentes acetilo o metilo y propionilo en los carbonos β y β' de los cuatro anillos

pirrólicos. En la naturaleza únicamente se han hallado los isómeros I y III, pero sólo el tipo III es el que lleva finalmente a PROTO IX y hemo; los isómeros I son productos de síntesis anormal en el camino metabólico de las porfirinas (Batlle & Magnin, 1988).

I.3 Regulación de la biosíntesis del hemo.

El 85% del total del hemo se sintetiza en la médula ósea. En los eritroblastos se sabe que el hemo regula la expresión del gen de la globina, la producción y metabolismo de la hemoglobina y el metabolismo y diferenciación de los eritroblastos (Moore et al., 1987).

Se postula que el pool de hemo libre intracelular estaría actuando sobre la densidad del receptor para transferrina, modificando de este modo la incorporación del hierro en las células eritroides (Ponka et al., 1974). También se cree que el hemo inhibe el ALA-S de eritroblastos (Granick & Sassa, 1987).

En hepatocitos, se sabe que el pool de hemo libre controla la actividad de ALA-S. Se calcula que el 65% del ALA-S hepática está destinado a la producción de citocromo P₄₅₀ (Cit P₄₅₀), el 15% a la producción de catalasa, el 6% es para los citocromos mitocondriales y el 8% para cit b. Por lo tanto, la inducción del Cit P₄₅₀ reduce el contenido del hemo en el pool de hemo libre y consecuentemente aumenta la actividad del ALA-S. La administración de hemo exógeno, revierte esta situación, provocando la inactivación de dicha enzima (Moore et al., 1987), además de inhibir la traslocación del ALA-S a la mitocondria (Hayashi et al., 1983).

Paralelamente, el hierro también regula la síntesis del hemo, induciendo al ALA-S, inhibiendo los sistemas de citocromos microsomales y mitocondriales, y catalizando la oxidación de porfirinógenos, modificando así el pool de hemo libre y la síntesis de porfirinas (Bonkowsky, 1991).

I.4 Enzimas del camino biosintético del hemo y su funcionamiento en células neoplásicas.

I.4.1 Acido 5-aminolevúlico dehidrasa y los modificadores de su actividad.

I.4.1.1 Caracterización y propiedades.

La 5-aminolevúlico dehidrasa, también denominada porfobilinógeno sintetasa y 5-aminolevulinato hidrolasa, cataliza la síntesis del primer intermediario aromático de la ruta biosintética del hemo, el PBG, a partir de dos moléculas de ALA.

Esta enzima ha sido aislada, purificada y caracterizada a partir de varias fuentes tanto animales y vegetales como bacterianas (Batlle et al., 1967; Tigier et al., 1970; Nandi & Shemin, 1968; Wilson et al., 1972; Stella & Batlle, 1977; Stella & Batlle, 1978; Jordan & Sheera, 1980; Anderson & Desnick, 1979; Dent et al., 1990; Boese et al., 1991) y cristalizada a partir de hígado bovino (Wu et al., 1974).

Debido a que la enzima anterior en el camino metabólico del Hemo (ALA-S) es particulada, la disponibilidad de sustrato para el ALA-D depende en gran parte del transporte del ALA desde la mitocondria hasta el citosol. Sin embargo, en la mayoría de los organismos, la cantidad y actividad del ALA-D están en exceso comparadas con el resto de las enzimas de esta vía metabólica, y por lo tanto, tendría poca intervención en la regulación de la velocidad de síntesis de porfirinas (Ebbon & Tait, 1969).

El ALA-D es una enzima oligomérica de peso molecular 280.000 daltons, constituida por 8 subunidades similares de peso molecular 35.000 daltons (Wu et al., 1974; Kreutzer et al., 1977). Se ha encontrado que, dependiendo de las condiciones experimentales, puede formar fácilmente agregados consigo misma, dando lugar a la existencia de especies de distinto peso molecular (Stafforini et al., 1980). La estructura mínima necesaria para la actividad es un dímero de peso molecular 70.000 daltons formado por dos tipos de subunidades que, aunque tienen similar composición, juegan distintos roles en la síntesis de PBG (Batlle et al., 1978; Batlle & Stella, 1978).

Es una enzima termoestable y, por ser sulfhidrónica, en la mayoría de los casos requiere la presencia de un activador tiólico como el glutatión, la cisteína, el ditioneitol (DTT) o el β -mercaptoetanol para manifestar su máxima actividad (Coleman, 1966; Nandi & Waygood, 1967; Shemin, 1972; Geisse et al., 1983).

La actividad de esta enzima se pierde rápidamente por exposición al aire debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilos, y por inhibición de estos residuos por reactivos de grupos sulfhidrilos, metales pesados o por desplazamiento del cinc por plomo o por quelación con EDTA (Granick et al., 1973; Finelli et al., 1975; Bevan et al., 1980; Moore et al., 1980b).

Todas las ALA-D de mamíferos requieren Zn^{++} para su actividad (Bevan et al., 1980), mientras que la enzima proveniente de algunas células vegetales y de bacterias, necesitan la presencia del catión bivalente magnesio (Schaumburg et al., 1991; Jaffe et al., 1995)

Jaffe et al. (1984), clarificaron la estequiometría del Zn^{++} /enzima, demostrando que se requieren 4 átomos de cinc por octámero para que la enzima presente su actividad máxima, mientras que habría otros 4 átomos adicionales que no tendrían participación en la reacción.

Se ha postulado que los grupos histidina y lisina del sitio activo de la enzima están involucrados en la unión del cinc al sitio catalítico y que este ión protege a los grupos sulfhidrilos esenciales de la oxidación, probablemente coordinándose con ellos (Tsukamoto et al., 1979; Gibbs & Jordan, 1981; Fukuda et al., 1988; Fukuda et al., 1990). Del análisis de la secuencia nucleotídica del ALA-D de diversas fuentes, se encontró una secuencia conservada que confirma la importancia de dichos aminoácidos para la actividad catalítica de la enzima (Berg, 1986; Schaumburg et al., 1991; Spencer & Jordan, 1993).

El ALA-D es una metaloenzima atípica, ya que durante su purificación se pierde gradualmente el cinc al que se encuentra unida (Kreutzer et al., 1977). Sin embargo, no está totalmente dilucidada la función de este metal, ya que se ha observado que la apo-ALA-D bovina retiene el 80% de la actividad de la holoenzima si se mantienen estrictamente las condiciones anaeróbicas (Tsukamoto et al., 1980). Estos datos son discordantes con los obtenidos por otros autores (Bevan et al.,

1980), que han atribuido esta diferencia a una contaminación con cinc presente en reactivos tales como el DTT.

A diferencia de otras cinc enzimas en las que este metal es reemplazable en sus funciones por cobalto, manganeso, cobre y cadmio, en el ALA-D de mamíferos, sólo el cadmio puede sustituirlo (Bevan et al., 1980; Sommer & Beyersman, 1984).

El plomo ha sido uno de los metales más estudiados tanto *in vitro* como *in vivo* en cuanto a sus efectos sobre el ALA-D (Nakao et al., 1968; Roels et al., 1975; Paredes et al., 1985; Paredes et al., 1986) dado su alto poder inhibitorio sobre la misma, y la frecuente utilización de la medida de la actividad de esta enzima como índice sensible de exposición al plomo.

Surge entonces que, la presencia de cinc y/o de un agente reductor podría conducir a un aumento de la actividad del ALA-D y consecuentemente a una mayor formación de porfirinas a partir de ALA.

I.4.12 Alteraciones del ALA-D en neoplasias.

Por cuanto existen numerosas evidencias sobre la acumulación de porfirinas en algunos tumores malignos (Tio et al., 1957; Thompson et al., 1970; Bengsston & Hardell, 1986; Channigan, 1974; Zawirska, 1978) se ha propuesto que el camino biosintético de los tetrapirroles se encuentra modificado en los pacientes portadores de neoplasias (Batlle & Riley, 1991).

En nuestro laboratorio, Navone et al. encontraron que la biosíntesis de porfirinas se encuentra aumentada en carcinomas mamarios humanos (Navone et al., 1988) y murinos (Navone et al., 1991) comparada con tejido normal.

Así, en pacientes leucémicos se han encontrado diferencias en cuanto a la utilización de ALA y protoporfirina para la síntesis de hemo (Walters et al., 1967), una disminución del ALA-D eritrocitaria (Stella et al., 1988) y un aumento en la actividad de la PBG deaminasa (Epstein et al., 1983).

En algunos tumores hematológicos tales como leucemias linfoblásticas agudas, linfomas Hodgkin y no Hodgkin, se ha observado una disminución de los niveles de ALA-D en sangre

(Kauppinen et al., 1992). En niños con leucemia linfoblástica asociada con porfiria cutánea tardía se observó una disminución del 30-40% en la actividad de ALA-D eritrocitaria (Stella et al., 1988). También estaba reducida en sangre de niños y adultos que sufrían enfermedades linfoproliferativas (Schoenfeld et al., 1988; El-Sharabasky et al., 1992; Kauppinen et al., 1992).

Por el contrario, en otros estudios con células eritroleucémicas K562 de origen humano se encontró que la actividad de esta enzima estaba marcadamente elevada (Hoffman et al., 1980; Chang & Sassa, 1985).

También se vio en una serie de líneas celulares derivadas de hepatomas, que la actividad de esta enzima era mayor que en una serie de líneas derivadas de hígado normal. Además el Km variaba mucho entre las distintas líneas, sugiriendo la existencia de mecanismos regulatorios específicos para cada tipo celular (Kondo et al., 1993).

Aparentemente, la presencia de un tumor no estaría afectando el ALA-D de otros órganos, ya que se vio que la presencia de adenocarcinomas mamarios no inducían cambios en la actividad hepática de esta enzima (Navone et al., 1990b). Estos mismos autores habían encontrado un aumento en la actividad del ALA-D de carcinomas mamarios humanos respecto al tejido mamario normal (Navone et al., 1988).

I.4.2. Porfobilinogenasa.

I.4.21 Caracterización y modificadores de su actividad.

Se ha establecido que para la conversión de PBG en Uroporfirinógenos metabólicamente activos se requieren dos enzimas: la Hidroximetilbilano sintetasa o PBG deaminasa (URO-I-S) y la Uroporfirinógeno III sintetasa (UROgen III-S), isomerasa o cosintetasa.

El complejo enzimático de la deaminasa-isomerasa, se conoce con el nombre de porfobilinogenasa (PBG-asa) (Lockwood & Rimington, 1957).

La deaminasa y la isomerasa se distinguen por su susceptibilidad al calor; mientras que la primera es termoestable, la segunda no lo es.

La deaminasa aislada convierte 4 moléculas de PBG en una del intermediario inestable monopirrólico de cadena abierta, el 1-hidroxi metilbilano (HMB), mediante una condensación repetitiva cabeza-cola (Burton, 1979; Battersby et al., 1983). En ausencia de isomerasa, el HMB se cicla no enzimáticamente para producir el UROgen I, en tanto que, por acción conjunta de la deaminasa y la isomerasa, el anillo D en el tetrapirrol cambia su orientación para formar el intermediario fisiológico UROgen III. La concentración de isomerasa determina la relación UROgen III: I formado, por lo que en la célula, esta enzima se encuentra normalmente en exceso (Rossetti et al., 1980).

La PBG deaminasa es una enzima sulfhidrónica que generalmente se localiza en citoplasma, si bien se ha encontrado actividad en fracciones de particulado de *Euglena gracilis* (Rossetti & Batlle, 1977).

El complejo de la PBG-asa se ha aislado y purificado de células animales, vegetales y bacterianas (Llambías & Batlle, 1971; Higuchi & Bogorad, 1975; Batlle & Rossetti, 1977; Rossetti et al., 1980; Correa-García et al., 1991; Hadener et al., 1993; Juknat et al., 1994; Araujo et al., 1994; Jones & Jordan, 1994).

En todas las fuentes estudiadas la PBG deaminasa parece ser monomérica, con un peso molecular de 40000 ± 6000 Da (Llambías & Batlle, 1971; Jordan & Shemin, 1973; Rossetti et al., 1980).

Asimismo, de una serie de estudios en distintas fuentes, se obtuvieron diferentes comportamientos cinéticos para el complejo PBG-asa según el origen de la enzima: desde la típica cinética michaeliana (Kotler et al., 1987) hasta el alosterismo (Batlle & Rossetti, 1977), con la presencia de por lo menos dos sitios de unión para el sustrato. Se ha observado también cooperatividad positiva o negativa o una combinación entre ambas, sugiriéndose la posibilidad de regulación por sustrato (Sancovich et al., 1969a; Llambías & Batlle, 1970; Llambías et al., 1971).

Al ser la actividad hepática de la deaminasa generalmente baja y en algunos casos cercana al orden de la del ALA sintetasa (Hutton & Gross, 1970), que es la enzima limitante del camino del hemo, se ha propuesto que bajo determinadas condiciones, esta enzima podría ser un punto de control secundario en la síntesis del hemo (Moore et al., 1980a).

Se postuló la presencia de un factor de bajo peso molecular que modifica la actividad de la PBG-asa (Sancovich et al., 1969b; Tephly, 1975). Asimismo, los derivados de grupo pteridilo estimulan su actividad (Piper & Van Lier, 1977; Juknat et al., 1981; Noriega et al., 1992). Este activador podría actuar como una coenzima o como un compuesto que controla la conversión enzimática del PBG a porfirinógenos.

Paralelamente, se demostró en *Euglena gracilis*, la presencia de un factor termoestable de bajo peso molecular, que puede ser reemplazado por el ácido fólico (Juknat et al., 1981). Posteriormente, este factor fue purificado (Juknat et al., 1988a); se comprobó que su estructura correspondía a la de una 6-biopterina (Juknat et al., 1988b) y que regula la actividad de la PBG-asa (Figura I.3).

Por otra parte, surgió la existencia de un sitio de unión para el ácido fólico sobre la PBG deaminasa (Christenson et al., 1986) y se demostró que el agregado de concentraciones del orden de 10^{-7} M de este compuesto producen una activación significativa, equivalente a 2-4 unidades del factor purificado (Juknat et al., 1988a).

Se observó un fenómeno similar con poliglutamatos reducidos, los que actuarían como coenzimas asociadas a la isomerasa de hígado de rata (Piper & Van Lier, 1977).

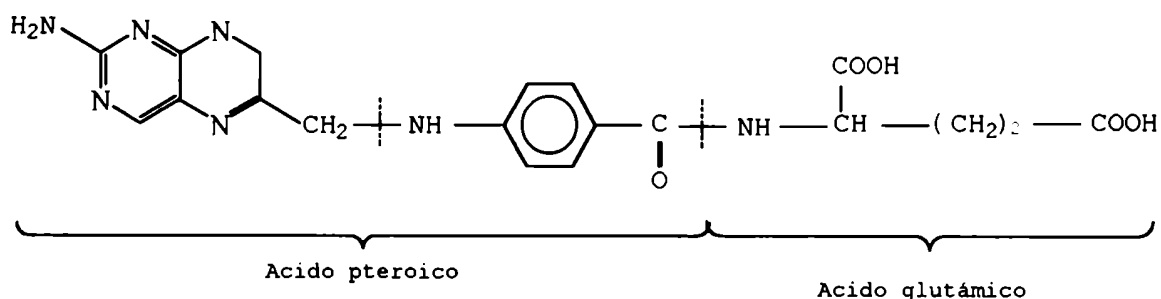


FIGURA I.3: Estructura del ácido fólico

I.4.22 Alteraciones de la PBG-asa en neoplasias

La mayoría de los datos relacionados con las alteraciones de la PBG-asa en neoplasias, se refieren a cambios en la actividad de su componente PBG deaminasa.

Se han observado aumentos en la actividad PBG deaminasa en eritrocitos de pacientes con leucemia linfocítica (Zawirska et al., 1993), en linfocitos de pacientes con desórdenes linfoproliferativos (Schoenfeld et al., 1988; Lahav et al., 1987) y en células mononucleares de pacientes con tumores epiteliales con diseminación metastásica (Leibovici et al., 1988). Incluso se ha propuesto el uso de la actividad enzimática de la PBG deaminasa como un marcador de la progresión del tumor y de su grado de metástasis (Lahav et al., 1987).

También se encontró *in vitro* que la transformación maligna de algunas células, conduce a un aumento en la actividad de la PBG deaminasa (Sassa et al., 1978), aunque se ha propuesto que este incremento se debería al aumento en la tasa de crecimiento más que al proceso de malignización (Schoenfeld et al., 1987).

Por otra parte, se ha sugerido que la porfiria aguda intermitente -desorden metabólico en el cual esta enzima se encuentra disminuida- estaría relacionada con un aumento en el riesgo de desarrollar un cáncer primario de hígado (Hardell et al., 1984). Sin embargo, la actividad PBG deaminasa eritrocitaria no aparecería como un buen marcador para este tipo de neoplasias (Kaczynski et al., 1995).

En nuestro laboratorio, Navone et al. (1991) encontraron que la presencia de tumores extrahepáticos no inducían alteraciones en la actividad de la PBG-asa en este órgano. Estos mismos autores encontraron que en carcinomas de mama humanos, esta enzima estaba aumentada respecto al tejido normal (Navone et al., 1988).

I.5 Catabolismo del hemo: Hemo oxigenasa.

En mamíferos el hemo es clivado en una reacción oxidativa que requiere oxígeno molecular y NADPH, convirtiéndose en biliverdina IX, que a su vez se reduce a bilirrubina IX α por la acción combinada de tres enzimas: NADPH citocromo c reductasa, hemo oxigenasa y biliverdina reductasa. Las dos primeras se localizan en la membrana del retículo endoplasmático, en tanto que la tercera es citosólica (Tenhunen et al., 1970).

A pesar de esta compartimentalización, las tres enzimas actúan en forma conjunta, en la siguiente secuencia: la hemo oxigenasa (Hem-O) se une al hemo con una orientación específica,

y este complejo es reducido por la NADPH citocromo c reductasa.

El complejo hemo-hemoxigenasa, activa el oxígeno molecular, que a su vez ataca al anillo tetrapirrólico para formar un β -hidroxihemo. Este compuesto reacciona con el oxígeno para formar el complejo biliverdina IX α -hierro, que es hidrolizado y reducido por acción de la biliverdina reductasa, que requiere NADPH como donador de hidrógenos (Yoshida & Kikuchi, 1978; Maines & Kappas, 1977), dando lugar a la formación de bilirrubina.

En la mayoría de los invertebrados se excreta la biliverdina, compuesto fácilmente eliminable. En cambio, los mamíferos la transforman en bilirrubina, que es insoluble y altamente tóxica, y que debe conjugarse con ácido glucurónico para poder eliminarse a través de la bilis. En humanos casi el 80% de la bilirrubina excretada proviene del hemo de la hemoglobina, mientras que el resto consiste mayoritariamente en los productos de degradación del Cit P₄₅₀.

La actividad de Hem-O es mayor en tejidos vinculados con la destrucción de los glóbulos rojos, tales como el bazo, hígado y médula ósea, aunque se ha demostrado actividad en todos los tejidos ensayados hasta el momento, tanto en animales superiores (Trakshel et al., 1988a; Trakshel et al., 1988b), como en organismos inferiores (Beall & Cornejo, 1984). A pesar de esta aparente omnipresencia, la actividad de Hem-O varía mucho entre las diversas fuentes.

El pool de hemo libre intracelular, además de controlar su propia síntesis, también está regulando el catabolismo de las porfirinas, actuando sobre el mRNA de la Hem-O (Moore et al., 1987). Inductores del Cit P₄₅₀, así como el hierro en bajas concentraciones inducen un aumento de actividad de la Hem-O, con la consiguiente disminución del pool de hemo libre y posterior aumento de la actividad del ALA-S.

I.6 Alteraciones en el camino del hemo y su relación con los procesos de carcinogénesis

La naturaleza de las alteraciones en el metabolismo del hemo en las células neoplásicas llevó a proponer un modelo (Batlle & Riley, 1991), en el cual dichas alteraciones forman parte del proceso de iniciación de la carcinogénesis.

En este modelo se postula que una lesión genética que afecta la tasa de mutación en un determinado clon, es la responsable del proceso de iniciación de la carcinogénesis (Riley, 1990). Además, la producción intrínseca de especies potencialmente mutagénicas en estas células iniciadas, como por ejemplo el aumento de la concentración intracelular de las especies reactivas del oxígeno (ROS) aumentaría aún más la tasa de mutación.

Se acepta la idea de que las ROS están implicadas en la iniciación y promoción de tumores (Cerutti, 1985), causando daño directo sobre el ADN, activando procarcinógenos y alterando los sistemas celulares antioxidantes.

En este modelo se sugiere que una deficiencia en el sistema de citocromos mitocondriales, con la consiguiente falla en la cadena respiratoria, llevaría a una superproducción de ROS, especialmente radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, y por lo tanto aumentaría el stress oxidativo y el daño al ADN.

Dicha deficiencia de citocromos podría ser la consecuencia de una lesión metabólica que conduce a una reducción en la disponibilidad del hemo o una modificación en la estructura de dicha molécula.

Aunque la inhibición en cualquier paso del camino biosintético de las porfirinas llevaría a las mismas consecuencias metabólicas en cuanto a que reduciría el contenido de hemo celular, se ha prestado particular interés al último paso en la formación de este producto, que consiste en la inserción del hierro en la molécula de PROTO IX, catalizada por la Fe-Quel

Se ha visto que en muchos tumores esta enzima está reducida (Dailey & Smith, 1984; Stout & Becker, 1987; Schoenfeld et al., 1987; Schoenfeld et al., 1988; El Sharabasky et al., 1992; Van Hillesberg et al., 1992), y por lo tanto el hierro y la PROTO acumulados podrían iniciar la transferencia electrónica al oxígeno molecular o a otros sustratos, bajo distintas condiciones, con la generación de ROS (Buettner & Oberley, 1979; Seret et al., 1986; Van Steveninck et al., 1986; Letendre, 1987; Jones et al., 1989).

Es interesante notar que la conocida práctica terapéutica de exponer a niños recién nacidos con exceso de bilirrubina a la iluminación fotosensibilizante, habría contribuido al aumento del 5 al 10% en la incidencia de desórdenes linfoproliferativos infantiles. Las lámparas fluorescentes activarían la molécula de

PROTO, produciendo superóxido y otras ROS, que finalmente dañarían al ADN (Moan & Berg, 1991).

Entonces, la inhibición de la síntesis del hemo llevaría a una deficiencia en los citocromos, con un incremento en la generación de ROS intracelulares, ya sea como producto de la cadena transportadora de electrones, o por la fotoactivación de las porfirinas y las reacciones de Haber-Weis y Fenton (ver más adelante).

Además, ante la presencia de un defecto metabólico en la síntesis del hemo, se esperaría que disminuyese el pool de hemo libre, con la consecuente desregulación y acumulación de porfirinas en la cercanía del punto de bloqueo. Si este punto estuviese en cambio a nivel del ALA-D, el aumento de ROS se podría también deber a la autoxidación del ALA (Hermes-Lima et al., 1991).

Al respecto, cabe notar la correlación existente entre pacientes con tirosinemia hereditaria y hepatomas (Weinberg et al., 1976) y entre la intoxicación crónica con plomo y el cáncer renal, donde también ocurre una inhibición del ALA-D (Sunderman, 1984; Searle & Teale, 1990).

Una reducción en el pool de hemo libre podría afectar la síntesis de otras hemoproteínas, especialmente el Cit P₄₅₀, cuya concentración está habitualmente muy reducida, y a veces ausente en células tumorales (Navone et al., 1990a; Searle & Teale, 1990), y de importantes enzimas antioxidantes tales como la catalasa (Adamson & Fants, 1961; Tisdale & Mahmoud, 1983), la superóxido dismutasa y otras que están también generalmente disminuidas en los tumores (Tisdale & Mahmoud, 1983; Sun et al., 1989).

Los cambios principales predichos por este modelo están esquematizados en la Figura I.4. Las modificaciones principales son: 1) La disminución de la disponibilidad de citocromos, lo cual incrementaría la producción mitocondrial de ROS, además de disminuir los niveles de Cit P₄₅₀ y otras enzimas, como la catalasa y las peroxidasas; 2) acumulación de porfirinas, debido a la falta de retroalimentación negativa; 3) disminución de la inserción del hierro en la molécula de hemo, aumentando los niveles intracelulares de este metal que, vía reacción de Fenton, aumentaría la concentración de ROS en la célula; y 4) como consecuencia del rol del Cit P₄₅₀ en la iniciación de la peroxidación lipídica (LPO), la disminución de este compuesto provocaría una menor producción de HO· en las membranas

microsomales, y por lo tanto, un bajo nivel de LPO, característico de las células tumorales (Cheesman et al., 1986).

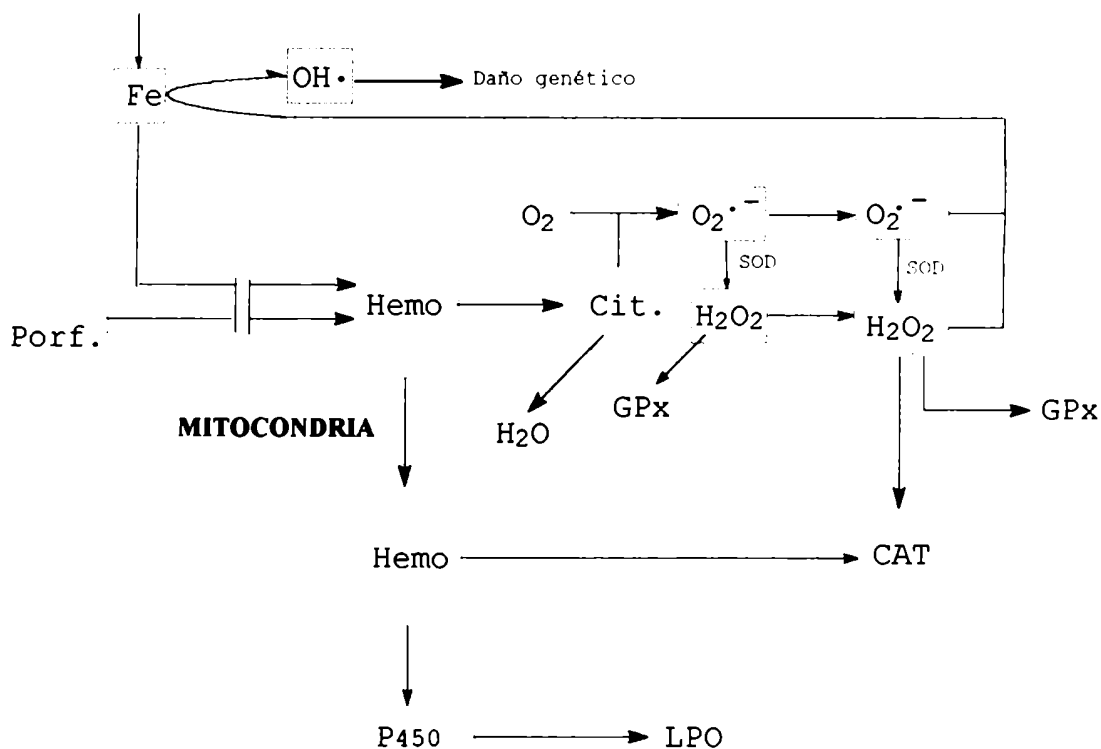


Figura 1.4: Representación esquemática de los efectos de un bloqueo en la síntesis del hemo al nivel de la ferroquelatasa. Modelo propuesto por Batlle (1993).

Como consecuencia de un bloqueo en la Fe-Quel se produce una disminución en la síntesis del hemo con la consiguiente acumulación de porfirinas y aumento en la concentración de ROS, en particular de OH·, que interactúa con el ADN, aumentando la tasa de mutación celular.

Abreviaturas: Cit. (citocromos mitocondriales); Porf. (porfirinas); LPO (peroxidación lipídica); P450 (citocromo P450); CAT (catalasa); GPx (glutathion peroxidasa); ROS (O₂·⁻; H₂O₂; OH·); SOD (superóxido dismutasa).

Este modelo, que predice que la tasa de mutación somática y por ende la incidencia de cáncer sería mayor en células con deficiencias hereditarias o adquiridas de la síntesis del hemo, parece confirmarse para un amplio rango de porfirias (Kile & Dameshek, 1964; Donaldson et al., 1967; Bengston & Hardell, 1986; Kauppinen & Mustajoki; 1988; Stella et al., 1988; Gluber et al., 1990). Por lo tanto, se postula que las porfirias estarían asociadas a un riesgo incrementado de desarrollar neoplasias.

En conclusión, el rol central que juegan las hemoproteínas en el metabolismo del oxígeno, hace que la disminución en la biosíntesis del hemo sea un posible candidato en la iniciación de la carcinogénesis y, de confirmarse esta hipótesis, se podrían elaborar estrategias para la detección de lesiones premalignas y para interferir en el proceso de malignización de las células iniciadas.

I.7 Referencias

- Adamson, R. & Fants, J. The metabolism of drugs by hepatic tumors. *Cancer Res.*, 21: 67-72 (1961).
- Anderson, P. & Desnick, R. Purification and properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 254: 6924-6930 (1979).
- Araujo, L.; Lombardo, E. & Batlle, A. Inhibition of porphobilinogenase by porphyrins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.*, 26: 1377-1381 (1994).
- Batlle, A. The importance of prebiotic porphyrins in biopoiesis. *Int. J. Unit. Sci.*, 2: 299-312 (1989).
- Batlle, A. & Rossetti, M. Enzyme polymerization of porphobilinogen into uroporphyrinogens. *Int. J. Biochem.*, 8: 251-267 (1977).
- Batlle, A. & Stella, A. Delta aminolevulinic acid dehydratase: its mechanism of action. *Int. J. Biochem.*, 9: 861-864 (1978).
- Batlle, A. & Magnin, P. Biosíntesis del hemo. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.*, 2: 3-36 (1988).
- Batlle, A. & Riley, P. A. Abnormality of heme synthesis as the initial lesion in carcinogenesis. *Cancer J.*, 4: 326-331 (1991).
- Batlle, A.; Ferramola, A. & Grinstein, M. Purification and general properties of 5-aminolaevulic acid dehydratase from cow liver. *Biochem. J.*, 104: 244-249 (1967).
- Batlle, A.; Stella, A.; Ferramola, A.; Sopena, Y.; Wider, E. & Sancovich, H. Porphyrin biosynthesis-Immobilized enzymes and ligands- X. A novel approach to the study of the relationship between the quaternary structure of aminolevulinic acid dehydratase and its activity. *Int. J. Biochem.*, 9: 401-406 (1978).
- Battersby, A.; Fookes, C.; Matcham, G.; McDonald, E. & Hollenstein, R. Biosynthesis of porphyrins and related macrocycles. Part 20. Purification of deaminase and studies on its mode of action. *J. Chem. Soc. Pekin Trans.*, 1: 3031-3040 (1983).
- Beall, S. & Cornejo, J. Enzymatic heme oxygenase activity in soluble extracts of the unicellular red alga *C. caldarium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 235: 371-384 (1984).
- Bengtsson, N. & Hardell, I. Porphyrins, porphyrias and hepatocellular cancer. *Br. J. Cancer*, 54: 115-117 (1986).
- Berg, J. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science*, 232: 485-487 (1986).
- Bermúdez Moretti, M.; Correa García, S.; Stella, C.; Ramos, E. & Batlle, A. 5-aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.*, 25: 1917-1924 (1993).
- Bevan, D.; Bodlaender, P. & Shemin, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{+2} for enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, 255: 2030-2035 (1980).
- Blumer, M. Evidence for isomerism in fossil porphyrins of 420-504 molecular weight. *Ann. Acad. Brasil. Cienc.*, 46: 77-81 (1974).
- Boese, Q.; Spano, A.; Li, J. & Timko, M. Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an

unusual metal binding domain in the plant enzyme. *J. Biol. Chem.*, 266: 17060-17066 (1991).

Bonkowsky, H. Key relationship of hepatic heme and iron metabolism: new insights into functions of two old molecules, *en Viewpoints on digestive diseases*. Boston, MA, p. 23: 4 (1991).

Buettner, G. & Oberley, L. Superoxide formation by protoporphyrin as seen by spin trapping. *FEBS Lett.*, 98: 18-20 (1979).

Burton, G.; Fagerness, P.; Hosozawa, S.; Jordan, P. & Scott, A. ¹³C.n.m.r. Evidence for a new intermediate, pre-uroporphyrinogen, in the enzymic transformation of porphobilinogen into uroporphyrinogens I and II. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 202-204 (1979).

Cerutti, P. Peroxidant states and tumor promotion. *Science*, 227: 375-381 (1985).

Chang, C. & Sassa, S. 5-aminolevulinic acid dehydrase in human erythroleukemia cells: an immunologically distinct enzyme. *Blood*, 65: 936-938 (1985).

Chanmigan, D. Choriocarcinoma associated with porphobilinogenuria. A case report. *Ind. J. Cancer*, 11: 108-109 (1974).

Cheesman, K.; Collins, M.; Proudfoot, K.; Slater, T.; Burton, G.; Webb, A. & Ingold, K. Studies on lipid peroxidation in normal and tumor tissues. The Novikoff rat liver tumour. *Biochem. J.*, 235: 507-514 (1986).

Christenson, W.; Reddy, V. & Piper, W. Reversal of sulfamerazine inhibition of rat hepatic uroporphyrinogen synthesis by folic acid. *Life Sci.*, 38: 1679-1684 (1986).

Coleman, D. Purification and properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from tissues of two strains of mice. *J. Biol. Chem.*, 241: 5511-5517 (1966).

Cookson, G. & Rimington, C. Porphobilinogen. *Chemical constitution*. *Nature*, 171: 875-876 (1953).

Correa García, S.; Rossetti, M & Batlle, A. Studies on porphobilinogen-deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.*, 46: 1017-1023 (1991).

Dailey, H. & Smith, A. Differential interaction of porphyrins used in photodynamic therapy with ferrochelatase. *Biochem. J.*, 223: 441-445 (1984).

Dent, A.; Beyersmann, D.; Black, C. & Hasnain, S. Two different sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended x-ray absorption fine structure. *Biochemistry*, 29: 7822-7829 (1990).

Donaldson, E.; Donaldson, A. & Rimington, C. Erythropoietic protoporphyria, a family study. *Br. Med. J.*, 1: 659-663 (1967).

Ebbon, J. & Tait, G. Studies on 5-adenosylmethionine-magnesium protoporphyrin methyltransferase in *Euglena gracilis* strain. *Biochem. J.*, 111: 573-582 (1969).

El-Sharabasky, M.; El-Waseef, A.; Hafez, M. & Salim, S. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br. J. Cancer*, 65: 409-412 (1992).

Epstein, O.; Laharre, M.; Schoenfeld, N.; Nemesh, L.; Shaklai, M. & Astman, A. Erythrocyte uroporphyrinogen synthetase activity as

a possible diagnostic aid in the diagnosis of lymphoproliferative disease. *Cancer*, 20: 828-832 (1983).

Finelli, V., Klauder, D.; Karaffa, M. & Petering, H. Interaction with zinc and lead on 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65: 303-311 (1975).

Fukuda, H.; Paredes, S. & Batlle, A. Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by Zn^{2+} ions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91: 285-291 (1988).

Fukuda, H.; Sopena, Y.; Iñigo, L.; Paredes, S.; Ferramola, A.; Sancovich, H. & Batlle, A. Further evidence for an essential histidyl residue at the active site of pig liver 5-aminolevulinic acid dehydratase. *J. Enzyme Inhibition*, 3: 295-302 (1990).

Geisse, S.; Briller, H. & Doss, M. Porphobilinogen synthase (5-aminolevulinic acid dehydratase) activity in human erythrocytes; reactivation with zinc and dithiotreitol depending on influence of storage. *Clin. Chim. Acta*, 135: 239-245. (1983).

Gibbs, P. & Jordan, P. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: Zinc-65 binding and exchange with the enzyme from human erythrocytes. *Biochem. Soc. Trans.*, 9: 232-233 (1981).

Gluber, J.; Bargetzi, M. & Meyer, U. Primary liver carcinoma in two sisters with acute intermittent porphyria. *Am. J. Med.*, 89: 540-541 (1990).

Granick, S. & Bogorad, L. Porphobilinogen a monopyrrole. *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 3610 (1953).

Granick, S. & Sassa, S. Hemin control of heme biosynthesis in mouse Friend erythroleukemia cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 253: 5402-5406 (1987).

Granick, J.; Sassa, S.; Granick, S.; Levere, R. & Kappas, A. Studies in lead poisoning. II. Correlation between the ratio of activated to inactivated 5-aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level. *Biochem. Med.*, 8: 149-159 (1973).

Hadener, A.; Matzinger, P.; Malashkevich, V.; Louie, G.; Wood, S.; Oliver, P.; Alefounder, P.; Pitt, A.; Abell, C. & Battersby, A. Purification, characterization, crystallisation and X-ray analysis of selenomethionine-labelled hydroxymethylbilane synthase from *Escherichia Coli*. *Eur. J. Biochem.*, 211: 6115-6124 (1993).

Hardell, L.; Bengtsson, N. & Jonsson, U. Aetiological aspects on primary liver cancer with special regard to alcohol, organic solvents and acute intermittent porphyria. An epidemiological investigation. *Br. J. Cancer*, 50: 389-397 (1984).

Hayashi, N.; Watanabe, G. & Kikuchi, G. Inhibition by hemin of *in vivo* translocation of chicken liver 5-aminolevulinic acid synthase in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115: 700-706 (1983).

He, D.; Sassa, S. & Lim, H. Effect of UVA and blue light on porphyrin biosynthesis in epidermal cells. *Photochem. Photobiol.*, 57: 825-829 (1993).

Hedgens, W.; Lütz, C. & Schneider, A. Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*. *Eur. J. Biochem.*, 135: 75-39 (1983).

Hermes-Lima, M.; Valle, V.; Vercesi, A. & Bechara, E. Damage to rat liver mitochondria promoted by delta aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute

- intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1056: 57-63 (1991).
- Higuchi, M. & Bogorad, L. The purification and properties of uroporphyrinogen I synthase and uroporphyrinogen II co-synthetase. Interactions between the enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 24: 401-408 (1975).
- Hoffman, R.; Ibrahim, N.; Murnane, J.; Diamond, A.; Forget, B. & Levere, R. Hemin control of heme biosynthesis and catabolism in human leukaemia cell line. *Blood*, 56: 1567-1569 (1980).
- Hutton, J. & Gross, S. Chemical induction of hepatic porphyrin inbred strains of mice. *Arch. Biochem. Biophys.*, 141: 284-292 (1970).
- Jaffe, E.; Salowe, S.; Chen, N. & De Haven, P. Porphobilinogen synthase modification with methylmethanthsulfonate. A protocol for the investigation of metalloproteins. *J. Biol. Chem.*, 259: 5032-5036 (1984).
- Jaffe, E.; Ali, S.; Mitchell, L.; Volin, M. & Markham, G. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. *Biochemistry*, 34: 244-251 (1995).
- Jones, S. & Jordan, P. Purification and properties of porphobilinogen deaminase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.*, 299: 895-902 (1994).
- Jones, S.; Riley, P. & Willson, R. Hydrogen peroxide cytotoxicity. *Biochem. J.*, 264: 651-655 (1989).
- Jordan, P. & Shemin, D. Purification of uroporphyrinogen I synthetase from *Rp. spheroides*. *J. Biol. Chem.*, 248: 1019-1024 (1973).
- Jordan, P. & Sheera, J. ¹³C NMR as a probe for the study of enzyme-catalysed reactions. Mechanism of action of 5-aminolevulinic acid dehydratase. *FEBS Lett.*, 114: 283-286 (1980).
- Juknat, A.; Rossetti, M. & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis in *Euglena Gracilis*. IV. An endogenous factor controlling the enzymic synthesis of porphyrinogens and its possible role in the treatment of some porphyrias. *Int. J. Biochem.*, 13: 343-353 (1981).
- Juknat, A.; Dörnemann, D. & Senger, H. Biosynthesis of porphyrinogens in etiolated *Euglena gracilis* Z. I. Isolation and purification of an endogenous factor, stimulating the formation of porphyrinogens. *Z. Naturforsch.*, 43: 351-356 (1988a).
- Juknat, A.; Dörnemann, D. & Senger, H. Biosynthesis of porphyrinogens in etiolated *Euglena gracilis* Z. II. Identification of a regulatory pteridine. *Z. Naturforsch.*, 43: 357-362 (1988b).
- Juknat, A.; Dörnemann, D. & Senger, H. Purification and kinetic studies on a porphobilinogen deaminase from the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Planta*, 193: 123-130 (1994).
- Kaczynski, J.; Hansson, G.; Thunell, S.; Wetterberg, L. & Wallerstedt, S. Erythrocyte porphobilinogen deaminase activity and primary liver cancer. *Am. J. Med.*, 237: 309-313 (1995).
- Kauppinen, R. & Mustajoki, P. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*, 57: 117-120 (1988).

- Kauppinen, R.; Peltonen, L.; Pihlaja, H. & Mustajoki, P. CRIM-positive mutations of acute intermittent porphyria in Finland. *Hum. Mutat.*, 1: 392-396 (1992).
- Kile, R. & Dameshek, W. Porphyria cutanea tarda associated with chronic granulocytic leukemia treated with busulfan. *Blood*, 23: 776-786 (1964).
- Kolesnikov, M. & Egorov, I. Porphyrins and phycobilins in precambrian rocks. *Orig. Life*, 8: 383-390 (1977).
- Kondo, M.; Hirota, N.; Takaoka, T. & Kajiwara, M. Heme-biosynthetic enzyme activities and porphyrin accumulation in normal liver and hepatoma cell lines of rat. *Cell Biol. Toxicol.*, 9: 95-105 (1993).
- Kotler, M.; Fumagalli, S.; Juknat, A. & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. IX. PBG deaminase. Kinetic studies. *Int. J. Biochem.*, 19: 981-985 (1987).
- Kreutzer, M.; Schmidt, M.; Stadler, E. & Zeitler, H. Purification and characterization of animal porphobilinogen synthases. I. Bovine liver porphobilinogen synthase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358: 1081-1091 (1977).
- Lahav, M.; Epstein, O.; Schoenfeld, N.; Shaklai, M. & Atsmon, A. Increased porphobilinogen deaminase activity in patients with malignant lymphoproliferative diseases. A helpful diagnosis test. *JAMA*, 257: 39-42 (1987).
- Leibovici, L.; Schoenfeld, N.; Yehoshua, H.; Mamet, R.; Rakowsky, E.; Shindel, A. & Atsmon, A. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer*, 62: 2297-2300 (1988).
- Letendre, E. Iron metabolism during infection and neoplasia. *Cancer metastasis Rev.*, 6: 41-53 (1987).
- Llambías, E. & Batlle, A. Negative homotropic kinetics of soybean callus porphobilinogen deaminase. Uroporphyrinogen III cosynthetase. *FEBS Lett.*, 9: 180-182 (1970).
- Llambías, E. & Batlle, A. Studies on porphobilinogen deaminase-uroporphyrinogen III cosynthetase system of cultured soybean cells. *Biochem. J.*, 121: 327-340 (1971).
- Llambías, E.; Locascio, G. & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis. IX. Porphobilinogen deaminase -Uroporphyrinogen III cosynthetase from avian erythrocytes. *Anal. Asoc. Quim. Arg.*, 59: 271-278 (1971).
- Lockwood, W. & Rimington, C. Purification of an enzyme converting porphobilinogen into uroporphyrinogen. *Biochem. J.*, 67: 8 (1957).
- Maines, M. & Kappas, A. Enzymatic oxidation of cobalt protoporphyrin IX. Observations on the mechanism of heme oxygenase action. *Biochemistry*, 16: 419-423 (1977).
- Malik, Z.; Ehrenberg, B. & Faraggi, A. Inactivation of erythrocytic, lymphocytic and myelocytic leukemic cells by photoexcitation of endogenous porphyrins. *Photochem. Photobiol.*, 4: 195-205 (1989).
- Meissner, P.; Adams, P. & Kirsh, R. Allosteric inhibition of human lymphoblast and purified porphobilinogen deaminase by protoporphyrinogen and coproporphyrinogen. A possible mechanism for the acute attack of variegate porphyria. *J. Clin. Invest.*, 91: 1436-1444 (1993).

- Mercer Smith, J. & Mauzerall, D. Molecular hydrogen production by uroporphyrin and coproporphyrin. A model for the origin of photosynthetic function. *Photochem. Photobiol.*, 34: 407-410 (1981).
- Moan, J. & Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the life time of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 53: 549-553 (1991).
- Moore, M.; McColl, K. & Goldberg, A. The activities of the enzymes of haem biosynthesis in the porphyrias during treatment of acute intermittent porphyria. *Int. J. Biochem.*, 12: 941-946 (1980a).
- Moore, M.; Meredith, P. & Goldberg, A. Lead and heme biosynthesis, en Lead toxicity, Eds. Singhal & Thomas. Urban & Schwarzenberg. Baltimore, Munich, p. 79-117 (1980b).
- Moore, M.; McColl, K.; Rimington, C. & Goldberg, A. Porphyrins and enzymes of the heme biosynthetic pathway, en Disorders of porphyrin metabolism. Plenum. New York, p. 21-116 (1987).
- Nakao, K.; Wada, O. & Yano, Y. 5-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning. *Clin. Chim. Acta*, 19: 319-325 (1968).
- Nandi, D. & Waygood, E. Biosynthesis of porphyrins in wheat leaves. II. 5-aminolaevulinate hydro-lyase. *Can. J. Biochem.*, 45: 327-336 (1967).
- Nandi, D. & Shemin, D. Delta aminolevulinic acid dehydratase of *Rh. Spheroides*. III. Mechanism of porphobilinogen synthesis. *J. Biol. Chem.*, 243: 1236-1242 (1968).
- Navone, N.; Frisardi, A.; Resnik, E.; Batlle, A. & Polo, C. Porphyrin biosynthesis in human breast cancer. Preliminary mimetic *in vitro* studies. *Med. Sci. Res.*, 16: 61-62 (1988).
- Navone, N.; Polo, C.; Dinger, R. & Batlle, A. Heme regulation in mouse mammary adenocarcinoma. I. Effect of allyl isopropyl acetamide and veronal on ALA-S, cyt P₄₅₀ and cytochrome oxidase. *Int. J. Biochem.*, 22: 1005-1008 (1990a).
- Navone, N.; Polo, C. Frisardi, A. & Batlle, A. Mouse mammary carcinoma ALA-D. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 96: 729-731 (1990b).
- Navone, N.; Polo, C.; Frisardi, A. & Batlle, A. Mouse mammary carcinoma PBGase and hydroxymethylbilane synthetase. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 98: 67-71 (1991).
- Neuberger, A. & Scott, J. Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis. *Nature*, 172: 1093-1094 (1953).
- Noriega, G.; Juknat, A. & Batlle, A. Non-essential activation of rat liver porphobilinogen-deaminase by folic acid. *Z. Naturforsch.*, 47: 416-419 (1992).
- Paredes, S.; Juknat, A.; Batlle, A. & Conti, H. Beneficial effect of S-adenosyl-L-methionine in lead intoxication: Another approach to clinical therapy. *Int. J. Biochem.*, 17: 625-629 (1985).
- Paredes, S.; Fukuda, H.; Kozicki, P.; Rossetti, M.; Conti, H. & Batlle, A. S-Adenosyl-L-methionine and lead intoxication: its therapeutic effect varying the route of administration. *Toxicol. and Env. Safety*, 12: 252-260 (1986).
- Piper, W. & Van Lier, R. Pteridine regulation of inhibition of hepatic uroporphyrinogen I synthetase by lead chloride. *Molec. Pharmacol.*, 13: 1126-1135 (1977).

- Ponka, P.; Borova, J. & Neuwert, J. The role of heme in the release of iron from transferrin in reticulocytes. *Enzyme*, 17: 91-99 (1974).
- Riley, P. A. Is the initial event in carcinogenesis an enhancement of the mutation rate? *Free Rad. Res. Commun.*, 11: 59-63 (1990).
- Rimington, C. & Krol, C. Decarboxylation of porphobilinogen- and iso-porphobilinogen- α -carboxylic acids. *Nature*, 175: 630-631 (1955).
- Roels, H.; Buchet, J.; Lauwerys, R. & Sonnet, J. Comparison of *in vivo* effect of inorganic lead and cadmium on glutathione reductase system and δ -aminolevulinate dehydratase in human erythrocytes. *Br. J. Ind. Med.*, 32: 181-191 (1975).
- Rossetti, M. & Batlle, A. Polypyrrole intermediates in porphyrin biosynthesis. Studies with *Euglena gracilis*. *Int. J. Biochem.*, 8: 277-283 (1977).
- Rossetti, M.; Juknat, A.; Kotler, M.; Fumagalli, S. & Batlle, A. Occurrence of multiple molecular forms of porphobilinogenase in diverse organisms: The minimum quaternary structure of porphobilinogenase is a protomer of one deaminase and one isomerase domain. *Int. J. Biochem.*, 12: 761-767 (1980).
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. The porphobilinogen deaminase uroporphyrinogen III cosynthetase system (porphobilinogenase) from bovine liver. Kinetic studies. *FEBS Lett.*, 3: 223-226 (1969a).
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. Porphyrin biosynthesis-VI. Separation and purification of porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen isomerase from cow liver. Porphobilinogenase as an allosteric enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 191: 130-143 (1969b).
- Sassa, S.; Zalar, G. & Kappas, A. Studies on porphyria. VII. Induction of uroporphyrinogen I synthase and expression of the gene defect of acute intermittent porphyria in mitogen-stimulated human lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 61: 499-508 (1978).
- Schaumburg, A.; Schneider-Poetsch, A. & Eckerskorn, C. Characterization of plastid 5-aminolevulinate dehydratase (ALAD ecc 4.2.1.24) from Spinach (*Spinacia-Oleracea*) by sequencing and comparison with non-plant ALAD enzymes. *Z. Naturforsch.*, 47: 77-84 (1991).
- Schoenfeld, N.; Mamet, R.; Epstein, O.; Lahav, M.; Lurie, Y. & Atsmon, A. The heme biosynthetic pathway in the regenerating rat liver. The relation between enzymes of heme synthesis and growth. *Eur. J. Biochem.*, 166: 663-666 (1987).
- Schoenfeld, N.; Epstein, O.; Lahav, M.; Mamet, R.; Shaklai, M. & Atsmon, A. The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett.*, 43: 43-48 (1988).
- Schoenfeld, N.; Mamet, R.; Nordenberg, Y.; Shafran, M.; Babushkin, T. & Malik, Z. Protoporphyrin biosynthesis in melanoma B16 cells stimulated by 5-aminolevulinic acid and chemical inducers: characterization of photodynamic inactivation. *Int. J. Cancer*, 56: 106-112 (1994).
- Searle, C. & Teale, O. Occupational carcinogenesis, en Handbook of experimental pharmacology. Ed. Grover. Springer. Berlin, p. 103-151 (1990).

- Seret, A.; Gandin, E. & Van der Vorst, A. Singlet oxygen production by UV and visible photoexcited porphyrins under different states of aggregation. *Photochem. Photobiol.*, 12: 259-266 (1986).
- Shemin, D. & Russel, C. δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 4873-4874 (1953).
- Shemin, D. δ -Aminolevulinic acid dehydratase, en *The enzymes*, 3rd edn. Ed. Boyer P. Academic Press. New York, p. 7: 322-337 (1972).
- Sommer, R. & Beyersmann, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic and ^{113}Cd -nmr studies. *J. Inorg. Biochem.*, 20: 131-145 (1984).
- Spano, A. & Timko, M. Isolation, characterization and partial aminoacid sequence of a chloroplast-localized porphobilinogen deaminase from pea (*Pisum sativum* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1076: 29-36 (1991).
- Spencer, P. & Jordan, P. Purification and characterization of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and a study of the reactive thiols at the metal-binding domain. *Biochem. J.*, 290: 279-287 (1993).
- Stafforini, D.; Polo, C.; Stella, A.; Wider, E. & Batlle, A. Pig liver aminolevulinic acid dehydratase. II. Studies on different conditions influencing its molecular weight determination. *Int. J. Biochem.*, 12: 757-760 (1980).
- Steinbach, P.; Weingandt, H.; Baumgartner, R.; Kriegmair, M.; Hofstädter, F. & Knüchel, R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.*, 5: 887-895 (1995).
- Stella, A. & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis. Immobilized enzymes and ligands. V. Purification of aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver by affinity chromatography. *Int. J. Biochem.*, 8: 353-358 (1977).
- Stella, A. & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis. Immobilized enzymes and ligands. VII. Studies on the purification of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Euglena gracilis*. *Plant Sci. Lett.*, 11: 87-92 (1978).
- Stella, A.; Melito, V.; Parera, Cohan, R.; Hoyo, O.; García Díaz, R.; Pierini, A.; Ferraris, J. & Batlle, A. Acerca de dos nuevos casos de porfiria cutánea tardía infantil en una niña con leucemia y en un niño hemodializado en tratamiento con S-adenosil-L-metionina. Aspectos bioquímicos. *Rev. Argent. Dermatol.*, 69: 118-124 (1988).
- Stout, D. & Becker, F. Heme enzymes patterns in rat liver nodules and tumors. *Cancer Res.*, 47: 963-966 (1987).
- Stout, D. & Becker, F. Heme enzymes synthesis in normal mouse liver and mouse liver tumors. *Cancer Res.*, 50: 2337-2340 (1990).
- Sun, Y.; Overley, L.; Elwell, J. & Sierra Rivera, E. Antioxidant enzymes in normal and transformed mouse liver cells. *Int. J. Cancer*, 44: 1028-1033 (1989).
- Sunderman, F. Recent advances in metal carcinogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 14: 93-122 (1984).

- Tenhunen, R.; Marver, H. & Smith, R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: Stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.*, 75: 410-421 (1970).
- Tephly, T. Identification of a small molecular weight substance that protects uroporphyrinogen I synthetase from the inhibition by lead, en Porphyrin in human diseases. Report of the discussions. Eds. Doss, M. & Nawrocki, P. 128-134 (1975).
- Thompson, R.; Nicholson, D.; Farnan, T.; Whitmore, D. & Williams, B. Cutaneous porphyria due to a malignant primary hepatoma. *Gastroenterology*, 59: 779-783 (1970).
- Tigier, H.; Battle, A. & Locascio, G. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties of delta aminolaevulinic acid dehydratase. *Enzymologia*, 138: 43-56 (1970).
- Tio, T.; Leijnse, B.; Jarrett, A. & Rimington, C. Acquired porphyria from a liver tumour. *Clin. Sci.* 16: 517-527 (1957).
- Tisdale, M. & Mahmoud, B. Activities of free radicals metabolizing enzymes in tumors. *Br. J. Cancer*, 47: 809-812 (1993).
- Trakshel, G.; Kutty, R. & Maines, M. Resolution of the rat heme oxygenase activity: absence of a detectable amount of the inducible form (HO-1). *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 732-739 (1988a).
- Trakshel, G.; Kutty, R. & Maines, M. Cadmium-mediated inhibition of testicular heme oxygenase activity: the role of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 732-739 (1988b).
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in the delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 570: 167-178 (1979).
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, Y. & Sano, S. Zinc and histidine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Int. J. Biochem.*, 12: 751-756 (1980).
- Van Hillesberg, R.; Van der Berg, J.; Wort, W.; Terpstra, O. & Willson, J. Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterology*, 103: 647-651 (1992).
- Van Steveninck, J.; Tussen, K.; Boegheim, J.; Van der Zee, J. & Dubbelman, T. Photodynamic generation of hydroxyl radicals by hematoporphyrin derivative and light. *Photochem. Photobiol.*, 44: 711-716 (1986).
- Walters, T.; Welland, F.; Gribble, T. & Schwartz, H. Biosynthesis of heme in leucocytes. *Cancer*, 20: 1117-1122 (1967).
- Weinberg, A.; Mize, C. & Morten, H. The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia. *J. Pediatrics*, 88: 434-438 (1976).
- Wilson, E.; Burger, P. & Dowdle, E. Beef-liver 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Eur. J. Biochem.*, 29: 563-571 (1972).
- Wu, W.; Shemin, D.; Richards, K. & Williams, R. The quaternary structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 1767-1770 (1974).

Yoshida, T. & Kikuchi, G. Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal heme oxygenase system. *J. Biol. Chem.*, 253: 4230-4236 (1978).

Yoshinaga, T. Sassa, S.; Kappas, A. A comparative study of heme degradation by NADPH-cytochrome c reductase alone and by the complete heme oxygenase degradation system. Distinctive aspects of heme degradation by NADPH-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.*, 257: 7794-7802 (1981).

Zawirska, B. Visceral porphyrins in circulatory disorders and tumor disease in humans. *Mater. Med. Pol.*, 35: 112-118 (1978).

Zawirska, B.; Usnarska-Kubkiewicz, L. & Gamian, E. Porphobilinogen deaminase activity in malignant proliferative disorders of the lymphatic system and bone marrow. *Pathol. Pol.*, 44: 13-17 (1993).

CAPITULO II

TERAPIA FOTODINAMICA

II.1 Su historia.....	27
II.2 Las porfirinas en la fotodetección de tumores.....	28
II.3 Las porfirinas como fotosensibilizantes.....	30
II.3.1 Toxicidad.....	32
II.3.1.1 Toxicidad fotodinámica de las porfirinas.....	32
II.3.1.2 Toxicidad de las porfirinas en la oscuridad.....	32
II.3.2 Farmacocinética.....	33
II.3.3 Mecanismos de acumulación de las porfirinas en los tumores.....	34
II.3.4 Fotoquímica.....	35
II.3.5 Sitios celulares y subcelulares blanco de la TFD.....	39
II.4 Fuentes y sistemas de aplicación de la luz.....	42
II.4.1 Fuentes de luz.....	42
II.4.2 Sistemas de aplicación.....	43
II.4.3 Intensidad de luz.....	44
II.5 Experiencia clínica.....	45
II.6 Combinación de la TFD con otras terapias.....	47
II.7 Fotosensibilizantes de segunda generación.....	49
II.8 Referencias.....	52

II. TERAPIA FOTODINAMICA.

II.1 Su historia.

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento antineoplásico sumamente prometedor para tumores superficiales localizados o sólidos, y se basa en la acumulación preferencial de un fotosensibilizante en el tejido maligno luego de su administración, generalmente sistémica. La iluminación subsecuente con una luz de una longitud de onda adecuada, da lugar a una reacción fotoquímica que resulta en la destrucción selectiva del tejido tumoral (Figura II.1).

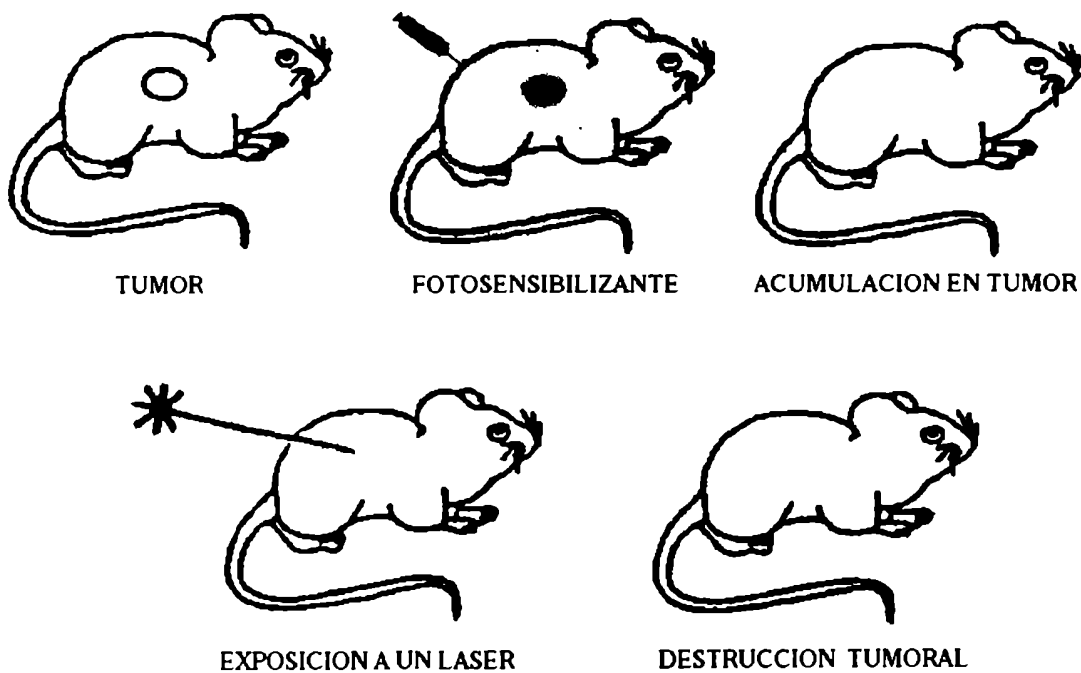


FIGURA II.1: Principios básicos de la Terapia Fotodinámica.

Luego de la administración sistémica, el fotosensibilizante se acumula en el tumor. La exposición posterior a una luz de longitud de onda apropiada genera especies reactivas que comienzan una reacción fotodinámica, que culmina con la destrucción del tumor.

La primera observación de sensibilización química de un tejido fue descrita en 1900 por Raab (1900). El concepto básico de la TFD data de 1903, cuando Tappeiner y Jesionek (1903) usaron eosina aplicada tópicamente y luz solar para tratar pacientes con cáncer de piel. Diez años más tarde, Meyer-Betz (1913) se

autoadministró Hematoporfirina con el objeto de determinar sus efectos biológicos.

En 1942, Auler y Banzer ya habían observado la particular afinidad de la Hematoporfirina por el tejido neoplásico, confirmada más tarde por Figge et al. (1948) quienes describen la fluorescencia de las porfirinas acumuladas en el tumor cuando se las iluminaba con la lámpara de Wood.

En la década del '50 Schwartz et al. (1955) propusieron que la fluorescencia selectiva del tejido maligno luego de la administración sistémica de la Hematoporfirina, podría deberse a impurezas en la preparación y no a la Hematoporfirina misma. Lipson et al. en 1961 mejoraron la localización del fotosensibilizante mediante acetilación y posterior reducción de la preparación cruda. La mezcla obtenida por este procedimiento se llamó Derivado de Hematoporfirina (HpD).

El hallazgo del HpD como un efectivo fotosensibilizante tumoral y el posterior desarrollo de equipos láser adecuados y sistemas ópticos de transmisión de la luz, llevaron al desarrollo de la TFD durante la década del '70.

Inicialmente, el principal interés en el uso del HpD se concentró en el área de detección y localización de tumores durante la exposición de los tejidos a una longitud de onda corta en el visible, o luz ultravioleta (alrededor de 400 nm). Diamond et al. (1972) evaluaron los efectos terapéuticos en gliomas murinos irradiando a longitudes de onda más largas, en tanto que Dougherty et al. (1975) realizaron los primeros estudios de TFD en tumores animales.

El primer caso clínico de TFD mostraba un paciente con cáncer de vejiga, a quien se le había administrado HpD y sometido a irradiación transuretral (Kelly & Snell, 1976). Desde ese momento, ha habido un creciente interés en esta nueva terapia, con una gran cantidad de estudios clínicos y experimentales en una variedad de tipos y localizaciones tumorales.

II.2 Las porfirinas en la fotodetección de tumores.

La concentración selectiva de las porfirinas en los tumores ha sido utilizada como método de diagnóstico a través de la detección de fluorescencia. La excitación de un tejido fotosensibilizado con luz de 405 nm induce la emisión de

fluorescencia roja entre 600 y 700 nm. Esta fluorescencia puede ser detectada endoscópicamente usando sistemas óptico-electrónicos.

Esta propiedad ha sido usada para la fotodetección de cánceres tempranos en el árbol tráqueo-bronquial (Doiron et al., 1979) y en la vejiga urinaria (Benson et al., 1982).

Una fuente de luz -un láser de kriptón o una lámpara de mercurio filtrada- es acoplada a una fibra óptica ubicada en el canal de un endoscopio. La luz emitida por la fibra induce la fluorescencia del HpD. Luego se pueden usar dos sistemas de detección diferentes.

En un caso (Figura II.2) la imagen del endoscopio es filtrada de manera de eliminar la luz excitante, y luego es amplificada por un intensificador de imagen para ser visualizada en un monitor.

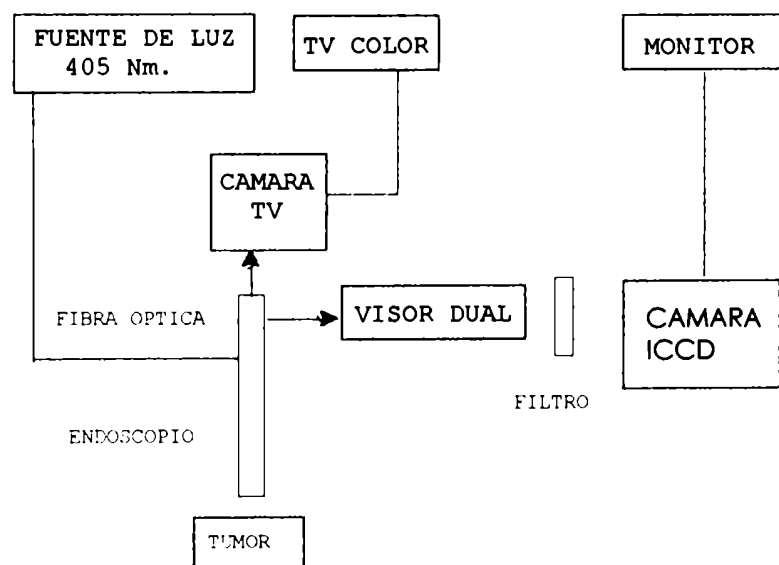


FIGURA II.2: Sistema óptico-electrónico para diagnóstico de fluorescencia por análisis de imágenes.

Un segundo sistema (Figura II.3) permite el análisis espectrográfico de los signos de fluorescencia mediante un policromador acoplado a una fibra óptica. Un analizador óptico multicanal (AOM) produce el espectro de fluorescencia que puede ser representado en una pantalla o un graficador. El espectro obtenido para el tumor es distinto en amplitud y forma al de la

mucosa normal, permitiendo la detección endoscópica de lesiones superficiales.

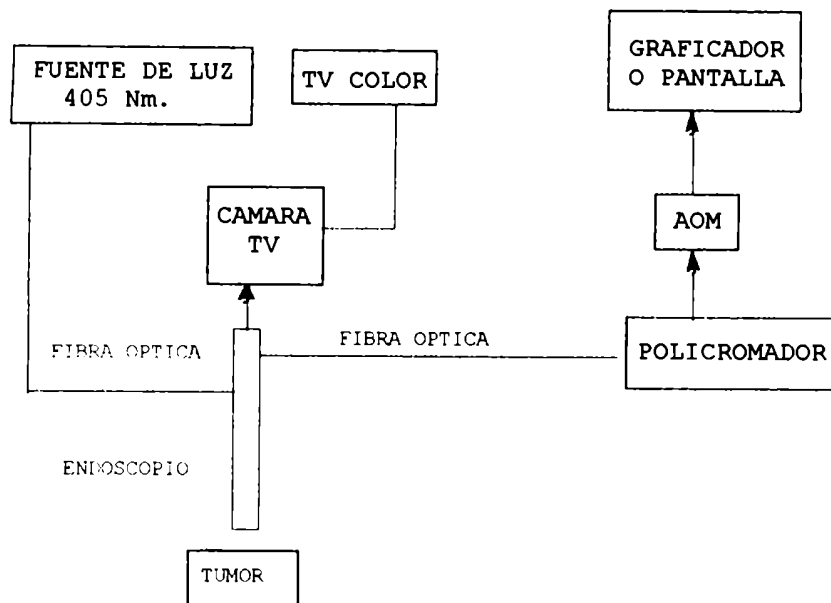


FIGURA II.3: Sistema óptico-electrónico para análisis espectrográficos de fluorescencia.

II.3 Las porfirinas como fotosensibilizantes.

El HpD desarrollado por Lipson, es una mezcla compleja de varias especies de porfirinas, algunas de las cuales son menos eficientes *in vivo* como fotosensibilizantes tumorales (Dougherty, 1984).

Mediante el uso de tamices moleculares se logró aislar una fracción enriquecida en las especies responsables de las propiedades fotosensibilizantes del HpD (Dougherty et al., 1984). Esta fracción activa es identificada como porfímero de sodio (Photofrin II, QLT Inc., Vancouver, Canadá y Laboratorios Lederle, Pearl River, NY, USA) y se cree que es una mezcla agregada de trímeros/oligómeros de porfirinas unidas por puentes de éter (Dougherty, 1987b; Kessel et al., 1987; Dougherty & Marcus, 1992) (Figura II.4). Actualmente este producto es usado para la TFD clínica, y el único aprobado hasta el momento por la FDA de Estados Unidos.

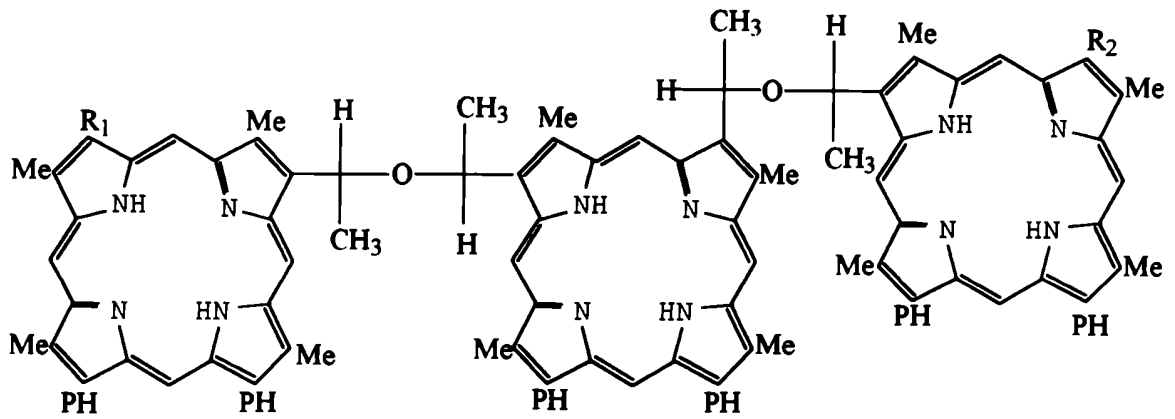


FIGURA II.4: Estructura química de un trímero de porfirina, una del las principales estructuras del Photofrin.

$R_1 = R_2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ó $\text{CH}=\text{CH}_2$.

$\text{PH} = (\text{CH}_2)_2\text{COOH}$.

Las ventajas terapéuticas que presenta la TFD respecto a las demás modalidades antitumorales, es que puede ser repetida o usada luego de otros tratamientos, por no exhibir resistencia cruzada con otras drogas. Además, el riesgo de generación de nuevas neoplasias es bajo, ya que el daño al ADN es limitado, así como lo es también el riesgo de perforar o reducir la fuerza mecánica de órganos internos.

Aparte de su uso como tratamiento de tumores sólidos, la TFD también se emplea como purga *ex-vivo* de células tumorales remanentes en médula ósea antes del autotransplante (Sieber & Krueger, 1989) y en el tratamiento hematológico de linfomas de células T (Edelson et al., 1987).

Además de la terapia antitumoral, la TFD también tiene un futuro promisorio en el tratamiento de la psoriasis (Berns et al., 1984), infecciones bacterianas (Malik et al., 1990; Merchat et al., 1996; Minnock et al., 1996) y virales (Sieber et al., 1989), micosis (Wolf et al., 1994), endometriosis (Yang et al., 1996) y de la aterosclerosis (Hayashi et al., 1995), ya que el HpD se une selectivamente a las placas ateromatosas (Kessel & Spikes, 1984).

II.3.1 Toxicidad.

II.3.11 Toxicidad fotodinámica de las porfirinas

Un buen fotosensibilizante debe tener baja toxicidad sistémica. Para el Photofrin, la dosis letal 50 (DL₅₀) para el ratón a las 24 hs de su administración es alrededor de 140 mg/kg (Dougherty, 1989). La letalidad se atribuye en todos los casos a necrosis hepática y renal.

Las porfirinas son considerablemente más tóxicas cuando se expone el cuerpo entero del animal durante 5 horas a una lámpara de xenón (6 mW/cm²), resultando en una DL₅₀ de 4 mg/kg a las 24 hs de la administración (Dougherty, 1986).

Debido a la localización eficiente del Photofrin en la piel, la administración sistémica de este compuesto induce fotosensibilidad cutánea, que puede causar severas lesiones. Los pacientes deben evitar las luces fuertes, incluyendo la luz solar, durante 2 a 8 semanas luego del tratamiento (Razum et al., 1987; Dougherty et al., 1990). Este efecto adverso limita la dosis máxima a 2-5 mg/kg. En general el intervalo entre la administración del Photofrin y la iluminación varía de 24 a 48 hs, dependiendo de la relación de concentración de porfirinas en el tumor respecto al tejido circundante.

Se ha sugerido el uso de carotenoides -secuestrantes del radical ¹O₂- luego de la sesión de TFD, con el objeto de reducir la fotosensibilidad cutánea (Mathews-Roth, 1984), aparte de la clásica aplicación de protectores solares.

II.3.12 Toxicidad de la porfirinas en la oscuridad.

Además de la bien conocida acción fotodinámica de las porfirinas, ya en 1959 Mauzerall & Granick demostraron reactividad de las porfirinas en la oscuridad, describiendo la inhibición de la enzima URO-D en presencia de otros pigmentos.

En nuestro laboratorio se encontró que ciertas porfirinas provocan una inactivación fotodinámica y no fotodinámica *in vitro* de varias enzimas tales como la URO-D (Chinarro et al, 1985;

Battle et al., 1986; Afonso et al., 1991), ALA-D (Stella et al., 1989; Afonso et al., 1990; Afonso et al., 1994a), PBG deaminasa e isomerasa (Afonso et al., 1990; Afonso et al., 1994b), succinil CoA sintetasa, ALA-S, rhodenasa y LDH (Afonso et al., 1996).

Estos autores atribuyeron la fotodescomposición de dichas enzimas, a la oxidación mediada por luz de los residuos de aminoácidos esenciales en el sitio activo, mientras que el efecto de los tetrapirroles en la oscuridad sería el resultado de la inhibición directa de la enzima por las porfirinas.

II.3.2 Farmacocinética.

El clearance plasmático del Photofrin luego de la administración i.p. o i.v. ha sido estudiado usando este compuesto marcado radioactivamente. Se vio que el 65% se excreta 192 horas luego de ser administrado, y que el 91% del material recuperado estaba presente en las heces.

Se ha encontrado que para la vía sistémica, las porfirinas se unen inicialmente (7 a 8 hs) a la albúmina y a lipoproteínas tanto de alta (HDL) como de baja afinidad (LDL), mientras que a tiempos más largos se observa únicamente unión a las HDL (Jori, 1987; Dougherty, 1987a).

La distribución de las porfirinas entre las proteínas séricas depende en gran parte de su estructura química. Compuestos hidrofílicos, como la Hematoporfirina y otros componentes monoméricos, forman preferentemente estructuras pseudomicelares o complejos no covalentes con la albúmina y las globulinas. Las LDL, por el contrario, son los carriers naturales de los fotosensibilizantes hidrofóbicos, tales como los oligómeros de porfirinas y los ésteres (Jori & Reddi, 1993).

La captación del Photofrin puede ser mediada en parte por un mecanismo de transporte activo (Jori, 1989; Korbelik & Hung, 1991). En muchos estudios se ha demostrado que la distribución de las porfirinas circulantes determina su localización en el tejido (Jori et al., 1984; Kessel, 1986a). Así, se pueden detectar tres pools de porfirinas circulantes: 1) componentes agregados (estructuras tipo micelas de oligómeros de porfirinas) que están fácilmente disponibles para ser fagocitados por macrófagos, células endoteliales y neoplásicas; 2) Hematoporfirina y otros componentes monoméricos con baja afinidad

por la albúmina y las globulinas, que en el tejido tumoral son generalmente liberados a la matriz extracelular ;3) oligómeros y ésteres de porfirinas unidos a lipoproteínas que son endocitados vía receptor por las células neoplásicas, liberados en el citoplasma y unidos a matrices apolares endocelulares (Jori et al., 1984; Kessel, 1986a).

Análisis farmacocinéticos demostraron acumulación de porfirinas en tejido tumoral en mayor grado que en la piel, músculo, cerebro y pulmón, pero en menor medida que en los órganos del sistema retículo-endotelial (hígado, bazo y riñón) (Gomer & Dougherty, 1979; Bugleski et al., 1981; Wilson & Van Lier, 1989).

II.3.3 Mecanismos de acumulación de las porfirinas en los tumores.

Aún no está dilucidada la razón por la cual las porfirinas se concentran preferencialmente en tejido maligno, pero podría deberse en parte a la afinidad porfirina/lipoproteína, debilidad de la vasculatura tumoral, drenaje linfático disminuido, receptores de LDL con mucha actividad o una escasa conversión a hemo debida a una baja actividad de la ferroquelatasa (Wilson et al., 1991).

Existe una hipótesis que propone que los tejidos de rápido crecimiento tienen una alta densidad de receptores para lipoproteínas y adquieren los lípidos necesarios para la síntesis de membranas vía endocitosis inespecífica o mediada por receptor (Spikes & Jori, 1987; Kessel & Woodburn, 1993). Así las porfirinas entrarían junto con las lipoproteínas a la célula.

También se propuso que el bajo pH intratumoral, producto de la pobre oxigenación sumada a una alta actividad glicolítica, estaría afectando la ionización de algunas porfirinas que aumentan su lipofilicidad a pHs bajos, quedando éstas retenidas en el tumor (Pottier & Kennedy, 1990).

Los tumores habitualmente tienen incrementado el número de cuerpos lipídicos, en particular de micelas neutras, además de contar con membranas celulares más hidrofóbicas que las de las células normales. Ambos fenómenos podrían también explicar la acumulación de los fotosensibilizantes hidrofóbicos por este tipo de células (Freitas, 1990).

La debilidad de la vasculatura tumoral, unida a un drenaje linfático disminuido favorecería la formación de agregados de porfirinas o complejos con proteínas en el espacio intersticial (Bugleski et al., 1981)

Las células tumorales también podrían tener aumentada la capacidad de fagocitar o pinocitar los agregados de porfirinas (Jori, 1989). Los macrófagos asociados al tumor podrían ser los responsables de la alta concentración de las porfirinas en este tejido. La fagocitosis de los agregados de porfirinas por los macrófagos residentes sería también el mecanismo responsable de la acumulación de estos compuestos en las placas ateroscleróticas (Hamblin & Newman, 1994).

Dailey y Smith (1984) estudiaron la interacción de algunas porfirinas presentes en el HpD con la ferroquelatasa, viendo que éstas eran o bien sustrato o bien inhibidores competitivos de la enzima. La baja actividad en tejido tumoral podría hacer que éstas permanezcan retenidas en el tumor.

La interacción entre las porfirinas y las glutatión S-transferasas, que están en relativa alta concentración en el tumor (Di Ilio et al., 1985) podría contribuir también a la acumulación de las porfirinas en los tumores (Smith et al., 1985).

II.3.4 Fotoquímica.

Las porfirinas muestran una intensa absorción en la región azul alrededor de los 400 nm, llamada banda de Soret, y cuatro bandas adicionales de absorción con intensidades decrecientes entre los 500 y 650 nm (Figura II.5). Como la penetración de la luz en los tejidos aumenta a mayores longitudes de onda (Van Gemert et al., 1985; Wilson, 1989) generalmente se usa la banda de absorción más débil que es la de 630 nm para iluminar los tejidos sensibilizados con el Photofrin (Gomer et al., 1984), aunque recientemente se vio que con una luz de 635 nm de longitud de onda se obtendría una mayor actividad biológica (Star et al., 1990).

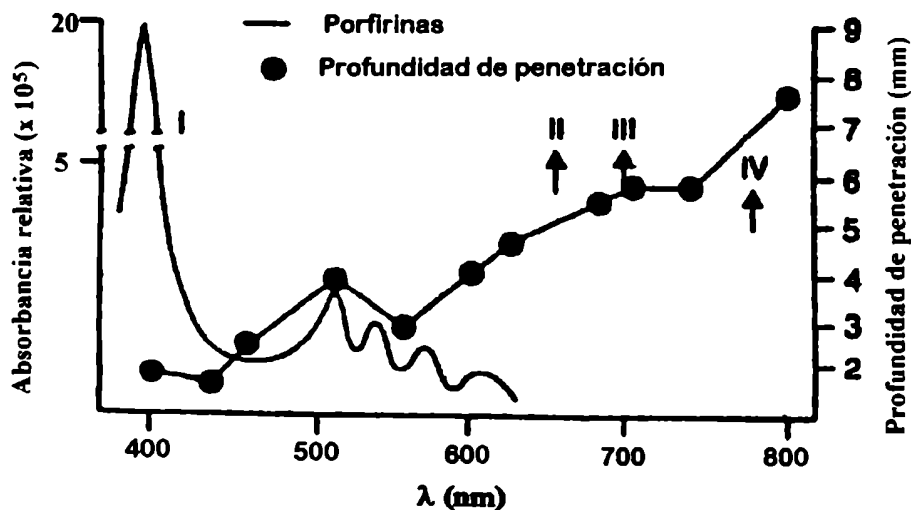


FIGURA II.5: Espectro típico de absorción de las porfirinas y profundidad de penetración en la piel.

La figura representa el espectro de absorción de porfirinas tales como el Photofrin y la PROTO IX (I) y la penetración relativa de la luz en músculo bovino versus la longitud de onda. Las flechas indican varios picos de absorción de fotosensibilizantes de segunda generación tales como las ftalocianinas y clorinas (II), ftalocianinas, purpurinas, verdinas y derivados de benzoporfirinas (III) y bacterioclorina A (IV).

La llamada "ventana fototerapéutica" de los fotosensibilizantes, va desde los 600 a los 1000 nm, rango en el cual la dispersión de la luz por los tejidos es baja, y hay escasa absorción por biomoléculas endógenas tales como la hemoglobina, la melanina y el agua. Estas características permiten una mayor penetración de la luz en el tejido y por lo tanto una mayor acción terapéutica.

Se cree que el daño tisular inducido por la TFD ocurriría principalmente como resultado de la formación del radical oxígeno singlete (¹O₂) a partir del oxígeno disponible en el tejido (³O₂) (Weishaupt et al., 1976). En un gran número de trabajos se ha demostrado la necesidad del oxígeno en las reacciones de fotosensibilización. Gomer y Razum (1984) han descripto la resistencia completa de un tumor hipóxico al tratamiento fotodinámico, hipótesis que fue confirmada por otros estudios *in vivo* e *in vitro* (Mitchell et al., 1985; Moan & Sommer, 1985; Henderson & Fingar, 1989; Chapman et al., 1991). También se observó que la presencia de secuestrantes de oxígeno singlete suprimían el efecto fototóxico (Valenzeno, 1987).

El radical oxígeno singulete se genera mediante el llamado mecanismo de oxidación fotosensibilizada tipo II (Figura II.6) (Foote, 1991). Cuando la molécula de porfirina absorbe un fotón, ésta es llevada a un estado de excitación singulete con una vida media extremadamente corta. Luego el fotosensibilizante puede volver al estado basal y emitir luz en forma de fluorescencia roja a longitudes de onda de alrededor de 620 nm.

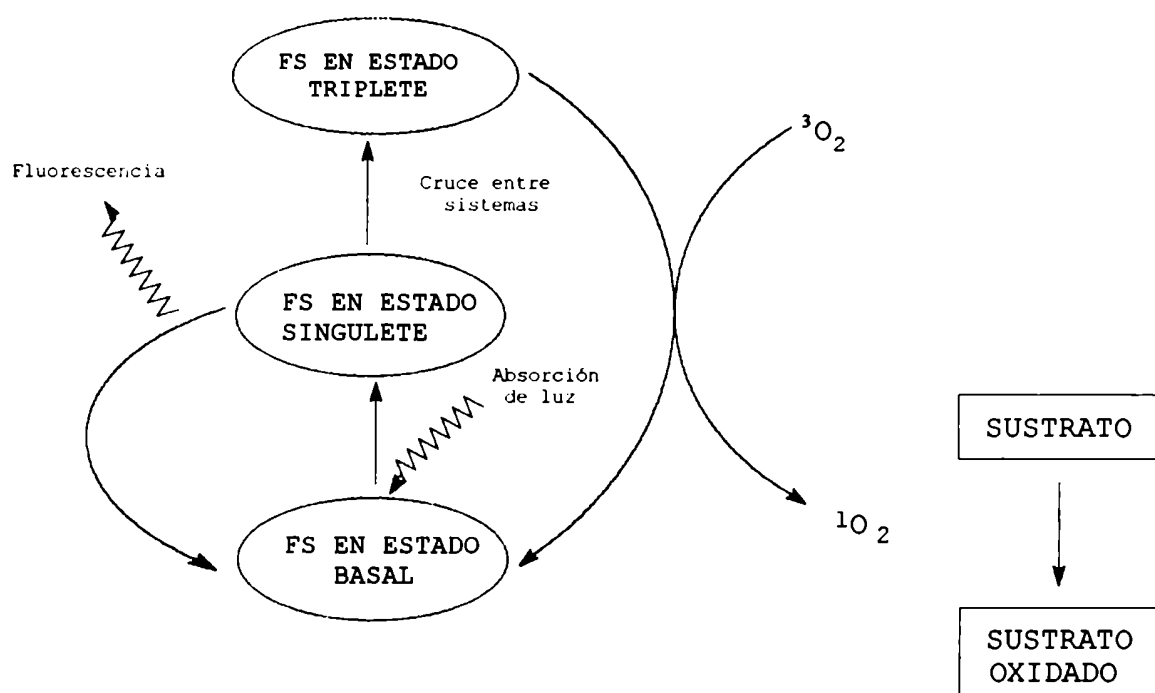


FIGURA II.6: Representación esquemática de la reacción fotoquímica tipo II.

Para ejercer su acción fotodinámica, sin embargo, los fotosensibilizantes deben sufrir un cruce entre sistemas hacia el estado de excitación triplete, especie que es más estable que la anterior, y por lo tanto tiene mayor probabilidad de interactuar con el oxígeno en estado basal (Gomer, 1989). La transferencia de energía desde el estado triplete del fotosensibilizante al oxígeno molecular genera la especie altamente reactiva oxígeno singulete.

FS=fotosensibilizante o molécula de porfirina.

La naturaleza electrofílica del oxígeno singulete le confiere eficiencia en la generación de formas oxidadas de las biomoléculas. Luego de la transferencia electrónica al oxígeno, el sensibilizante vuelve a su estado basal. La eficiencia de excitación de un fotosensibilizante se define como la probabilidad de generar un estado triplete por fotón absorbido.

El camino alternativo es el mecanismo tipo I (Figura II.7), que implica la interacción directa del fotosensibilizante en estado triplete excitado con una biomolécula con transferencia de electrones o de hidrógenos, produciendo formas radicales tanto

del sustrato como del fotosensibilizante. Los radicales pueden reaccionar directamente con el oxígeno molecular para producir especies activas como los radicales hidroxilos, peróxidos de hidrógeno y anión superóxido (Buettner & Need, 1985; Van Steveninck et al., 1986; Athar et al., 1989). Esta reacción tipo I es de menor importancia en la fotosensibilización, debido a la competencia entre los sustratos y el oxígeno por el fotosensibilizante en estado triplete y es extremadamente dependiente de la concentración de éste último.

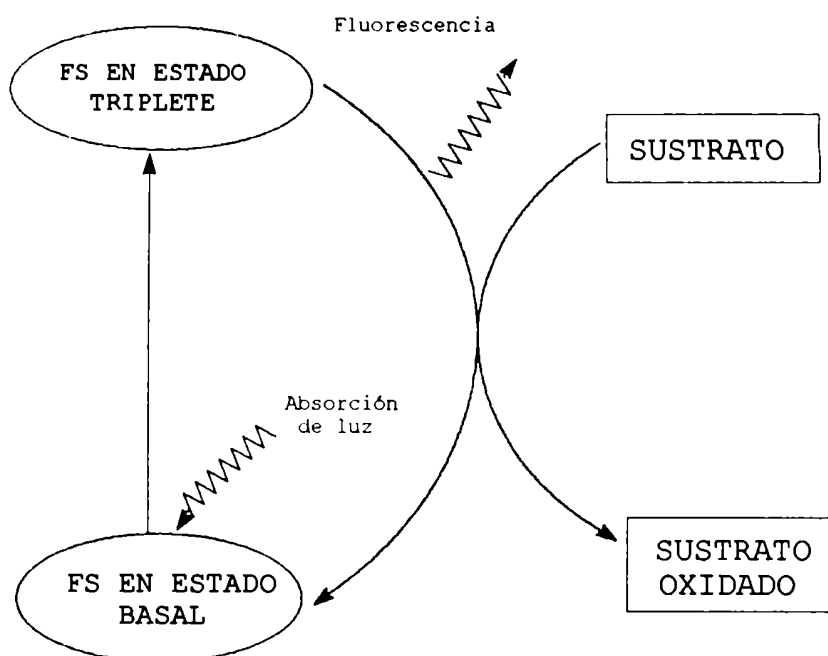


FIGURA II.7: Esquema de la reacción fotoquímica tipo I

El fotosensibilizante (FS) en estado triplete es capaz de reaccionar, aunque en una proporción muy baja, con una biomolécula, generando radicales libres tanto del sustrato como del FS.

Las porfirinas sufren una lenta fotodestrucción (fotobleaching) durante la exposición *in vivo* a la luz, ya sea por la reacción de estas moléculas en su estado basal con el oxígeno singulete, o por su reacción en el estado triplete excitado con componentes tisulares. Los productos de este proceso son ineficientes en actividad fotodinámica (Mang et al., 1987). Este proceso ha sido aprovechado para disminuir la fotosensibilidad cutánea inducida por las drogas fotoactivas (Boyle & Pottier, 1987).

II.3.5 Sitios celulares y subcelulares blancos de la Terapia Fotodinámica.

Aún se sabe poco acerca de los blancos iniciales del daño fotodinámico. Estos sitios de acción pueden ser biomoléculas así como también organelas subcelulares tales como microsomas, mitocondrias, lisosomas y núcleo. (Zhou, 1989; Moan et al., 1989; Jori, 1990b).

Existe amplio consenso en señalar a las membranas celulares como uno de los objetos principales de daño (Girotti, 1990; Chapman et al., 1991). La peroxidación lipídica así como la formación de agregados entrecruzados de proteínas y fragmentación luego de la TFD han sido algunas de las evidencias encontradas a favor de esta hipótesis. Estas proteínas así modificadas serían más susceptibles a la proteólisis (Prinsze et al., 1990).

Tanto los sistemas de transporte a través de membrana como la síntesis de proteínas se verían afectadas por la TFD (Boegheim et al., 1989). Esto llevaría a un aumento de la permeabilidad celular junto con una inhibición en el transporte de aminoácidos, nucleósidos y azúcares (Kessel, 1986b).

El daño a membranas también parece ser responsable de la liberación de prostaglandinas (Henderson & Donovan, 1989) y de tromboxano (Reed et al., 1989; Fingar et al., 1990) de las células tumorales y de los macrófagos. Estos cambios estarían relacionados con la respuesta inflamatoria e inmunosupresora observada luego de la TFD.

En líneas celulares murinas la fotosensibilización redujo la actividad enzimática de las enzimas unidas a membrana (ATPasa de Na^+/K^+ , ATPasa de Mg^+ y 5' nucleotidasa), mientras que las enzimas citosólicas lactato y malato deshidrogenasa no sufrieron cambios (Gaffney & Sieber, 1990).

Por otra parte, como las mitocondrias son el sitio principal de acumulación de las porfirinas usadas en la TFD, se pensó que estas organelas también constituyen un blanco importante (Gomer et al., 1988a; Salet & Moreno, 1990).

Funcionalmente estas organelas se ven afectadas por la TFD. Se ha observado disipación del gradiente electroquímico, desacople e inhibición de la fosforilación oxidativa e inhibición

de la respiración como efecto de la fototerapia sobre mitocondrias (Sandberg & Romslo, 1980; Singh et al., 1987).

Se cree que los transportadores fosforilados en mitocondrias contienen grupos -SH funcionalmente importantes que son blanco del daño fotodinámico (Atlante et al., 1990). También lo son el transportador de adenina (Ara et al., 1987) y el receptor de benzodiazepinas mitocondrial (Stepiens et al., 1991), cuyo ligando endógeno se postula que son precisamente las porfirinas.

Woodburn et al. (1991) propusieron que las porfirinas con cadenas catiónicas se localizan en mitocondria, mientras que las de carácter aniónico tienden a localizarse en los lisosomas, siendo estas últimas las de menor citotoxicidad.

La fotosensibilización mediada por las porfirinas, también es capaz de inducir rupturas de simple cadena o intercambio de cromátidas hermanas en el ADN (Jori & Spikes, 1984; Evensen et al., 1988). El ADN puede ser asimismo indirectamente dañado por activación de endonucleasas, llevando al típico patrón apoptótico de fragmentación en escalera (Agarwall et al., 1991).

Si bien la mayoría de los fotosensibilizantes usados en TFD se localizan fuera del núcleo, los componentes nucleares cercanos a la membrana nuclear pueden ser dañados. Se ha observado que las células sujetas a tratamiento fotodinámico se acumulan en mitosis (Berg et al., 1990), probablemente por ataque a los centriolos o a los microtúbulos polimerizados.

Sin embargo, no parece que el daño y reparación nucleares fueran importante en la fotodestrucción celular, ya que la TFD indujo niveles similares de citotoxicidad en fibroblastos normales y en las mismas células deficientes en las enzimas reparadoras de ADN (Gomer et al., 1988b).

La fotosensibilización mediada por porfirinas puede aumentar la transcripción y traducción de varios genes de stress oxidativo como el de la Hem-O (Gomer et al., 1991). Si bien el significado de esta inducción aún se desconoce, se cree que esta enzima tendría participación en los mecanismos de defensas antioxidantes.

A pesar de que estudios *in vitro* demostraron muerte celular directa, se ha sugerido que la vasculatura tumoral sería una de las estructuras más dañadas en la TFD (Star et al., 1986; Gomer et al., 1988b). Las células tumorales sufren de por sí de una falta de nutrientes y aporte de oxígeno debido a la debilidad de

su vasculatura, por lo que suelen ser más vulnerables al daño vascular que las células normales; éstas últimas se recuperarían más rápidamente del efecto fotodinámico.

La fotosensibilización con porfirinas produce liberación de factores de coagulación (Ben-Hur, 1990), degranulación de mastocitos con liberación de histamina (Kerdel et al., 1987), liberación de vasoconstrictores (Fingar et al., 1991) y agregación plaquetaria (Henderson, 1990), con la consiguiente estasis vascular, eventual degeneración de los vasos sanguíneos y hemorragia.

Tres importantes observaciones apoyan el rol central de la vascularización en el proceso fotodinámico: 1) la clonogenicidad de las células tumorales no se modifica cuando éstas son cosechadas inmediatamente después del tratamiento fotodinámico causante de una toxicidad importante en el animal huésped (Henderson et al., 1985); 2) el flujo sanguíneo y la tensión de oxígeno disminuyen significativamente durante la TFD (Selman et al., 1984); 3) el HpD se concentra en mayor proporción en el estroma vascular y alrededor de los vasos sanguíneos que en las células tumorales (Bugleski et al., 1981; Jori, 1987).

Sin embargo, no todos los fotosensibilizantes ni en todas las formas de administración, actuarían de esta manera. Parece ser que si el HpD es inyectado en su forma libre, sensibilizaría principalmente el sistema vascular, mientras que si es administrado unido a liposomas o a LDLs, estaría induciendo sensibilización directa en el tumor (Jori, 1990a).

De este modo, los sitios iniciales de daño podrían involucrar cambios en la matriz de colágeno subendotelial y en las células endoteliales de la microvasculatura (Nelson et al., 1987a). Sin embargo, actualmente se cree que se necesita tanto del daño vascular como del celular para lograr la destrucción completa del tumor.

Luego de la fotosensibilización *in vivo* también se vio liberación de histamina (He et al., 1989). Los datos sugieren que los mastocitos participarían en la última fase de la fototoxicidad por HpD en ratas.

También se han observado una cantidad de reacciones inmunológicas asociadas a la acción fotodinámica de las porfirinas, tales como el aumento de la liberación de factor de necrosis tumoral de macrófagos (Evans et al., 1990), inhibición de la estimulación mitogénica de linfocitos (Kol et al., 1989) e

inhibición de la unión de IgG al receptor (Krutmann et al., 1989).

Sin embargo, la acción de la TFD en la respuesta inmune puede ser supresora o potenciadora, dependiendo de la dosis y los tratamientos (Yamamoto et al., 1991). Más aún, se ha propuesto que el efecto estimulador del Photofrin en la hematopoyesis podría tener un rol en la recuperación de la médula ósea luego de terapia inmunosupresiva, ya que se vio que la administración de la droga produce un aumento en los granulocitos y leucocitos circulantes, además de incrementar la población eritroide en el bazo (Henderson & Stewart, 1992).

II.4 Fuentes y sistemas de aplicación de la luz.

II.4.1 Fuentes de luz.

Inicialmente, se usaban lámparas convencionales para la iluminación de superficies corporales, especialmente la piel, con filtros apropiados de manera de seleccionar la longitud de onda fotoactivadora y eliminar los componentes del infrarrojo que pudieran causar el calentamiento indeseado del tejido. Las desventajas que presentaban estas lámparas convencionales de gas era la limitación en cuanto a los métodos de aplicación de la luz, precisión y control de la intensidad, que era de alrededor de 50 mW/cm². (Wilson & Patterson, 1986).

El advenimiento de los láseres combinados con las fibras ópticas amplió el rango de aplicaciones de la TFD, ya que la luz de una longitud de onda acotada adecuadamente con una potencia de salida definida puede aplicarse prácticamente en cualquier sitio del cuerpo ya sea intersticial o endoscópicamente.

Aunque el láser de helio-neón, con una longitud de onda de 632,8 nm se adecua a los requerimientos de la TFD con Photofrin, su baja potencia de salida limita su aplicación, por eso es que el láser de argón-colorante, que puede generar luz de cualquier longitud de onda entre 350 y 700 nm, lo ha superado. El láser de argón emite a una longitud de 514,5/488 nm, que es modificada por la acción del colorante, generalmente rodamina B o Kiton-red, que fluoresce en la región de 630 nm, con una potencia de salida de 3 a 4 W, de la cual un 80-90% puede ser acoplado con una fibra

óptica. La desventaja en cuanto al empleo masivo de este láser es su alto costo y su difícil manipulación para uso clínico. Estas desventajas son compartidas con el láser de vapor de cobre, que es capaz de emitir en una longitud de 518.5/578.2 nm, que se puede modificar también con el bombeo de colorantes.

Recientemente se ha introducido un nuevo sistema de láser para TFD que usa fosfato de potasio-titanio (532 nm) y colorante, que supera a los anteriores en la facilidad de transporte (Ferrario et al., 1991).

Una alternativa prometedora sería el uso de láseres diodo que emitan a una longitud de 630 nm, que son más económicos, más pequeños y fácilmente transportables (Wilson, 1989), pero hasta ahora no se han logrado equipos que emitan con una buena intensidad a esta longitud de onda.

Finalmente, el láser de vapor de oro es más simple y barato que los anteriores, pero tiene la limitación de poder operar sólo a una longitud de onda fija de 628 nm, lo que lo hace inadecuado para otros fotosensibilizantes que no sean el Photofrin. La ventaja que presenta es que emite pulsos cortos de luz, logrando una dosis terapéutica sin causar un efecto térmico significativo.

II.4.2 Sistemas de aplicación.

Para el tratamiento de tumores superficiales, tales como los cutáneos o los de la cavidad oral, es suficiente con el uso de lentes y aperturas ópticas para producir una iluminación uniforme y continua (Figura II.8).

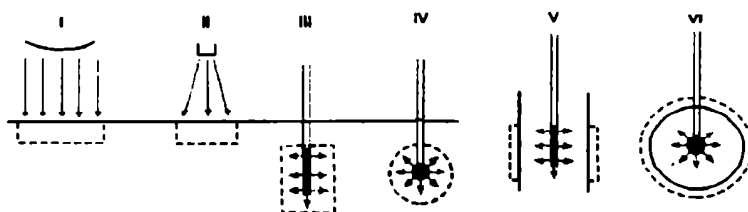


FIGURA II.8: Sistemas de aplicación de luz en TFD.

Iluminación superficial con lámpara convencional (I), láser acoplado a una fibra óptica (II). Iluminación intersticial con un difusor cilíndrico (III) o esférico (IV). Iluminación intraluminal e intracavitaria con difusor cilíndrico (V) o esférico e isotrópico (VI).

Las flechas representan la luz emitida, y la línea punteada representa la distribución de la luz en un tejido altamente refringente.

La fibra óptica es necesaria para el caso de tumores sólidos o situados más profundamente, y ésta puede ubicarse intersticialmente, directamente en el tejido tumoral mediante una aguja de biopsia y eventualmente con la ayuda de un equipo de ultrasonido.

Para el caso de tumores bronquiales, de esófago y de vejiga, que necesitan de iluminación intraluminal o intracavitaria, se usa una fibra flexible de cuarzo que puede ser ubicada en un endoscopio común.

También es posible un control más preciso de la distribución espacial de la luz modificando el extremo de la fibra (Marijnissen et al., 1985) o ubicando a la misma en un medio que difunda la luz (Muller & Wilson, 1987). La salida de la fibra puede hacerse isotrópica introduciendo en la punta una esfera o cilindro de algún material que disperse la luz (Arnfield et al., 1986). Las fibras ópticas múltiples son adecuadas para el tratamiento de grandes volúmenes de tejido (Marijnissen et al., 1992).

II.4.3 Intensidad de luz.

En la actualidad los regímenes de administración son principalmente empíricos y son en general expresados como la potencia incidente por área (W/cm^2) o como la energía incidente por área (J/cm^2). Sin embargo, poco se sabe aún sobre la distribución espacial de la energía lumínica absorbida por los tejidos.

La activación de un fotosensibilizante en un determinado punto de un tejido es proporcional a la tasa de energía incidente multiplicada por el coeficiente de absorción del fotosensibilizante (Star et al., 1992). La tasa de energía incidente se define como la energía radiante que incide por segundo en una pequeña esfera dividida por la sección de la misma (W/m^2). Al multiplicar esta cifra por el tiempo de irradiación se obtiene la tasa de energía incidente (J/m^2). La verdadera distribución de la luz en el tejido puede ser aproximada teniendo en cuenta la absorción óptica y la capacidad de disipación de la luz del mismo, usando un modelo matemático de transporte de radiación (Patterson et al., 1991). Alternativamente, se puede medir directamente usando detectores de luz de fibra óptica en el tejido en estudio.

Las mediciones *in vivo* proveen una información más directa sobre la distribución de la luz. Marijnissen et al. (1989) desarrollaron un citoscopio modificado que emite luz isotrópica, para monitorear y controlar la administración de la luz durante la sesión de TFD en pacientes, con el cual se demostró la diferencia entre la energía de luz emitida y la de luz incidente en el tejido entre los distintos pacientes, remarcando la importancia del uso de estos detectores en la TFD tanto intracavital como intersticial (Marijnissen et al., 1992).

Modificaciones en los regímenes de administración de luz pueden contribuir también al aumento de la eficiencia de la TFD.

Así, Gibson et al. (1990) encontraron una mejora en el tratamiento de carcinomas mamarios de ratas, empleando una iluminación periódica con intervalos de una hora de oscuridad. En el mismo trabajo se vio que los animales tratados continuamente con luz de 50 mW/cm^2 por 2 hs (dosis total de 360 J/cm^2) mostraron retraso en el crecimiento de sus tumores, en comparación con los tratados con la misma dosis total, pero con potencias de 100 o 200 mW/cm^2 y tiempos de exposición de 1 ó 0,5 hs respectivamente.

Aunque la luz roja es la más usada habitualmente para excitar las porfirinas debido a su eficiente penetración en los tejidos, en ciertas condiciones es más conveniente el uso de luz verde (Bellnier et al., 1985). Por ejemplo, en urología la principal indicación de TFD es el carcinoma *in situ* de vejiga, y una longitud de onda de 514 nm es suficiente para atravesar el urotelio sin causar daños mayores en las capas más profundas como la muscular. Sin embargo, aún queda por resolver el problema de la absorción por la sangre a esta longitud de onda.

II.5 Experiencia clínica

Desde 1976 hasta el presente, una gran cantidad de pacientes han sido tratados con TFD. En los comienzos, los pacientes que recibían TFD tenían largas historias de enfermedad metastásica o recurrente y habían agotado toda las terapias disponibles. Los resultados del tratamiento en tumores de gran tamaño han sido poco satisfactorios.

El tratamiento intersticial de tumores sólidos ha tenido escasa repercusión debido a las limitaciones en la penetración de la luz. En cambio, la tendencia actual es tratar con TFD tumores superficiales, estadios tempranos de tumores primarios o como método de esterilización de la zona peritumoral, en el caso de la TFD intraoperatoria (Delaney et al., 1993; Abulafi et al., 1993).

Uno de los principales puntos a favor de la TFD radica en la disminución del daño a los tejidos adyacentes, ya que en general el fotosensibilizante se ubica con mayor selectividad en las células tumorales.

Además de la conocida fotosensibilidad cutánea, otros efectos secundarios observados incluyen náusas, vómitos, fotosensibilidad ocular, dolor y edema en la zona irradiada y toxicidad hepática.

Los tumores de origen epidérmico son, por su accesibilidad, los más adecuados para la aplicación de esta terapia, con resultados cosmetológicos muy aceptables. Se han tratado con éxito melanomas malignos, carcinomas de células escamosas, sarcomas de Kaposi, metástasis dérmicas de carcinoma mamario y carcinomas basocelulares, siendo estos últimos los que mejor respuesta han presentado. Una de las ventajas que ofrece ésta, sobre otras terapias, es que deja menos cicatrices (Tomio et al., 1984; Calzavara-Pinton, 1995).

También se han tratado carcinomas de cabeza y cuello refractarios a las terapias tradicionales, habiéndose reportado en algunos casos remisiones completas (Schuller et al., 1984; Sturgies & Miller, 1995).

En cuanto a los carcinomas genitourinarios, los resultados en carcinomas de células transicionales de vejiga resultan alentadores. Las lesiones superficiales han sido erradicadas con una tasa baja de recurrencia. En este tipo de tumor, la localización por fluorescencia ha mejorado el éxito de la cirugía, de manera de asegurar la resección total del tejido neoplásico (Misaki et al., 1984; Uchibayashi et al., 1995).

La TFD también puede ser indicada como tratamiento paliativo o curativo de lesiones endobronquiales; por ejemplo, en lesiones obstructivas, para la remoción de la obstrucción, aunque sin modificación de la sobrevida. La localización y el tipo celular condicionan la efectividad del tratamiento. Cuando el tumor se localiza en submucosa o con amplia extensión en la mucosa, éstos son tratados intersticialmente. En todos los casos se requiere

una broncoscopia con el objeto de remover los detritos (Vincent et al., 1984; Murakami et al., 1995).

La detección por fluorescencia ha sido usada con éxito para el diagnóstico precoz de cáncer de pulmón, sobre todo en pacientes con alto riesgo, para el caso de lesiones no visibles por radiología (Cortese & Kinsey, 1982).

En tumores esofágicos y gástricos se aplicó TFD con muchos resultados exitosos, no así en el caso de carcinomas colorrectales, donde dicho tratamiento es menos adecuado (Hayata et al., 1985; Chan, 1995).

También se han tratado tumores del SNC con buenos resultados. En algunos protocolos se aplicó TFD durante el acto quirúrgico, en tumores que no habían recibido tratamiento previo, y en algunos casos se combinó TFD con cirugía y con radioterapia (Laws et al., 1981; Powers, 1992).

Tumores ginecológicos, en particular de vagina, son adecuados para el tratamiento tópico con fotosensibilizantes y posterior aplicación de luz (Rettenmaier et al., 1984; Wyss et al., 1995).

II.6 Combinación de la TFD con otras terapias.

En algunos estudios se vio que la iluminación por sí misma durante la TFD causa un incremento significativo de la temperatura en el sitio blanco. En base a estas observaciones se propuso el uso deliberado de la hipertermia -inducida por el mismo láser u otro independiente, por microneedles o por ultrasonido- junto con la TFD. De esta manera se vio que la TFD puede tener un efecto sinérgico con la hipertermia subletal (Waldow & Dougherty, 1984).

También se vio una respuesta sinérgica cuando la hipertermia (generalmente a 45,5 °C por 30 min.) fue aplicada simultáneamente con la iluminación o en los 30 minutos siguientes en ratones portadores de tumor y en células malignas humanas, respectivamente (Matsumoto et al., 1990; Glassberg et al., 1991).

Aparentemente el sinergismo de la TFD con la hipertermia, se debería a un retardo en el proceso de reparación tisular por el aumento de temperatura (Moan, 1986).

El láser de Nd-YAG es muy apropiado para la generación de calor, ya que tanto la luz de 630 nm para activar el fotosensibilizante como la generadora de hipertermia (1064 nm) es entregada por la misma fibra óptica.

Las interacciones *in vivo* combinando aplicaciones intersticiales de radiación ionizante, hipertermia y TFD han sido estudiadas por Levandag et al. (1989), habiéndose encontrado un leve aumento en la tasa de necrosis. Sin embargo, otros trabajos muestran radioprotección bajo ciertas condiciones experimentales (Figge & Wichterman, 1955).

También se ha intentado mejorar la eficiencia de la TFD aumentando la retención del fotosensibilizante mediante el agregado de Verapamil y otros bloqueantes de canales de calcio, que se presume son inhibidores de la glicoproteína P, involucrada en la resistencia múltiple a drogas, pero los resultados en este punto aún son contradictorios (Cowled & Forbes, 1989; Gossner et al., 1991).

Recientemente se ha ensayado la combinación entre la TFD y drogas biorreductivas, con el objeto de aprovechar la hipoxia inducida por la TFD para activar la acción citotóxica de estas drogas, encontrándose resultados alentadores. Bremner et al. (1992), Cho et al (1992) y Baas et al. (1994) encontraron sinergismo en el tratamiento conjunto de tumores murinos de diversas estirpes. Los mecanismos que mediarían esta respuesta, serían el aumento de la incorporación de Photofrin y la inducción del pasaje de las células a la fase S (Ma et al., 1995).

Debido a que la reducción del aporte de oxígeno como resultado de la constricción celular limita la efectividad de la TFD (Moan & Sommer, 1985), alternativamente, se puede aumentar la oxigenación del tumor -factor limitante en la producción de especies reactivas del oxígeno- mediante la respiración de una emulsión perfluoroquímica y carbonada (95% O₂, 5%CO₂) (Fingar et al., 1988). También se probó potenciar la respuesta fotodinámica en ratones con oxígeno hiperbárico (Jirsa et al., 1991).

Cambios en el pH del tumor pueden producir asimismo efectos en la biodistribución de las porfirinas. Esto se puede aprovechar para mejorar el índice terapéutico de la TFD.

La hiperglicemia inducida por inyecciones múltiples de glucosa puede provocar en los tumores una disminución transitoria del pH que cause un aumento en la retención del HpD. De hecho,

la TFD de tumores tratados con glucosa resultó ser más efectiva (Nelson et al., 1992).

El uso de fotosensibilizantes unidos a anticuerpos monoclonales es una alternativa interesante para aumentar la eficacia de la TFD (Rakestraw et al., 1990).

II.7 Fotosensibilizantes de segunda generación.

A pesar de la efectividad demostrada por el Photofrin como fotosensibilizante y como localizador de tumores, sus efectos adversos han llevado al desarrollo de productos alternativos, llamados fotosensibilizantes de segunda generación, tales como las ftalocianinas, clorinas, purpurinas, bacterioclorinas, verdinas y protoporfirina IX sintetizada endógenamente a partir de ALA.

Como ya se ha señalado, uno de los inconvenientes en el uso de las porfirinas es la fotosensibilidad cutánea que éstas inducen, la cual permanece por varias semanas luego de su administración, ya que parte del pigmento se distribuye en la piel, donde puede causar edemas y eritemas similares a los ocasionados en las porfirias cutáneas ante la exposición del paciente a la luz solar (Menyak et al., 1988). Si bien órganos como hígado, riñón y bazo se caracterizan por acumular una buena cantidad de fotosensibilizante, este efecto indeseado no se manifiesta por no estar directamente expuestos a la luz.

Un fotosensibilizante ideal debería tener ciertas propiedades tales como pureza química, mínima toxicidad en oscuridad, presentar absorción a longitudes de onda cercanas a los 650 nm, poseer altos rendimientos cuánticos para la generación de reacciones fotoquímicas tipo I o tipo II, localización preferencial tumoral y rápida eliminación de los tejidos normales (Wilson, 1989; Gomer et al., 1989)

Un fotosensibilizante que se active a longitudes de onda mayores que 630 nm (Figura II.5) debería poseer mayor capacidad de penetrar en el tejido. A 630 nm la profundidad del efecto tumoricida llega de 3 a 15 mm, dependiendo del tipo de tejido y modo de iluminación.

Además una mayor captación diferencial por el tejido tumoral podría mejorar más aún el índice terapéutico. Así se ha

investigado el uso de liposomas como vehículo del agente fotosensibilizante, sobre la base teórica de que la endocitosis mediada por LDL es un factor importante en el ingreso del agente a la célula. De esta manera hay autores que han encontrado alguna mejora en la selectividad tumoral (Jori, 1989; Cannon, 1993), mientras que otros no han hallado correlación entre la selectividad de las porfirinas por el tumor y su afinidad por las LDL (Kongshaug et al., 1989). Sin embargo, se han encontrado diferencias en cuanto al daño subcelular generado. Mientras que la administración de HpD en su forma acuosa produce un daño a nivel citoplasmático, en su forma encapsulada es causante de daños en la membrana plasmática (Milanesi et al., 1989). Además, la naturaleza de los liposomas influiría también en la distribución del fotosensibilizante (Ginevra et al., 1990).

Las ftalocianinas (FC) son compuestos estructuralmente similares a las porfirinas, que muestran una fuerte absorción entre 650 y 700 nm (Rosenthal, 1991). Se han estudiado derivados metálicos y no metálicos. Así, por ejemplo, la cloro-aluminio FC demostró ser un buen fotosensibilizante tanto *in vitro* (Ben-Hur & Rosenthal, 1985) como *in vivo* (Roberts et al., 1991).

Brasseur et al. (1987) encontraron que los complejos de cerio y aluminio FC poseían una buena acción fotodinámica pero una alta toxicidad. Las FC libres, en cambio, no han dado buenos resultados para la TFD.

Los ésteres aspárticos de Clorina e6 (NPe6) poseen una absorción máxima a 664 nm y una importante acción fototóxica (Nelson et al., 1987b). Más recientemente se encontró que derivados etéreos de cadena larga son mejores fotosensibilizantes que sus ésteres análogos (Pandey et al., 1991). Existen también resultados del uso clínico con meso-tetra-(hidrofenil)-clorina en la TFD intraoperatoria, en intervenciones quirúrgicas de mesoteliomas malignos (Ris et al., 1991).

Las purpurinas poseen un grupo pirrólico reducido, y por lo tanto tienen propiedades similares a las clorinas. La ventaja sobre estos compuestos es que muestran una absorción más intensa con un pico cercano a los 700 nm. En estudios con tumores experimentales demostraron una considerable acción fotodinámica (Morgan et al., 1987).

La bacterioclorina A presenta una banda de absorción a 765 nm y probada efectividad en la destrucción de células leucémicas murinas *in vitro* (Beems et al., 1987).

También una verdina con un ciclohexano fusionado a uno de los pirroles de un núcleo de porfirina, que presenta un pico de absorción a 695 nm, parece ser útil en la TFD *in vivo* de tumores animales (Morgan et al., 1990).

Se ha preparado una benzoporfirina derivada de la PROTO IX con el objeto de mejorar su selectividad tumoral (Pangka et al., 1986). Este compuesto, que presenta una banda de absorción a 690 nm, pareció ser mejor fotosensibilizante *in vitro* que el HpD. La fotosensibilidad cutánea desaparece en 72 hs luego de su administración a voluntarios sanos, y actualmente se están realizando los estudios clínicos de fase I.

II. 8 Referencias

- Abulafi, A.; Alardice, J. & Williams, N. Adjunctive intraoperative photodynamic therapy for colorectal cancer. *Lasers Surg. Med.*, suppl. 4: 49 (1992).
- Afonso, S.; Chinarro, S.; Muñoz, J.; Salamanca, R. & Batlle, A. Photodynamic and non-photodynamic action of several porphyrins on the activity of some heme-enzymes. *J. Enzyme Inhibition*, 3: 303-310 (1990).
- Afonso, S.; Chinarro, S.; Salamanca, R. & Batlle, A. Further evidence on the photodynamic and the novel non-photodynamic inactivation of Uroporphyrinogen decarboxylase by Uroporphyrin I. *J. Enzyme Inhibition*, 5: 225-233 (1991).
- Afonso, S.; Chinarro, S.; Salamanca, R. & Batlle, A. 5-Aminolevulinic acid dehydratase inactivation by Uroporphyrin I in light and darkness. *Int. J. Biochem.*, 26: 255-258 (1994a).
- Afonso, S.; Chinarro, S.; Salamanca, R. & Batlle, A. How the atmosphere and the presence of substrate affect the photo and non-photoinactivation of heme enzymes by Uroporphyrin I. *Int. J. Biochem.*, 26: 259-262 (1994b).
- Afonso, S.; Salamanca, R. & Batlle, A. Cytosolic and mitochondrial enzymes inactivation by uroporphyrin in light and darkness. *J. Enzyme Inhibition*, 10: 141-146 (1996).
- Agarwal, M.; Clay, M.; Harvey, H.; Evans, H.; Antunez, A. & Oleinick, N. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.*, 51: 5993-5996 (1991).
- Ara, G.; Aprille, C.; Malis, S.; Hane, S.; Cincotta, L.; Foley, J.; Bonventre, J. & Oseroff, A. Mechanisms of mitochondrial photosensitization by the cationic dye, NN-Bis (2-ethyl-1,3-dioxylene) kryptocyanine (EDKC): preferential inactivation of Complex I in the electron transport chain. *Cancer Res.*, 47: 6580-6585 (1987).
- Arnfield, M.; González, S. & Lea, P. Cylindrical irradiation fibre tip for photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.*, 6: 150-154 (1986).
- Athar, M.; Elmetts, D.; Bickers, D.; Mukhtar, H. A novel mechanism for generation of superoxide anions in hematoporphyrin derivative-mediated cutaneous photosensitization: activation of the xantine oxidase pathway. *J. Clin. Invest.*, 83: 1137-1143 (1989).
- Atlante, A.; Passarella, E. & Quagliariello, G. Carrier thiols are targets of Photofrin II photosensitization of isolated rat liver mitochondria. *J. Photochem. Photobiol.*, 7: 21-32 (1990).
- Auler, H. & Banzer, G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwülstkranken Menschen und Tieren. *Z. Krebsforsch.*, 53: 65-68 (1942).
- Baas, P.; Michielsin, C.; Oppelaar, H.; Van Zandwijk, N. & Stewart, F. Enhancement of interstitial photodynamic therapy by mitomycin C and EO9 in a mouse tumour model. *Int. J. Cancer*, 56: 880-885 (1994).
- Batlle, A.; Salamanca, R.; Chinarro, S.; Afonso, S. & Stella, A. Photodynamic activation of red cell uroporphyrinogen decarboxylase by porphyrins. *Int. J. Biochem.*, 18: 143-147 (1986).

- Beems, E.; Dubbelman, T. & Lugtenburg, J. Photosensitizing properties of bacteriochlorophyll a. *Photochem. Photobiol.*, 46: 639-643 (1987).
- Bellnier, D.; Prout Jr, G. & Lin, C. Effect of 514.5 nm argon ion laser radiation on hematoporphyrin derivative-treated bladder tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 74: 617-625 (1985).
- Benson, R.; Farrow, G; Kinsey, J.; Cortese, D.; Zincke, H. & Utz, D. Detection and localization of *in situ* carcinoma of the bladder with Hematoporphyrin derivative. *Mayo Clin. Proc.*, 57: 548-555 (1982).
- Ben-Hur, E. & Rosenthal, I. The phtalocyanines: a new class of mammalian cell photosensitizers with a potential for cancer phototherapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, 47: 145-147 (1985).
- Ben-Hur, E. Mechanisms of blood flow stoppage by photodynamic therapy. *Spectrum*, 3: 3-4 (1990).
- Berg, K. Cellular uptake and photosensitizing effects of porphyrins and phtalocyanins. PhD thesis, Oslo University, 11-65 (1990).
- Berns, M.; Rettenmaier, M. & McCullough, J. Response of psoriasis to red laser light (630 nm) following systemic injection of hematoporphyrin derivative. *Lasers Surg. Med.*, 4: 73-77 (1984).
- Boegheim, J.; Lagerberg, J.; Tijissen, T.; Dubbelman, T. & Van Steveninck, J. Preferential uptake of cytotoxic porphyrins from hematoporphyrin derivative on murine L929 fibroblasts and Chinese hamster ovary K1 epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1012: 237-242 (1989).
- Boyle, G. & Pottier, W. Photobleaching of Photofrin II as a means of eliminating skin photosensitivity. *Photochem. Photobiol.*, 46: 997-1001 (1987).
- Brasseur, N.; Ali, H.; Langlois, R.; Wagner, R.; Rousseau, J. & Van Lier, J. Biological activities of phtalocyanines: photodynamic therapy of EMT-6 mammary tumors in mice with sulfonated phtalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 45: 581-586 (1987).
- Bremner, J.; Adams, G.; Pearson, J.; Sansom, J.; Straford, I.; Bedwell, J.; Bown, S. & Philips, D. Increasing effect of photodynamic therapy on the RIF-1 murine sarcoma, using the bioreductive drugs RSU1069 and RB6145. *Br. J. Cancer*, 66: 1070-1076 (1992).
- Buettner, G. & Need, M. Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by hematoporphyrin derivative, ascorbate and light. *Cancer Lett.*, 25: 297-304 (1985).
- Bugleski, P.; Porter, C. & Dougherty, T. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in malignant and normal tissue of the mouse. *Cancer Res.*, 41: 4606-4612 (1981).
- Calzavara-Pinton, P. Repetitive photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumors. *J. Photochem. Photobiol. B*, 53-57 (1995).
- Cannon, J. Pharmaceutics and drug delivery aspects of heme and porphyrin therapy. *J. Pharm. Sci.*, 82: 435-446 (1993).
- Chan, A. Photodynamic therapy for early esophageal cancer. *Gastroenterol.*, 109: 1406 (1995).

- Chapman, J.; Stobbe, C. & Arnfield, M. Oxygen dependency of cell killing *in vitro* by light-activated Photofrin II. *Radiat. Res.*, 126: 73-79 (1991).
- Chinarro, S.; Afonso, S.; Stella, A.; Salamanca, R. & Batlle, A. Acción fotodinámica de las porfirinas sobre la uroporfirinógeno decarboxilasa de eritrocitos. *Biométrica*, 10: 75-79 (1985).
- Cho, Y; Straight, R. & Smith, J. Effects of photodynamic therapy in combination with intravesical drugs in a murine bladder tumor model. *J. Urol.*, 147: 743-746 (1992).
- Cortese, D. & Kinsey, H. Endoscopic management of lung cancer with hematoporphyrin derivative phototherapy. *Mayo Clin. Proc.*, 57: 543-574 (1992).
- Cowled, P. & Forbes, I. Modification by vasoactive drugs of tumor destruction by photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer*, 59: 904-909 (1989).
- Dailey, H. & Smith, A. Differential interactions of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem. J.*, 223: 441-445 (1984).
- Delaney, T.; Sindelar, W. & Tochner, Z. Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 25: 445-457 (1993).
- Diamond, I.; Granelli, S. ; McDonagh, A.; Nielsen, S.; Wilson, C. & Jaenicke, R. Photodynamic Therapy of malignant tumors. *Lancet*, 2: 1175-1177 (1972).
- Di Ilio, C.; Sacchetta, P.; del Boccio, LaRovere, G. & Federici, G. Glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Lett.*, 29: 37-42 (1985).
- Doiron, D.; Profio, A.; Vincent, R. & Dougherty, T. Fluorescence bronchoscopy for detection of lung cancer. *Chest*, 76: 27-32 (1979).
- Dougherty, T.; Grindey, G. ; Fiel, R.; Weishaupt, K. & Boyle, D. Photoradiation therapy II: cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55: 115-121 (1975).
- Dougherty, T. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2: 83-116 (1984).
- Dougherty, T. Photosensitization of malignant tumors. *Semin. Surg. Oncol.*, 2: 24-37 (1986).
- Dougherty, T. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.*, 45: 879-889 (1987b).
- Dougherty, T. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. *Photochem. Photobiol.*, 46: 569-573 (1987a).
- Dougherty, T. Photodynamic Therapy: new approaches. *Semin. Surg. Oncol.*, 5: 6-16 (1989).
- Dougherty, T. & Marcus, S. Photodynamic therapy. *Eur. J. Cancer*, 28A: 1734-1742 (1992).
- Dougherty, T.; Potter, W. & Weishaupt, K. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 170: 301-314 (1984).

- Dougherty, T.; Cooper, M. & Mang, T. Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin. *Lasers Surg. Med.*, 10: 485-488 (1990).
- Edelson, R.; Berger, C. Gasparro, F. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 316: 297-303 (1987).
- Evans, S.; Matthews, R.; Perry, D.; Frankel, D. & Pass, H. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 34-39 (1990).
- Evensen, J.; Malik, Z. & Moan, J. Ultrastructural changes in the nuclei of human carcinoma cells after photodynamic treatment with hematoporphyrin derivative with tetrasodium-meso-tetra(4-sulphonatophenyl) porphine. *Lasers Med. Sci.*, 3: 195-206 (1988).
- Ferrario, A.; Rucker, N.; Ryter, S.; Doiron, D. & Gomer, C. Direct comparison of *in vitro* and *in vivo* Photofrin II mediated photosensitization using a pulsed KTP pumped dye laser and continuous wave argon ion pumped dye laser. *Lasers Surg. Med.*, 11: 404-410 (1991).
- Figge, F.; Weiland, G. & Manganiello, L. Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Roy. Soc. Exp. Biol. Med.*, 68: 640-641 (1948).
- Figge, F. & Wichterman, R. Effect of hematoporphyrin on X-radiation sensitivity in paramecium. *Science*, 122: 468-469 (1955).
- Fingar, V.; Mang, T. & Henderson, B. Modification of photodynamic therapy-induced hypoxia by Fluosol-DA (20%) and carbogen breathing in mice. *Cancer Res.*, 48: 3350-3354 (1988).
- Fingar, V.; Wieman, T. & Doak, K. Role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy-induced tumor destruction. *Cancer Res.*, 50: 2599-2603 (1990).
- Fingar, V.; Wieman, T. & Doak, W. Changes in tumor interstitial pressure induced by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 53: 763-768 (1991).
- Foote, C. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.*, 54: 659 (1991).
- Freitas, I. Lipid accumulation, the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissues. *J. Photochem. Photobiol.*, 359-361 (1990).
- Gaffney, D. & Sieber, F. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of soluble and membrane-bound enzymes in L1210 leukemia cells. *Cancer Res.*, 50: 7765-7769 (1990).
- Gibson, S.; Vandermeid, K.; Murant, S.; Raubertas, R. & Hilf, R. Effect of various photoradiation regimens on the antitumor efficacy of photodynamic therapy for R3230 AC mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 50: 7236-7241 (1990).
- Ginevra, F.; Biffanti, S.; Pagnan, A. Delivery of the tumor photosensitizer zinc (II) phthalocyanine to serum proteins by different liposomes: studies *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.*, 49: 59-65 (1990).
- Girotti, A. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.*, 51: 497-509 (1990).
- Glassberg, E.; Lewandowski, L. & Halcin, C. Hyperthermia potentiates the effects of aluminium phthalocyanine

- tetrasulfonate-mediated photodynamic toxicity in human malignant and normal cell lines. *Lasers Surg. Med.*, 11: 432-439 (1991).
- Gomer, C. Photodynamic therapy in the treatment of malignancies. *Semin. Hematol.*, 26: 27-34 (1989).
- Gomer, C. & Dougherty, T. Determination of (³H)- and (¹⁴C)-hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.*, 39: 146-151 (1979).
- Gomer, C. & Razum, N. Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. *Photochem. Photobiol.*, 40: 435-439 (1984).
- Gomer, C.; Doiron, D. & Rucker, N. Action spectrum (620-640 nm) for hematoporphyrin derivative induced cell killing. *Photochem. Photobiol.*, 39: 365-368 (1984).
- Gomer, C.; Ferrario, A.; Hayasho, N.; Rucker, B.; Szirth, C. & Murphree, L. Molecular, cellular and tissue responses following photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.*, 8: 450-463 (1988a).
- Gomer, C.; Rucker, N. & Murphee, A. Differential cell photosensitivity following photodynamic therapy. *Cancer Res.*, 48: 4539-4542 (1988b).
- Gomer, C.; Rucker, N.; Ferrario & Wong, S. Properties and applications of photodynamic therapy. *Radiat. Res.*, 120: 1-18 (1989).
- Gomer, C.; Luna, M.; Ferrario, A. & Rucker, N. Increases transcription and translation of heme oxygenase in Chinese Hamster fibroblasts following photodynamic stress or Photofrin II incubation. *Photochem. Photobiol.*, 53: 275-279 (1991).
- Goosner, L.; Wittke, H.; Warzecha, A.; Stroka, R.; Ernst, H.; Meier, M. & Ell, C. Verapamil and Hematoporphyrin derivative for tumour destruction by Photodynamic Therapy. *Br. J. Cancer*, 69: 84-86 (1991).
- Hamblin, M. & Newman, E. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.*, 23: 3-8 (1994).
- Hayashi, T.; Saito, T.; Sato, H.; Kuroiwa, Y. & Aizawa, K. Direct visualization of atherosclerosis in small coronary arteries using the epifluorescence stereoscope. *Cardiovasc. Res.*, 30: 5: 775-780 (1995).
- Hayata, Y.; Kato, H. & Okitsu, H. Photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative in cancer in the upper gastrointestinal tract. *Semin. Surg. Oncol.*, 1: 1-11 (1985).
- He, D.; Soter, N. & Lim, H. The late phase of hematoporphyrin derivative-induced phototoxicity in mice: release of histamine and histological changes. *Photochem. Photobiol.*, 50: 91-95 (1989).
- Henderson, B. Probing the effects of photodynamic therapy through *in vivo-in vitro* methods, in *Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease*. Ed. Kessel, D. Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston. Vol. I, p. 169-188 (1990).
- Henderson, B. & Donovan, J. Release of prostaglandin E₂ from cells by photodynamic treatment *in vitro*. *Cancer Res.*, 49: 6896-6900 (1989).
- Henderson, B. & Fingar, V. Oxygen limitation of direct tumour cell killing during photodynamic treatment of a murine tumour model. *Photochem. Photobiol.*, 49: 299-304 (1989).

- Henderson, B. & Stewart, C. Effects of porphyrins on murine hematopoiesis. *Photochem. Photobiol. Suppl.*, 55: 6S (Abstract) (1992).
- Jirsa, M.; Pouckova, J.; Dolezal, J.; Jospisil, J. & Jirsa, M. Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in tumour-bearing nude mice. *Eur. J. Cancer*, 27: 109 (1991).
- Jori, G. Photodynamic therapy of solid tumors. *Radiat. Phys. Chem.*, 30: 375-380 (1987).
- Jori, G. *In vivo* transport and pharmacokinetic behavior of tumours photosensitizers. *Ciba Found Symp.*, 146: 78-94 (1989).
- Jori, G. Factors controlling the selectivity and efficiency of tumour damage in photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.*, 5: 115-120 (1990a).
- Jori, G. Photosensitized processes *in vivo*: proposed phototherapeutic applications. *Photochem. Photobiol.*, 52: 439-443 (1990b).
- Jori, G. & Spikes, J. Photochemistry of porphyrins, en *Topics in photomedicine*. Ed. Smith, C. Plenum Press, New York, p. 183-318 (1984).
- Jori, G. & Reddi, E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int. J. Biochem.*, 25: 1369-1375 (1993).
- Jori, G.; Beltramini, M. ; Reddi, E.; Salvato, B.; Pagnan, A.; Ziron, L.; Tomio, L. & Tsanov, T. Evidence for a major role of plasma proteins as hematoporphyrin carriers *in vivo*. *Cancer Lett.*, 24: 291-297 (1984).
- Kelly, J. & Snell, M. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 155: 150-151 (1976).
- Kerdel, F.; Soter, A. & Lim, H. *In vivo* mediator release and degranulation of masts cells in hematoporphyrin derivative-induced phototoxicity in mice. *J. Invest. Dermatol.*, 88: 277-280 (1987).
- Kessel, D. Porphyrin lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Lett.*, 33: 183-188 (1986a).
- Kessel, D. Sites of photosensitization by derivatives of hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, 44: 489-494 (1986b).
- Kessel, D. & Spikes, E. Porphyrin accumulation by atheromatous plaques of the aorta. *Photochem. Photobiol.*, 40: 59-63 (1984).
- Kessel, D. & Woodburn, K. Biodistribution of photosensitizing agents. *Int. J. Biochem.*, 25: 1377-1383 (1993).
- Kessel, D.; Thompson, P. ; Musselman, B. & Chang, C. Probing the structure and stability of the tumor localizing derivative of hematoporphyrin by reduction with LiAlH₄. *Cancer Res.*, 47: 4642-4645 (1987).
- Kol, R.; Ben-Hur, E.; Marko, R. & Rosenthal, I. Inhibition of human lymphocyte stimulation by visible light and phtalocyanine photosensitization: mitogen and wavelength dependency. *Int. J. Radiat. Biol.*, 55: 1015-1022 (1989).
- Kongshaug, M.; Moan, J. & Bown, S. The distribution of porphyrins with different tumor localizing ability among human plasma proteins. *Br. J. Cancer*, 59: 184-188 (1989).

Korbelik, M. & Hung, J. Cellular delivery and retention of Photofrin: II. The effects of interaction with human plasma proteins. *Photochem. Photobiol.*, 53: 501-510 (1991).

Krutmann, J.; Athar, M.; Mendel, D.; Khaan, I.; Guyre, P.; Mukhtar, H. & Elmets, C. Inhibition of the high affinity Fc receptor (Fc RI) on human monocytes by porphyrin sensitization is highly specific and mediated by the generation of superoxide radicals. *J. Biol. Chem.*, 264: 11407-11413 (1989).

Laws, E.; Cortese, D. & Kinsey, J. Photoradiation therapy in the treatment of malignant brain tumors: a phase I (feasibility) study. *Neurosurg.*, 9: 672-678 (1981).

Levandag, P.; Ruifrok, J.; Marijnissen, W.; Van Putten, W. & Visser, A. Preliminary experience with interstitial radiation, interstitial hyperthermia and interstitial photodynamic therapy in a simple animal model. *Strahlenther. Onkol.*, 165: 56-60 (1989).

Lipson, R., Baldes, E. & Olsen, A. The use of hematoporphyrin in tumour destruction. *J. Natl. Cancer Inst.*, 26: 1-11 (1961).

Ma, L.; Moan, J.; Steen, H. & Iani, V. Anti-tumour activity of photodynamic therapy in combination with mitomycin C in nude mice with human colon adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*, 71: 950-956 (1995).

Malik, Z.; Hanania, J. & Nitzan, Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins. An alternative approach to antimicrobial drugs. *J. Photochem. Photobiol.*, 5: 281-293 (1990).

Mang, T.; Dougherty, T.; Potter, W.; Boyle, D.; Sommer, S. & Moan, J. Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. *Photochem. Photobiol.*, 45: 501-506 (1987).

Marijnissen, J.; Star, W. & Versteeg, A. Pilot study on the interstitial HPD-PDT in rats bearing solid mammary carcinoma or rhabdomyosarcoma, en Photodynamic therapy of tumours and other diseases. Eds. Jori, G. & Perria, C. *Libreria Progetto, Padova*, p. 387-390 (1985).

Marijnissen, J.; Jansen, H. & Star, W. Treatment system from whole bladder wall photodynamic therapy with *in vivo* monitoring and control of light dose rate and dose. *J. Urol.*, 142: 1351-1355 (1989).

Marijnissen, J.; Versteeg, J.; Star, W. & Van Putten, W. Tumor and normal tissue response to interstitial photodynamic therapy of the rat R-1 rhabdomyosarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22: 963-972 (1992).

Mathews-Roth, M. Porphyrin photosensitization and carotenoid protection in mice; *in vitro* and *in vivo* studies. *Photochem. Photobiol.*, 40: 63-67 (1984).

Matsumoto, N.; Saito, H.; Miyoshi, N.; Nakanishi, K. & Fukuda, M. Combination effect of hyperthermia and photodynamic therapy on colon carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 116: 824-829 (1990).

Mauzerall, M. & Granick, S. Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Uroporphyrinogen and its decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 232: 1141-1152 (1958).

Menyak, M.; Smith, P.; Harrington, F.; Steinberg, S.; Glastein, E. & Russo, A. Protection against di-Hp-ether photosensitivity. *Photochem. Photobiol.*, 47: 823-830 (1988).

- Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A. & Jori, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 32: 153-157 (1996).
- Meyer-Betz, F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des hematoporphyrins und andere Derivative des Bluts and Gallenfarbstoffs. *Arch. Dtsch. Klin. Med.*, 112: 476-503 (1913).
- Milanesi, C.; Sorgato, F. & Jori, G. Photokinetic and ultrastructural studies on porphyrin photosensitization of HeLa cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 55: 59-69 (1989).
- Minnock, A.; Vernon, D.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Parish, J. & Brown, S. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phtalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 32: 159-164 (1996).
- Misaki, T.; Hisazumi, H. & Miyoshi, N. Photoradiation therapy of bladder tumors, en Porphyrin localization and treatment of tumors. Eds. Doiron, D. & Gomer, C. Liss, New York, p. 785-795 (1984).
- Mitchell, J.; McPhearson, S.; DeGraff, W.; Gamson, J.; Zabel, A. & Russo, A. Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative induced photoinactivation of Chinese Hamster cells. *Cancer Res.*, 45: 2008-2011 (1985).
- Moan, J. Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem. Photobiol.*, 43: 681-690 (1986).
- Moan, J. & Sommer, S. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK-3025 cells. *Cancer Res.*, 45: 1608-1610 (1985).
- Moan, J.; Berg, K.; Kvam, E.; Western, A.; Malik, Z.; Ruck, A. & Schneckenburger, H. Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Found Symp.*, 146: 95-111 (1989).
- Morgan, A.; Garbo, M.; Kreimer-Birnbaum, M.; Keck, R.; Chaudhuri, K. & Selman, S. Morphological study of the combined effect of purpurin derivatives and light on transplantable rat bladder tumors. *Cancer Res.*, 47: 496-498 (1987).
- Morgan, A.; Rampersaud, A. & Keck, R. Verdins in photodynamic therapy of squamous cell carcinoma. *Am. J. Otolaryngol.*, 11: 125-130 (1990).
- Muller, P. & Wilson, B. Photodynamic therapy of malignant brain tumors: clinical effects, post-operative ICP and light penetration of the brain. *Photochem. Photobiol.*, 46: 929-935 (1987).
- Murakami, S.; Watanabe, Y.; Saitoh, H.; Yamashita, R.; Shimizu, J.; Oda, M. & Hayashi, Y. Treatment of multiple primary squamous cell carcinomas of the lung. *Ann. Thorac. Surgery*, 60: 964-969 (1995).
- Nelson, J.; Liaw, L. & Berns, M. Tumor destruction in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 46: 829-835 (1987a).
- Nelson, J.; Roberts, W. & Berns, M. *In vivo* studies on the utilization of the mono-L-aspartyl chlorin (NPe6) for photodynamic therapy. *Cancer Res.*, 47: 4681-4685 (1987b).
- Nelson, J.; Kimel, S. & Brown L. Glucose administration combined with photodynamic therapy of cancer improves therapeutic efficacy. *Lasers Surg. Med.*, 12: 153-158 (1992).

- Pandey, R.; Bellnier, D.; Smith, K. & Dougherty, T. Chlorin and porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 53: 65-72 (1991).
- Pangka, V.; Morgan, A. & Dolphin, D. Diels-Alder reactions of protoporphyrin IX dimethyl ester with electron-deficient alkynes. *J. Org. Chem.*, 51: 1094-1100 (1986).
- Patterson, M.; Wilson, B. & Wyman, D. The propagation of optical radiation in tissue, I: models of transport and their application. *Lasers Med. Sci.*, 6: 155-168 (1991).
- Pottier, J. & Kennedy, J. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J. Photochem. Photobiol.*, 8: 1-16 (1990).
- Powers, S. Current status of lasers in neurosurgical oncology. *Semin. Surg. Oncol.*, 8: 226-232 (1992).
- Prinsze, C.; Dubbelman, T. & Van Steveninck, J. Protein damage induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta*, 1038: 152-157 (1990).
- Raab, O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. *Z. Biol.*, 39: 524-526 (1900).
- Rakestraw, S.; Tompkins, R. & Yarmush, M. Antibody-targeted photolysis: *In vitro* studies with Sn (IV) chlorin e6 covalently bound to monoclonal antibodies using a modified dextran carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4217-4221 (1990).
- Razum, N.; Balchum, O. ; Profio, A. & Carstens, F. Skin photosensitivity: duration and intensity following intravenous hematoporphyrin derivatives, HpD and DHE. *Photochem. Photobiol.*, 46: 925-928 (1987).
- Reed, M.; Wieman, K.; Doak, C.; Piets, A. & Schuschke, A. The microvascular effects of photodynamic therapy: Evidence for a possible role of cyclooxygenase products. *Photochem. Photobiol.*, 50: 419-423 (1989).
- Rettenmaier, M.; Berman, M. & Disaia, P. Gynecologic uses of photoradiation therapy, en Porphyrin localization and treatment of tumors. Eds. Doiron, D. & Gomer, C. Liss, New York, p. 767-777 (1984).
- Ris, H.; Altermatt, H.; Inderbitzy, R.; Hess, R.; Nachbur, B.; Stewart, J.; Wang, Q.; Lim, C.; Bonnet, R.; Berenbaum, H. & Althaus, U. Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results. *Br. J. Cancer*, 64: 1116-1120 (1991).
- Roberts, W.; Klein, M. & Loomis, M. Photodynamic therapy of spontaneous cancers in felines, canines and snakes with chloro-aluminium sulfonated phtalocyanine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 18-23 (1991).
- Rosenthal, I. Phtalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.*, 53: 859-870 (1991).
- Salet, C. & Moreno, G. Photosensitization of mitochondria: molecular and cellular aspects. *J. Photochem. Photobiol. B*, 5: 133-150 (1990).
- Sandberg, S. & Romslo, I. Phototoxicity of protoporphyrin as related to its subcellular localization in mice livers after short-term feeding with griseofulvin. *Biochem. J.*, 198: 67-74 (1981).

Schuller, D.; McCaughan, J. & Rock, R. Photodynamic therapy in head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol.*, 111: 351-355 (1984).

Schwartz, S.; Absolon, K. & Vermund, H. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. *Univ. Minnesota Med. Bull.*, 7: 7-13 (1955).

Selman, S.; Kreimer-Birnbaum, M.; Klanuig, J.; Goldblatt, P.; Keck, R. & Britton, S. Blood flow in transplantable bladder tumors treated with hematoporphyrin derivative and light. *Cancer Res.*, 44: 1924-1927 (1984).

Sieber, F. & Krueger, G. Photodynamic therapy and bone marrow transplantation. *Seminars in Hematology*, 26: 35-39 (1989).

Sieber, F.; Krueger, J.; O'Brien, S.; Schober, S.; Sensenbrenner, L. & Sharkis, S. Inactivation of Friend erythroleukemia virus and Friend virus transformed cells by merocyanine 540-mediated photosensitization. *Blood*, 73: 345-350 (1989).

Singh, G.; Jeeves, W.; Wilson, C.; Jang, D. Mitochondrial photosensitization by Photofrin II. *Photochem. Photobiol.*, 46: 645-649 (1987).

Smith, A.; Nuiry, I. & Awasthi, Y. Interactions with glutathione S-transferases of porphyrins used in photodynamic therapy and naturally occurring porphyrins. *Biochem. J.*, 229: 823-831 (1985).

Spikes, J. & Jori, G. Photodynamic therapy of tumours and other diseases. *Lasers Med. Sci.*, 2: 3-15 (1987).

Star, W.; Marijnissen, J.; Van den Berg-Blok; Versteeg, J.; Franken, K. & Reinholds, H. Destruction of mammary and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed *in vivo* in sandwich observation chambers. *Cancer Res.*, 46: 2532-2540 (1986).

Star, W.; Versteeg, J.; Van Putten, W. & Marijnissen, H. Wavelength dependence of hematoporphyrin derivative photodynamic treatment on rat ears. *Photochem. Photobiol.*, 52: 547-554 (1990).

Star, W.; Wilson, B. & Patterson, M. Light delivery and optical dosimetry in photodynamic therapy of solid tumors, in *Photodynamic therapy: basic principles and clinical applications*. Eds. Henderson, B. & Dougherty, T. Marcel Dekker, New York, p. 335-367 (1992).

Stella, A.; Parera, V. & Battle, A. Acción fotodinámica y no fotodinámica de las porfirinas sobre la aminolevulíco dehidrasa en sangre normal y de pacientes con porfiria cutánea tardía. *Rev. Arg. Derm.* 70: 209-215 (1989).

Stepiens, H.; Kunert-Radek, J. Stanis, G.; Zerek-Melen, G. & Pawlikowsky, M. Inhibitory effect of porphyrins on the proliferation of mouse spleen lymphocytes *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174: 313-322 (1991).

Sturgies, E. & Miller, R. Second primary malignancies in the head and neck cancer patient. *Ann. Otol. Rhin. Laryn.*, 104: 946-954 (1995).

Tappeiner, H. & Jesionek, A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffe. *Muench Med. Wochenschr.*, 47: 2042-2044 (1903).

Tomio, L.; Calzavara, F. & Zorat, P. Photoradiation therapy for cutaneous and subcutaneous malignant tumors using hematoporphyrin, in *Porphyrin localization and treatment of*

- tumors. Eds. Doiron, D. & Gomer, C. Liss, New York, p. 829-841 (1984).
- Uchibayashi, T.; Koshida, K.; Kunimi, K. & Hisazumi, H. Whole bladder wall photodynamic therapy for refractory carcinoma in situ of the bladder. *Br. J. Cancer*, 71: 625-628 (1995).
- Valenzeno, D. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem. Photobiol.*, 46: 147-160 (1987).
- Van Gemert, M.; Berenbaum, M. & Gijsberts, G. Wavelength and light-dose dependence in tumour phototherapy with hematoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer*, 52: 43-49 (1985).
- Van Steveninck, J.; Tijssen, K.; Boegheim, J.; Van der Zee, J. & Dubbelman, T. Photodynamic generation of hydroxyl radicals by hematoporphyrin derivative and light. *Photochem. Photobiol.*, 44: 711-716 (1986).
- Vincent, R.; Dougherty, T. & Rao, U. Photoradiation therapy in the treatment of advanced carcinoma of trachea and bronchus, en Porphyrin localization and treatment of tumors. Eds. Doiron, D. & Gomer, C. Liss, New York, p. 759-767 (1984).
- Waldow, S. & Dougherty, T. Interaction of hyperthermia and photoradiation therapy. *Radiat. Res.*, 97: 380-385 (1984).
- Weishaupt, K.; Gomer, C. & Dougherty, T. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoactivation of a murine tumour. *Cancer Res.*, 36: 2326-2329 (1976).
- Wilson, B. & Patterson, M. The physics of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.*, 31: 327-360 (1986).
- Wilson, B. & Van Lier. Radiolabelled photosensitizers for tumor imaging and photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B*, 3: 459-463 (1989).
- Wilson, B. Photodynamic therapy: light delivery and dosage for second-generation photosensitizers. *Ciba Found Symp.*, 146: 60-77 (1989).
- Wilson, J., Van Hillesberg, R. ; Van der Berg, J.; Kort, W. & Terpstra, O. Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors. *Scand. J. Gastroenterol.*, 188: 20-25 (1991).
- Wolf, P.; Fink-Puches, R.; Cerroni, L. & Kerl, H. Photodynamic therapy for mycosis fungoides after topical photosensitization with 5-aminolevulinic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 31: 678-680 (1994).
- Woodburn, K.; Vardaxis, J.; Hill, A.; Kaye, A. & Phillips, D. Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem. Photobiol.*, 54: 725-732 (1991).
- Wyss, P.; Svaasand, L. & Tadir, Y. Photomedicine of the endometrium: Experimental concepts. *Hum. Repr.*, 10: 221-226 (1995).
- Yamamoto, N.; Homma, S.; Sery, T.; Donoso, L. & Hooper, K. Photodynamic immunopotential: *in vitro* activation of macrophages by treatment of mouse peritoneal cells with haematoporphyrin derivative and light. *Eur. J. Cancer*, 27: 467-471 (1991).
- Yang, J.; Van Dijk-Smith, J.; Van Vugt, D.; Kennedy, J. & Reid, R. Fluorescence and photosensitization of experimental endometriosis in the rat after systemic 5-aminolevulinic acid administration: A potential new approach to the diagnosis and

treatment of endometriosis. Am. J. Obstet. Gynecol., 174: 154-160 (1996).

Zhou, C. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol., 3: 299-318 (1989).

CAPITULO III

TERAPIA FOTODINAMICA A PARTIR DE ALA

III.1 Fundamentos.....	64
III.2 Especificidad de tejidos por la PROTO IX inducida por ALA.....	67
III.3 Farmacocinética de la PROTO IX inducida a partir de ALA.....	68
III.4 Excitación de las porfirinas endógenas.....	68
III.5 Vías de administración.....	72
III.5.1 Penetración del ALA a través de la piel.....	72
III.5.2 Uso de liposomas.....	73
III.6 Sitios de acción.....	74
III.7 Experiencia clínica.....	76
III.8 Toxicidad del ALA y/o PROTO IX sintetizada a partir de ALA.....	79
III.9 Referencias.....	80

III. TERAPIA FOTODINAMICA A PARTIR DEL ALA

III.1 Fundamentos.

Se ha descrito que la administración del precursor ácido 5-aminolevúlico a una variedad de organismos desde bacterias (Kilian, 1974), plantas y animales (Batlle et al., 1975; Malik & Djaldetti, 1979; Sima et al., 1981; Rebeiz et al., 1984; Fukuda et al., 1992a) hasta el hombre (Berlin et al., 1956), lleva a la síntesis de un exceso de PROTO IX.

La fotosensibilización inducida a partir de ALA se ha convertido recientemente en una alternativa prometedora en la TFD. Este método se basa en dos importantes observaciones: 1) todas las células son productoras de porfirinas como precursores del hemo; 2) se ha encontrado disminución en la actividad de la ferroquelatasa en varios tejidos malignos y en tejidos en regeneración, mientras que en estas mismas células se ha hallado que la actividad de la PBG-asa estaba aumentada (Rubino & Rasseti, 1966; Schoenfeld et al., 1988; Leivovici et al., 1988; Navone et al., 1990; El-Sharabasy et al., 1992).

La idea consiste en "by-pasear" la enzima limitante del camino del hemo, el ALA-S, mediante la administración de un exceso de su producto, el ALA, lo cual conduce a la acumulación de porfirinas, en particular PROTO IX (Malik & Lugaci, 1989; Fukuda et al., 1989; Kennedy et al., 1990) en las células malignas.

Ya en 1975, Batlle et al., trabajando en nuestro laboratorio con tumores vegetales, observaron que cuando éstos se hacían crecer en presencia de ALA, sintetizaban rápidamente porfirinas, se coloreaban y fluorescían al exponerlos a la luz UV; mientras que cuando eran expuestos a la luz visible, se amarronaban y morían en un corto período de tiempo. Se propuso entonces, que esta propiedad de sintetizar y acumular porfirinas a partir de ALA en los tumores de origen vegetal y luego la destrucción fotodinámica de los tejidos por acción de la luz sobre estos pigmentos, podía hacerse extensiva a las células neoplásicas de mamíferos.

Posteriormente, también en nuestro laboratorio, se observó que, usando ALA como precursor (Navone et al., 1988), la biosíntesis de porfirinas en un adenocarcinoma humano era 20

veces mayor que en tejido normal; asimismo se detectó una actividad mayor de ALA-D, PBG-asa, URO-D, rodenasa y hemoxigenasa en tumores humanos y murinos, mientras que la actividad de ALA-S era muy baja y los niveles de Cit P₄₅₀, no detectables (Navone et al., 1990).

Malik et al. (1987, 1989) lograron la inactivación fotodinámica de células leucémicas eritrocíticas, linfocíticas y mielocíticas y de linfoma de Burkitt incubadas con ALA.

Además de la selectividad, la ventaja que presenta la fotosensibilización endógena con ALA es que el producto principal, la PROTO IX, tiene una estructura molecular definida, con un máximo de absorción en la zona roja a los 630 nm (Pottier et al., 1986). Otra ventaja terapéutica del uso del ALA es la disminución del período de fotosensibilización cutánea que, a diferencia del Photofrin, se limita a un lapso menor a 24 hs (Divaris et al., 1990; Fukuda et al., 1992a).

En contraste con lo que ocurre con el Photofrin, cuando se administra ALA hay una correlación directa entre la fluorescencia y la presencia de fotosensibilizante activo. En el primero, los componentes hidrofílicos fluorescen, pero son fotodinámicamente menos activos que los hidrofóbicos, que no fluorescen, de manera tal que la intensidad de fluorescencia no es proporcional al daño producido (Dougherty, 1987). En cambio, la intensidad de la fluorescencia luego de la administración de ALA, es un indicador de la concentración de PROTO IX en los tejidos (Loh et al., 1993b). Esta propiedad es muy importante para su uso en la detección y destrucción simultánea del tumor.

Sin embargo, Van der Veen et al. (1994) encontraron discrepancias entre la intensidad de fluorescencia y el daño fotodinámico, posiblemente debido a la constricción vascular durante el tratamiento, ya que también es necesaria una óptima concentración de O₂ para lograr el daño tisular.

Se cree que la baja actividad de la Fe-Quel en células tumorales se debería a una deficiencia mitocondrial en la generación de energía (Rimington & Riley, 1993), provocada por un aumento en la glicólisis, en comparación con la fosforilación oxidativa. Como se sabe, los tumores, tejidos con altas tasas de proliferación, poseen baja actividad de citocromo oxidasa mitocondrial (Dailey & Smith, 1984).

Otros autores creen que la deficiencia de la Fe-Quel se puede deber a la competencia por el hierro de otros caminos

metabólicos en las células tumorales, ya que este metal juega un rol importante en la división celular (Sussman, 1989).

Por otro lado, se ha propuesto que la entrada de ALA a las células es mayor en aquéllas de estirpe tumoral que en el resto de los tejidos o que, por el contrario, es menor el eflujo de la PROTO IX formada, debido a la desorganización de la vasculatura tumoral y/o necrosis y acumulación de fluidos en las lesiones (Hua et al., 1995).

Sin embargo, otros autores no han encontrado un aumento de la fluorescencia de la PROTO IX al aumentar la dosis de ALA, y proponen que el factor limitante en la acumulación de la porfirina no es la entrada de ALA a la célula sino la biosíntesis del hemo (Van der Veen e al., 1994).

Por lo expuesto anteriormente, la eficiencia de la terapia con ALA está condicionada al metabolismo de la célula blanco, ya que si la producción de PROTO IX ocurre preferencialmente en células metabólicamente activas, entonces las células relativamente quiescentes dentro del tumor no serían capaces de producir suficiente porfirina como para ser fotosensibilizadas por iluminación (Cairnduff et al., 1995). Este sería un posible mecanismo de resistencia a esta terapia.

Aquellos compuestos que alteran la síntesis endógena de hemo pueden utilizarse para potenciar la acumulación de PROTO. Por ejemplo se encontró que las mitocondrias de células hepáticas de roedor acumulan esta porfirina lipofílica luego de administrar a los animales compuestos porfirinogénicos tales como hexaclorobenceno, griseofulvina (Sandberg & Romslo, 1981) y AIA (Schoenfeld et al., 1994).

Otra alternativa es el uso de agentes complejantes del hierro tales como la desferroxamina (Ortel et al., 1993, Iinuma et al. 1994), o la o-fenantrolina (Rebeiz et al., 1992) potenciando la fotosensibilidad inducida por ALA como resultado de una mayor acumulación de PROTO IX al disminuir la síntesis de hemo.

También se aumentó la producción endógena de porfirinas en cultivos celulares de melanomas mediante el agregado de del inductor de diferenciación dimetilsulfóxido (DMSO) (Schoenfeld et al., 1994). Ese agente induce la síntesis de ARN mensajero de las enzimas biosintéticas del hemo (Fujita et al., 1991).

III.2 Especificidad de tejidos por la PROTO-IX inducida por ALA.

La administración sistémica de una dosis adecuada de ALA en animales de experimentación induce la típica fluorescencia de la PROTO IX en algunos tejidos, pero no en otros.

En ratones, se observó una fuerte fluorescencia en piel, mucosa de las cavidades oral, vaginal y anal, en las glándulas salivales, ductos biliares, vejiga y vesícula seminal. Ciertos órganos, por otra parte, exhibieron una débil fluorescencia, en tanto que no fue detectable en músculo esquelético y cardíaco (Sima et al., 1981; Pottier et al., 1986).

Mediante microscopía de fluorescencia de la piel, vejiga y útero, se comprobó que estos tejidos presentan una fuerte emisión en la epidermis, endometrio y urotelio, pero no así en la dermis, miometrio y músculos de la vejiga (Divaris et al., 1990).

En tumores humanos se observó que aquéllos que tenían origen epidérmico (carcinoma de células basales, escamoso, adenocarcinoma de glándulas sebáceas), bronquial (carcinoma de células escamosas de pulmón), de tejido mamario (adenocarcinoma de mama) y en las glándulas salivales (carcinoma escamoso de parótidas), exhibían una fuerte fluorescencia luego de la aplicación tópica de ALA (Kennedy & Pottier, 1990).

Aparentemente, la PROTO IX inducida a partir de ALA se acumula primariamente en tejidos que recubren superficies, tales como epidermis, conjuntiva, mucosas, endometrio o urotelio, o en glándulas con ductos que se vacían en dichas superficies, tales como glándulas sebáceas, mamarias, salivales o vesículas seminales.

En contraste, los tejidos de origen mesodérmico, tales como músculo, tejido conectivo, cartílago, médula ósea y sangre, no desarrollaron *in vivo* una fluorescencia significativa (Kennedy & Pottier, 1992).

Steinbach et al. (1995) estudiaron la capacidad de acumular PROTO IX a partir de ALA en diversas líneas celulares, y encontraron que las células uroteliales que derivaban de tumores de vejiga mostraban una intensidad de fluorescencia cuantificada por citometría de flujo, mucho mayor que la exhibida por las células normales.

En arterias de rata, se vio que la TFD a partir de ALA provocaba a los 3 días la pérdida completa del endotelio, de la capa media de células musculares lisas, dejando una pared arterial débil y desprovista de células. Luego de dos semanas, sin embargo, las arterias ya habían recuperado el endotelio, sin presentar en ningún momento peligro de hemorragia u oclusión (Grant et al., 1994).

Es posible que los diferentes tipos celulares tengan distinta capacidad para sintetizar hemo, o bien que actúen sobre ellos diferentes mecanismos de regulación (Whetsell et al., 1978).

III.3 Farmacocinética de la PROTO IX inducida a partir de ALA.

La PROTO IX inducida por ALA es eliminada de los tejidos en 24 hs luego de la inyección i.p., s.c., tópica o intradérmica (Pottier et al., 1986; Qian et al., 1987; Fukuda et al., 1992a).

III.4 Excitación de las porfirinas endógenas.

La principal especie activa de oxígeno producida cuando se excita a una molécula de porfirina con luz de 630 nm es el 1O_2 , y, más aún, en el caso de la TFD a partir de ALA, se encontró que es la molécula de PROTO IX y no el ALA *per se* la productora de dicha especie (Ratcliffe & Matthews, 1995).

Sin embargo, otras especies como el $OH\cdot$ también estarían involucradas en el daño celular (Kessel, 1977) y existen documentadas evidencias de los efectos *per se* de la PROTO IX sobre la célula.

La irradiación de PROTO IX lleva a la producción de los isómeros A y B de Protoporfirina, que son clorinas que presentan una mayor absorción a longitudes de onda mayores (Figura III.1), en base a ello se ha sugerido la combinación de las irradiaciones 630 + 670 nm para aumentar la eficacia terapéutica del tratamiento (Charlesworth & Truscott, 1993).

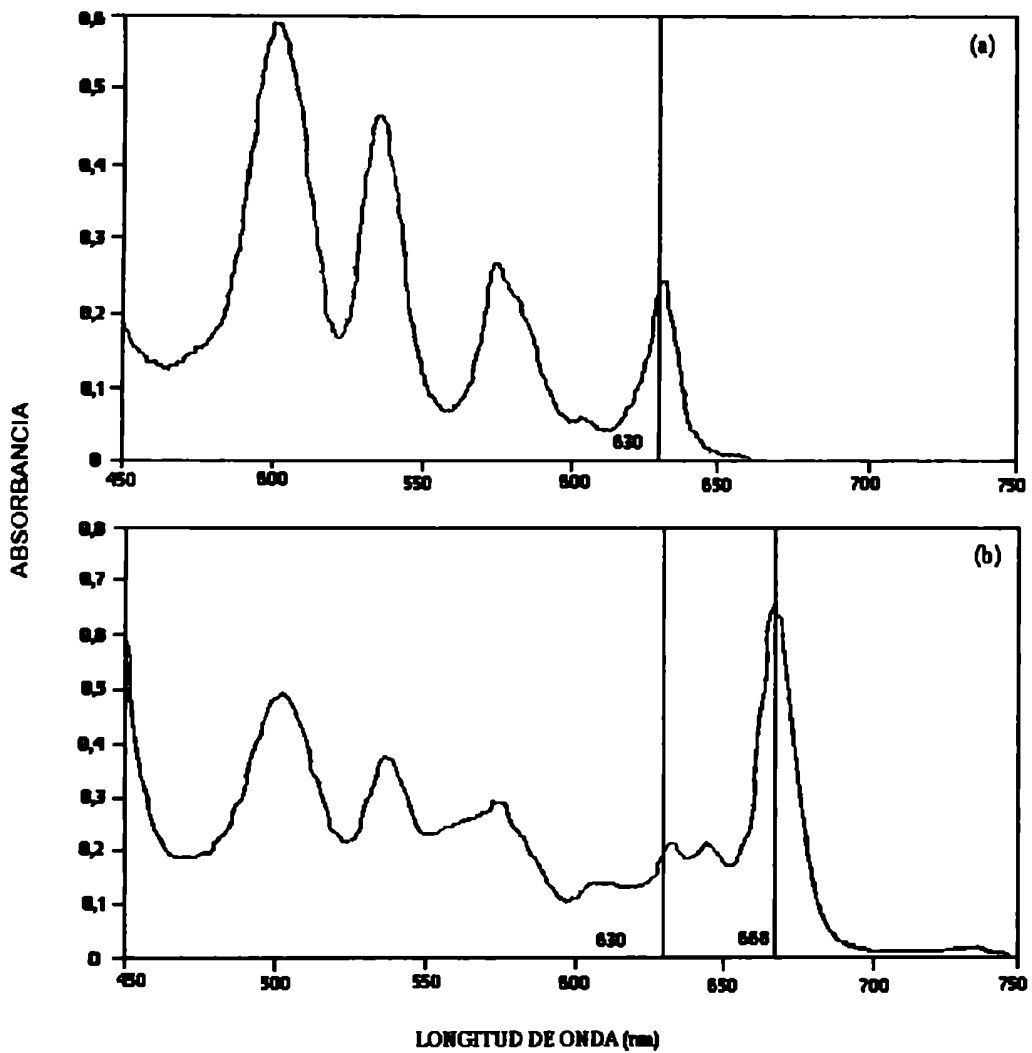


FIGURA III.1: Espectro de absorción de Protopofirina antes (a) y después de ser irradiada (b).

Luego de ser irradiada, parte de la PROTO IX se convierte en dos tipos de clorinas que presentan un pico de absorción a 670 nm.

Se cree que el 1O_2 actúa sobre la molécula de PROTO IX para producir estos fotoproductos, llamados fotoprotoporfirinas (Figura III.2), los que, a diferencia de lo que ocurre con los productos del "fotobleaching", absorben en la región visible del espectro, presentan un alto rendimiento cuántico y tienen una buena penetración en los tejidos (Dickson & Pottier, 1995).

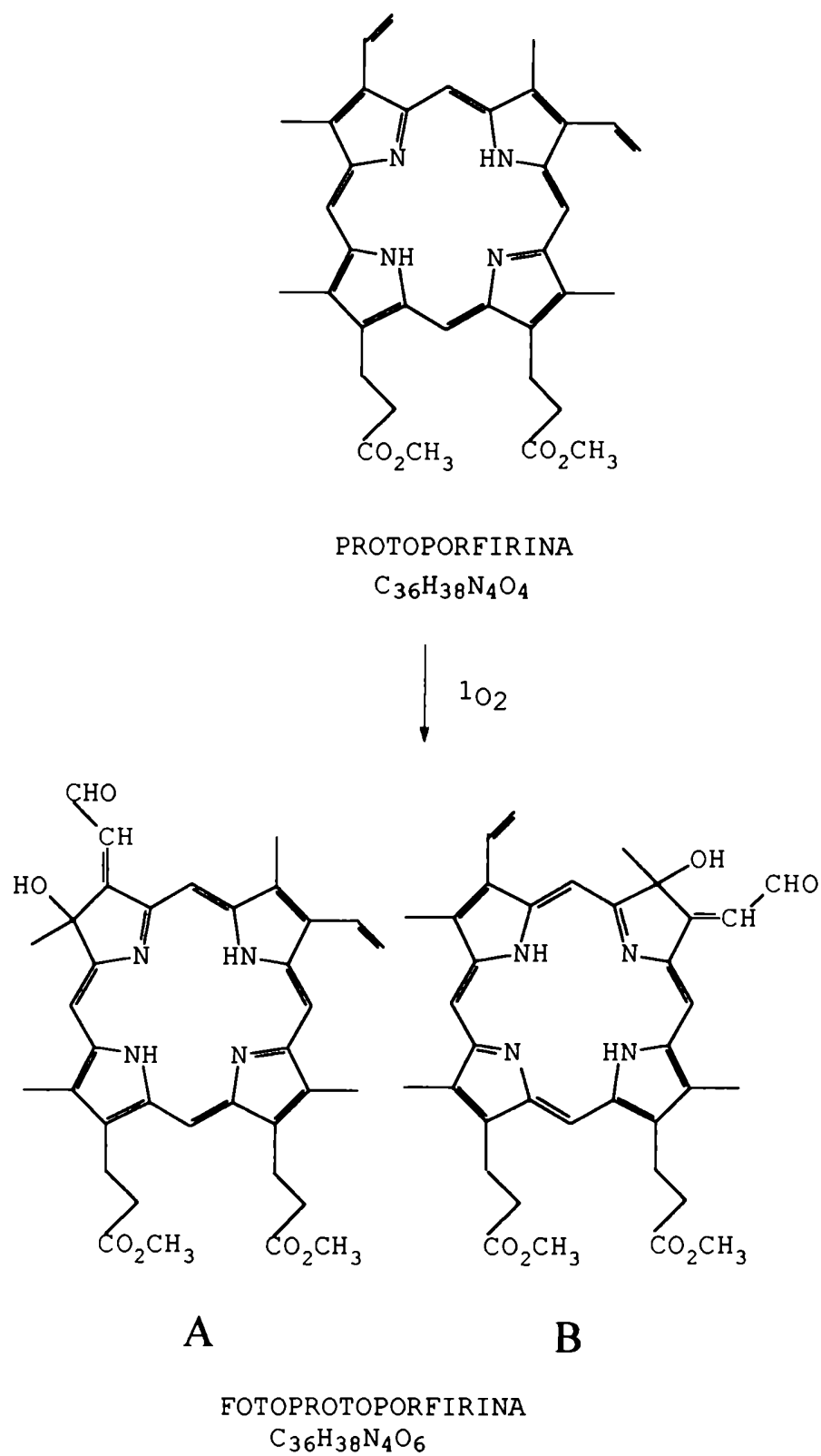


FIGURA III.2: Estructura de dos de los fotoproductos de tipo clorinas, derivados de la PROTO IX.

Para la formación de estos isómeros, que son conocidos como Protoporfirina A y B es necesario el oxígeno singulete.

Los estudios *in vivo* de formación de fotoproductos son muy difíciles de llevar a cabo, aunque recientemente han aparecido algunos trabajos en los cuales se describe la emisión de

fluorescencia por parte de los fotoproductos luego de irradiación de tumores murinos y humanos (König et al., 1993; König & Schneckenburger, 1994).

Cuando se siguió la formación de estos fotoproductos a lo largo del tiempo, se vio que la contribución a la banda de 670 nm aumentó respecto a la la de 630 nm de la PROTO IX con el tiempo de irradiación. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que haya bandas menores de emisión entre la región de 640-650 nm (König & Schneckenburger, 1994).

Se ha observado que la TFD a partir de ALA provocaba la destrucción superficial del tumor, probablemente debido al régimen de administración de luz, ya que la molécula de PROTO puede ser más susceptible a reaccionar con el oxígeno singulete o con componentes tisulares durante la iluminación (fotobleaching o fotoinactivación) (Kennedy & Pottier, 1992).

Debido a que la fotoinactivación del pigmento está compitiendo con la acción fotodinámica de las porfirinas, se recomienda la iluminación periódica o exposición prolongada con luz de baja potencia para aumentar la eficacia, al permitir que se regeneren cantidades suficientes de PROTO (Joseph et al., 1993).

Se vio también que se mejoraba la eficacia de la TFD con la aplicación de un régimen de luz fraccionado (30 seg. on/30 seg off) luego de la administración sistémica de ALA (Hua et al., 1995).

Mediante el uso de láseres pulsados es posible lograr la llamada "excitación de dos cuantos" de la molécula de PROTO IX, que da lugar a una reacción fotoquímica con mayor rendimiento cuántico (Karu et al., 1981). Los fotoproductos que se forman con este tipo de reacciones son distintos de aquéllos originados en la excitación de un cuanto de los láseres comunes. Aún no se sabe si estos hallazgos pueden mejorar la eficiencia de la ALA-TFD, aunque una ventaja inmediata es la disminución del tiempo necesario para alcanzar la fotodestrucción del tumor (Karu & Letokhov, 1994).

Por otra parte, Van der Veen et al. (1994) encontraron que, aumentando el número de aplicaciones de luz, aumentaba el grado de necrosis tumoral, sin aumentar el daño en los tejidos normales peritumorales.

En cuanto a la fotodetección de tumores, el ALA se ha estado utilizando recientemente aprovechando la fluorescencia de la PROTO IX. Se han obtenido muy buenos resultados tanto en animales de experimentación como en clínica mediante esta técnica, lográndose una mejor definición de la zona tumoral comparada con el uso de otros fotosensibilizantes (Kriegmair, et al., 1994; Cubeddu et al., 1995).

III.5 Vías de administración.

Ya existen hoy día un importante número de aplicaciones clínicas acerca del uso del ALA en distintas dosis y vías, tanto para la detección como para el tratamiento de tumores sólidos. Retomaremos este tema más adelante en III.7.

Una de las ventajas del uso del ALA en la fotosensibilización, es la variedad de formas de administración inocuas del ALA, ya que, a diferencia de lo que ocurre con el Photofrin, el ALA se puede administrar no sólo por vía sistémica sino también por vía intrauterina, intravesical, por topicación, inhalación y por vía oral.

En animales de experimentación también se ha usado la vía intratumoral (i.t.) para administrar ALA en la TFD de tumores accesibles, y si bien los niveles de porfirinas acumuladas fueron adecuados (Fukuda et al., 1992a, 1992b), no se observó un aumento de la eficiencia del tratamiento con respecto a las vías clásicas (Cairnduff et al., 1995).

III.5.1 Penetración del ALA a través de la piel.

La piel normal varía en cuanto al grado de penetración del ALA, ya que las pieles orientales o nativas americanas bloquean mejor que las occidentales el pasaje de ALA y más aún que las europeas. Por otra parte en pieles célticas, el ALA parece penetrar de una manera puntuada, como lo demuestra la fluorescencia irregular que éstas presentan luego de la administración de ALA (Kennedy & Pottier, 1992).

Varios tipos de anomalías benignas de la piel tales como heridas, quemaduras, psoriasis, queratosis actínicas, etc., favorecen la permeabilidad del ALA. En cambio, las hiperqueratosis asociadas con las verruca vulgaris, inhiben en gran medida la penetración del ALA.

En lesiones malignas tales como los carcinomas escamosos y de células basales, por presentar alteraciones en sus capas de queratina, presentan una gran permeabilidad al ALA. Esta diferencia respecto a las células normales adyacentes hacen que no sea necesaria la restricción de la aplicación del ALA al área afectada.

El ALA que penetra al *stratum corneum* difunde a través de la epidermis y llega hasta la dermis, donde la fluorescencia se observa principalmente en las glándulas pilosebáceas y no en las células en sí, por lo cual se pueden tratar cánceres de origen epidérmico sin causar daños serios en la dermis (Kennedy & Pottier, 1992).

III.5.2 Uso de liposomas.

Con el objetivo de incrementar la afinidad del ALA por las células tumorales, en nuestro laboratorio se logró encapsular ALA en liposomas de fosfatidilcolina. El uso de ALA encapsulado en liposomas presenta la ventaja adicional de alcanzar una distribución más uniforme en el tumor, además de disminuir los posibles efectos neurológicos colaterales, impidiendo el paso de este precursor por la barrera hematoencefálica.

Estudios *in vitro* en cultivos de explantes tisulares en medio conteniendo ALA libre o encapsulado en liposomas, mostraron que la formación de porfirinas fue mayor cuando se utilizó el precursor encapsulado (Fukuda et al., 1989).

Los estudios *in vivo* en ratones en los que se inyectó ALA encapsulado por vía i.p., sc. e i.t., mostraron una relación de concentración de porfirinas tumor/piel de aproximadamente 30, observándose una elevada síntesis de porfirinas en el tejido neoplásico, mientras que en el resto de los tejidos, la concentración de porfirinas después de 24 hs volvía a valores normales. Con una dosis de 200 mg/kg de peso se encontró la máxima concentración de porfirinas en tumor luego de 10 hs de la

administración i.t., siendo ésta de 7 µg/g de tejido (40% PROTO y 40% COPRO). La maximización de la síntesis de porfirinas por la vía i.t. confirma una vez más la integridad del camino del hemo en este tejido (Fukuda et al., 1992a).

Se demostró también *in vivo* que la administración previa de liposomas vacíos, con el objeto de bloquear la captación hepática de ALA encapsulado inyectado por vía i.t., incrementaba un 30% el nivel de porfirinas acumuladas en tumor, como resultado de una menor incorporación de ALA al tejido hepático y una consecuente disminución del 20% en la cantidad de porfirinas sintetizadas en este tejido (Fukuda et al., 1992b).

III.6 Sitios de acción

Como la PROTO IX se sintetiza en mitocondria, se acumula principalmente en el interior de las células más que en el espacio extracelular, encontrándose una cantidad muy baja de esta porfirina en la circulación general. Como consecuencia de esta localización, es de esperar que los daños causados por la TFD a partir de ALA se localizaran subcelularmente a nivel de esta organela.

Por microscopía de fluorescencia se comprobó que la mayor parte de la emisión se ubica en las mitocondrias, como así también los primeros indicios de daño celular (Iinuma et al., 1994) percibidos por microscopía electrónica.

En un estudio hecho en mitocondrias de ratón (Sandberg & Romslo, 1980) se encontró desacople e inhibición de la fosforilación oxidativa, disipación de energía, inhibición de la respiración, hinchamiento y ruptura de la mitocondrias entre otros daños causados por la PROTO IX activada.

También se vio por espectroscopía de resonancia magnética nuclear *in vivo* que había una dramática disminución de la concentración de ATP luego de la fotosensibilización de ratones tratados con ALA sistémicamente (Hua et al., 1995).

Por otra parte, en un estudio de fotosensibilización con ALA de células en cultivo se detectó por microscopía de scaneo que uno de los daños iniciales era la desintegración de la membrana celular (Schoenfeld et al., 1994).

En este mismo estudio, y por microanálisis de rayos X se detectó un importante eflujo de K acompañado de influjo de Na, Cl y Ca. El incremento de la permeabilidad pasiva de cationes lleva finalmente a la lisis de la célula.

Las lipofuscinas son productos de la reacción de compuestos aldehídicos de la lipoperoxidación con grupos amino libres, y se siguen formando aún en la oscuridad, luego de la fotosensibilización. La formación de estos productos estaría implicada en la pérdida de K, la entrada de ácidos grasos a la célula y la pérdida de actividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa (Morliere et al., 1987).

La alta formación de lipofuscinas en fibroblastos fotosensibilizados con ALA, confirma que la membrana plasmática es un sitio de localización preferencial para la PROTO IX sintetizada endógenamente (Gaulhier et al., 1995).

Steinbach et al. (1995) observaron que luego de 4 hs de incubación con ALA, la fluorescencia de la PROTO IX se localizaba principalmente en la zona perinuclear, mientras que, luego de 48 hs de incubación, ésta se relocalizaba en la membrana plasmática, pero no vieron en ningún momento fluorescencia en las mitocondrias.

También se vio, haciendo uso de técnicas microespectrofluorimétricas con sondas fluorescentes específicas para lisosomas, que la fluorescencia inducida a partir de ALA colocalizaba en lisosomas pero no en mitocondrias (Gaulhier et al., 1995).

Por otra parte, Loh et al. (1993b) e Iinuma et al. (1994) encontraron discrepancias entre la fluorescencia inducida por ALA y el daño fotodinámico *in vivo* e *in vitro* respectivamente.

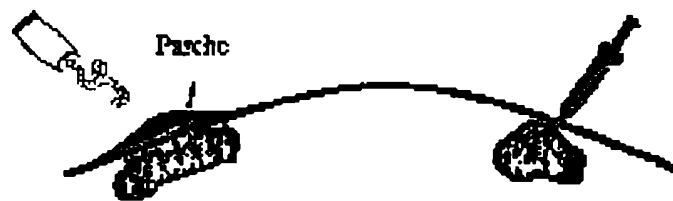
Además del ataque fotodinámico del ¹O₂ sobre membranas mitocondriales y celulares, los ácidos nucleicos y las proteínas también son susceptibles a la acción fotoactiva (Foote, 1984) de la PROTO IX.

III.7 Experiencia clínica.

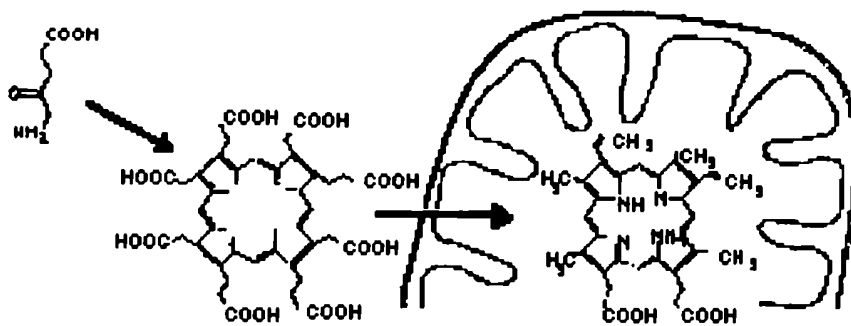
La administración oral de ALA en dosis de 30 a 60 mg/kg indujo una fluorescencia selectiva en carcinomas escamosos de la cavidad oral después de 4 a 6 hs de su administración, volviendo a los niveles basales a las 24 hs. Luego de la iluminación con 50-100 J/cm² a 630 nm se obtuvo necrosis parcial de los tejidos malignos (Grant et al., 1993). En un estudio piloto en dos pacientes con carcinoma colorrectal inoperable, la administración oral de ALA (30-60 mg/kg) también indujo fluorescencia selectiva en los tumores a las 4-6 hs (Loh et al., 1993a). En otro estudio de TFD luego de ALA oral (60 mg/kg) en dos pacientes con carcinomas gástricos se observó una remisión total del tumor por dos meses y en un paciente con un tumor avanzado de esófago se encontró remisión parcial.

Como fotosensibilizante de tumores de piel, la TFD a partir de ALA es particularmente prometedora, siendo indicada como la alternativa de elección para el tratamiento de lesiones grandes o en localizaciones de difícil acceso o con poca vascularización. Esta técnica presenta mejores resultados cosméticos, en cuanto a que deja cicatrices mucho menos pronunciadas que la electrodisecación y la criocirugía (Figura III.3).

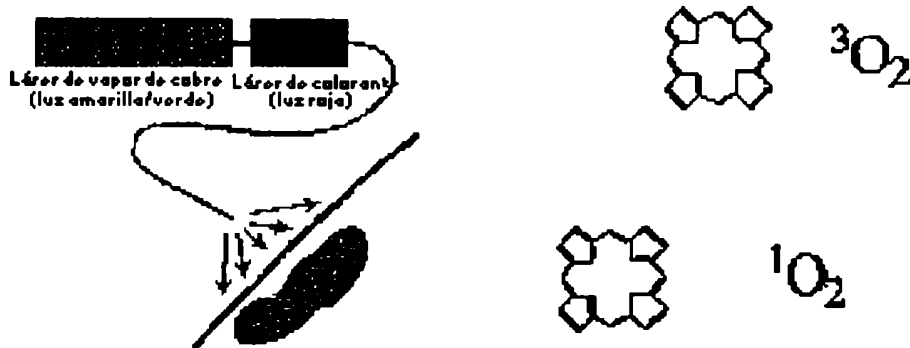
La aplicación de un ungüento conteniendo ALA en un 10-20% sobre carcinomas de células basales (CCB) produjo una intensa fluorescencia de PROTO luego de 4 a 12 hs (Szeimies et al., 1994). Sin embargo, se vio que la fluorescencia estaba heterogéneamente distribuida dentro del tumor (Martin et al., 1995). En este mismo trabajo se observó que en neoplasias cutáneas, la fluorescencia -analizada por microscopía- no se localizaba selectivamente en el tejido tumoral, sino que se hallaba igualmente dispersa en la epidermis normal. Los autores atribuyeron la mayor acumulación de PROTO en tejido neoplásico encontrada por otros autores, al mayor grosor de los tumores epidérmicos comparados con el tejido normal y al aumento de la penetración del ALA a través del *stratum corneum* peritumoral.



1) Se aplica el ALA tópicamente en una crema al 20% o por vía intratumoral.



2) El ALA penetra en las células tumorales. Allí entra en el camino de biosíntesis del hemo, y se forman las porfirinas en el citosol y las mitocondrias.



3) Un tiempo más tarde, la lesión se irradia con luz roja proveniente de un láser (630nm) por medio de una fibra óptica.

4) La luz activa las porfirinas y se forma oxígeno singlete. Las células mueren por daño masivo a organelas y vasculatura.

FIGURA II.3: Protocolo simplificado para el tratamiento de tumores cutáneos con TFD luego de la aplicación de ALA.

La heterogeneidad de los patrones de fluorescencia en CCB nodulares parecía correlacionarse con una mayor tasa de recurrencia, mientras que en los CCB superficiales se apreciaba una distribución homogénea (Szeimes et al., 1994).

En estudios de fase I (Cairnduff et al., 1994) se encontraron tasas de respuestas del 90% en pacientes con enfermedad de Bowen y del 50% en CCB, en tanto que las metástasis cutáneas de cáncer de mama y carcinomas de células escamosas mostraron una respuesta pobre al tratamiento.

Otros autores encontraron resultados similares (Wolf et al., 1993), con respuestas completas a queratosis solares, carcinomas tempranos invasivos a células escamosas y CCB superficial; y sin respuesta sobre metástasis cutáneas de melanomas malignos.

A pesar de los excelentes resultados obtenidos en el tratamiento de los CCB aún no está claro por qué presenta mayores tasas de recurrencia que la enfermedad de Bowen. Inicialmente se había postulado que la penetración de la droga estaría limitando la eficacia de la TFD a partir de ALA, ya que mientras que la enfermedad de Bowen es intraepidérmica, los CCB pueden extenderse en capas más profundas de la piel (Cairnduff et al., 1994). Sin embargo, más tarde, usando microscopía de alta resolución, se vio que la fluorescencia de la PROTO IX llegaba hasta las zonas más profundas del tumor (Roberts et al., 1995). Actualmente, la hipótesis es que existen en los CCB células resistentes a la TFD localizadas en el centro de las llamadas "islas", las que, dentro de estos tumores, se ubican en la dermis (Roberts & Cairnduff, 1995).

En CCB nodulares, en cambio, los resultados no han sido buenos debido a las limitaciones en la penetración del ALA en las capas más profundas del tumor (Wolf et al., 1993).

En la clínica también se mejoró la eficacia de la TFD de tumores cutáneos mediante la topicación de una mezcla de ALA con desferroxamina, con el objeto de que se acumulen suficientes porfirinas en las zonas más profundas del tumor, sobre todo en los CCB nodulares (Fijan et al., 1995).

De la misma manera, Warloe et al. (1994) encontraron buenos resultados en CCB nodulares mediante la administración previa o simultánea de DMSO y ALA en forma tópica. Sin embargo, la

ruptura indiscriminada del *stratum corneum* provocada por el DMSO podría estar aumentando también la penetración del ALA en el área peritumoral (Martin et al., 1995).

En la TFD de melanomas se halló una fuerte correlación entre el grado de regresión y la pigmentación del tumor (Favilla et al., 1991). Como una posible solución a la protección conferida por la melanina frente a la acción de los fotosensibilizantes que se localizan principalmente en el estroma vascular, se intentó hacer TFD a partir de ALA en este tipo particular de tumor, ya que la PROTO se ubicaría directamente en las células (Schoenfeld et al., 1994). Sin embargo, aún se ha logrado muy poco en cuanto al tratamiento de este tipo de tumor con la TFD en pacientes topicados con ALA (Calzavara-Pinton, 1995).

Con el objetivo de mejorar la eficiencia de la ALA-TFD, se están llevando a cabo protocolos empleando mayores tiempos de exposición al ALA, topicación de la droga en emulsiones y otros vehículos y penetración de la droga mediante la técnica de iontoforesis (Martin et al., 1995).

En el área de la fotodetección de tumores, se encontró que la instilación intravesical de ALA induce fluorescencia selectiva del urotelio maligno o displásico (Kriegmair et al., 1996). La excitación de las porfirinas endógenas se llevó a cabo mediante la luz UV provista por un láser de kriptón acoplado al sistema óptico del endoscopio. De esta manera, se practica la resección de las zonas de la vejiga que presentan fluorescencia, disminuyendo el margen de error del procedimiento.

III.8 Toxicidad del ALA y/o PROTO IX sintetizada a partir de ALA.

Numerosos investigadores han estudiado la neurotoxicidad del ALA y del PBG, que puede llevar a cambios de comportamiento, de funcionamiento de las membranas celulares, y de transmisión neuromuscular (Goldberg et al., 1954; Muller & Snyder, 1977; Whetsell et al., 1978; Daya et al., 1989).

Una dosis de ALA de 1000 mg/kg es casi letal, y en ratones produce una depresión transitoria en la conducción nerviosa, con recuperación completa luego de 7-10 días del tratamiento. Es interesante señalar que se obtuvieron resultados similares luego

de una dosis de 80 mg HpD/Kg (Cutler et al., 1979; Sima et al., 1981).

Estudios *in vitro* mostraron que URO, COPRO, PROTO y HpD producen inhibición del crecimiento de neuritas en la oscuridad, en un modo dosis dependiente, siendo la PROTO la porfirina más tóxica. En contraste, el ALA no provocó una toxicidad detectable aún a una concentración de 1,5 mM (Ripopelle & Kennedy, 1982).

Asimismo se vio que el ALA puede causar inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ en cultivos de neuronas (Russell et al., 1983), contribuyendo esto a explicar los cambios de comportamiento y la disminución de la velocidad de conducción nerviosa observada en ratones luego de la administración de una sola dosis de ALA.

En particulados de cerebelo, se observó que empleando ALA 0,1 mM, había un aumento en el 50% en la formación de dienos conjugados. En cuanto a las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), su acumulación muestra incrementos con el tiempo de incubación y con la concentración de ALA. También se observó que el agregado de distintos secuestrantes de radicales libres al medio de incubación, prevenía la lipoperoxidación del ALA, encontrando que la catalasa y el DMSO protegen al cerebelo del ataque de los ROS (Princ, 1995). Retomaremos este tema más adelante en el apartado V.4

III.9 Referencias

- Batlle, A.; Llambías, E.; Wider, E. & Tigier, H. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue XV. The effect of growth conditions. *Int. J. Biochem.*, 6: 591-606 (1975).
- Berlin, N.; Neuberger, A. & Scott, J. The metabolism of delta-aminolevulinic acid: 1. Normal pathways, studied with ¹⁴N. *Biochem. J.*, 64: 80-90 (1956).
- Cairnduff, F.; Stringer, M.; Hudson, E.; Ash, D. & Brown, S. Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. *Br. J. Cancer*, 69: 605-608 (1994).
- Cairnduff, F.; Roberts, D.; Dixon, B. & Brown, S. Response of a rodent fibrosarcoma to photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid or polyhaematoporphyrin. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67: 93-99 (1995).
- Calzavara-Pinton, P., Repetitive photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumors. *J. Photochem. Photobiol. B*, 53-57 (1995).
- Charlesworth, P. & Truscott, T. The use of 5-aminolaevulinic acid in photodynamic therapy (PDT). *J. Photochem. Photobiol. B*, 18: 99-100 (1993).
- Cubeddu, R.; Canti, G.; Taroni, P. & Valentini, G. Delta-aminolevulinic acid induced fluorescence in tumor-bearing mice. *J. Photochem. Photobiol.*, 30: 23-27 (1995).
- Cutler, M.; Moore, M. & Ewart, F. Effects of 5-aminolaevulinic acid administration on social behaviour in the laboratory mouse. *Psychopharmacol.*, 61: 131-135 (1979).
- Dailey, H. & Smith, A. Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem. J.*, 223: 441-445 (1984).
- Daya, S.; Nonaka, K.; Buzzell, G. & Reiter, R. Heme precursor 5-aminolevulinic acid alters brain tryptophan and serotonin levels without changing pineal serotonin and melatonin concentrations. *J. Neurosci. Res.*, 23: 304-309 (1989).
- Dickson, E. & Pottier, R. On the role of protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 29: 91-93 (1995).
- Divaris, D.; Kennedy, J. & Pottier, R. Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic administration of 5-aminolaevulinic acid correlates with localized protoporphyrin IX fluorescence. *Am. J. Pathology*, 136: 891-897 (1990).
- Dougherty, T. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.*, 45: 879-889 (1987).
- El-Sharabasy, M.; El-Waseef, A.; Hafez, M.; Salim, S. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br. J. Cancer*, 65: 409-412 (1992).
- Favilla, I.; Barry, W.; Gosbell, A.; Ellims, P. & Burgess, F. Phototherapy of posterior uveal melanomas. *Brit. J. Ophthalmol.*, 75: 718-721 (1991).
- Fijan, S.; Hönigsmann, H. & Ortel, B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and deferrioxamine. *Br. J. Dermatol.*, 133: 282-288 (1995).

Footo, C. Mechanisms of photooxygenation, en Porphyrin localization and treatment of tumors. Eds. Doiron, D. & Gomer, C. Liss, New York, p. 3-18 (1984).

Fujita, H.; Yamamoto, M.; Yamagami, T.; Hayashi, N.; Bishop, T.; DeVerneuil, H.; Yoshinaga, T.; Shibahara, S.; Morimoto, R. & Sassa, A. Sequential activation of genes for heme pathway enzymes during erythroid differentiation of mouse Friend-virus-transformed erythroleukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1090: 311-316 (1991).

Fukuda, H.; Paredes, S. & Batlle, A. Tumor-localizing properties of porphyrins. *In vitro* studies using the porphyrin precursor aminolevulinic acid in free and liposome encapsulated forms. *Drug Des. Deliv.*, 5: 133-139 (1989).

Fukuda, H.; Paredes, S. & Batlle, A. Tumor-localizing properties of porphyrins. *In vivo* studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 102: 433-436 (1992a).

Fukuda, H.; Paredes, S.; Casas, A.; Chueke, F. & Batlle, A. Potential of liposome-entrapped aminolevulinic acid in cancer therapy. Effect of prior injection of empty liposomes and different routes of administration. *Cancer J.*, 5: 295-299 (1992b).

Gaullier, J.; Geze, M.; Santus, R.; Melo, T.; Maziere, J.; Bazin, M.; Morliere, P. & Dubertret, L. Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX in human keratinocytes and fibroblasts cultivated with 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.*, 62: 114-122 (1995).

Goldberg, A.; Paton, W. & Thompson, J. Pharmacology of the porphyrins and porphobilinogen. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 9: 90-94 (1954).

Grant, W.; Hopper, C. MacRobert, A.; Speight, P. & Bown, S. Photodynamic therapy of oral cancer: photosensitization with systemic aminolevulinic acid. *Lancet*, 342: 147-148 (1993).

Grant, W.; MacRobert, A.; Hopper, C.; Speight, P. & Bown, S. Photodynamic therapy of normal rat arteries after photosensitization using disulphonated aluminium phtalocyanine and 5-aminolevulinic acid. *Br. J. Cancer*, 70: 72-78 (1994).

Hua, Z.; Gibson, S.; Foster, T. & Hilf, R. Effectiveness of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin as a photosensitizer for photodynamic therapy *in vivo*. *Cancer Res.*, 55: 1723-1731 (1995).

Iinuma, S.; Farshi, S.; Ortel, B. & Hasan, T. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br. J. Cancer*, 70: 21-28 (1994).

Joseph, R.; Gofstein, G. & Jacques, S. Photobleaching of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg. Med.*, 5: 46 (1993).

Karu T.; Kryukov, P.; Letokhov, V.; Matveetz, Y. & Semchishen, V. High quantum yield of photochemical reactions of protoporphyrin IX induced by powerful ultrashort laser pulses. *Appl. Phys.*, 24: 245-247 (1981).

Karu T. & Letokhov, V. Possible benefits of two quantum excitation in ALA-PDT? *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 23: 261-262 (1994).

Fijan, S.; Hönigsmann, H. & Ortel, B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and deferrioxamine. *Br. J. Dermatol.*, 133: 282-288 (1995).

Kennedy, J.; Pottier, R. & Pross, G. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 6: 143-148 (1990).

Kennedy, J. & Pottier, R. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 14: 275-292 (1992).

Kessel, D. Effects of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L1210 cells. *Biochemistry*, 16: 3443-3449 (1977).

Kilian, M.; A rapid method for the differentiation of *Hemophilus* strains. The porphyrin test. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, 82 (B): 835-842 (1974).

König, K. & Schneckenburger, H. Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis. *J. Fluorescence*, 4: 17-20 (1994).

König, K.; Schneckenburger, H.; Rück, A. & Steiner, R. *In vivo* photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 26: 203-204 (1993).

Kriegmair, M.; Baumgartner, R.; Knuechel, R.; Steinbach, P.; Ehsan, A.; Lumper, W.; Hofstädter, F. & Hofstetter, A. Fluorescence of photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology*, 44: 836-841 (1994).

Kriegmair, M.; Baumgartner, R.; Knuechel, R.; Stepp, H.; Hofstädter, F. & Hofstetter, A. Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J. Urology*, 155: 105-110 (1996).

Leivovici, L.; Schoenfeld, N.; Yehoshua, H.; Mamet, R.; Rakowsky, E.; Schindel, A. & Atsom, A. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer*, 62: 2297-2300 (1988).

Loh, C.; MacRobert, A.; Bedwell, J.; Regula, J.; Krasner, N. & Bown, S. Oral versus intravenous administration of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Br. J. Cancer*, 68: 41-51 (1993a).

Loh, C.; Vernon, D.; MacRobert, A.; Brown, S. G. & Brown, S. B. Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of gastrointestinal tract. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 20: 47-54 (1993b).

Malik, Z. & Djaldetti, M. 5-Aminolevulinic acid stimulation of porphyrin and hemoglobin synthesis by uninduced Friend erythroleukemic cells. *Cell Differentiation*, 8: 223-233 (1979).

Malik, Z. & Lugaci, H. Destruction of erythroleukemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br. J. Cancer*, 56: 589-595 (1987).

Malik, Z.; Ehrenberg, B. & Faraggi, A. Inactivation of erythrocytic, lymphocytic and myelocytic leukemic cells by photoexcitation of endogenous porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 4: 195-205 (1989).

Martin, A.; Tope, W.; Grevelink, J.; Starr, J.; Fewkes, J.; Flotte, T.; Deutsch, T. & Anderson, R. Lack of selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for basal cell carcinoma after topical application of 5-aminolevulinic acid: implications for

photodynamic treatment. Arch. Dermatol. Res., 287: 665-674 (1995).

Morliere, P.; Kohen, J.; Reyftmann, R.; Santus, R.; Kohen, C.; Maziere, J.; Goldstein, S.; Mangel, W. & Dubertret, L. Photosensitization by porphyrins delivered to L cell fibroblasts by human serum low density lipoproteins. A microspectrofluorometric study. Photochem. Photobiol., 46: 183-191 (1987).

Muller, W. & Snyder, S. Delta-aminolevulinic acid: Influences on synaptic GABA receptor binding may explain CNS symptoms of porphyria. Ann. Neurol., 2: 340-342 (1977).

Navone, N.; Frisardi, A.; Resnik, E.; Polo, C. & Battle, A. Porphyrin biosynthesis in human breast cancer. Preliminary mimetic *in vitro* studies. Med. Sci. Res., 16: 61-62 (1988).

Navone, N.; Polo, C.; Frisardi, A.; Andrade, N. & Battle, A. Heme biosynthesis in human breast adenocarcinoma. Mimetic *in vitro* studies and some heme enzymic activity levels. Int. J. Biochem., 22: 1407-1411 (1990).

Ortel, B.; Tanew, A.; Hönigsmann, H. Lethal photosensitization by endogenous porphyrins of PAM cells -modification by desferrioxamine. J. Photochem. Photobiol. B, 17: 273-278 (1993).

Pottier, R.; Chow, Y.; LaPlante, J.; Truscott, T.; Kennedy, J. & Beiner, L. Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra *in vivo*. Photochem. Photobiol., 44: 679-687 (1986).

Princ, F. Biosíntesis de porfirinas en corteza y cerebro de rata. Estudios sobre la porfobilinógeno-deaminasa. Empleo del ácido 5-aminolevúlico como generador de especies reactivas de oxígeno. Tesis doctoral, UBA (1995).

Qian, P.; Evensen, J.; Rimington, C. & Moan, J. A comparison of different photosensitizing dyes with respect to uptake C3H-tumors and tissues of mice. Cancer Lett., 36: 1-10 (1987).

Ratcliffe, S. & Matthews, E. Modification of the photodynamic action of 5-aminolaevulinic acid (ALA) on rat pancreatoma cells by mitochondrial benzodiazepine receptor ligands. Br. J. Cancer, 71: 300-305 (1995).

Rebeiz, C.; Montazer-Zouhoor, A.; Hopen, H. & Wu, S. Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. Enzyme Microbial Technology, 6: 390-401 (1984).

Rebeiz, N.; Rebeiz, C. & Arkins, S. Photodestruction in tumor cells by induction of endogenous accumulation of protoporphyrin IX. Enhancement by 1,10-phenantroline. Photochem. Photobiol., 55: 431-435 (1992).

Rimington, C. & Riley, P. The biochemical approach to cancer therapy: a short essay. Int. J. Biochem., 25: 1385-1393 (1993).

Ripopelle, R. & Kennedy, J. Some aspects of porphyrin neurotoxicity *in vitro*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 60: 707-714 (1982).

Roberts, D. & Cairnduff, F. Photodynamic therapy of skin cancer: a review. Br. J. Plast. Surg., 48: 360-370 (1995).

Roberts, D.; Stables, G.; Ash, D. & Brown, S. Distribution of protoporphyrin IX in Bowen's disease and basal cell carcinomas treated with topical 5-aminolaevulinic acid. SPIE Procs., 2371: 490-494 (1995).

- Rubino, C. & Rasetti, L. Porphyrin metabolism in human neoplastic tissues. *Panminerva Med.*, 8: 290-292 (1966).
- Russell, V.; Lamm, M. & Taljaard, J. Inhibition of Na⁺, K⁺ ATPase activity by 5-aminolevulinic acid. *Neurochem. Res.*, 8: 1407-1411 (1983).
- Sandberg, S. & Romslo, I. Porphyrin-sensitized photodynamic damage of isolated rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 593: 187-195 (1980).
- Sandberg, S. & Romslo, I. Phototoxicity of protoporphyrin as related to its subcellular localization in mice livers after short-term feeding with griseofulvin. *Biochem. J.*, 198: 67-74 (1981).
- Schoenfeld, N.; Epstein, O.; Lahav, M.; Mamet, R.; Shaklai, M. & Atsom, A. The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett.*, 43: 43-48 (1988).
- Schoenfeld, N.; Mamet, R.; Nordenberg, Y.; Shafran, M.; Babushkin, T. & Malik, Z. Protoporphyrin biosynthesis in melanoma B16 cells stimulated by 5-aminolaevulinic acid and chemical inducers: characterization of photodynamic inactivation. *Int. J. Cancer*, 56: 106-112 (1994).
- Sima, A.; Kennedy, J.; Blakeslee, D. & Robertson, D. Experimental porphyric neuropathy: a preliminary report. *Can. J. Neurol. Sci.*, 8: 105-114 (1981).
- Steinbach, P.; Weingandt, H.; Baumgartner, R.; Kriegmair, M.; Hofstädter, F. & Knüchel, R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer Protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.*, 62: 887-895 (1995).
- Sussman, H. Iron and tumor cell growth, en Iron in immunity, cancer and inflammation. Eds. De Souza, M, & Brocks, J. Wiley Press, Chichester, UK, p. 261-282 (1989).
- Szeimies, R.; Sassy, T. & Landthaler, M. Penetration of topical applied delta-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem. Photobiol.*, 59: 73-76 (1994).
- Van der Veen, N.; Van Leengoed, H. & Stra, W. *In vivo* fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin: increased damage after multiple irradiations. *Br. J. Cancer*, 70: 867-872 (1994).
- Warloe, T.; Heyerdahl, H.; Peng, Q.; Giercksky, K. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induced porphyrins and skin penetration enhancer for basal cell carcinoma. 5th International Photodynamic Association Biennial Meeting, Amelia Island, Florida, September 21-24 (1994).
- Whetsell, W.; Sassa, S.; Bickers, D. & Kappas, A. Studies on porphyrin-heme biosynthesis in organotropic cultures of chick dorsal root ganglion. I. Observations on neuronal and non-neuronal elements. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 37: 497-507 (1978).
- Wolf, P.; Rieger, E. & Kerl, H. Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 28: 17-21 (1993).

CAPITULO IV

AGENTES ANTINEOPLASICOS Y SUS INTERACCIONES CON LA TFD

IV.1 Generalidades sobre los antineoplásicos.....	86
IV.1.1. 5-Fluorouracilo.....	90
IV.1.2 Ciclofosfamida.....	92
IV.1.21 Biotransformación de fármacos. Citocromo P ₄₅₀	95
IV.1.3 Doxorubicina.....	98
IV.1.31 Las antraciclinas como fotosensibilizantes.....	102
IV.2 Combinación de la TFD con agentes antineoplásicos.....	104
IV.3 Referencias.....	106

IV. AGENTES ANTINEOPLASICOS Y SUS INTERACCIONES CON LA TFD

IV.1 Generalidades sobre los antineoplásicos

El objetivo último de la terapéutica antineoplásica es la eliminación completa de toda célula cancerosa mediante métodos quirúrgicos, radioterapéuticos y/o farmacológicos. Cuando ello es posible se habla de curación, pero si el tumor no está localizado, existen metástasis, o no es factible esa eliminación por otros motivos, el objetivo en la terapéutica es paliativo; en ese caso lo que se pretende es reducir el tamaño del tumor o el número de células, aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia con una calidad de vida aceptable. En la actualidad la acción de los fármacos se dirige en su totalidad a frenar la proliferación celular interfiriendo con algún proceso de la reproducción en el nivel del ADN, del ARN o de la división mitótica, mediante un efecto relacionado con la concentración de fármacos o por otros mecanismos. La terapéutica citostática no es altamente específica contra las células cancerosas, lo que ocasiona la frecuente y grave afección de otros órganos y tejidos sanos.

La cirugía y la radioterapia suelen ser el tratamiento inicial de la mayoría de los tumores sólidos. Sin embargo, la extirpación quirúrgica o la irradiación del tejido maligno sólo elimina al cáncer localizado y regional. Hasta el momento, sólo un tercio de los pacientes se curan con cirugía o radioterapia solas; en los restantes pacientes el cáncer ya se encuentra diseminado en el momento del diagnóstico y la terapia local por lo tanto es ineficaz.

Las drogas antineoplásicas, a diferencia de lo que ocurre con la cirugía y la radioterapia, pueden ser efectivas en las neoplasias sistémicas. La quimioterapia ha sido tradicionalmente la modalidad principal de tratamiento en los cánceres hematológicos (leucemias, linfomas) y en el coriocarcinoma, y se utilizaba como terapia secundaria en los tumores sólidos que no respondían a la cirugía y a la radioterapia. Aunque estas drogas aún se usan ampliamente como paliativos de ciertos cánceres diseminados, se está dando mayor énfasis a la quimioterapia como tratamiento primario con intenciones curativas.

En la quimioterapia continúan produciéndose avances constantemente. En los últimos años, el mayor progreso no ha sido el descubrimiento de nuevos o mejores agentes quimioterápicos, sino el desarrollo de nuevos conceptos terapéuticos. Entre éstos se encuentran el planteo de regímenes de tratamiento más efectivos para la administración combinada de drogas, incluyendo combinaciones de agentes antineoplásicos con los llamados "modificadores o moduladores de la respuesta biológica"; el conocimiento de los mecanismos de acción de muchos antineoplásicos, lo que facilita la propuesta de nuevos métodos para prevenir o minimizar la toxicidad de las drogas; la mayor comprensión de los mecanismos de resistencia a las drogas antineoplásicas; el aumento del uso de la quimioterapia sinérgica (es decir, el diseño de enfoques quimioterapéuticos para prevenir el desarrollo de micrometástasis luego de la remoción del tumor por cirugía o radioterapia) y quimioterapia neosinérgica (es decir, la administración de drogas antes de la cirugía o radioterapia para disminuir el volumen de las neoplasias primarias grandes); y el mejor conocimiento acerca de procesos vitales como la iniciación y diseminación del tumor, implantación y crecimiento de las metástasis.

De gran importancia es el reconocimiento de los problemas que resultan de la heterogeneidad de los tumores, después de haber comprendido que cada tumor puede contener muchas subpoblaciones de células neoplásicas que difieren en características cruciales como su cariotipo, morfología, inmunogenicidad, velocidad de crecimiento, capacidad para producir metástasis y, especialmente, su respuesta a los agentes antineoplásicos.

Es importante entender el mecanismo de resistencia a la droga para la búsqueda de nuevos agentes y para el planteo de regímenes más efectivos. Distintos cambios bioquímicos caracterizan a las células tumorales resistentes en sistemas experimentales. Estos cambios incluyen alteraciones en el transporte de la droga, un incremento en la concentración de la enzima blanco o cambios en su afinidad por un inhibidor y un aumento en la capacidad para inactivar a la droga. Un ejemplo sería la amplificación del gen MDR, que codifica para la glucoproteína P, responsable del transporte, fuera de las células, de un amplio espectro de sustancias tóxicas, entre las que se encuentran los antineoplásicos.

Muchos de los agentes citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y en consecuencia tienen actividad sólo en células que están en proceso de división (Figura IV.1). De la misma manera las neoplasias humanas que en la actualidad son más susceptibles al tratamiento quimioterápico son aquellas que tienen una gran fracción en crecimiento, es decir, un alto porcentaje de células en proceso de división.

Algunos agentes actúan específicamente en procesos como síntesis de ADN, transcripción o en la función de mitosis de los fibroblastos y, por lo tanto, en un lugar específico del ciclo celular. Otros agentes pueden actuar sobre varios o sobre todos los estadios del ciclo celular o, aunque no sean específicos del ciclo, sus efectos citotóxicos pueden ser dependientes de la proliferación.

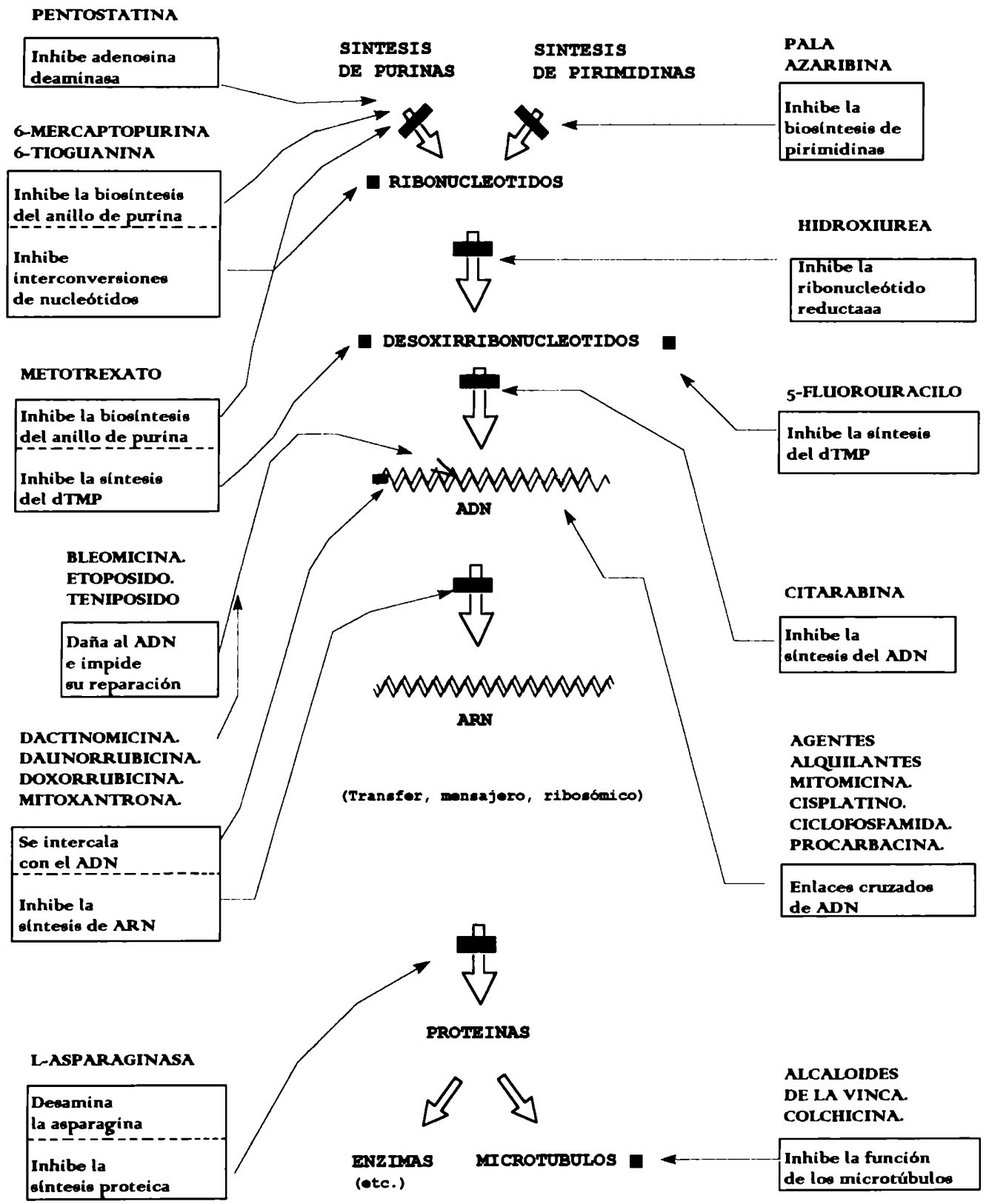


FIGURA IV.1: Resumen de los mecanismos y sitios de acción de los agentes quimioterápicos útiles en los tratamientos de las neoplasias.

IV.1.1 5-Fluorouracilo

Entre los antimetabolitos, el análogo de pirimidina 5-Fluorouracilo (5-Fu) ejerce su actividad citotóxica convirtiéndose enzimáticamente en el deoxinucleótido 5-Fluoro-2' deoxiuridina 5-monofosfato (F-dUMP), el cual es su metabolito activo (Figura IV.2). El F-dUMP inhibe a la timidilato sintetasa, enzima que cataliza la metilación del ácido deoxiuridílico (dUMP) a ácido timidílico (dTMP), impidiendo así la síntesis de ADN.

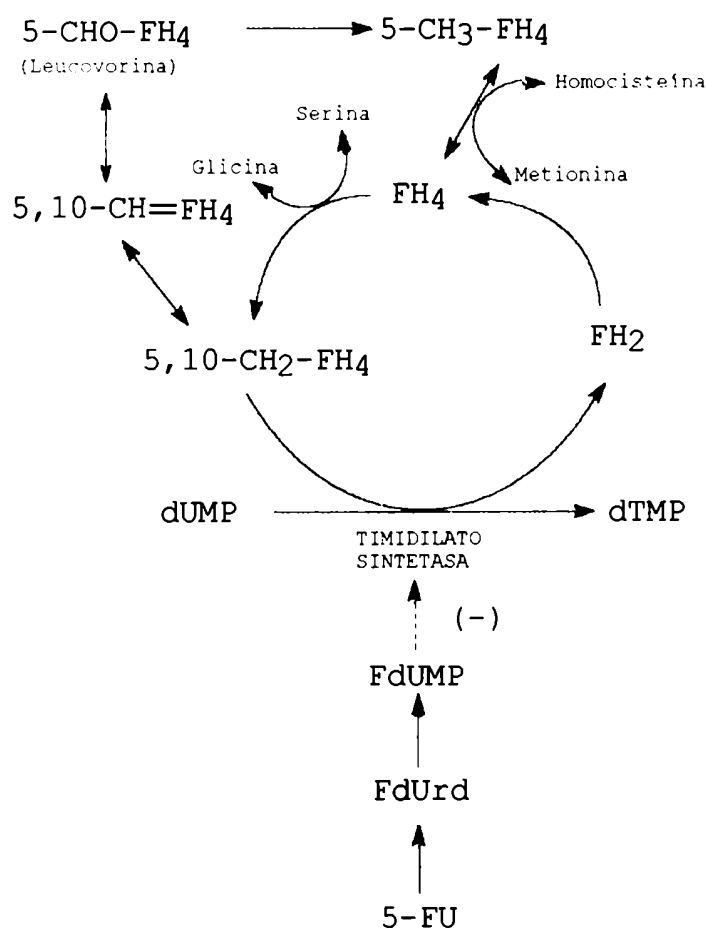


FIGURA IV.2: Metabolismo intracelular del 5-Fluorouracilo.

Las abreviaturas significan: FdUrd, Fluorodeoxiuridina; FdUMP, Fluorodeoxiuridina monofosfato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; dTMP, timidilato; 5,10-CH₂-FH₄, 5,10-metilen-tetrahydrofolato; FH₂, dihydrofolato; 5-CHO-FH₄, 5-formil-tetrahydrofolato; 5,10-CH=NH-FH₄, 5,10-metenil-tetrahydrofolato; 5-CH₃-FH₄, 5-metil-tetrahydrofolato; FH₄, tetrahydrofolato.

El pool intracelular de 5,10-CH₂-FH₄ proviene de la conversión metabólica de los folatos circulantes, que pueden entrar a la célula mediante un mecanismo mediado por transportadores.

El cofactor del folato, el 5-10-metilentetrahidrofolato y el F-dUMP, forman un complejo terciario unido en forma covalente a la enzima. Este complejo inhibidor se asemeja al estado de transición formado durante la reacción enzimática normal que se produce cuando el dUMP es convertido en timidilato. Aunque el complejo fisiológico siga hacia la síntesis de timidilato, esta reacción es bloqueada en el complejo inhibidor por el átomo de flúor sobre el F-dUMP, produciéndose una inhibición prolongada de la enzima.

El 5-Fu se incorpora tanto en el ADN como en el ARN. La incorporación en el ARN ha sido asociada con la toxicidad. El significado de la incorporación del 5-Fu en el ADN aún no está aclarado.

El agregado de folato exógeno en la forma de 5-formil-tetrahidrofolato (leucovorina) aumenta la formación del complejo, según ha sido demostrado en experimentos efectuados en laboratorio así como en ensayos clínicos (Ullman et al., 1978; Zaniboni, 1996).

No es conveniente la vía oral para el 5-Fu porque es de absorción errática. Se da por vía i.v., aunque también se ha aplicado por vía intrarterial y en cavidades corporales.

El 5-Fu tiene una vida media plasmática muy corta (7 a 10 min.), ya que es rápidamente metabolizado. Se produce una degradación metabólica principalmente en el hígado.

El 5-Fu es indicado para tumores sólidos, principalmente en el tracto gastrointestinal y en mama, sólo o en combinación otros agentes. Últimamente se ha incorporado el uso tópico de 5-Fu en carcinomas de células basales y queratosis actínica.

Si bien el 5-Fu, al disminuir la síntesis de ARN y de proteínas celulares, podría afectar la síntesis de ALA-S y de otras enzimas del camino del hemo, se ha observado que en embriones de pollo el 5-Fu no es porfirinogénico ni afecta las

actividades de las enzimas del camino del hemo (Wainstok & San Martín de Viale, 1988).

En relación con la TFD, sólo se ha descrito la formación de tres compuestos sintéticos de porfirina-fluorouracilo covalentemente unidos, que resultaron fototóxicos para células malignas (Huang et al., 1991).

IV.1.2 Ciclofosfamida

Es un alquilante del grupo de las mostazas nitrogenadas con un amplio espectro de actividad clínica. Es un componente esencial en muchas combinaciones de drogas. La ciclofosfamida (CY) es efectiva en la enfermedad de Hodgkin y en otros linfomas.

Se han informado remisiones completas y probables curaciones de linfomas de Burkitt y de leucemias linfoblásticas infantiles mediante el empleo de CY combinada con otros agentes. Con frecuencia se emplea en combinación con Metotrexato y 5-Fu como terapia adyuvante luego de la cirugía de carcinoma de mama (Bonadonna & Valagussa, 1983).

La CY, como todos los alquilantes utilizados en quimioterapia, se transforma en electrófilos fuertes a través de la formación de iones carbonio intermediarios o de complejos de transición con las moléculas blanco. Estas reacciones dan lugar a la formación de uniones covalentes por alquilación de varias secciones nucleofílicas como los grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carbonilo e imidazol. Los efectos quimioterápicos y citotóxicos están relacionados directamente con la alquilación del ADN.

La CY se ha administrado a pacientes por vía oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intrapleural, lográndose los mejores resultados por las dos primeras.

La droga es activada por el sistema del Cit P₄₅₀ hepático, por conversión a 4-hidroxi-ciclofosfamida (4-OH-CY), la cual se encuentra en un estado de equilibrio con el tautómero acíclico aldofosfamida (AP) (Figura IV.3). Estos compuestos pueden ser oxidados posteriormente por la aldehído oxidasa hepática y tal

vez por otras enzimas, produciendo metabolitos, entre ellos la carboxifosfamida, que no tienen actividad biológica significativa.

Pareciera que estas reacciones secundarias reducen el daño hepático, mientras que cantidades significativas de los metabolitos activados, como la AP, son transportados por el sistema circulatorio a los sitios blanco. La AP puede ser clivada en las células que son susceptibles a la citólisis, generando cantidades estequiométricas de mostaza fosforamida y de acroleína. Este último compuesto puede ser el responsable de la cistitis hemorrágica que se presenta durante el tratamiento con CY. La intensidad de la cistitis puede reducirse y aún prevenirse, mediante la administración parenteral de acetilcisteína, mesna (2-mercaptoetano-sulfonato) o de otros compuestos sulfhidrúlicos como el glutatión (GSH) (Figura IV.3), ya que la acroleína reacciona fácilmente con estos grupos (Colvin, 1982).

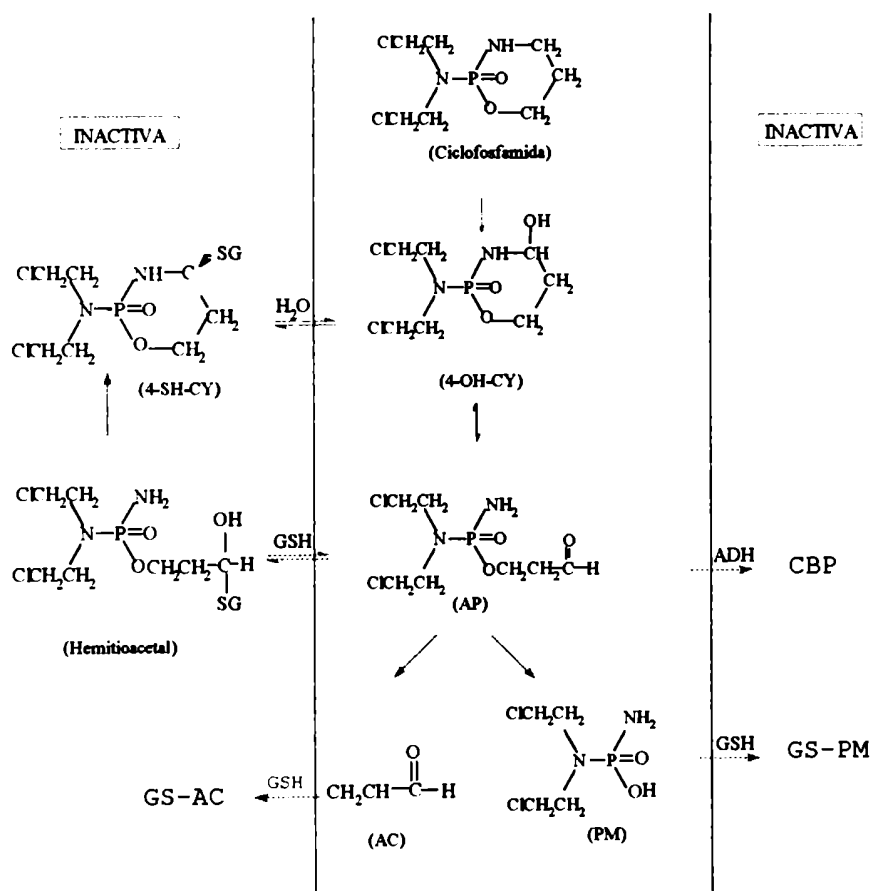


FIGURA IV.3: Metabolismo de la ciclofosfamida (simplificado)

Las abreviaturas significan: CY, ciclofosfamida; 4-OH-CY: 4-hidroxiciclofosfamida; AP: aldofosfamida; AC: acroleína; PM: mostaza fosforamida; CBP: carboxifosfamida; ADH: aldehído deshidrogenasa y 4-SH-CY: 4-tiociclofosfamida.

Si en un animal se induce el sistema Cit P₄₅₀, la actividad antitumoral y el índice terapéutico no se modifican (Sladek, 1972). La explicación propuesta para este hallazgo inesperado esclarece principios farmacológicos de importancia. La CY se elimina en forma muy lenta del organismo y los efectos citotóxicos están relacionados con la cantidad total, más que con la velocidad de generación de los metabolitos activados. Por lo tanto, parece probable que las acciones biológicas de la CY puedan ser afectadas en forma más drástica por alteraciones en la velocidad de detoxificación y de eliminación que por cambios en la velocidad de generación de los metabolitos activados.

Además de leucopenia y cistitis hemorrágica, la CY provoca una toxicidad hepática que se manifiesta mediante la disminución de la actividad del Cit P₄₅₀, con la consecuente depresión del metabolismo de varias drogas, incluso la misma CY.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar este hallazgo, sugiere la formación de aductos entre la acroleína y los grupos sulfhidrilos de la apoproteína, con la consiguiente destrucción o desnaturalización del citocromo (Gurtoo et al., 1981). Este mecanismo es coherente con el hallazgo de una reducción en la degradación del Cit P₄₅₀ inducida por CY luego de la administración de n-acetilcisteína (Berrigan et al., 1980).

En ratas se vio que con altas dosis de CY (200 mg/kg) se producía una disminución en la actividad enzimática del ALA-S hepática así como una disminución del Cit P₄₅₀ y un incremento de la actividad Hem-O (Rizzardini et al., 1983). El ALA-S, que contiene un grupo -SH en su sitio activo, podría ser alquilada por la acroleína o bien la CY podría actuar a nivel genómico regulando la síntesis.

Por otro lado, se vio que en embriones de pollo la CY tiene una marcada capacidad porfirinogénica, provocando un incremento en la acumulación de porfirinas hepáticas así como en la actividad de ALA-S (Wainstok & San Martín de Viale, 1988).

En el mismo sistema se vio una alteración en el patrón de porfirinas acumuladas en hígado, con un aumento en la relación Copro/Protoporfirina.

También se ha descrito el caso de una paciente con cáncer de ovario que después de recibir CY desarrolló una porfiria cutánea tardía con disminución de la actividad de la URO-D eritrocitaria. Luego de interrumpir el tratamiento con CY, los signos clínicos y bioquímicos alterados, desaparecieron (Manziona et al., 1988).

Sin embargo, Bhutani et al. (1985) reportaron un caso de porfiria eritropoyética congénita contradictorio con el anterior, donde los síntomas clínicos y bioquímicos de la enfermedad mejoraron luego de la administración de CY.

IV.1.21 Biotransformación de fármacos. Citocromo P₄₅₀.

Los sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación de muchos fármacos están localizados en el retículo endoplasmático liso del hígado (fracción microsomal). Estas enzimas están presentes también en otros órganos como el riñón, pulmón y el epitelio gastrointestinal, aunque en cantidades menores. El retículo endoplasmático hepático contiene un grupo de enzimas oxidativas denominadas monoxigenasas, que requieren un agente reductor, NADPH y oxígeno molecular.

El paso clave de estas reacciones oxidativas es la inserción de un átomo de oxígeno en el sustrato, produciendo a menudo un complejo inestable, que se descompone dando el producto final.

En general estas reacciones son llevadas a cabo por la familia de isoenzimas del Cit P₄₅₀ que se encuentran, al igual que la reductasa asociada, incluidas en la bicapa lipídica del retículo endoplasmático liso.

El sistema Cit P₄₅₀ comprende una amplia familia de isoenzimas que se encuentran en todas las especies vivientes, cuya función es la activación del oxígeno molecular para que éste oxide un sustrato orgánico. Está dividido en dos grupos, uno de los cuales incluye las enzimas constitutivas que intervienen en procesos vitales como la síntesis del colesterol, la producción de esteroides y de prostaglandinas, etc.. El otro grupo incluye

a las enzimas inducibles responsables del metabolismo de sustancias endógenas, y cuya concentración aumenta en presencia de sustratos específicos tales como herbicidas, hidrocarburos, insecticidas, etc. El último grupo a su vez comprende dos familias: la primera se relaciona con el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, y la otra, de mayor interés desde el punto de vista clínico, es la responsable de la respuesta polimórfica a diferentes drogas tales como el halotano, etanol, nitrosaminas, ciclofosfamida, etc. (Rasore-Quartino & Frenquellucci, 1993).

Esta última familia está directamente relacionada con los mecanismos de carcinogénesis, ya que el polimorfismo genético es un factor determinante en el porcentaje de activación de un procarcinógeno (Nakachi et al., 1981; Toussaint et al., 1993).

Tres enzimas del Cit P₄₅₀ intervienen en la bioactivación de la ciclofosfamida: CitP2B1 (inducible por fenobarbital), CitP2C6 (constitutivamente expresada en ambos sexos) y CitP2C11 (constitutivamente expresada en machos) (Clarke & Waxman, 1989).

Estas tres enzimas catabolizan el paso de CY a 4-OH-CY. De los metabolitos producidos en la vía de degradación de la CY, la acroleína no tiene actividad antitumoral, pero es sumamente reactiva y se une covalentemente a proteínas, incluyendo al mismo Cit P₄₅₀ (Leblanc & Waxman, 1990) y a la NADPH-citocromo reductasa, conduciendo así a la inactivación enzimática.

Chen & Waxman (1995) vieron que ratas implantadas subcutáneamente con células que expresaban el CitP2B1, presentaban ventajas terapéuticas sobre las que recibían células no transfectadas. En las primeras, la eficacia del tratamiento con CY era total.

Sin embargo, aún no están esclarecidos los mecanismos por los cuales la CY altera los niveles hepáticos de proteínas del Cit P₄₅₀ y las actividades enzimáticas correspondientes. Algunos autores proponen que dicha alteración es debida a la alquilación de los grupos sulfhidrilos de la apoproteína (McClure & Stupans, 1992), mientras que otros proponen un proceso de feminización de los perfiles enzimáticos (Clarke & Waxman, 1989), provocado por la mostaza fosforamida.

Se piensa que la CY inactiva el Cit P₄₅₀ hepático *in vivo* e *in vitro* por diferentes mecanismos, ya que se vio que la disminución mediada por esta droga de las actividades de enzimas relacionadas con el citocromo, fue revertida *in vitro* por la N-acetilcisteína, mientras que la administración de tioles *in vivo* no alteró estos patrones (McClure & Stupans, 1992).

Muchos fármacos con sustituyentes no saturados (Abbritti & De Matteis, 1971) como el alil-isopropil-acetamida (AIA) provocan la destrucción del Cit P₄₅₀, que es una hemoproteína, y la formación de pigmentos verdes, con la consiguiente estimulación del ALA-S hepática (Figura IV.4), como consecuencia de la pérdida del control normal por feed back sobre la enzima y el acúmulo de porfirinas en este órgano (De Matteis, 1975; De Matteis, 1983). Este podría ser el mecanismo de acción de la CY para inducir el ALA-S hepático.

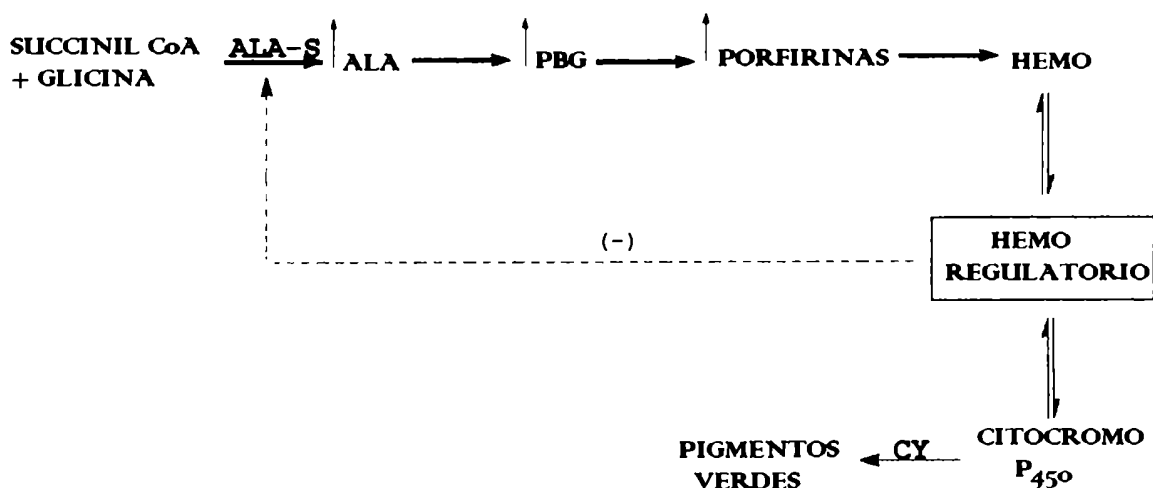


FIGURA IV.4: Posible sitio de acción de la ciclofosfamida.

La ciclofosfamida, a través de su metabolito activo acroleína disminuye los niveles de Cit P₄₅₀, induciendo así su síntesis, con el aumento consiguiente de la cantidad de hemo hepático. Se propone que la CY, al igual que el inductor porfirinogénico AIA, mediante este mecanismo provocaría un aumento en la actividad de ALA-S, que es la enzima regulatoria, lo cual llevaría a un incremento en la concentración de porfirinas hepáticas.

Estos inductores no saturados se convierten en compuestos monoxigenados, también mediante una reacción dependiente del Cit P₄₅₀ (De Matteis, 1971), al cual desactivan, en una reacción de síntesis letal o de sustratos autosuicidas.

En realidad la pérdida del hemo del Cit P₄₅₀ conduce a una disminución de la concentración del pool del hemo regulador de la actividad del ALA-S y también de otros reservorios hepáticos de hemo.

Estos compuestos son capaces de causar en humanos sin predisposición genética, diversas porfirias tóxicas y porfirinurias, o desencadenar un ataque de porfiria en individuos portadores de una falla genética en el camino del hemo.

Hay datos que sugieren un aumento de la oxidación del UROgen a URO mediado por el Cit P₄₅₀, lo cual llevaría a la acumulación de tetrapirroles (Sinclair et al., 1987).

En cuanto a la TFD del cáncer existen evidencias tanto *in vitro* como *in vivo*, de que la administración de HpD y posterior exposición a la luz, causa la destrucción del Cit P₄₅₀ y su sistema de monoxigenasas. Esta fototoxicidad sería un componente importante en la destrucción de las células tumorales y estaría mediada por especies activas de oxígeno (Das et al., 1985).

IV.1.3 Doxorubicina.

El antibiótico antraciclínico Doxorubicina (DOX), también llamado Adriamicina, se encuentra entre los más importantes agentes antitumorales; y es empleado para tratamiento de una gran variedad de tumores sólidos, leucemias agudas y linfomas.

El valor clínico de este antibiótico producido por el hongo *Streptomyces peucetius* var. *caesius* está limitado por una miocardiopatía poco frecuente, cuya manifestación se relaciona con la dosis total del fármaco y que es habitualmente irreversible.

La DOX se administra en general por vía intravenosa, con una depuración del plasma en forma rápida. La curva de desaparición es multifásica, con vidas medias de eliminación de 3 y 30 horas.

Este fármaco es captado en forma rápida por el corazón, riñón, pulmón y bazo.

Se han descrito un número importante de efectos bioquímicos para las antraciclinas. Estos compuestos poseen la capacidad de intercalarse con el ADN, inhibiendo la síntesis de ADN y de ARN.

Producen rupturas sobre cadenas simples y dobles, conduciendo a intercambios de cromátidas hermanas. Se cree que la escisión del ADN está mediada por la acción de la Topoisomerasa II (Tewey et al., 1984) o por la producción de radicales libres (Gray & Phillips, 1981; Gray et al., 1982).

La DOX también puede interactuar con las membranas celulares y alterar sus funciones; esto puede tener un papel importante en las acciones antitumorales, así como también sobre la toxicidad cardíaca (Tritton et al., 1978).

Además de la acción directa sobre el ADN y la producción intracelular de ROS, la droga puede aumentar la respuesta inmune induciendo la liberación de H_2O_2 de los neutrófilos, estimulando la acción de los macrófagos y células natural killers (Salazar & Cohen, 1984).

Las antraciclinas reaccionan con la Cit P_{450} reductasa en presencia de NADPH para formar radicales semiquinona intermediarios, que a su vez pueden reaccionar con oxígeno y formar radicales aniónicos superóxido (Figura IV.5). Estos pueden generar peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, que como sabemos, son altamente nocivos para las células (Bachur et al., 1977; Goodman & Hochstein, 1977). También se ha sugerido que la producción de radicales hidroxilo puede ocurrir vía reducción de peróxidos por las propias semiquinonas (Kalyanaraman et al., 1984).

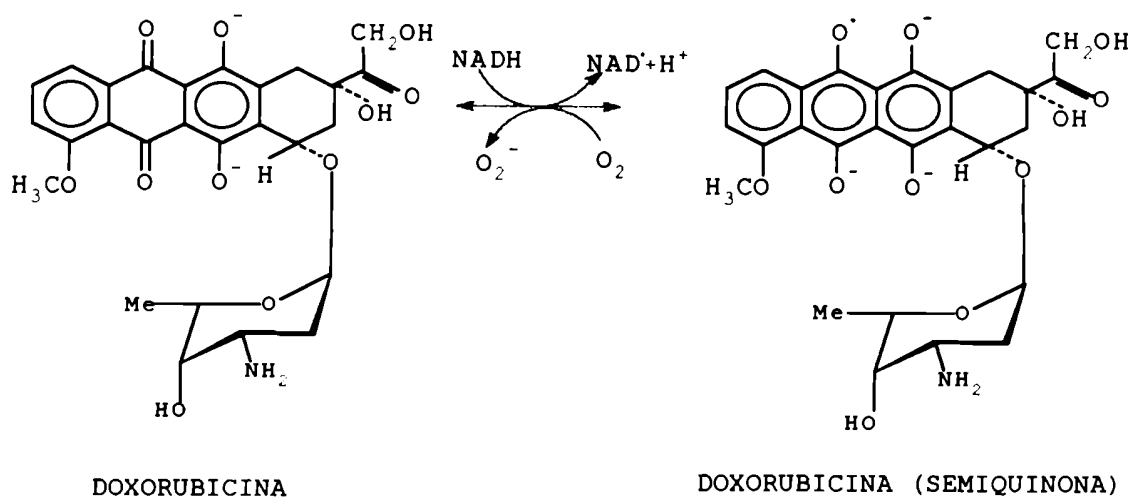


FIGURA IV.5: Esquema del ciclo rédox de la DOX con generación de O_2^-

El NADH reduce a la antraciclina en la membrana mitocondrial y rápidamente reoxida el oxígeno molecular. Este ciclo rédox origina O_2^- , que por reacciones de tipo Fenton y Haber-Weiss, originan $HO\cdot$, cuya reactividad conduce, luego de interactuar con los lípidos insaturados de las membranas, a la cadena de reacciones de la LPO. Los antioxidantes endógenos inhiben la propagación de dicha cadena, porque forman un compuesto más estable con los radicales y llevan a una reacción de terminación.

La producción de radicales está estimulada en forma significativa por la interacción de la DOX con el hierro (Myers, 1988). Además, las reacciones intramoleculares de transferencia de electrones por los intermediarios semiquinonas dan lugar a la producción de otros radicales y por lo tanto de potentes agentes alquilantes.

La generación de radicales libres por la unión de las antraciclinas con el Fe es el mecanismo principal de toxicidad cardíaca, si bien la acción tumoricida de estas especies aún está en discusión. Se ha propuesto que la DOX se une con gran afinidad a la cardiolipina (Cheneval et al., 1985), que es un fosfolípido específico de la membrana mitocondrial interna. Allí la DOX es convertida por la NADH deshidrogenasa mitocondrial en radicales semiquinona, que conducirían a cambios importantes en la estructura de la membrana y en las funciones mitocondriales (Pollakis et al., 1983).

La DOX inhibe los complejos I-III y IV de la cadena respiratoria, peroxida lípidos mitocondriales y modifica la fluidez de la membrana (Marcillat et al., 1989; Goormaghtigh et al., 1982); estos efectos desaparecen en presencia de secuestrantes de ROS (Praet et al., 1988). Sin embargo, la producción de ROS puede explicar sólo en parte la toxicidad *in vivo* (Praet & Ruysschaert, 1993).

Se sabe que las defensas enzimáticas, como la superóxido dismutasa y la catalasa tienen un papel importante en la protección de las células contra la acción tóxica de las antraciclinas, y estas defensas pueden aumentarse mediante el empleo de agentes antioxidantes exógenos como el α -tocoferol (Myers et al., 1977) o por quelantes férricos como la desferroxamina, que tienen conocida acción protectora contra la toxicidad cardíaca (Speyer et al., 1988; Miura et al., 1993).

Pueden presentarse dos tipos de miocardiopatías. 1) Una forma aguda, que está caracterizada por variaciones anormales en el electrocardiograma, que aparecen a los pocos minutos de la administración de la droga y pueden persistir por dos semanas. Estos cambios suelen ser transitorios y reversibles. 2) La toxicidad crónica, relacionada con la dosis acumulativa, se manifiesta como una insuficiencia cardíaca congestiva, con disminución en el número de fibrillas miocárdicas, alteraciones en las mitocondrias y degeneración celular, como puede observarse al microscopio electrónico.

Los mecanismos que intervienen en la resistencia celular a las antraciclinas, incluyen el aumento en la actividad de la glutatión peroxidasa (Sinha et al., 1989), y una disminución de la actividad de la topoisomerasa II (Deffie et al., 1989).

En cuanto a la relación entre las antraciclinas y las porfirinas, se vio que la DOX, si bien produce una disminución general en la síntesis de proteínas, en concentraciones subtóxicas, estimula específicamente la síntesis de globina y de hemo en células eritroleucémicas (Trentesaux et al., 1989). Por otra parte, Tsifsoglou et al. (1988) encontraron que la hemina interfiere con la acumulación intracelular de las antraciclinas y protege a las células hematopoyéticas de su acción citotóxica, probablemente debido a interacciones de la hemina con el ADN o

por formación de un complejo molecular entre la hemina y las antraciclinas en los sitios intracelulares de acción de la droga.

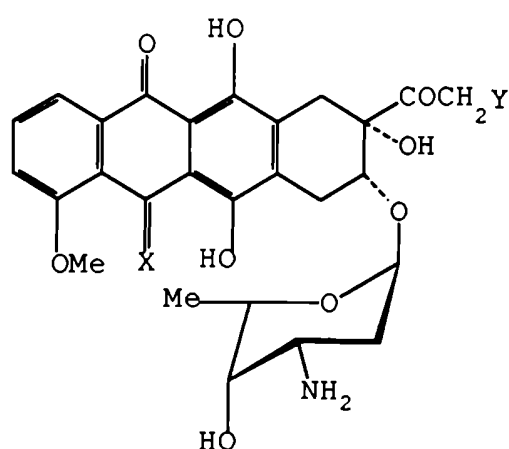
IV.1.31 Las antraciclinas como fotosensibilizantes

En 1968, Sanfilippo et al. encontraron actividad fotodinámica en las antraciclinas, y desde ese entonces se les ha adjudicado una variedad de efectos tóxicos relacionados con la fotosensibilización ocasionada por estas drogas (Rudolph et al., 1976; Reilly et al., 1977).

Así la fotoactivación, fotofísica y fotobioquímica de las antraciclinas, que contienen el cromóforo 1,4-dihidroxi-9,10-antraquinona (Figura IV.6), han sido ampliamente estudiadas, con el objeto de evitar los efectos secundarios fototóxicos, o bien utilizar sus propiedades en la TFD (Rudolph et al., 1976; Hartley et al., 1990).

La daunorubicina, que es una de las antraciclinas más usadas como antineoplásico, es capaz de fotosensibilizar bacterias, virus y levaduras (Sanfilippo et al., 1968; Verini et al., 1968), y más recientemente se encontró que en algunas líneas celulares tumorales, la citotoxicidad de las antraciclinas podía ser incrementada por irradiación (488-514 nm) de las mismas (Andreoni et al., 1990; Andreoni et al., 1991b). Se observó consumo de oxígeno y formación de ROS ante la exposición de las células a la luz. También se observó ruptura de ADN luego de la fotosensibilización, pero no hubo evidencias de daño a membranas fotoinducido (Hartley, 1990).

Gillio & Cortese (1985) encontraron aumento en la mortalidad de ratones inyectados con DOX y HpD cuando se les irradiaba todo el cuerpo. Dougherty (1984) reportó que pacientes que habían sido tratados con DOX sufrían severas reacciones cutáneas luego de una HpD-TFD, en las regiones de piel no expuestas a la terapia.



ANTRACICLINAS

	X	Y
DAUNORUBICINA	O	H
DOXORUBICINA	O	OH
5-IMINODAUNORUBICINA	NH	H

FIGURA IV.6: Estructura química de las antraciclina con propiedades fotosensibilizantes.

Algunos derivados sintéticos de la daunorubicina han producido fotosensibilización de células tumorales *in vitro* luego de ser excitados con luz visible (Andreoni et al., 1989; 1991a)

A diferencia de la mayoría de los agentes utilizados en la TFD, las reacciones tipo II no son las principales en el daño fotodinámico, debido a los rendimientos cuánticos bajos de formación de estado triplete, y por ende, de formación de 1O_2 .

El bajo rendimiento de formación de 1O_2 de las antraciclina lleva a una transferencia ineficiente de energía del estado triplete al estado basal (Redmond & Braskavsky, 1988). La producción fotoinducida de radicales como OH^\cdot , O_2^\cdot y semiquinonas, lleva a la fotodegradación de moléculas como ADN, proteínas y lípidos (Carmichael & Riesz, 1985; Reszka et al., 1990).

La DOX se puede detectar en células leucémicas y tumores sólidos por su fluorescencia (Diwu & Lown, 1994). Por lo tanto, las antraciclina también han sido usadas como sondas fluorescentes para la detección de tumores y en la TFD de células escamosas y de adenocarcinomas humanos (Saxton et al., 1992).

IV.2 Combinación de la TFD con agentes antineoplásicos

La interacción entre la TFD y el tratamiento con drogas citotóxicas se está comenzando a investigar *in vitro* en cultivos de tejidos e *in vivo* en tumores transplantados en ratón, con el objetivo de potenciar la efectividad antitumoral, reducir las dosis de las drogas citotóxicas y del fotosensibilizante y disminuir lo más posible los efectos secundarios.

La quimioterapia contribuye en general a la reducción de la masa tumoral, aunque no siempre logra la eliminación completa de toda célula cancerosa. La TFD sirve para erradicar preferentemente pequeños focos tumorales, ya que por las propiedades físicas de la luz roja, es muy difícil de acceder a grandes masas tumorales. Esto hace que la combinación de ambas modalidades sea, en teoría, un potencial avance en el tratamiento del cáncer.

Varios estudios han demostrado que los efectos de la TFD pueden ser potenciados por agentes quimioterápicos tales como doxorubicina, ciclofosfamida (Cowled et al., 1985; 1987), metotrexato (Edell & Cortese, 1988), Bacillus Calmette-Guerin (González et al., 1986), misonidazol (Cho et al., 1992), cisplatino (Sun & Brown, 1993) y bleomicina (Jones et al., 1990), aumentando la efectividad de la monoterapia en tumores murinos. Se encontró potenciación de la TFD en cultivos de células con vincristina, mitomicina, bleomicina, 5-Fu (Niu, 1992) y adriamicina (Dima et al., 1990).

Algunos investigadores han propuesto que el aumento de la eficacia de la TFD en combinación con ciertas drogas antineoplásicas podría estar asociado con la suma del daño inducido por ambas modalidades, o bien con el efecto citotóxico de las drogas sobre los capilares, de manera de estar inhibiendo la recuperación luego del daño fotodinámico (Cho et al., 1992).

También han sido descriptos cambios en el transporte celular de una gran cantidad de compuestos, mediados por la acción de la luz sobre las porfirinas; en particular, se ha encontrado un aumento del 300% en la captación de actinomicina D por células leucémicas (Kessel, 1977). Estudios de eficiencia de la combinación de TFD con actinomicina D, sin embargo mostraron sólo

efectos aditivos entre ambas terapias (Creekmore & Zaharko, 1983). En el mismo trabajo, se encontró sinergismo entre la mostaza fenilalanina y la TFD con Hematoporfirina, presuntamente debido a alteraciones en el transporte pasivo de este compuesto, producto de la acción fotodinámica del fotosensibilizante.

Otros agentes que serían de interés estudiar en cuanto a su interacción con la TFD, son las drogas que actúan sobre membranas o estructuras celulares, como los alcaloides de la Vinca, los que debido a su acción sobre los microtúbulos, podrían impedir que la célula se recupere del daño subletal fotodinámico (Creekmore & Zaharko, 1983).

Recientemente, varios trabajos han demostrado sinergismo entre TFD y drogas biorreductivas (Henry & Isaacs, 1989; Bremner et al., 1992; Baas et al., 1994), donde se aprovecha la hipoxia inducida por la TFD para activar la citotoxicidad de estas drogas (Hirsch et al., 1987). La mitomicina C, que es una droga biorreductiva y un agente quimioterapéutico ampliamente usado, ha entrado en numerosos protocolos tanto *in vitro* como *in vivo* en combinación con TFD (Baas et al., 1994; Ma et al., 1995).

Con dosis bajas de ciclofosfamida (5 a 10 mg/kg) y de 5-Fluorouracilo (12 a 50 mg/kg) se vio muy poca potenciación de la eficacia fotodinámica de HpD (Cowled et al., 1985; 1987); sin embargo no se han ensayado todavía dosis mayores ni combinaciones con otros fotosensibilizantes.

Como ya hemos visto, existen evidencias de las propiedades fotosensibilizantes del antineoplásico doxorubicina. Varios autores han intentado combinar la TFD con dicha antraciclina. Cohen et al. (1985); Cowled i.t. (1987) y Nahabedian et al. (1988) encontraron potenciación de la TFD a partir de HpD *in vivo* pero no *in vitro* con la administración de DOX.

Sin embargo, no existen datos sobre la combinación de la TFD a partir de ALA con otros tratamientos antitumorales.

IV.3 Referencias

- Abbritti, G. & De Matteis, F. Decreased levels of cytochrome P450 and catalase in hepatic porphyria caused by substituted acetamides and barbiturates. Importance of the allyl group in the molecule of the active drugs. *Chem. Biol. Interact.*, 4: 281-286 (1971).
- Andreoni, A.; Land, E.; Mclean, A.; Malatesta, V. & Truscott, T. Triplet state characteristics and singlet oxygen generation properties of anthracyclines. *Biochim. Biophys. Acta*, 990: 190-197 (1989).
- Andreoni, A.; Colasanti, A.; Malatesta, V. & Giuseppe, R. A method for enhancing the cytotoxicity of anthracyclines through photoactivation. European Patent Application EP400480 (1990).
- Andreoni, A.; Canti, G.; Fabbrocini, G.; Mastrocinque, M. & Quarto, E. B16 melanoma response *in vivo* to photochemotherapy with mitoxantrone and red light. *Cancer Lett.*, 61: 89-94 (1991a).
- Andreoni, A.; Colasanti, A.; Malatesta, V. & Roberti, G. Phototoxicity of anthracyclines upon laser excitation in their long-wavelength absorption bands. *Radiat. Res.*, 127: 24-29 (1991b).
- Baas, P.; Michielsin, C.; Oppelaar, H.; Van Zandwijk, N. & Stewart, F. Enhancement of interstitial photodynamic therapy by mitomycin C and EO9 in a mouse tumour model. *Int. J. Cancer*, 56: 880-885 (1994).
- Bachur, N.; Gordon, S. & Gee, M. Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Molec. Pharmacol.*, 13: 901-910 (1977).
- Berrigan, M.; Gurtoo, H.; Sharma, S.; Struck, R. & Marinello, A. Protection by N-Acetylcysteine of cyclophosphamide metabolism-related *in vivo* depression of mixed function oxygenase activity and *in vitro* denaturation of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 797-803 (1980).
- Bhutani, L.; Deshpande, S.; Bedi, T.; Malhotra, Y.; Kumar, A.; Malhotra, K. & Sood, S. Cyclophosphamide and congenital erythropoietic porphyria. *Photodermatol.*, 2: 394-398 (1985).
- Bonadonna, G. & Valagussa, P. Chemotherapy of breast cancer: current views and results. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 3: 279-297 (1983).
- Bremner, J.; Adams, G.; Pearson, J.; Sansom, J.; Stratford, I.; Bedwell, J.; Bown, S.; MacRobert, A. & Phillips, D. Increasing effect of photodynamic therapy on the RIF-1 murine sarcoma, using the bioreductive drug RSU1069 and RB6145. *Br. J. Cancer*, 66: 1070-1076 (1992).
- Carmichael, A. & Riesz, P. Photoinduced reactions of anthraquinone antitumor agents with peptides and nucleic acid base: an electron spin resonance and spin trapping study. *Arch. Biochem. Biophys.*, 237: 433-444 (1985).
- Chen, L. & Waxman, D. Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: Development of a combined

chemotherapy/cancer gene therapy strategy. *Cancer Res.*, 55: 581-589 (1995).

Cheneval, D.; Müller, M.; Toni, R.; Ruetz, S. & Carafoli, E. Adriamycin as a probe for the transversal distribution of cardiolipin in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, 260: 13003-13007 (1985).

Cho, Y.; Straight, R. & Smith, J. Effects of photodynamic therapy in combination with intravesical drugs in a murine bladder tumor model. *J. Urol.*, 147: 743-746 (1992).

Clarke, L. & Waxman, D. Oxidative metabolism of cyclophosphamide: identification of the hepatic monooxygenase catalysts of drug activation. *Cancer Res.*, 49: 2344-2350 (1989).

Cohen, R.; Nahabedian, M.; Terem, T.; Glenn, D.; Contino, M.; Berns, M. & Wile, A. Potentiation of laser photoradiation therapy by chemotherapy. *Curr. Surg.*, 42: 379-381 (1985).

Colvin, M. The alkylating agents, en *Pharmacologic principles of cancer treatment*. Ed. Chabner, B. Saunders Co., Philadelphia, p. 276-308 (1982).

Cowled, P. Mackenzie, L. & Forbes, I. Interaction between photochemotherapy with HPD and light and cytotoxic drugs. *Aust. N.Z.J. Med.*, 15: 127-131 (1985).

Cowled, P.; Mackenzie, L. & Forbes, I. Pharmacological modulation of photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative and light. *Cancer Res.*, 47: 971-974 (1987).

Creekmore, S. & Zaharko, D. Modification of chemotherapeutic effects on L1210 cells using hematoporphyrin and light. *Cancer Res.*, 43: 5252-5257 (1983).

Das, M.; Dixit, R.; Mukhtar, H. & Bickers, D. Role of active oxygen species in the photodestruction of microsomal cytochrome P-450 and associated monooxygenases by hematoporphyrin derivative in rats. *Cancer Res.*, 45: 608-615 (1985).

Deffie, A.; Batra, J. & Goldenberg, G. Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines. *Cancer Res.*, 49: 58-62 (1989).

De Matteis, F. Loss of heme in rat liver caused by the porphyrinogenic agent 2-allyl-2-isopropylacetamide and ferric citrate. *Biochem. J.*, 124: 677-687 (1971).

De Matteis, F. The effect of drugs on 5-aminolevulinate synthetase and other enzymes in the pathway of liver haem synthesis, en *Enzyme induction*. Ed. Parke, D. Plenum Press, London & New York, p. 185-195 (1975).

De Matteis, F. Las porfirias experimentales como modelos de las porfirias hepáticas humanas. *Endocrinología*, 5: 67-78 (1983).

Dima, V.; Mihailescu, I.; Dima, S.; Chivu, L.; Stirbet, M.; Udrea, M. & Popa, A. . Studies on the effects of associated photodynamic therapy and drugs on macromolecular synthesis of tumoral cells grown *in vitro*. *Arch. Roum. Pat. Exp. Microbiol.*, 49: 156-175 (1990).

Diwu, Z. & Lown, W. Phototherapeutic potential of alternative photosensitizers to porphyrins. *Pharmac. Ther.*, 63: 1-35 (1994).

- Dougherty, T. Photoradiation therapy. *Urology*, 23: 61-64 (1984).
- Edell, E. & Cortese, D. Combined effects of hematoporphyrin derivative phototherapy and adriamycin in a murine tumor model. *Lasers Surg. Med.*, 8: 413-417 (1988).
- Gillio, R. & Cortese, D. Hematoporphyrin derivative: interactions which promote and inhibit its activity in mice. *Lasers Surg. Med.*, 5: 167 (1985).
- González, S.; Arnfield, M.; Meeker, B.; Tulip, J.; Lakey, W.; Chapman, J. & McPhee, M. Treatment of dunning R3327-AT rat prostate tumors with photodynamic therapy in combination with misonidazole. *Cancer Res.*, 46: 2858-2862 (1986).
- Goodman, J. & Hochstein, P. Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77: 797-803 (1977).
- Goormaghtigh, E.; Brasseur, R. & Ruyschaert, J. Adriamycin inactivates cytochrome c oxidase by exclusion of the enzyme from its cardiolipin essential environment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104: 314-320 (1982).
- Gray, P. & Phillips, D. Ultraviolet photo-irradiation of daunomycin and DNA-daunomycin complexes. *Photochem. Photobiol.*, 33: 297-303 (1981).
- Gray, P.; Phillips, D. & Wedd, A. Photosensitized degradation of DNA by daunomycin. *Photochem. Photobiol.*, 49-57 (1982).
- Gurtoo, H.; Marinello, A.; Struck, R.; Paul, B. & Dahms, R. Studies on the mechanism of denaturation of cytochrome P-450 by cyclophosphamide and its metabolites. *J. Biol. Chem.*, 256: 11691-11701 (1981).
- Hartley, J.; Forrow, S. & Souhami, R. Photosensitization of human leukemic cells by anthracenedione antitumor agents. *Cancer Res.*, 50: 1936-1940 (1990).
- Henry, J. & Isaacs, J. Synergistic enhancement of the efficacy of the bioreductively activated alkylating agent RSU-1164 in the treatment of prostatic cancer by photodynamic therapy. *J. Urol.*, 142: 165-170 (1989).
- Hirsch, B.; Walz, N.; Meeker, B.; Arnfield, M.; Tulip, J.; McPhee, M. & Chapman, J. Photodynamic therapy-induced hypoxia in rat tumours and normal tissues. *Photochem. Photobiol.*, 46: 847-852 (1987).
- Huang, S.; Jiang, S.; Li, L.; Xu, J. & Yang, J. Study on porphyrins: synthesis and antitumor activity of porphyrin-fluoro uracil compounds. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 26: 415-419 (1991).
- Jones, G.; Cortese, D. & Neel, H. Effect of bleomycin on hematoporphyrin derivative phototherapy of solid tumors. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 99: 941-944 (1990).
- Kalyanaraman, B.; Searly, R. & Sinha, B. An electron spin resonance study of the reduction of peroxides by anthracycline semiquinones. *Biochim. Biophys. Acta*, 799: 270-275 (1984).

Kessel, D. Effects of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L1210 cells. *Biochemistry*, 16: 3443-3449 (1977).

Leblanc, G. & Waxman, D. Mechanisms of cyclophosphamide action on hepatic P-450 expression. *Cancer Res.*, 50: 5720-5726 (1990).

Ma, L.; Moan, J.; Steen, H. & Iani, V. Anti-tumour activity of photodynamic therapy in combination with mitomycin C in nude mice with human colon adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*, 71: 950-956 (1995).

Manziona, N.; Wolkoff, A. & Sassa, S. Development of porphyria cutanea tarda after treatment with cyclophosphamide. *Gastroenterology*, 95: 1119-1122 (1988).

Marcillat, O.; Zhang, Y. & Davies, K. Oxidative and non-oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin. *Biochem. J.*, 259: 181-189 (1989).

McClure, M. & Stupans, I. Investigation of the mechanism by which cyclophosphamide alters cytochrome P-450 in male rats. *Biochem. Pharmacol.*, 43: 2655-2658 (1992).

Miura, T.; Muraoka, S. & Ogiso, T. Adriamycin-induced lipid peroxidation of erythrocyte membranes in the presence of ferritin and the inhibitory effect of ceruloplasmin. *Biol. Pharm. Bull.*, 16: 664-667 (1993).

Myers, C. Role of iron in anthracycline action, an Organ-directed toxicities of anticancer drugs. Eds. Hacker, M; Lazo, J. & Tritton. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, p. 17-30 (1988).

Myers, C.; McGuire, W.; Liss, R. & Ifrim, I. Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197: 165-167 (1977).

Nahabedian, M.; Cohen, R.; Contino, M.; Terem, T.; Wright, W.; Berns, M. & Wile, A. Combination cytotoxic chemotherapy with cisplatin or doxorubicin and photodynamic therapy in murine tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 80: 739-743 (1988).

Nakachi, K.; Imai, K.; Hayashi, S.; Watanabe, J. & Kawajiri, K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res.*, 51: 5177-5180 (1981).

Niu, M. Effect of combined use of chemotherapeutic agents and hematoporphyrin derivative (HPD) on human gastric cancer cell line *in vitro*. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih*, 14: 70-72 (1992).

Praet, M. & Ruysschaert, J. *In vivo* and *in vitro* mitochondrial membrane damages induced in mice by adriamycin and derivatives. *Biochim. Biophys. Acta*, 1149: 79-85 (1993).

Praet, M. Buc Calderon, P.; Pollakis, G.; Roberfroid, M. & Ruysschaert, J. A new class of free radical scavengers reducing adriamycin mitochondrial toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 4617-4622 (1988).

Pollakis, G.; Goormaghtigh, E. & Ruysschaert, J. Role of quinone structure in the mitochondrial damage induced by antitumor anthracyclines: comparison of adriamycin and 5-iminodaunorubicin. *FEBS Lett.*, 155: 267-272 (1983).

- Rasore-Quartino & Frenquellucci, G. Pharmacokinetics of cytochrome P-450. *Pathologica*, 85: 395-419. (1993).
- Redmond, R. & Braslavsky, S. Time-resolved thermal lensing and phosphorescence studies on photosensitized singlet molecular oxygen formation. Influence of the electronic configuration of the sensitizer on sensitization efficiency. *Chem. Phys. Lett.*, 148: 523-529 (1988).
- Reilly, J.; Neifield, J. & Rosenberg, S. A clinical course and management of accidental adriamycin extravasation. *Cancer*, 40: 2053-2056 (1977).
- Reszka, K.; Hartley, J. & Lown, J. Photosensitization with selected anticancer agents. *Biophys. Chem.*, 35: 313-323 (1990).
- Rudolph, R.; Stein, R. & Pattilo, R. Skin ulcers due to adriamycin. *Cancer*, 38: 1087-1094 (1976).
- Rizzardini, M.; Ferraroli, A.; Dal Fiume, D. & Cantoni, L. Cyclophosphamide-impaired regulation of hepatic heme metabolism. *Experientia*, 40: 1390-1392 (1983).
- Salazar, D. & Cohen, S. Multiple tumoricidal effector mechanisms induced by adriamycin. *Cancer Res.*, 44: 2561-2566 (1984).
- Sanfilippo, A.; Schioppacassi, G.; Morvillo, E. & Ghione, M. Photodynamic action of daunomycin. I. Effect on bacteriophage T2 and bacteria. *Giorn. Microbiol.*, 16: 49-54 (1968).
- Saxton, R.; Huang, M.; Plante, D.; Fettermen, H.; Lufkin, R. & Castro, D. Daunomycin as a fluorescent probe for tumor detection and laser chemotherapy of human squamous and adenocarcinoma cells. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, 33: 500 (1992).
- Sinclair, P.; Lambrecht, R. & Sinclair, J. Evidence for cytochrome P-450-mediated oxidation of Uroporphyrinogen by cell-free liver extracts from chick embryos treated with 3-methylcholanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146: 1324-1329 (1987).
- Sinha, B.; Mimmaugh, E.; Rajagopalan, S. & Myers, C. Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells: protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance. *Cancer Res.*, 49: 3844-3848 (1989).
- Sladek, N. Therapeutic efficacy of cyclophosphamide as a function of its metabolism. *Cancer Res.*, 32: 535-542 (1972).
- Speyer, J.; Green, M.; Kramer, E.; Rey, M.; Sanger, J.; Ward, C.; Dubin, N.; Ferrans, V.; Stecy, P.; Zeleniuch-Jacquotte, M.; Wernz, M.; Freit, F.; Slater, W.; Blum, R. & Muggia, M. Protective effect of the bispiper azinedione ICRF-187 against doxorubicin-induced cardiotoxicity in women with advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 319: 745-752 (1988).
- Sun, J. & Brown, J. Lack of differential radiosensitization of hypoxic cells in a mouse tumor at low radiation doses per fraction by cisplatin. *Radiat. Res.*, 133: 252-256 (1993).
- Tewey, K.; Chen, G.; Nelson, F. & Liu, L. Intercalative anticancer drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.*, 259: 9182-9187 (1984).

Toussaint, C.; Albin, N.; Massaad, L.; Grunenwald, D.; Parise, O.; Morizet, J.; Gouyette, A. & Chaot, G. Main drug and carcinogen-metabolizing enzyme systems in human non-small cell lung cancer and peritumoral tissues. *Cancer Res.*, 53: 4608-4612 (1993).

Trentesaux, C.; Gérard, B. & Mayeux, P. Differentiating activity of adriamycin in human erythroleukemic cells: effect on globin and heme synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1012: 161-165 (1989).

Tritton, T.; Murphee, S. & Sartorelli, A. Adriamycin: a proposal on the specificity of drug action. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 84: 802-808 (1978).

Tsiftoglou, A.; Wong, W. & Robinson, S. Analysis of Hemin-induced protection of human hemopoietic cells from the cytotoxic effects of anthracyclines. *Cancer Res.*, 48: 3566-3570 (1988).

Ullman, B.; Lee, M; Martin, D. & Santi, D. Cytotoxicity of 5-fluoro-2'-deoxycoformycin: requirement for reduced folate cofactors and antagonism by methotrexate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 980-983 (1978).

Verini, M.; Cassazza, A.; Fioretti, H. Photodynamic action of daunomycin II. Effect on animal viruses. *Giorn. (gen.) Microbiol.*, 16: 55-64 (1968).

Wainstok, R. & San Martín de Viale, L. Effect of some antineoplasics on metabolic heme pathway. *Int. J. Biochem.*, 20: 1015-1020 (1988).

Zaniboni, A. The combination of 5-fluorouracil and folinic acid in the treatment of breast cancer: the emerging role. *The Cancer Journal*, 9: 77-79 (1996).

CAPITULO V

RADICALES LIBRES

V.1 Generalidades.....	112
V.2 Control biológico de los radicales libres.....	118
V.3 Radicales libres y porfirinas.....	121
V.4 Radicales libres y ALA.....	121
V.5 Radicales libres y cáncer.....	123
V.6 Referencias.....	124

V. RADICALES LIBRES.

V.1 Generalidades

Los radicales libres (RL) son compuestos que pueden existir en forma independiente, y que tienen uno o más electrones no apareados en su órbita externa, pudiendo tener carga positiva, negativa o neutra.

Son muy inestables y tienen tendencia a perder o ganar rápidamente electrones, por lo cual son muy reactivos. Los RL pueden intercambiar uno de los electrones no apareados con otras sustancias. También pueden unirse a otras estructuras, convirtiéndolas en radicales, dando lugar a reacciones en cascada con formación de nuevos radicales.

Estos compuestos pueden generarse intra o extracelularmente, tanto endógena como exógenamente. Endógenamente los RL se generan principalmente como producto de la cadena de transporte electrónico, de enzimas oxidantes, células fagocíticas y reacciones de autooxidación, siendo el retículo endoplasmático, la mitocondria y los peroxisomas, las principales organelas que los producen (Figura V.1).

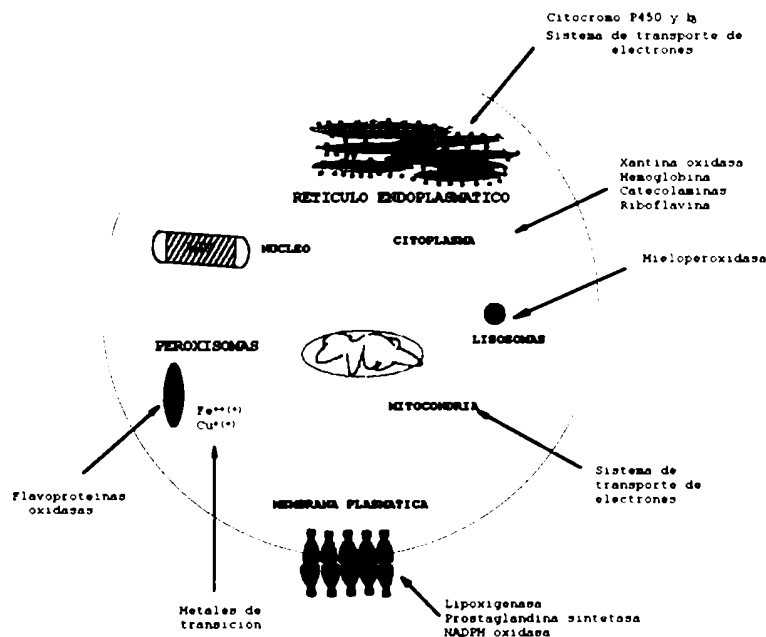


FIGURA V.1: Fuentes celulares de radicales libres

Los ROS son producidos por las células a través de la acción de varias enzimas solubles o unidas a membrana. La capacidad de producción de ROS por cada vía depende del tipo de células.

Exógenamente pueden ser producidos por oxidación de fármacos, humo de tabaco, choque térmico, luz solar, reacciones ionizantes, sustancias oxidantes del glutatión y sustancias cíclicas de naturaleza oxidoreductora tales como la doxorubicina.

Cuando se habla de RL, en general se refiere a los RL del oxígeno. Del oxígeno se derivan, entre otros RL, el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y el radical peróxido ($ROO\cdot$) (Figura VI.2).

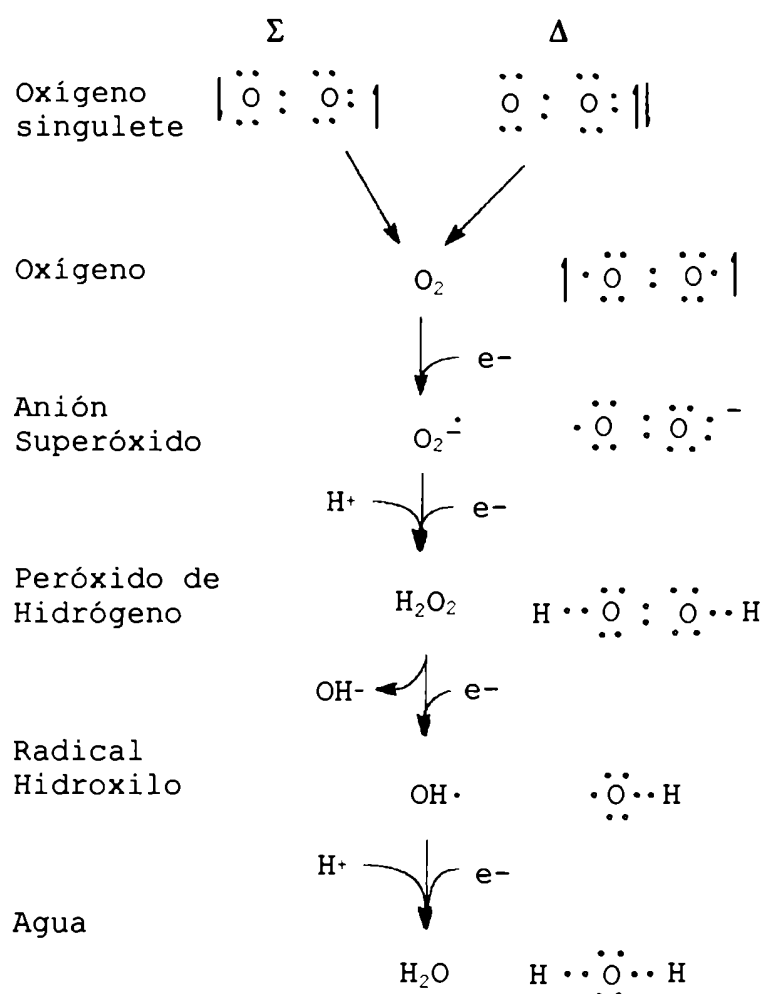


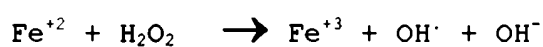
FIGURA VI.2: Cadena de reducción y excitación del oxígeno

El término ROS, incluye a los radicales libres mencionados, así como a los intermediarios reactivos del oxígeno, el oxígeno singlete 1O_2 y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y abarca a todas las especies que son más reactivas que el oxígeno en su estado basal.

En los sistemas biológicos también existen radicales centrados en carbono, nitrógeno y azufre, los cuales son importantes iniciadores y/o propagadores de varios tipos de daños.

Los radicales tiólicos pueden formarse a partir de compuestos endógenos como el GSH, y los radicales centrados en carbono pueden originarse a partir de la abstracción de hidrógenos de ácidos grasos insaturados durante el proceso de peroxidación lipídica (LPO).

La fuente principal de HO· es la mitocondria, donde se genera como producto de la cadena transportadora de electrones. Este radical también puede formarse en otras reacciones en cualquier parte de la célula en la que haya moléculas de H₂O₂ y un metal catalizador, fundamentalmente el hierro. La reacción de Fenton es una de ellas:



Esto significa que el hierro, constituyente de numerosas proteínas, básicamente la hemoglobina, es también un promotor de RL. El HO· es extremadamente reactivo, su vida media es de 10⁻⁹ segundos e interacciona en forma instantánea con la molécula más próxima, oxidándola y, por ende, alterando su estructura. El radical HO·, puede interaccionar con prácticamente cualquier molécula, incluyendo ácidos nucleicos, membranas lipídicas, proteínas y carbohidratos.

El radical superóxido es formado *in vivo* por la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y por el retículo endoplasmático; también las células fagocíticas activadas son capaces de producirlo. En condiciones biológicas El O₂⁻ es poco reactivo. Sólo puede inactivar unas pocas enzimas (McCord & Russell, 1988); tiene una vida media muy corta, y no es capaz de atravesar membranas que no posean un canal aniónico específico.

El H₂O₂ es poco reactivo en soluciones acuosas en concentraciones fisiológicas, pero es capaz de atravesar membranas biológicas. Se sabe que el H₂O₂ es tóxico en una gran cantidad de sistemas, sobre todo en el SNC (Colton et al, 1991).

Sin embargo, la toxicidad en general no es mediada directamente por esta molécula, sino que, vía reacción de Fenton, el peróxido de hidrógeno estaría generando radicales HO·.

El ¹O₂ es electrofílico, tiene una vida media de 10⁻⁵ segundos y se combina fácilmente con sustancias que poseen enlaces dobles o grupos funcionales con muchos electrones, como son los ácidos grasos polinsaturados, los aminoácidos con azufre, las purinas y

los carotenoides. Estas sustancias, como son capaces de atenuar este radical, se denominan quenchers.

Una molécula que ha sido postulada recientemente como un radical libre, es el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$). El $\text{NO}\cdot$ reacciona con el O_2^- dando el radical peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot^-$), que es sumamente reactivo.

Se ha sugerido que el $\text{NO}\cdot$ producido por el endotelio vascular tendría un rol en la regulación del tono vascular (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Algunos cambios celulares atribuidos a la acción de los RL (Figura V.3), incluyen peroxidación lipídica (Janero, 1990), oxidación de proteínas, que se vuelven más sensibles a la proteólisis, pérdida de grupos $-\text{SH}$ y modificación de aminoácidos (Davies, 1987).

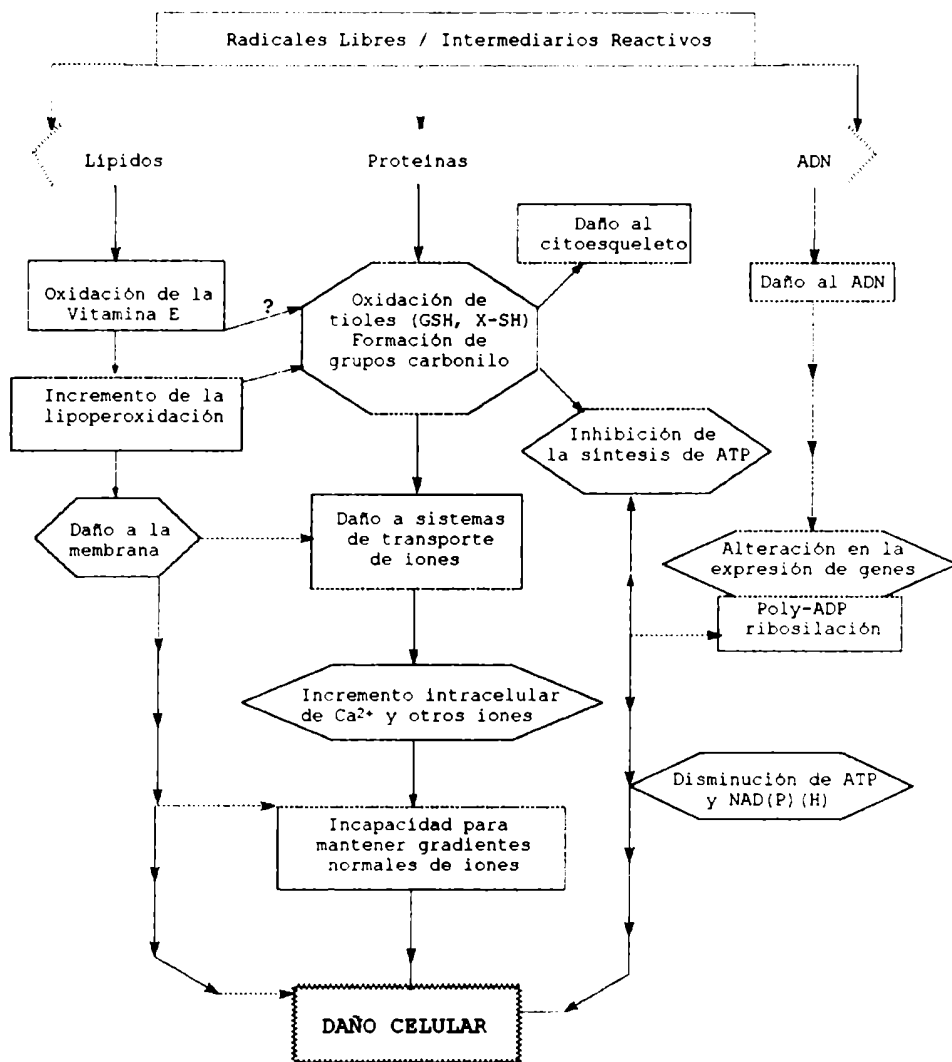


FIGURA V 3: Mecanismos de daño celular de los radicales libres.

La capacidad de los ROS de interactuar con lípidos, proteínas y ADN producen numerosos cambios que pueden afectar el funcionamiento celular. Se representan aquéllos que se creen más estrechamente ligados al daño celular.

El proceso de LPO es una reacción en cadena, que se caracteriza por ser autocatalítica y alterar las moléculas de ácidos grasos polinsaturados, principales componentes de las membranas celulares.

A nivel de ácidos nucleicos, los ROS actúan escindiendo las cadenas de ADN, causando citotoxicidad y mutaciones en el sitio de acción, o alterando factores de transcripción y activando la ADN polimerasa, con la consiguiente deficiencia en algunas enzimas y compromiso para mantener los gradientes de calcio (Cerutti & Trump, 1991). Además la calcio ATPasa contiene grupos tioles que pueden ser inactivados por ROS (Ariki & Shamo, 1983).

Se ha propuesto un rol de los RL en la toxicidad de numerosas sustancias y en la patogénesis de una gran cantidad de enfermedades, en parte porque estas moléculas reactivas son capaces de producir una cantidad de cambios en los tejidos, que están frecuentemente asociados a procesos patológicos; sin embargo, muchos de estos cambios pueden ser una consecuencia más que una causa del daño y, salvo excepciones, es difícil encontrar una vinculación directa entre la generación de RL y una enfermedad.

Dentro de las patologías que se presumen más frecuentemente relacionadas con los RL, se encuentran la inflamación, la artritis reumatoidea, la aterosclerosis, síndrome de isquemia y reperfusión, y enfermedades directamente relacionadas con el envejecimiento, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, algunas disfunciones cerebrales, cataratas y depresión del sistema inmune (Figura V.4).

Situaciones en las que están implicados los RL

Enfermedades del envejecimiento

Arteriosclerosis
Cáncer
Cataratas
Artritis
Parkinson
Alzheimer

Isquemia-reperfusión

Infarto de miocardio
Transplante de órganos
Cirugía cardíaca
Terapias trombolíticas

Adicciones

Alcoholismo
Tabaquismo

Sistema nervioso

Parkinson
Alzheimer
Esclerosis lateral amiotrófica
Traumatismo cerebral
Hiperoxia

Sangre

Fotoxidación de Protoporfirina
Malaria
Varias anemias

Agresiones químicas y físicas

Radiaciones
Doxorubicina
Contaminación ambiental

Pulmón

Hiperoxia
Displasia broncopulmonar
Enfisema
Distrés respiratorio del adulto
Pulmón de bomba
Enfermedad pulmonar del recién nacido
Inhalación de SO₂, NO_x y O₃

Riñón

Síndromes nefrotóxicos autoinmunes
Nefrotoxicidad por metales pesados

Aumento de actividad de los leucocitos

Artritis
Inflamaciones en general
Sepsis

Piel

Dermatitis por contacto
Porfirias
Fotosensibilizantes
Injurias térmicas

FIGURA V.4: Patologías y síndromes que se consideran relacionados con los radicales libres

Se han desarrollado una variedad de marcadores para determinar el daño producido por los RL. La mayoría de ellos consisten en medir cambios relacionados con procesos oxidativos, pero estos no siempre son específicos para RL (Janero, 1990). Entre los métodos más utilizados se encuentran la determinación de marcadores de LPO, como la concentración de etano y pentano en la espiración como método no invasivo, y la determinación de quimioluminiscencia y el dosaje de dienos conjugados y malondialdehído. También resultan útiles los métodos que determinan daños a proteínas (concentración de carbonilos, inhibición o activación de algunas enzimas), daños a ADN (contenido de nucleósidos oxidados), oxidación de mioglobina, etc. Además existen métodos basados en la carga de antioxidantes: contenido de GSH/GSG (glutation reducido/glutation oxidado), concentración de vitamina E y C, entre otros. Se puede confirmar que estos procesos son efectivamente mediados por radicales, agregando agentes secuestrantes tales como catalasa o superóxido dismutasa.

V.2 Control biológico de los radicales libres.

La existencia de ROS es el producto de un equilibrio entre la acción de sustancias prooxidantes con otras antioxidantes (secuestrantes) que las hacen desaparecer.

El stress oxidativo es producto de un desequilibrio entre estos agentes en favor de los prooxidantes. Muchos de los agentes prooxidantes son RL, y entre los antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa, catalasa, glutacion peroxidasa, glutacion, N-acetilcisteína, vitaminas A, C y E, cinc y algunos fármacos (Figura V.5).

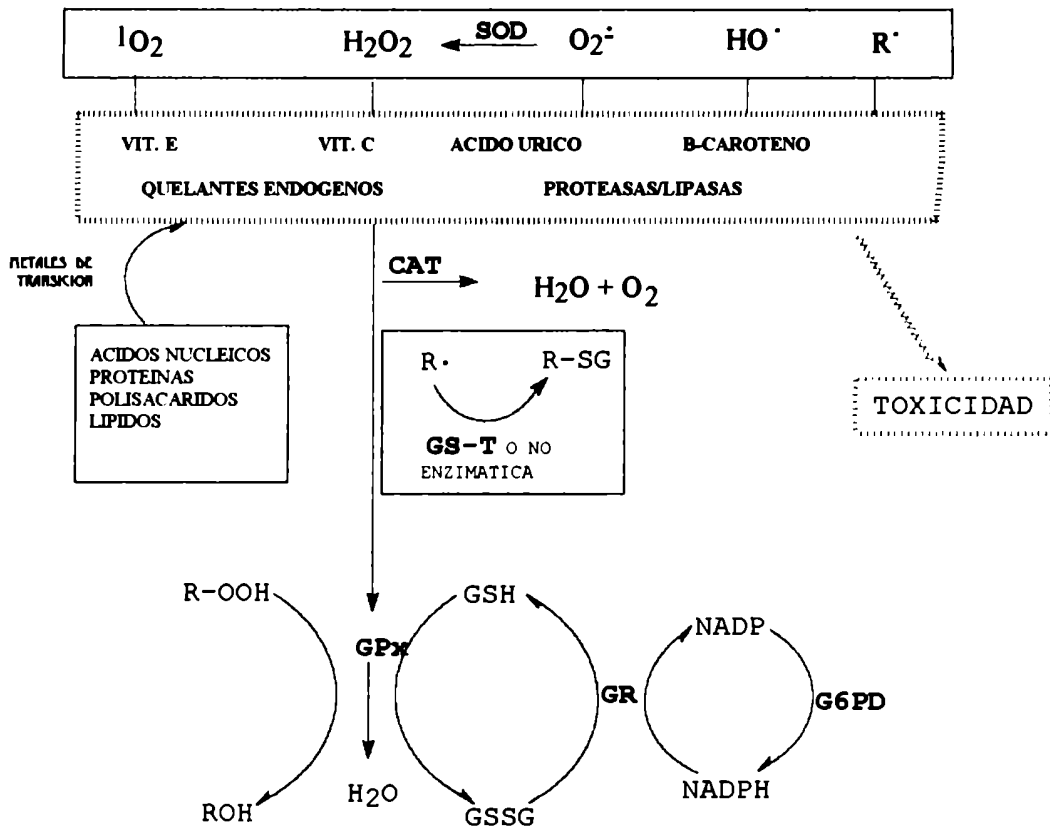


FIGURA V.5: Sistemas biológicos de defensas antioxidantes

Todas las células aeróbicas contienen defensas químicas y antioxidantes enzimáticos que en conjunto tienden a minimizar reacciones oxidativas indeseables para la célula.

Los RL pueden ser eliminados mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos. En particular, el anión superóxido y el radical hidroxilo son especies con un elevado potencial tóxico, por lo que las células aerobias disponen de mecanismos para bloquear sus efectos.

Entre las principales enzimas involucradas en el proceso de eliminación de RL se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

Todas las células aeróbicas poseen la enzima superóxido dismutasa, que cataliza la desaparición del superóxido, para producir peróxido de hidrógeno y oxígeno, manteniendo los niveles del radical suficientemente bajos para evitar la formación de radicales hidroxilo. La SOD dismuta dos moléculas de anión superóxido para formar H_2O_2 y O_2 .

Existen 4 metaloformas de esta enzima. Dos de ellas contienen cobre y cinc, una contiene manganeso y la otra hierro. Una forma de Cu,Zn-SOD está presente en el citosol de células

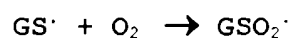
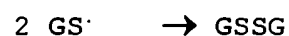
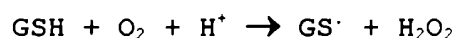
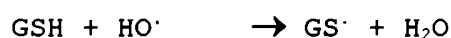
eucariotas (Fridovich, 1975), mientras que la otra está localizada en el fluido extracelular (Marklund, 1987). La Mn-SOD está ubicada en la matriz mitocondrial (Fridovich, 1974), y la Fe-SOD se encuentra exclusivamente en procariotas (McCord et al., 1977).

La CAT está ampliamente distribuida en organismos aeróbicos, y cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 , compitiendo con la GPx por el sustrato. En mamíferos, se encuentra en la mayoría de las células, especialmente en hepatocitos y eritrocitos. A nivel subcelular, el 80% de la actividad de CAT se encuentra en peroxisomas y el 20% en el citosol.

Las glutathion S-transferasas (G-ST) (ver más adelante en VI.2.2) también inactivan compuestos electrofílicos tales como los productos aldehídicos de la LPO.

Además hay defensas estructurales de la célula, tales como la compartimentalización en los peroxisomas de las enzimas generadoras de H_2O_2 , y la quelación del hierro y cobre en transferrina y ferritina o ceruloplasmina, evitando la generación de $OH\cdot$ de la reacción de Fenton.

El glutathion también ejerce una acción directa en la eliminación de los RL, reaccionando con los aldehídos dañinos que son formados durante la peroxidación de lípidos polinsaturados, causada por los ROS (Haenen et al., 1987), además de actuar directamente con algunos ROS mediante las siguientes reacciones:



Existen también una serie de glicosilasas que reparan el ADN oxidado, además de enzimas de escisión inespecíficas. Las proteínas oxidadas sean degradadas por proteasas. Los hidroperóxidos lipídicos son eliminados por la GPx (ver más adelante en VI.2.12). Aparentemente, toda esta batería de defensas es inducible en respuesta al daño oxidativo (Wolff et al., 1990).

Otra línea de defensa celular contra los RL es la de los antioxidantes, que, a diferencia de las enzimas, que tienen una capacidad ilimitada para eliminar radicales, reaccionan con éstos molécula a molécula, formando un sistema saturable.

Entre los antioxidantes biológicos se encuentran los tocoferoles (vitamina E), los carotenoides (vitamina A), que eliminan oxígeno singulete, y el ácido ascórbico (vitamina C), que son incorporados por la dieta y los uratos, la bilirrubina y el ubiquinol, que son de existencia fisiológica. También actúan como antioxidantes diversos oligoelementos, como el cinc, el manganeso, y el cobre.

V.3 Radicales libres y porfirinas

La fotoxidación de la protoporfirina de los glóbulos rojos, también es una fuente de RL. En relación con las porfirias, cabe destacar que en pacientes con porfiria aguda intermitente (PAI), portadores de una deficiencia congénita de la PBG deaminasa, se han encontrado diferencias en las actividades de las enzimas detoxificadoras de RL. En eritrocitos de estos pacientes se encontró, por ejemplo, un aumento de la SOD durante las crisis agudas y un incremento de la GPx en pacientes con PAI latente y asintomática (Medeiros et al., 1982). Sin embargo, otros autores no han encontrado cambios en la SOD eritrocitaria de pacientes porfíricos (Michelson et al., 1977).

V.4 Radicales libres y ALA

In vitro el ALA en su forma enólica reacciona con el oxígeno mediante una reacción catalizada por hierro, produciendo radicales libres. (Figura V.6).

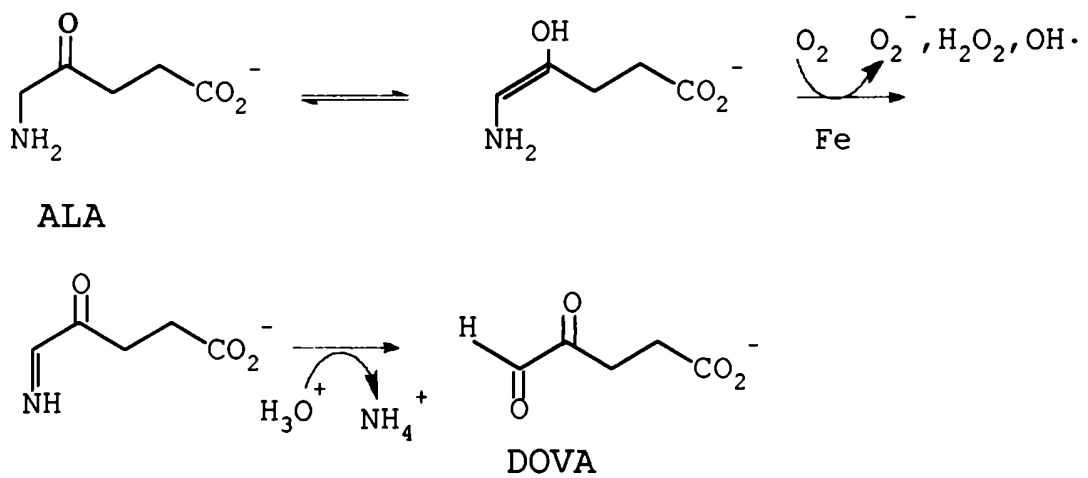


FIGURA V.6: Autoxidación aeróbica del ALA catalizada por hierro para dar como producto ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA).

Como ya se ha hecho referencia en el Capítulo III, numerosos investigadores han estudiado la neurotoxicidad del ALA, que puede llevar a cambios de comportamiento, en el funcionamiento de las membranas celulares, y en la transmisión neuromuscular. Aparentemente, en estos procesos estarían involucrados los ROS.

Los pacientes con PAI, poseen niveles inusualmente elevados de ALA circulante, por lo cual se ha propuesto que esta sobrecarga induciría, por un mecanismo mediado en parte por RL, las manifestaciones clínicas de la enfermedad, en particular los ataques de dolor abdominal y las alteraciones neuropsiquiátricas (Hermes-Lima et al., 1991; Bechara et al., 1993).

Como también se ha citado previamente, algunos autores han encontrado una correlación entre la PAI y el desarrollo de tumores primarios hepáticos (Hardell et al., 1984). Teniendo en cuenta que los ROS están involucrados en la iniciación y promoción de la carcinogénesis, y que una sobreproducción de ALA estaría induciendo un aumento de los niveles de ROS, se ha propuesto que estas especies reactivas podrían inducir daños en el ADN, que se traducirían en mutaciones, disparando el proceso de carcinogénesis (Onuki et al., 1994).

Así se encontró que ROS generados a partir de ALA causaron daños en mitocondrias hepáticas (Hermas-Lima et al., 1991) con cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y disrupción del potencial de membrana, rupturas (Onuki et al., 1994) y transversiones (Fraga et al., 1994) en el ADN; y aumento de la LPO de membranas (Princ, 1995), todos estos efectos se

pueden evitar o revertir con el agregado de enzimas antioxidantes.

V.5 Radicales libres y cáncer

Está ampliamente aceptado el hecho de que la inducción del cáncer puede tener origen físico (radiación), químico (carcinogénesis) o viral (oncogenes). Se cree que los mecanismos implicados en el inicio por radiación y carcinogénesis se relacionan con la presencia de RL. Una variedad de iniciadores del proceso de carcinogénesis producen o inducen la producción de RL (Ames, 1983; Nakayama et al., 1983; Frenkel, 1992).

Estos compuestos, además de actuar sobre la iniciación de la carcinogénesis, también están involucrados en los estadios posteriores del desarrollo tumoral, tales como promoción y progresión (Cerutti, 1985; Halliwell & Gutteridge, 1989).

Algunos promotores tumorales no sólo aumentan la producción de RL, sino que también modulan las defensas antioxidantes de la célula. Por ejemplo, se vio que el promotor TPA, un éster de forbol, produce una disminución en la actividad de la GR y CAT (Solanki et al., 1981), mientras que la GPx muestra una respuesta variable (Perchellet et al., 1985) y la concentración de glutatión aumenta (Halliwell & Gutteridge, 1988).

Se ha intentado antagonizar el proceso de carcinogénesis mediante el uso de antioxidantes, observándose que estas sustancias sólo son efectivas si son administradas al mismo tiempo de exposición al promotor (Thompson et al., 1991).

Es lógico pensar, entonces, que los RL producidos endógenamente también podrían ser carcinogénicos, aún cuando la mayoría de los estudios no apoyan esta conclusión (Kehrer, 1993).

Sin embargo, se sabe que la presencia de un tumor induce en el hígado del animal portador, un aumento en la concentración de ROS, junto con una disminución en la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx y los niveles totales de GSH (Boveris et al., 1985). El hígado de los animales portadores de tumor estaría, entonces, expuesto a una disminución en el sistema de protección antioxidante.

V. 6 Referencias

- Ames, B. Dietary carcinogens and anticarcinogens, oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221: 1256-1264 (1983).
- Ariki, M. & Shamoo, A. Oxidation of reactive sulfhydryl groups of sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 743: 83-87 (1983).
- Bechara, E.; Medeiros, M.; Monteiro, H.; Hermes-Lima, M.; Pereira, B.; Demasi, M.; Costa, C.; Abdalla, D.; Onuki, J.; Wendel, C. & Di Mascio, P. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim. Nova*, 10: 385-392 (1993).
- Boveris, A.; Llesuy, S. & Fraga, C. Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 1: 131-138 (1985).
- Cerutti, P. Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227: 375-381 (1985).
- Cerutti, P. & Trump, B. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells*, 3: 1-5 (1991).
- Colton, C.; Grossman, Y. & Gilbert, D. The effect of xantine/xantine oxidase generated reactive oxygen species on synaptic transmission. *Free Rad. Res. Commun.*, 14: 385-393 (1991).
- Davies, K. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.*, 262: 9895-9900 (1987).
- Fraga, C.; Onuki, J.; Lucesoli, E.; Bechara, J. & Mascio, P. 5-aminolevulinic acid mediates the *in vivo* and *in vitro* formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis*, 15: 2241-2244 (1994).
- Frenkel, K. Carcinogen mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol. Ther.*, 53: 127-166 (1992).
- Fridovich, I. Superoxide dismutase, en *Advances in enzymology*. Ed. Meister, A. New York, vol. 41, p. 39-97 (1974).
- Fridovich, I. Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, 44: 147-159 (1975).
- Haenen, G.; Tai Tin Tsoi, J.; Vermeulen, N.; Timmerman, H. & Bast, A. 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal stimulates microsomal peroxidation by reducing the glutathione-dependent protection. *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 449-456 (1987).
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum. Toxicol.*, 7: 7-11 (1988).
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. Free radicals in biology and medicine, 2da edición, Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell, B. & Aruoma, O. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*, 281: 9-19 (1991).
- Hardell, L.; Bengtson, N.; Jonsson, U.; Eriksson, S.; & Larsson, L. Aetiological aspects on primary liver cancer with special regard to alcohol, organic solvents and acute intermittent

porphyria An epidemiological investigation. *Br. J. Cancer*, 50: 389-397 (1984).

Hermes-Lima, M.; Valle, V.; Vercesi, A. & Bechara, E. Damage to rat liver mitochondria promoted by 5-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species. Connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta*, 1056: 57-63 (1991).

Janero, D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.*, 9: 515-519 (1990).

Kehrer, J. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.*, 23: 21-48 (1993).

McCord, M. & Russell, W. Superoxide inactivates creatine phosphokinase during reperfusion of ischemic heart, en *Oxy radicals in molecular biology and pathology*. Eds. Cerutti, P.; Fridovich, I. & McCord, M. Liss, New York, p. 27-35 (1988).

McCord, M.; Boyle, J.; Day, E.; Rizzolo, L. & Salin, M. A manganese-containing superoxide dismutase from human liver, en *Superoxide and Superoxide dismutases*. Eds. McCord, M. & Fridovich, I. Academic Press, London, p. 129-138 (1977).

Marklund, S. Caeruloplasmin, extracellular superoxide dismutase, and scavenging of superoxide anion radicals. *Free Rad. Biol. Med.*, 2, 255-261 (1987).

Medeiros, M.; Marchiori, P. & Bechara, E. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in the erythrocytes of patients with intermittent acute porphyria. *Clin. Chem.*, 28: 242-247 (1982).

Michelson, A.; Puget, K.; Durosay, P. & Bouneau, J. Clinical aspects of dosage of erythrocytorein, en *Superoxide and superoxide dismutase*. Eds. Michelson, A.; McCord, M. & Fridovich, I. Academic Press, New York, p. 467-499 (1977).

Nakayama, T.; Kimura, T.; Kodama, M. & Nagata, C. Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion from active metabolites of naphthylamine and aminoazo dyes: its possible role in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 4: 765-769 (1983).

Onuki, J.; Medeiros, H.; Bechara, E. & Di Mascio, P. 5-aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe⁺ ions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1225: 259-263 (1994).

Perchellet, J.; Perchellet, E.; Orten, D & Schnider, B. Inhibition of the effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse epidermal glutathione peroxidase and ornithine decarboxylase activities by glutathione level-raising agents and selenium-containing compounds. *Cancer Lett.*, 26: 283-286 (1985).

Princ, F. Biosíntesis de porfirinas en corteza cerebral y cerebelo de rata. Estudios sobre la porfobilinógeno-deaminasa. Empleo del ácido 5-aminolevulínico como generador de especies reactivas de oxígeno. Tesis doctoral, UBA (1995).

Solanki, V.; Rana, R. & Slaga, T. Diminution of mouse epidermal superoxide dismutase and catalase activities by tumor promoters. *Carcinogenesis*, 2: 1141-1145 (1981).

Thompson, J.; Bolton, J. & Malkinson, A. Relationship between the metabolism of butylated hydroxytoluene (BHT) and lung tumor promotion in mice. *Exp. Lung Res. Commun.*, 12-13: 745 (1991).

Wolff, S.; Olivieri, G. & Afzal, V., en Chromosomal aberrations: Basic and applied aspects. Eds. Natarajan & Obe. Springer, New York, p. 140-150 (1990).

CAPITULO VI

METABOLISMO DEL GLUTATION. SU RELACION CON LA TFD Y LAS DROGAS ANTINEOPLASICAS

VI.1 Glutation reducido y oxidado.....	127
VI.2 Enzimas involucradas en el metabolismo del glutacion.....	127
VI.2.1 Interconversión de GSH Y GSSG.....	127
VI.2.11 Glutation reductasa.....	129
VI.2.12 Glutation peroxidasa.....	129
VI.2.2 Conjugación del glutacion con compuestos exógenos: Glutation S-transferasas.....	129
VI.3 Rol del glutacion en la TFD.....	131
VI.4 Rol del glutacion en la eficacia terapéutica de la ciclofosfamida.....	133
VI.5 Referencias.....	136

VI. METABOLISMO DEL GLUTATION. SU RELACION CON LA TFD Y LAS DROGAS ANTINEOPLASICAS.

VI.1 Glutation reducido y oxidado

El glutacion (GSH) es el compuesto tiólico más abundante en la célula. Actúa principalmente como antioxidante y detoxificante, protegiendo a la célula contra las ROS (ver capítulo V) y conjugándose con compuestos extraños. Es fundamental para el mantenimiento de la integridad celular y de las membranas de las organelas y también para la síntesis de microtúbulos y macromoléculas.

El GSH se sintetiza a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina por la acción consecutiva de dos enzimas que requieren ATP (Figura VI.1). En la primera etapa la γ -glutamil cisteinil sintetasa (γ -GC-S) cataliza la unión entre la cisteína y el glutamato. En una segunda etapa por acción de la glutacion sintetasa (G-S) se produce una condensación de la glicina con el dipéptido formado para dar lugar al γ -glutamil cisteinil glicina o GSH. La vida media de este compuesto varía entre los 2 y los 15 días, para las distintas especies (Kurata et al., 1993).

Es común el uso del término GSH para incluir tanto el GSH (glutacion reducido) como el GSSG (glutacion oxidado), por cuanto pueden desconocerse las cantidades relativas de cada forma.

VI.2 Enzimas involucradas en el metabolismo del glutacion

VI.2.1 Interconversión de GSH Y GSSG.

En las células de mamíferos el GSH puede encontrarse bajo 3 ó 4 formas metabólicas dinámicamente intercambiables. En condiciones normales y en equilibrio, la mayor proporción de GSH existe en la forma reducida; el nivel intracelular en mamíferos está en el orden milimolar (0,5 a 10 mM) mientras que en el plasma sanguíneo es del orden micromolar. La oxidación del GSH a GSSG puede ocurrir no enzimáticamente o por medio de la glutacion

peroxidasa. También se forma GSSG por reacción del GSH con radicales libres.

La reducción del GSSG por la glutathion reductasa así como su eflujo, contribuyen a mantener eficazmente la concentración intracelular de GSSG a niveles muy bajos, del orden de 5 a 50 μM .

El GSH celular también participa en la formación de disulfuros mixtos GSS-Y, tanto con proteínas como con otros compuestos sulfhidrúlicos no proteicos (Figura VI.1).

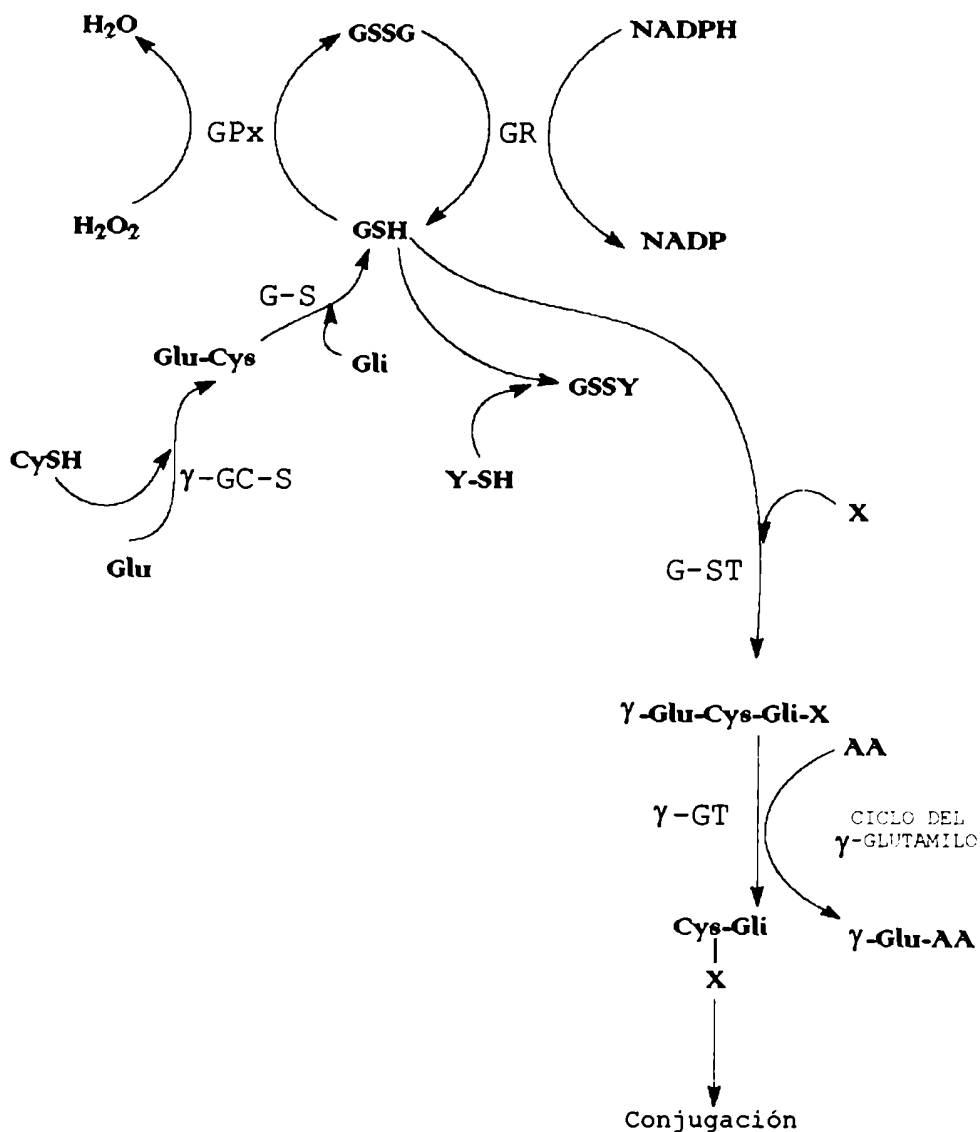


FIGURA VI.1: Metabolismo del GSH. Ciclo de óxido-reducción y reacciones de conjugación. Formación de tio-éteres

La oxidación de GSH a GSSG puede ocurrir enzimáticamente por la glutathion peroxidasa (GPx). La reacción inversa es catalizada por la glutathion reductasa (GR). Algunas de las enzimas que intervienen en la conjugación son la glutathion transferasa (G-ST) y la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT). Esta última enzima participa también en el ciclo del γ -glutamilo, en el cual tiene lugar la síntesis y degradación del GSH a través de 6 reacciones enzimáticas.

VI.2.11 Glutation reductasa.

La GR es una flavoproteína ampliamente distribuida que cataliza la reducción del GSSG usando NADPH como cofactor (Harvey & Kaneko, 1975). La reacción requiere O_2 y libera H_2O_2 .

La reacción catalizada por esta enzima es irreversible, y da cuenta de la alta proporción GSH: GSSG que se encuentra en la mayoría de las células. El mantenimiento de esta relación es de suma importancia para la integridad celular, ya que la concentración de glutatión en forma reducida contribuye a la estabilidad de otros tioles celulares, incluyendo los de membrana y los que intervienen en la composición del sitio activo de las enzimas celulares (Jacob & Jandl, 1962; Allen & Jandl, 1962).

La GR constituye una de las defensas del organismo ante la presencia de radicales libres, catalizando la reducción del GSSG producido por la GPx (Figura V.4).

VI.2.12 Glutation peroxidasa

La GPx cataliza la oxidación de GSH a GSSG con la utilización de H_2O_2 . Según sus requerimientos de selenio, se han identificado dos formas de esta enzima: la selenio dependiente y la selenio independiente. Ambas se distribuyen tanto en citosol (70%) como en mitocondria (30%). La GPx Se-independiente a veces se considera una isoenzima de la GS-T (Carmagnol et al., 1983).

Se han encontrado deficiencias de esta enzima detoxificante en ciertos tejidos tumorales (Pinto & Bartley, 1973).

VI.2.2 Conjugación del glutatión con compuestos exógenos: Glutation S-transferasas.

La interacción de compuestos extraños al organismo con el GSH puede darse espontáneamente o ser catalizada por las G-ST. Los sitios electrofílicos de estos compuestos, al combinarse con los grupos -SH, son neutralizados de manera que resultan más hidrosolubles. Los conjugados del glutatión se convierten luego en ácidos mercaptúricos por medio de una serie de reacciones

iniciadas por la γ -GT (γ -glutamil transpeptidasa), para ser después eliminados del organismo (Figura VI.1). Estas reacciones de conjugación producen una pérdida irreversible de GSH.

Las G-ST se hallan en gran cantidad en el hígado (el 10% del total de proteína soluble), así como también en otros tejidos tales como eritrocitos (Marcus et al., 1977) e intestino (Fleischner et al., 1976).

Las G-ST de hígado existen como dímeros que contienen 4 tipos de subunidades que se combinan para formar seis isoenzimas diferentes.

Las funciones fisiológicas de las G-ST son muy diversas. Intervienen en el metabolismo del etanol y otras drogas, así como en la reducción de peróxidos.

Aunque las concentraciones de GSH hepático son altas (4-6 mM), la conjugación con compuestos extraños puede llevar a una disminución del GSH.

En relación a las porfirinas, las GS-T están involucradas en la captación intracelular de porfirinas. Algunas isoenzimas captan hematina, PROTO IX y Hematoporfirina. En general, todas las porfirinas naturales y artificiales se unen en mayor o menor medida a alguna de las isoenzimas (Smith et al., 1985).

Además, algunas G-ST pierden actividad catalítica en presencia de hemo (Van der Jagt et al., 1985). La expresión aumentada de estas enzimas en los procesos neoplásicos podría ser una respuesta compensatoria a los efectos inhibitorios del hemo (Stout & Becker, 1990).

Existe una expresión diferencial tejido-específica de estas isoenzimas en cuanto a tipo y cantidad tanto en tejidos normales (Tu et al., 1983) como neoplásicos (Smith et al., 1985). Cabe señalar aquí que esta expresión puede modificarse por la presencia de un tumor en el organismo, lo cual puede llevar a alteraciones en el metabolismo de drogas, como así también en el de las porfirinas exógenas (Smith, 1987).

La asociación de las G-ST con las porfirinas puede llegar a jugar un rol importante en la determinación de los sitios intracelulares blanco del daño fotodinámico (citosol, mitocondria, retículo endoplasmático, etc.), que es donde habitualmente se localizan las isoenzimas.

VI.3 Rol del glutation en la TFD

Existe abundante información sobre la existencia de cambios en la eficacia de la terapia fotodinámica del cáncer cuando la célula se deprivada de GSH. No obstante, aún no están claros los mecanismos por los cuales actuaría este compuesto.

Algunos tumores de piel, hígado y colon, poseen niveles inusualmente altos de γ -GT (Figura VI.1). Niveles altos de esta enzima actuarían como marcadores tempranos de la diferenciación y envejecimiento celular y/o proliferación celular reducida (Richards & Astrup, 1982) y puede ser también un marcador de fetalización celular.

En relación al tratamiento del cáncer, está descrito el rol de los tioles intracelulares, en particular del GSH, en la quimioterapia, radiación ionizante e hipertermia (Arrick & Nathan, 1984). En este caso el GSH estaría involucrado en la protección de las células vía detoxificación de especies citotóxicas, como secuestrante de radicales libres y reparador del daño oxidativo mediante la cesión de hidrógeno. También se ha sugerido que el GSH puede intervenir en la reparación del daño al ADN (Revesz & Larsson, 1981) y en la conservación de la integridad de membranas por medio de la formación de disulfuros mixtos (Isaacs & Binkley, 1979).

La radiación ionizante toma un H de una molécula para formar un radical, entonces el GSH actúa como donador de hidrógenos para restaurar el estado original de la molécula a expensas de un aumento en la concentración de GSSG. Un efecto inmediato a la irradiación es la oxidación de los grupos tiólicos de la célula y una disminución del contenido de GSH intracelular acompañado de un aumento en la concentración de GSSG. Por eso es que, bajo condiciones de stress oxidativo hay un incremento en la producción y transporte de GSSG (Sies et al., 1972).

Sobre estas bases se han ensayado tratamientos con butionina sulfoximina (BSO), inhibidora de la γ -GC-S (Figura VI.1), con el objeto de producir una deprivación de GSH y así estimular la lisis oxidativa de células tumorales *in vitro* (Peinado et al., 1992). Por otra parte se ha visto que el glutation reducido y no el oxidado, es capaz de atenuar *in vitro* la oxidación catalizada

por Fe-H₂O₂ de porfirinógenos a porfirinas (Woods, 1988), por un mecanismo poco claro que se relaciona con la habilidad del GSH para destruir intermediarios reactivos de oxígeno *in vivo* (Meister & Anderson, 1983).

También se ha ensayado deprivar al GSH intracelular *in vitro*, como método para incrementar la eficacia de la TFD, demostrándose que la disminución de la concentración de GSH en células normales, al igual que en células genéticamente deficientes en GSH, las hace más sensibles al tratamiento (Miller & Henderson, 1986).

Sin embargo, la administración de N-acetilcisteína-estimulador del sistema redox del glutation- no resultó eficaz en la prevención de la fotodermatosis producida por la acumulación de PROTO IX en pacientes con protoporfiria eritropoyética (Bijlmer-Iest et al., 1992). En contraste, el uso de S-adenosil-L-metionina, generador de GSH, sola o en combinación con otros tratamientos, había mostrado efectos altamente benéficos en la terapia por intoxicación por plomo (Paredes et al., 1986), de la Porfiria Cutánea Tardía (Batlle et al., 1988) y aún de la protoporfiria eritropoyética (Batlle et al., 1989).

Como se demostró en mitocondrias de rata (Atlante et al., 1990), los grupos SH presentes en los transportadores de fosfato, son blancos preferenciales del Photofrin II. Un posible mecanismo de acción del GSH estaría relacionado con este hallazgo, ya que la presencia de grupos tiólicos estaría compitiendo por los oxígenos singulete (Rougee et al., 1988) generados en la TFD. También se ha propuesto a la membrana mitocondrial como blanco preferencial de la terapia fotodinámica (Perlin et al., 1985).

Además se ha visto que algunas porfirinas usadas en TFD, inhiben isoenzimas de las G-ST purificadas de hígado de ratón o pulmón o de citosol de células hepáticas normales o cancerosas (Smith et al., 1985). Aunque existen diferencias en el tipo y cantidad de transferasas localizadas en hígado normal y en hepatoma, estas enzimas son sitios potenciales de unión para las porfirinas, sugiriendo que éstas se acumularían preferencialmente en tejidos donde dichas transferasas estén sobreexpresándose. A la vez, la unión a porfirinas inhibe la actividad de estas enzimas detoxificantes, con consecuencias metabólicas importantes para la célula.

Se observó también que la administración i.p. de PROTO en ratas ocasionó un incremento en el contenido del GSH hepático,

sin encontrarse cambios en la actividad de las enzimas GR, GPx, G-ST, SOD y CAT (Imai et al., 1993).

VI.4 Rol del glutation en la eficacia terapéutica de la ciclofosfamida

En relación a los agentes quimioterápicos se ha visto que el pool de GSH mitocondrial jugaría un rol importante en la peroxidación de lípidos inducida por adriamicina y nitrosoureas (Meredith & Reed, 1983).

El metabolismo del glutation puede participar de varias maneras en cuanto a la eficacia terapéutica de las drogas antineoplásicas:

1) Detoxificación: el GSH puede proteger a las células detoxificando especies activas y/o reparando daño celular.

2) Toxicación: el GSH puede estar involucrado en la formación de especies activas en el tumor o en células normales.

3) Distribución: el metabolismo de GSH puede modificar la incorporación de la droga a la célula.

4) Interacciones terapéuticas: alteraciones en los niveles de GSH en el tumor o en el huésped pueden influir en la eficacia del tratamiento antineoplásico.

El glutation puede participar en reacciones conjugativas en diversos sitios del camino metabólico de la ciclofosfamida (Figura IV.3), pudiendo modificar la toxicidad de dicho agente (Lee, 1991; Lee, et al., 1991). El GSH se une irreversiblemente a los metabolitos tóxicos de la 4-OH-CY, en particular la acroleína, con lo cual la exposición de las células a 4-OH-CY puede conducir a la disminución de GSH endógeno si dicha reacción supera la entrada de éste a la célula. Se ha visto tanto *in vivo* (Adams et al., 1986) como *in vitro* (Crook et al., 1986) una notable reducción del GSH intracelular frente a concentraciones tóxicas de 4-hidroperoxiciclofosfamida(4-OOH-CY), que por un proceso no enzimático forma rápidamente 4-OH-CY, muy usada debido a su mayor estabilidad y facilidad de síntesis.

En repetidas condiciones se han encontrado aumentos en la actividad de las GS-T acompañados por deprivación de GSH en células leucémicas resistentes a la CY (Institoris et al., 1993; Colvin et al., 1993) y en médula ósea (Adams et al., 1986).

Probablemente ambos fenómenos son paralelos y se deban a la conjugación de este compuesto tiólico con dicha droga, siendo éste el mecanismo causante de la resistencia.

Así también se encontró (Siemann et al., 1989) que la línea celular KHT, altamente susceptible a la deprivación de GSH por 4-OOH-CY es también sensible a éste agente, mientras que la línea A459, resistente a la deprivación de GSH por la 4-OOH-CY mostró ser refractaria a los efectos tóxicos de la droga.

Sin embargo, también se vio que con bajas dosis de CY se producía un aumento de los niveles de GSH y de G-ST en granulocitos como respuesta a esta citotoxina (Carmichael et al., 1986).

También en células leucémicas resistentes a CY se observó el doble de actividad de la GR con respecto a las células sensibles al alquilante (Institoris et al., 1993).

El GSH, como un mecanismo alternativo de protección, enmascararía la formación de entrecruzamientos mediada por CY. En células resistentes a CY (2-3 veces más contenido de GSH), se encontró menor cantidad de entrecruzamientos de ADN-ADN y ADN-proteínas. El GSH probablemente se uniría al monoadducto formado por la droga, previniendo así que actúe sobre el ADN celular.

La 4-OH-CY (Figura IV.3) es la forma en la que se transporta la ciclofosfamida, luego de su activación en hígado, hasta la célula blanco. La 4-OH-CY intracelular está en equilibrio con la aldofosfamida y ésta puede seguir tres caminos distintos: 1) transformación espontánea a acroleína y a mostaza fosforamida, 2) transformación enzimática a la forma no tóxica carboxifosfamida (CBP) o 3) reacción con un grupo tiólico para formar un hemitioacetal que luego sufre una hidroxilación y cierre de anillo para formar nuevamente 4-OH-CY. Como se muestra en la Figura IV.3 el GSH puede participar en reacciones conjugativas en tres sitios diferentes con una considerable influencia en la eventual citotoxicidad de la 4-OH-CY: la reacción con AP desplazando el equilibrio hacia la formación de 4-OH-CY en detrimento de la formación de metabolitos tóxicos de la AP y la reacción irreversible de GSH con los metabolitos tóxicos acroleína y mostaza fosforamida.

Aunque no tan importante como en la DOX, la cardiotoxicidad provocada por la CY es a veces un factor limitante para el tratamiento quimioterápico (Buckner et al., 1972). En consecuencia, el GSH juega un rol importante en la protección del tejido cardíaco frente a la CY. Se vio que el tratamiento con BSO provocaba la muerte en ratones, luego del tratamiento con el antineoplásico (Soble & Dorr, 1987). Aparentemente, la causa de esta toxicidad aguda de la CY sería la muerte cardíaca, ya que se encontró fibrilación ventricular luego de 3 hs post tratamiento.

Este tipo de toxicidad se podría controlar farmacológicamente mediante la administración de GSH simultánea con el tratamiento antitumoral (Friedman et al., 1990).

Sobre estas bases se ha propuesto que la manipulación de los niveles intracelulares de glutatión podría emplearse como adyuvante tanto en la quimioterapia como en la terapia radiante; no obstante es necesario conocer previamente el estado del glutatión en las células tumorales y en las normales.

VI.5 Referencias

- Adams, D.; Carmichael, J. & Wolf, C. Altered mouse bone marrow glutathione transferase levels in response to cytotoxins. *Cancer Res.*, 45: 1669-1674 (1986).
- Allen, D. & Jandl, J. Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action. *J. Clin. Invest.*, 40: 454-475 (1962).
- Arrick, B. & Nathan, F. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res.*, 44: 4224-4232 (1984).
- Atlante, A.; Passarella, S. & Quagliariello, E. Carrier thiols are targets of photofrin II photosensitization of isolated rat liver mitochondria. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, 7: 21-32 (1990).
- Batlle, A.; Paredes, S.; Fukuda, H.; Kozicki, P. & Rossetti, M. S-adenosyl-L-methionine, a mechanism for its action on lead mobilization and disposal in lead poisoning. *Biochem. Arch.*, 2: 293-303 (1986).
- Batlle, A.; Stella, A.; Melito, V.; Guzmán, H.; Pietropaolo, N. & Cabrera, H. Estudio comparativo de los tratamientos de la porfiria cutánea tardía con S-adenosil-L-metionina (SAM) y cloroquina; flebotomías y cloroquina combinadas y la sola administración de SAM, cloroquina o flebotomías. *Rev. Arg. Derm.*, 69: 245-250 (1988).
- Batlle, A.; Stella, A.; Melito, V.; Gomez, M.; Pietropaolo, N.; Cabrera, H. & Pierini, A. S-adenosil-L-metionina, un posible agente terapéutico anticolestático en las porfirias, con particular referencia a la protoporfiria eritropoyética. Resultados preliminares. *Arch. Argent. Dermat., T. XXXIX*: 3-21 (1989).
- Bijlmer-Iest, J.; Baart, H.; Van Asbeck, B.; Van Hattum, J.; Van Weelden, H.; Marx, J. & Koningsberger, J. Protoporphyrin photosensitivity cannot be attenuated by oral N-acetylcysteine. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 9: 245-249 (1992).
- Buckner, C.; Randolph, R.; Fefer, A.; Clift, R.; Epstein, R.; Funk, D.; Neiman, P.; Slichter, S.; Storb, R. & Thomas, E. High-dose cyclophosphamide therapy for malignant disease: toxicity, tumor response and the effects of stored autologous marrow. *Cancer (Phila.)*, 19: 357-365 (1972).
- Carmagnol, F.; Sinet, P. & Jerome, H. Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim. Biophys. Acta*, 759: 49-57 (1983).
- Carmichael, J.; Adams, D.; Ansell, J. & Wolf, R. Glutathione and glutathione transferase levels in mouse granulocytes following cyclophosphamide administration. *Cancer Res.*, 46: 735-739 (1986).
- Colvin, O.; Friedman, H.; Gamcsik, M.; Fenselau, C. & Hilton, J. Role of glutathione in cellular resistance to alkylating agents. *Adv. Enzyme Regul.*, 33: 19-26 (1993).
- Crook, T.; Souhami, R.; Whyman, G. & McLean, A. Glutathione depletion as a determinant of sensitivity of human leukemia cells to cyclophosphamide. *Cancer Res.*, 46: 5035-5041 (1986).

- Fleischner, G.; Kamisata, K.; Gatmaitan, Z. & Arias, I., en *Glutathione: Metabolism and function*. Eds. Arias, I. & Jakobky, W., Raven Press, New York, p. 259-263 (1976).
- Friedman, H.; Colvin, M.; Aisaka, K.; Popp, J.; Bossen, E.; Reimer, K.; Powell, J.; Hilton, J.; Gross, S.; Levi, R.; Bigner, D. & Griffith, O. Glutathione protects cardiac and skeletal muscle from cyclophosphamide-induced toxicity. *Cancer Res.*, 50: 2455-2462 (1990).
- Harvey, W. & Kaneko, J. Erythrocyte enzyme activities and glutathione levels of the horse, cat, dog and man. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B: 507-510 (1975).
- Imai, K.; Aimoto, T.; Sato, M. & Kimura, R. Antioxidative effect of protoporphyrin and increase of glutathione in protoporphyrin-administered rat liver. *Biochem. Pharm. Bull.*, 16: 759-761 (1993).
- Institoris, E.; Tretter, L. & Gaal, D. Severe depletion of cellular thiol and glutathione-related enzymes of a carmustine-resistant L1210 strain associated with collateral sensitivity to cyclophosphamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 33: 85-88 (1993).
- Isaacs, J. & Binkley, F. Glutathione dependent control of protein disulfide-sulfhydryl content by subcellular fractions of hepatic tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 497: 192-204 (1979).
- Jacob, H. & Jandl, J. Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of hemolysis. *J. Clin. Invest.*, 41: 779-792 (1962).
- Kurata, M.; Suzuki, M. & Takeda, K. Differences in levels of erythrocyte glutathione and its metabolizing enzyme activities among the primates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B: 169-171 (1993).
- Lee, F. Glutathione diminishes the anti-tumour activity of 4-hydroperoxycyclophosphamide by stabilising its spontaneous breakdown to alkylating metabolites. *Br. J. Cancer*, 63: 45-50 (1991).
- Lee, F.; Flanney, D. & Siemann, D. Prediction of tumour sensitivity to 4-hydroperoxycyclophosphamide by a glutathione-targeted assay. *Br. J. Cancer*, 63: 217-222 (1991).
- Marcus, C.; Habig, W. & Jakoby, W. Glutathione transferase from human erythrocytes. Nonidentity with the enzymes from liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 188: 287-293 (1977).
- Meister, A. & Anderson, M. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 711-760 (1983).
- Meredith, M. & Reed, J. Depletion *in vitro* of mitochondrial glutathione in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by adriamycin and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). *Biochem. Pharmacol.*, 32: 1383-1388 (1983).
- Miller, A.; Henderson, B. The influence of cellular glutathione content on cell survival following photodynamic treatment *in vitro*. *Radiat. Res.*, 107: 83-94 (1986).
- Peinado, P.; Martinez-Liarte, J.; del Marmol, V.; Solano, F. & Lozano, J. Glutathione depletion in mouse melanoma cells increases their sensitivity to oxidative lysis. *Cancer J.*, 5: 348-352 (1992).
- Perlin, D.; Murand, R.; Gibson, S. & Hilf, R. Effects of photosensitization by hematoporphyrin derivative on mitochondrial adenosine triphosphatase-mediated proton transport and membrane

- integrity of R3230AC mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 45: 653-658 (1985).
- Pinto, R. & Bartley, W. Glutathione reductase and glutathione peroxidase activities in hepatomas livers of rats treated with diethylnitrosamine. *FEBS Letters*, 32: 307-309 (1973).
- Revesz, M. & Larsson, A. Induction and repair of single-strand DNA breaks after X-ray irradiation of human fibroblasts deficient in glutathione. *Int. J. Radiat. Biol.*, 40: 355-363 (1981).
- Richards, W. & Astrup, E. Expression of γ -glutamyl transpeptidase activity in the developing mouse tooth, vertebral disc and hair follicle. *Cancer Res.*, 42: 4143-4152 (1982).
- Richardson, M. & Siemann, D. DNA damage in cyclophosphamide-resistant tumor cells: the role of glutathione. *Cancer Res.*, 55: 1691-1695 (1995).
- Rougee, M.; Benasson, R.; Land, E. & Pariente, R. Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. *Photochem. Photobiol.*, 47: 485-489 (1988).
- Siemann, D.; Flaherty, A. & Penney, D. Effect of thiol manipulation chemopotential by nitroimidazoles. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 16: 1341-1348 (1989).
- Sies, H.; Gerstenecker, C.; Menzel, H.; Flohé, L. Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides. *FEBS Lett.*, 27: 171-175 (1972).
- Smith, A. Mechanisms of toxicity of photoactivated artificial porphyrins. Role of porphyrin-protein interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 514: 309-322 (1987).
- Smith, A.; Niury, H. & Awasthi, Y. Interactions with glutathione S-transferases of porphyrins used in photodynamic therapy and naturally occurring porphyrins. *Biochem. J.*, 229: 823-831 (1985).
- Soble, M. & Dorr, R. Lack of enhanced myelotoxicity with buthionine sulfoximine and sulfhydryl-dependent anticancer agents in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 55: 161-180 (1987).
- Stout, D. & Becker, F. Heme synthesis in normal mouse liver and mouse liver tumors. *Cancer Res.*, 50: 2337-2340 (1990).
- Tu, C.; Weiss, M. ; Li, N. & Reddy, C. Tissue-specific expression of the rat glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, 258: 4659-4662 (1983).
- Van der Jagt, D.; Hunsaker, L.; García, K. & Royer, R. Isolation and characterization of the multiple glutathione S-transferases from human liver. Evidence for unique heme-binding sites. *J. Biol. Chem.*, 260: 11603-11610 (1985).
- Woods, J. Attenuation of porphyrinogen oxidation by glutathione *in vitro* and reversal by porphyrinogenic trace metals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152: 1428-1434 (1988).

MATERIALES Y METODOS

I. Drogas.....	139
II. Animales.....	139
III. Determinaciones de porfirinas.....	139
III.1 Determinación de la cantidad de porfirinas sintetizadas.....	139
III.2 Cromatografías.....	140
III.3 Determinación del contenido de porfirinas en materia fecal.....	141
III.4 Determinación de porfirinas en sangre.....	141
III.5 Índice de porfirinas plasmáticas.....	142
III.6 Determinación de porfirinas libres totales en orina empleando columnas de Bio-Rad.....	142
IV. Determinaciones de actividad de algunas enzimas del camino del hemo.....	143
IV.1 Determinación de ALA dehidrasa.....	143
IV.1.1 Fuente enzimática.....	143
IV.1.2 Sistema de incubación.....	144
IV.2 Determinación enzimática de PBG-asa.....	144
IV.2.1 Fuente enzimática.....	144
IV.2.2 Sistema de incubación.....	145
V. Determinación de ALA y PBG en hígado.....	146
VI. Cultivo de explantes tisulares.....	147
VII. Preparación de ALA encapsulado.....	148
VIII. Marcadores de integridad celular.....	148
VIII.1 Lisis celular: determinación de Láctico Deshidrogenasa en el medio de incubación.....	148
VIII.2 Integridad de membranas: determinación de potasio intracelular.....	148
IX. Antineoplásicos.....	149
IX.1 Dosis de antineoplásicos para los estudios de la TFD.....	149
IX.1.1 5-Fluorouracilo.....	149
IX.1.2 Ciclofosfamida.....	149
IX.1.3 Doxorubicina.....	150
X. Determinación de citocromo P ₄₅₀	150
XI. Metabolismo de glutatión.....	151
XI.1 Determinación de glutatión reducido y oxidado.....	151
XI.2 Determinación de actividad de la glutatión reductasa.....	151
XI.3 Determinación de actividad de glutatión S-transferasas.....	152
XII. Determinación de malondialdehído.....	153
XIII. Determinación de la concentración proteica.....	154
XIV. Tratamiento estadístico de los datos.....	154
XV. Referencias.....	155

I. Drogas

Se usó ALA, DTT, GSH y GSSG de Sigma Chem. Co.; ácido fólico BDH; Acetato de cinc de Mallinkrot; y acroleína de Riedel-de Haën. Los antineoplásicos utilizados fueron 5-Fluorouracilo y Ciclofosfamida Endoxan, donación de Laboratorios Labinca y Doxorubicina Asofarma, donación de Laboratorios Raffo.

Los demás reactivos empleados fueron de grado analítico, obtenidos de distintas fuentes comerciales.

II. Animales

Se emplearon ratones machos y hembras de la cepa Balb/C de 2 a 6 meses de edad y de 25 a 30 g de peso. Se les suministró agua y comida (Alimento Cooperación, de la Asociación de Cooperativas Argentinas) *ad libitum*. Los ratones tratados portaban un adenocarcinoma M2 (Hospital Roffo) inyectado subcutáneamente 14 días antes de comenzar las experiencias.

Los sacrificios se realizaron por asfixia en cámara de éter. Previamente se inyectaron 0,15 ml de heparina, y se perfundieron los órganos con 200 ml de solución fisiológica.

III. Determinaciones de porfirinas

III.1 Determinación de la cantidad de porfirinas sintetizadas

Para la extracción de porfirinas, los tejidos y explantes se homogeneizaron con 2 ml de una mezcla de acetato de etilo: ácido acético (4:1, v:v) con un potter Ultra Turrax. Los homogenatos se centrifugaron durante 25 minutos a 4000 rpm en una centrífuga clínica y los precipitados se descartaron.

Tanto los sobrenadantes obtenidos en el paso anterior, como los medios de mantenimiento remanentes fueron extraídos con 2 ml

de HCl 5% por agitación en un vortex. Se midieron los volúmenes de la fase clorhídrica y se descartó la fase orgánica.

La presencia de porfirinas fue determinada por espectrofluorometría y espectrofotometría mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g porfirinas/g tejido} = \frac{\Delta \times f \times \text{vol.HCl} \times 1000}{\text{mg tej.usado}}$$

donde:

$\Delta = 2 \times \text{Absorbancia máxima} - \text{Absorbancia a } 430 \text{ nm} - \text{Absorbancia a } 380 \text{ nm}$, para espectrofotometría.

$\Delta =$ se obtiene para fluorometría en relación al patrón de URO.

$f =$ factor de conversión para URO. (0,875).

Para las determinaciones de las absorbancias se utilizó un espectrofotómetro Hewlett Packard diode array modelo 8452A.

Para las determinaciones fluorométricas, se empleó un espectrofluorómetro Shimadzu RF-510, usando una longitud de onda de emisión de 604 nm y una longitud de onda de excitación de 407 nm., y se usó un patrón de URO como referencia.

III.2 Cromatografías

Las porfirinas de los medios de incubación y de los explantes se esterificaron con una mezcla de ácido sulfúrico: metanol 10% v/v, y se extrajeron en cloroformo según el método de Batlle & Grinstein (1962); se concentraron en un baño térmico y se sembraron en placas de TLC (Merck).

Las placas con las muestras y los patrones se corrieron durante 20 min. en benceno:metiletilcetona (20:1,5; v:v) y luego, durante 45 min. en benceno:acetato de etilo:metanol:éter de petróleo (25:0,5:1:3; v:v:v:v) (With, 1975).

Las placas se revelaron bajo lámpara de Wood y se asignaron valores relativos a los compuestos intermediarios.

III.3 Determinación del contenido de porfirinas en materia fecal

La extracción y cuantificación de las porfirinas fecales se realizó según la técnica de With (1975) con algunas modificaciones. Se agregaron 3 ml de la mezcla esterificante metanol:ácido sulfúrico (90:10, v:v) a las heces recogidas, y se disgregaron con una varilla de vidrio. Se esterificaron durante 24 hs en oscuridad y a temperatura ambiente. Luego se separaron las partículas sólidas por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min. y se extrajeron las porfirinas del sobrenadante, previo agregado de 0,1 ml de EDTA 10%, según la técnica de Batlle y Grinstein (1962).

La cantidad de porfirinas esterificadas en materia fecal se calculó, previa determinación espectrofotométrica de las absorbancias a 430, 380 nm y máxima, de acuerdo a la siguiente relación:

$$\mu\text{g porf./g. peso} = \frac{2 \times A_{\text{máx}} - A_{360} - A_{430}}{\text{g de materia fecal}} \times \text{vol.} \times 1,9 \times 2,721$$

donde:

Vol.= volumen total de extracto clorofórmico (ml).

1,9= relación entre el peso húmedo y peso seco de ratón, calculado por calentamiento a 150°C hasta peso constante.

2,721= factor de conversión.

III.4 Determinación de porfirinas en sangre

Las porfirinas libres en sangre se determinaron según los métodos de Rimington (1971) y Piomelli (1977) modificados.

Para aproximadamente 1 ml de sangre heparinizada, se agregaron dos fracciones de 2 ml de solución acetato de etilo: ácido acético (4:1, v:v) y se centrifugaron a 2000 rpm 10 min. para separar las partículas sólidas. Luego se reunieron ambas fracciones y se liberaron las porfirinas con 4 ml de ácido clorhídrico para ser cuantificadas espectrofotométricamente:

$$\mu\text{g/ml de sangre} = \frac{(2 A_{\text{máx}} - A_{430} - A_{380}) \times \text{Vol. HCl} \times 1,28}{\text{ml de sangre}}$$

donde:

1,28= factor de conversión.

III.5. Índice de porfirinas plasmáticas

Se centrifugó a 2000 rpm la sangre extraída por punción cardíaca y heparinizada. Luego se tomó una alícuota de 0,3 ml de la fracción plasmática y se llevó a 3 ml con buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 7,4, conteniendo NaCl 0,9%. Esta mezcla se coloca en cubetas de cuarzo para espectrofluorometría de 1 cm de paso de luz. En un espectrofluorómetro con un ancho de banda de excitación y de emisión de 10 nm, se barre el espectro de emisión entre 550 y 700 nm con una excitación fija en 400 nm y el espectro de excitación entre 350 y 450 nm, con la emisión fija en el máximo determinado previamente.

El IPP se calcula como el cociente entre la intensidad máxima (I_m) y la intensidad registrada sobre la línea de base a la altura del máximo de emisión (I_o) (Schoua & Batlle, 1987).

$$\text{IPP} = I_m / I_o$$

Los valores controles de IPP varían entre 1,00 y 1,30. Cifras superiores a éstas corresponden a situaciones patológicas y a concentraciones elevadas de porfirinas en plasma.

III.6 Determinación de porfirinas libres totales en orina empleando columnas de Bio-Rad

Se pipetea 0,5 ml de la muestra de orina sobre la resina de la columna y se deja escurrir. Luego se agrega un volumen de agua destilada igual al volumen de cama y se deja escurrir, descartando el eluido que contiene sustancias que interfieren en la determinación de porfirinas.

Luego se agregan 5 ml de HCl 3N y se recoge el eluido. Se repite la operación dos veces más y se leen las tres fracciones en un espectrofotómetro

La fórmula aplicada es la siguiente:

$$\mu\text{g porf/ml} = \frac{(2 \times A_{\text{máx}} - A_{380} - A_{430}) \times 1,185 \times \text{Vol. HCL}}{\text{Vol. de muestra}}$$

donde:

1,185 $\mu\text{g/ml}$ = factor de conversión.

Luego se suman los tres valores obtenidos.

IV. Determinaciones de actividad de algunas enzimas del camino del hemo.

IV.1 Determinación de ALA dehidrasa.

IV.1.1 Fuente enzimática.

Luego de sacrificar y perfundir los ratones, se extrajeron el tumor y el hígado, se lavaron con solución fisiológica y se secaron con papel de filtro. Se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento el mismo día del sacrificio.

Los tejidos se homogeneizaron en frío en una solución de sacarosa 0,25 M en una relación de 1:10 p/v para hígado y 1:5 para tumor con un potter Ultra-Turrax.

Los homogenatos resultantes se centrifugaron en una centrífuga Sorvall RC-5B a 12000 rpm y el sobrenadante así obtenido se utilizó como fuente enzimática (Batlle et al., 1978).

IV.1.2 Sistema de incubación.

El sistema de incubación standard contenía en un volumen final de 1 ml, buffer fosfato de sodio pH 6.8 50 mM, DTT 10 mM, ALA 5 mM y 0,1 ml de sobrenadante, según las condiciones óptimas obtenidas en nuestro laboratorio. Cuando se utilizó cinc, éste se agregó en la mezcla final de reacción en las concentraciones detalladas en Resultados y Discusión.

La incubación se llevó a cabo a 37 °C durante una hora en oscuridad, aerobiosis y con agitación constante, y se detuvo por el agregado de 0,1 ml de CuSO₄ (ss). Las proteínas separadas se separaron por centrifugación, y se midió el PBG formado en el sobrenadante mediante la reacción de Ehrlich, aplicando la siguiente expresión para su cálculo:

$$\text{nmoles PBG/mlhomogenato: } \frac{A_{555} \times \text{vol. inc.} \times 10^6 \times \text{dil}}{E \times \text{PM} \times \text{vol. enz.}}$$

donde:

E= 113,6 (absorción de una solución de PBG de concentración 1 mg/ml).

PM= 226, peso molecular del PBG.

Las unidades enzimáticas (UE) se definieron como nmoles de PBG formado por hora en las condiciones standard de incubación; y la actividad específica (AE) se definió como UE por mg de proteína.

IV.2 Determinación enzimática de PBG-asa

IV.2.1 Fuente enzimática

La actividad de esta enzima se determinó en la fracción soluble de los homogenatos preparados según IV.1.1.

IV.2.2 Sistema de incubación

El sistema de incubación standard (Navone, 1988) contenía en un volumen final de 1.5 ml: solución buffer Tris-Cl pH 8.2 0.05 M, cloruro de sodio 0.2 M, cloruro de magnesio 6mM, 0.5 ml de sobrenadante y PBG en condiciones saturantes (salvo otra indicación). En los casos en los que se agregó ácido fólico, éste fue disuelto en el momento en el buffer de incubación. Las concentraciones utilizadas se encuentran descriptas en Resultados y Discusión.

La incubación se llevó a cabo durante 2 hs (a menos que se indique lo contrario) y a 37°C, con agitación mecánica, en aerobiosis y en oscuridad. Los blancos se realizaron con PBG y sin enzima.

La reacción se detuvo por agregado de TCA (en una concentración final de 5%) para precipitar las proteínas. La mezcla se centrifugó en una centrífuga clínica Rolco CM-36 (2000 x g x 15 min.), se eliminó el precipitado y la fase acuosa se expuso 30 min. a luz blanca de tubo fluorescente (20 W) a una distancia de 40 cm a fin de oxidar los porfirinógenos.

La cantidad de porfirinas formadas se midió por los métodos espectrofotométrico y fluorométrico que se describen en III.1.

Para el cálculo de la cantidad de porfirinas formadas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles porf.form./ml} = \frac{\Delta \times \text{vol.inc.} \times \text{dil} \times 1,008}{\text{vol. enz}}$$

donde:

$\Delta = 2 \times A_{\text{max}} - A_{430} - A_{380}$, para espectrofotometría.

Δ = se obtiene para fluorometría en relación al patrón de URO.

A = Absorbancia expresada en nm.

1,008 = factor de conversión (nmoles porfirinas/ml).

Las unidades enzimáticas (UE) se definieron como nmoles de porfirinas formadas por hora en las condiciones standard de incubación. La actividad específica (AE) se definió como UE por mg de proteína.

V. Determinación de ALA y PBG en hígado.

Una parte del hígado se homogeneizó en buffer Tris/ HCl pH 7,4 50 mM (1:5, p/v), y el homogenato resultante se centrifugó a 14000 rpm en una centrífuga Sorvall RC-5B con rotor SS34.

El sobrenadante se desproteinizó con TCA 5% (concentración final) y se centrifugó en una centrífuga clínica Rolco CM-36 (2000 X g x 25 min.).

El contenido de PBG presente en el sobrenadante desproteinizado se determinó mediante el reactivo de Ehrlich, y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles PBG/g tejido} = \frac{A_{555} \times V_{\text{sob}} \times 10^6}{E \times \text{PM} \times \text{g. tejido}}$$

donde:

A_{555} = Absorbancia a 555 nm.

V_{sob} = Volumen total de sobrenadante.

E = 113,6 (absorción de una solución de PBG de concentración 1 mg/ml).

PM = 226, peso molecular del PBG.

La concentración de ALA se determinó mediante una modificación del método de Mauzerall & Granick (1956).

Al sobrenadante desproteinizado se lo llevó a pH con hidróxido de sodio 1 M. A 1 ml de esta muestra se le agregó igual volumen de buffer Acético/ Acetato pH 4,8 1 M y 0,05 ml de acetyl acetona. Se hizo un blanco sin acetyl acetona para sustraer el aporte del PBG presente.

La condensación se llevó a cabo durante 10 min. a 100 °C y se determinó la concentración del producto ALA-pirrol obtenido mediante el agregado del reactivo de Ehrlich y leyendo la absorbancia a 555 nm.

Para calcular la cantidad de ALA presente se aplicó la siguiente expresión:

$$\text{nmoles ALA/g tejido} = \frac{A_{555} \times 10^6 \times V_f \times V_{sob}}{E \times \text{g tejido} \times \text{Vol. enz.}}$$

donde:

E= coeficiente de extinción molar = $7,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

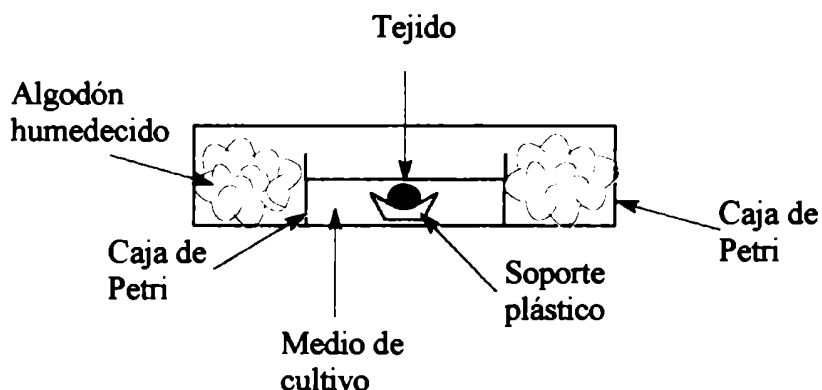
V_f= volumen final de la reacción.

Vol. enz.= volumen de enzima incubado.

V_{sob}= volumen total de sobrenadante luego de llevar a pH.

VI. Cultivo de explantes tisulares

Los explantes fueron mantenidos en cámaras de cultivo estériles diseñadas por Fell y Robison (1929) y adaptadas según el esquema ilustrado:



Se incubaron explantes de tumor, piel e hígado de 50 mg para las determinaciones de porfirinas y de malondialdehído y de 2 mg para los estudios de efectividad.

Los explantes se colocaron sobre una malla plástica y se incubaron en la oscuridad a 37°C. Se utilizó como medio de mantenimiento una solución salina balanceada estéril con la siguiente composición: NaCl (6,8 g/l), KCl (0,4 g/l), CaCl₂ · 2H₂O (0,264 g/l), NaH₂PO₄ · 2 H₂O (0,14 g/l), MgSO₄ · 7 H₂O (0,2 g/l), NaHCO₃ (1,68 g/l) y glucosa (1 g/l) según lo descrito por Vázquez y et al. (1987).

Durante la preparación de los explantes se trataron de mantener las mayores condiciones de asepsia posibles.

La concentración de ALA y el tiempo de incubación se detallan para cada determinación más adelante. Para los estudios de modulación, se agregaron distintas concentraciones de cinc, que se detallan en Resultados y Discusión.

VII. Preparación del ALA encapsulado

Los liposomas (vesículas multilaminares) se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Espínola et al. (1983), a partir de 75 mg de fosfatidilcolina disueltos en 5 ml de cloroformo. La solución se evaporó bajo N₂ y luego se adicionaron con agitación, 3 ml de ALA 50 mM en buffer fosfato pH 7,4. La mezcla se centrifugó 60 min. a 140.000 x g y el sedimento se resuspendió en el mismo buffer. El rendimiento (ALA encapsulado/ALA adicionado) fue del 12 al 20%.

VIII Marcadores de integridad celular

VIII.1 Lisis celular: Determinación de Láctico deshidrogenasa en el medio de incubación

El efecto de la irradiación sobre la integridad celular se evaluó midiendo la actividad de la enzima Láctico Deshidrogenasa (LDH) en el medio de incubación, y el contenido de potasio intracelular. La actividad de LDH se determinó espectrofotométricamente por el descenso de la absorbancia de NADH a 240 nm (kit de laboratorio Wiener).

VIII.2 Integridad de membranas: Determinación de potasio intracelular

Para medir la concentración de potasio intracelular, los explantes (50 mg) se sonicaron (12μ, 1 min.) en agua destilada y deionizada y se precipitaron las proteínas con perclórico 70%. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 5 min., y se

determinó en el sobrenadante el contenido de potasio mediante un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (Metrolab 4200).

IX. Antineoplásicos

IX.1 Dosis de antineoplásicos para los estudios de la TFD

IX.1.1 5-Fluorouracilo

A un grupo de animales portadores de tumor se le administró una única dosis de 5-Fu de 100 mg/kg peso (Peters et al., 1987), diluido en solución fisiológica estéril por vía i.p., y a otro grupo, una única dosis de 25 mg/kg peso por vía i.t. Los animales se sacrificaron a las 1,2,6 y 24 h post inyección y a las 1 y 2 horas luego de la inyección intratumoral. Dichos tiempos se eligieron teniendo en cuenta que la vida media plasmática del 5-Fu es de 10 min. Se realizaron controles de ratones inyectados con solución fisiológica.

IX.1.2 Ciclofosfamida

A un grupo de animales portadores de tumor se les administró por vía i.p. 2 dosis de CY diluída en solución fisiológica estéril de: 35 mg/kg peso (Hengst et al., 1980), con un intervalo de 24 hs entre dosis. Los sacrificios se realizaron luego de 16, 21, 40 y 46 horas después de la última inyección (Hengst et al., 1980). Para la vía i.t. se usaron también 2 dosis pero de 9 mg/kg de peso, y los animales se sacrificaron a las 16 hs después de la última inyección. Los controles se inyectaron con solución fisiológica.

Para los estudios de la CY en el metabolismo del hemo, cit P₄₅₀ y glutatión se emplearon 2 dosis de CY de 150 mg/kg de peso por vía i.p.

IX.I.3 Doxorubicina

A un grupo de animales portadores de tumor se les administró por vía i.p. una única dosis de DOX de 30 mg/kg peso (dosis alta). Otro grupo fue inyectado con una dosis baja de la droga: 5 mg/kg. Los sacrificios se realizaron luego de 16 y 40 horas después de la inyección. Los controles se inyectaron con solución fisiológica.

X. Determinación de citocromo P₄₅₀

Para la medición de Cit P₄₅₀ se utilizó la fracción microsomal de los homogenatos de hígado y tumor según el método de Omura & Sato (1964).

Los homogenatos se prepararon en buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,4. (1:5 p/v).

La fracción microsomal se resuspendió con una solución buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,4 conteniendo glicina 20% y EDTA 1,5 M hasta una concentración de proteínas de 1 mg/ml.

Se colocó la muestra en una cubeta previo agregado de ditionito y se leyó la absorbancia a 450 y 490 nm. Estos valores se tomaron como blanco.

Luego se burbujeó monóxido de carbono durante 30 segundos y se volvió a leer la absorbancia a 450 y 490 nm.

Para el cálculo del contenido de cit P₄₅₀ se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles Cit P}_{450}/\text{mg proteína} = \frac{(A_m - A_b) \times \text{dil} \times 10^3}{E}$$

donde:

$A_m = (A_{450} - A_{490})$ de la muestra.

$A_b = (A_{450} - A_{490})$ del blanco.

E= Incremento de la extinción molar entre 450 y 490 nm= 91 cm⁻¹ cm⁻¹.

XI. Metabolismo de glutatión.

XI.1 Determinación de glutatión reducido y oxidado.

La concentración de GSH y de GSSG se midió en hígado y en tumor, por el método fluorométrico de Hissin & Hilf (1976).

Los tejidos se homogeneizaron en una mezcla (4:15, v:v) de ácido fosfórico 25%: buffer fosfato de sodio 100 mM pH8 conteniendo EDTA 5 mM (BPE). Las proteínas se eliminaron por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min. en una centrífuga Sorvall refrigerada. Se tomó una alícuota del sobrenadante obtenido y se realizaron diferentes tratamientos para determinar el GSH y el GSSG.

***GSH**

Una alícuota del sobrenadante se diluyó 10 veces en BPE. Se tomaron 0,1 ml de esta dilución y se tamponaron por el agregado de 1,8 ml de BPE, y a esto se le agregaron 0,1 ml de ortoftaldehído en una concentración de 1 mg/ml de metanol (OPT).

***GSSG**

Una alícuota del sobrenadante se diluyó 10 veces con una solución de N-etilmaleimida 40 mM en NaOH 0,1 N. Luego de 30 min. a temperatura ambiente, se tomaron 0,1 ml de dicha solución y se agregaron 1,8 ml de NaOH 0,1 N y 0,1 ml de OPT.

Después de un período de reacción de 15 a 20 min. a temperatura ambiente, se midió la fluorescencia a 420 nm resultante de la excitación a 350 nm.

XI.2 Determinación de actividad de la glutatión reductasa.

La actividad de la GR se midió siguiendo el método de Pinto & Bartley adaptado (1969).

Los tejidos se homogeneizaron en una solución de KCL 0,154 M y luego se centrifugaron durante 10 min. a 9000 rpm en una centrífuga Sorvall RC-5B a 4°C.

Se midió la disminución de la absorbancia a 340 nm a 30 °C en una cubeta que contenía 0,25 ml de buffer fosfato de potasio 0,25 M pH 7,4; 0,05 ml de EDTA 25 mM; 0,05 ml de NADPH 7,5 mM; 0,125 ml de GSSG 25 mM y 0,1 ml de sobrenadante.

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de un nmol de GSSG por minuto a 30 °C a pH 7,4 por ml de homogenato:

$$UE: \frac{\text{Pendiente} \times V_f \times 10^6}{E \times \text{Vol. enz.}}$$

donde:

$E = 6,22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ = coeficiente de absorción molar del NADPH a 340 nm.

Pendiente = Absorbancia 340 nm/min.

V_f = volumen de incubación.

Vol. enz. = volumen de enzima.

La actividad específica se define como UE por mg de proteína.

XI.3 Determinación de actividad de glutathion S-transferasa

La actividad de G-ST se midió utilizando una adaptación del método descripto por Habig et al. (1974).

Se homogeneizaron los tejidos en buffer Tris HCl 2 mM pH 8,1 conteniendo manitol 20 mM y sacarosa 70 mM (1:20, p/v). Los homogenatos se centrifugaron durante 15 min. a 9500 rpm en una centrífuga Sorvall RC-5B. El sobrenadante se diluyó en agua 50 veces para el tumor y 250 veces para el hígado y se utilizó como fuente enzimática.

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 2 ml: GSH 1 mM; buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno 1 mM y solución enzimática. Se incubó 3 min. a 25 °C y se leyó la absorbancia a 340 nm.

Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un mmol de producto por minuto por ml de homogenato.

$$UE = \frac{A_{340} \times V_f \times 10^3}{E \times \text{Vol. enz.} \times 3 \text{ min.}}$$

donde:

E= coeficiente de extinción molar = $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Vf= volumen de incubación.

Vol. enz.= volumen de enzima.

La actividad específica se definió como UE por mg de proteína.

XII. Determinación de malondialdehído

La cantidad de malondialdehído (MDA) se determinó según el método de Niehaus & Samuelson (1968). Los tejidos se homogeneizaron en solución fisiológica y a 1 ml de homogenato se le agregaron 2 ml de una mezcla de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375% p/v, HCl 0,25 N y ácido tricloracético (TCA) 15% p/v. La mezcla de reacción se calentó durante 15 min. a 100°C. Luego se enfrió en hielo, se centrifugó a 2000 x g durante 20 min. y se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 nm.

La concentración de MDA en explantes se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles MDA/g de tejido} = \frac{(A_{535} - A_{bco}) \times 10^6 \times V_f \times V_h}{E \times \text{g tejido}}$$

donde:

A₅₃₅= absorbancia de la muestra a 535 nm

A_{bco}= absorbancia del blanco de reactivos a 535 nm

Vf= volumen final de incubación (3 ml)

Vh= volumen de homogeneización (2,5 ml)

E= $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Los niveles basales de MDA en los tejidos se expresaron en nmoles de MDA por mg de proteína.

XIII. Determinación de la concentración proteica:

Para las determinaciones de proteínas se utilizó el método de Lowry et al. (1951).

XIV. Tratamiento estadístico de los datos.

Se determinó la significancia estadística de los datos mediante el test paramétrico para muestras independientes t de Student. Todos los datos corresponden al promedio de por lo menos 3 experiencias independientes, con sus correspondientes desviaciones standard. Las determinaciones se realizaron siempre por duplicado.

XV. Referencias

- Battle, A. & Grinstein, M. Porphyrin biosynthesis. Studies on the nature of a biosynthetic porphyrin and its identification with the so-called "208" porphyrin. *Biochim. Biophys. Acta*, 57: 191-194 (1962).
- Battle, A.; Wider, E. & Stella, A. A simple method for measuring erythrocyte porphobilinogenase and its use in the diagnosis of acute intermittent porphyria. *Int. J. Biochem.*, 104: 434 (1978).
- Espínola, L.; Wider, E.; Stella, A. & Battle, A. Enzyme replacement therapy in Porphyrias. II. Entrapment of aminolevulinatase in liposomes. *Int. J. Biochem.*, 15: 439-446 (1983).
- Fell, H. & Robison. The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated *in vitro*. *R. Biochem. J.*, 26: 767 (1929).
- Fukuda, H.; Paredes, S. & Battle, A. Tumor-localizing properties of porphyrins. *In vitro* studies using the porphyrin precursor aminolevulinic acid in free and liposome encapsulated forms. *Drug Des. Deliv.*, 5: 133-139 (1989).
- Habig, W.; Pabst, M. & Jakoby, W. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139 (1974).
- Hengst, J.; Mokyr, M. & Dray, S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor bearing mice. *Cancer Res.*, 40: 2135-2141 (1980).
- Hissin, P. & Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.*, 74: 214-226 (1976).
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, L. & Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951).
- Mauzerall, M. & Granick, S. The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.*, 219: 435-437 (1956).
- Navone, N. Porfirinas y neoplasias. Tesis doctoral, UBA, Facultad de Medicina (1988).
- Niehaus, W. & Samuelson, B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur. J. Biochem.*, 6: 126-130 (1968).
- Omura, T. Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239: 2370-2378 (1964).
- Peters, G.; Nadal, J. & Pinedo, H. Diurnal variation in the therapeutic efficacy of 5-Fluorouracil against murine colon cancer. *In vivo*, 1: 113-118 (1987).
- Pinto, R. & Bartley, W. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem. J.*, 112: 109-115 (1969).
- Piomelli, S. Free erythrocyte porphyrins in the detection of undue absorption of Pb and of Fe deficiency. *Clin. Chem.*, 23: 264-269 (1977).

Polo, C.; Frisardi, L; Resnik, E.Schoua, E. & Batlle, A. Factors influencing fluorescence spectra of free porphyrins. Clin. Chem., 34: 757-760 (1988).

Rimington, C. Quantitative determination of porphobilinogen and porphyrins in urine and porphyrin faeces and erythrocytes. Broadsheet (revd Broadsheet 36). Association of Clinical Pathologists, 70: 1-17 (1971).

Schoua, A. & Batlle, A. Índice de porfirinas plasmáticas: IPP. Un método rápido para la caracterización de las porfirias. Rev. Arg. Derm.; 68: 79-85 (1987).

Vázquez, E.; Afonso, S.; Buzaleh, A.; Navone, N.; Polo, C.; Schoua, E. & Batlle, A. The effect of griseofulvin on the heme pathway. Studies on tissue explant cultures. Toxicology, 46: 73- 82 (1987).

With, T. Clinical use of porphyrin ester chromatography in urine and feces. Dan. Med. Bull., 22:74 (1975).

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

SINTESIS DE PORFIRINAS A PARTIR DE ALA EN EXPLANTES TUMORALES Y DE OTROS TEJIDOS

I.1 Cuantificación de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA en explantes de tumor y otros tejidos.....	157
I.2 Síntesis de porfirinas a partir de ALA libre y encapsulado.....	161
I.3 Identificación de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA.....	163
I.4 Conclusiones.....	166

I. SINTESIS DE PORFIRINAS A PARTIR DE ALA EN EXPLANTES TUMORALES Y DE OTROS TEJIDOS

Con el objeto de estudiar la funcionalidad del camino biosintético del hemo a partir de ALA en el tumor en comparación con otros tejidos, se utilizó la técnica de cultivo de explantes tisulares, desarrollada en nuestro laboratorio (Vázquez et al., 1987).

Para ello se incubaron explantes de 50 mg de tejido, con distintas concentraciones de ALA, durante distintos tiempos, a 37°C y se midió la cantidad y el tipo de porfirinas sintetizadas en esas condiciones.

Además de utilizar el ALA en su forma libre, se empleó también ALA encapsulado en liposomas, a fin de investigar si esta forma de administrar el precursor aumentaba la captación del mismo por el tejido tumoral.

I.1 Cuantificación de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA en explantes de tumor y otros tejidos.

Se incubaron explantes de tumor, hígado, piel y cerebro de ratones portadores del adenocarcinoma M2, durante 6, 12 y 22 horas, en presencia de ALA 0,06; 0,1 y 0,2 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura I.1 (a,b y c). Se encontró que el contenido de porfirinas en todos los casos, tanto en los tejidos como en los medios, se incrementó con el tiempo y con la concentración del precursor. En incubaciones más prolongadas y con concentraciones de ALA más elevadas, la cantidad de porfirinas en los medios fue comparativamente mayor que en los tejidos.

En el tumor se llegaron a acumular 7 µg de porfirinas por g de tejido, luego de 22 hs de incubación con ALA 0,2 mM (Figura I.1c).

Esta cantidad de porfirinas acumulada es igual o mayor que la encontrada en tumor por otros autores luego de la administración *in vivo* de HpD u otras porfirinas (Dougherty et al., 1979; Jori et al., 1986)

Sin embargo, bajo estas condiciones, se liberaron al medio 40 µg porfirinas/g tej., lo que representa el 85% del total de porfirinas sintetizadas. Este aumento en la liberación de porfirinas con el tiempo, puede atribuirse a un aumento de la lisis celular con el tiempo de incubación o a una mayor permeabilidad de la membrana, ya sea por aumento del transporte pasivo como consecuencia de la diferencia en la concentración de porfirinas entre el tejido y el medio, o a un incremento en el transporte activo. Avalando esta última hipótesis, se encontró que la presencia de porfirinas puede producir daños en la membrana plasmática y formación de canales iónicos (Moan, 1986, Moan et al., 1987).

Cuando se determinó la actividad de LDH en el medio, como un indicador de lisis celular, no se detectó actividad en ninguno de los tejidos. Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de Vázquez et al. (1987); según estos autores, la presencia de ALA en el medio de incubación protege a las células de la lisis, de manera que, en nuestro caso, la presencia de porfirinas en el medio, se debería a alguna de las otras dos alternativas.

Fukuda et al. (1993) han observado que en cultivos de células epiteliales, la liberación de porfirinas sintetizadas a partir de ALA al medio, aumenta en presencia de suero en el medio de incubación. Esto sugiere que en el proceso, estaría involucrado algún mecanismo de transporte.

Con respecto a este punto, Snyder et al. (1987) han descrito un receptor para porfirinas en la membrana mitocondrial externa, sugiriendo que dicho receptor estaría asociado a canales iónicos involucrados en el transporte de varios metabolitos, entre los cuales se encontrarían también las porfirinas.

Si calculamos la velocidad de síntesis, esto es, la cantidad de porfirinas formadas por hora, encontramos que la misma es prácticamente constante para todas las concentraciones de ALA e intervalos de tiempo estudiados, en tumor, piel y cerebro, en tanto que en hígado se produce un leve descenso a tiempos largos.

Estos resultados confirman, además, la viabilidad de las células cuando se usa el sistema de cultivo de explantes tisulares.

Se observó también que los explantes de tumor fueron muy activos en la síntesis de porfirinas, formando una cantidad de pigmentos similar, y casi siempre mayor, a la de los explantes de hígado, y hasta unas 20 veces más que en piel y cerebro para todas las concentraciones de ALA.

Cuando se calculó la relación de concentración de porfirinas tumor/tejido normal, se encontró que las mejores condiciones se obtenían en todos los casos, con tiempos de incubación largos y con la mayor concentración de ALA

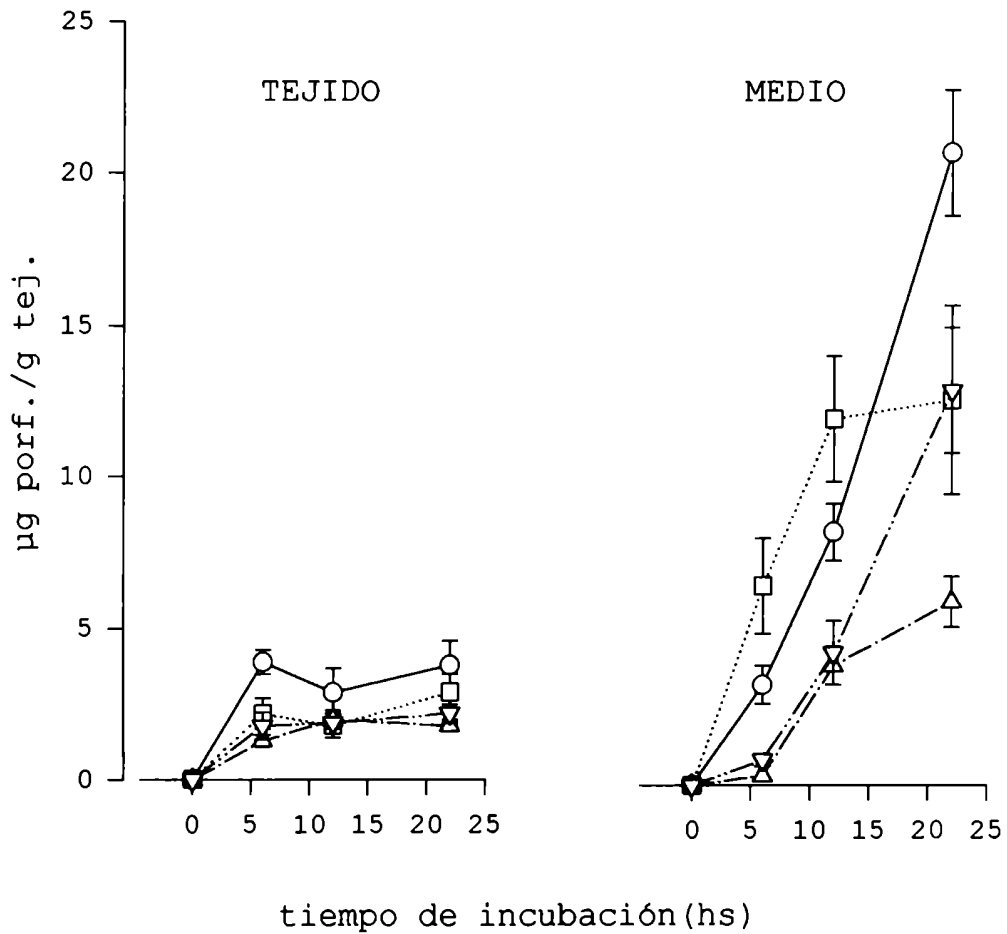


FIGURA I.1a: Síntesis y contenido de porfirinas en explantes tisulares y medios de incubación

Se incubaron explantes de tumor (O), hígado (□), piel (▽) y cerebro (Δ) de ratones portadores de tumor, a distintos tiempos en presencia de ALA 0,06 mM y se determinaron las concentraciones de porfirinas en explantes y medios de incubación. Ver detalles en Materiales y Métodos.

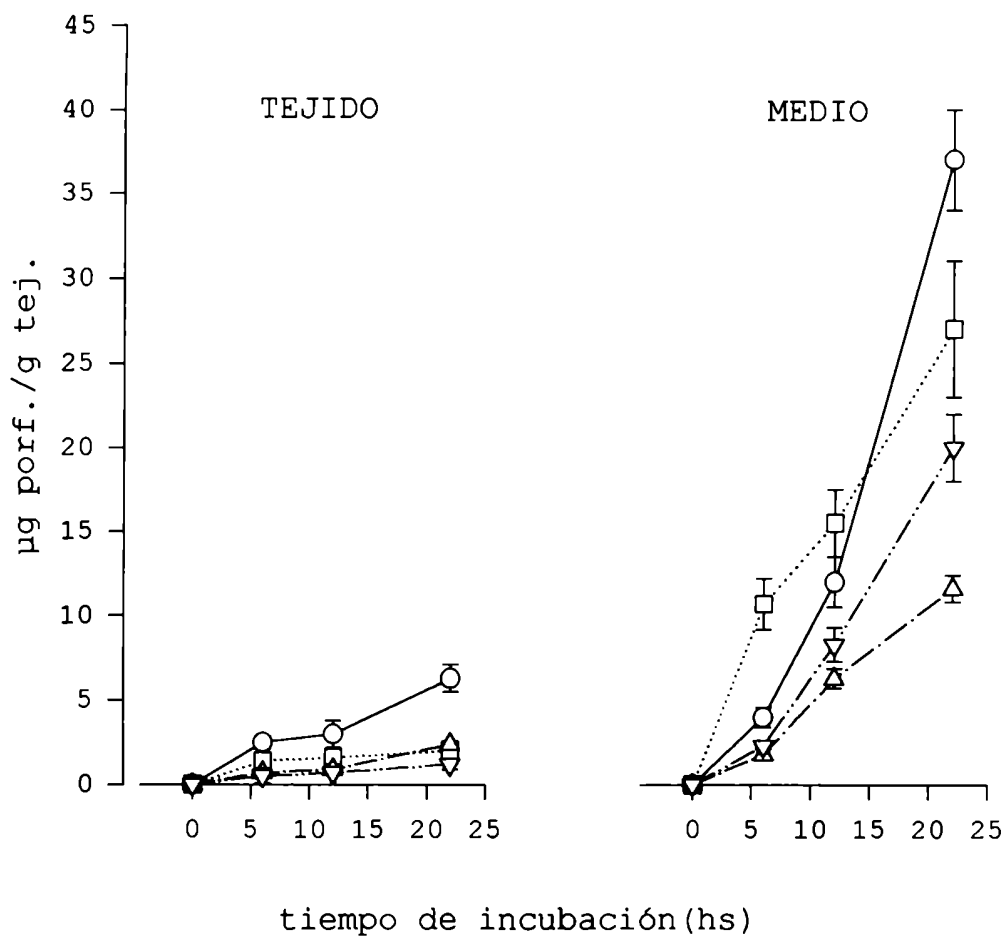


FIGURA I.1b: Síntesis y contenido de porfirinas en explantes tisulares y medios de incubación

Se incubaron explantes de tumor (O), hígado (□), piel (∇) y cerebro (Δ) de ratones portadores de tumor, a distintos tiempos en presencia de ALA 0,1 mM y se determinaron las concentraciones de porfirinas en explantes y medios de incubación. Ver detalles en Materiales y Métodos.

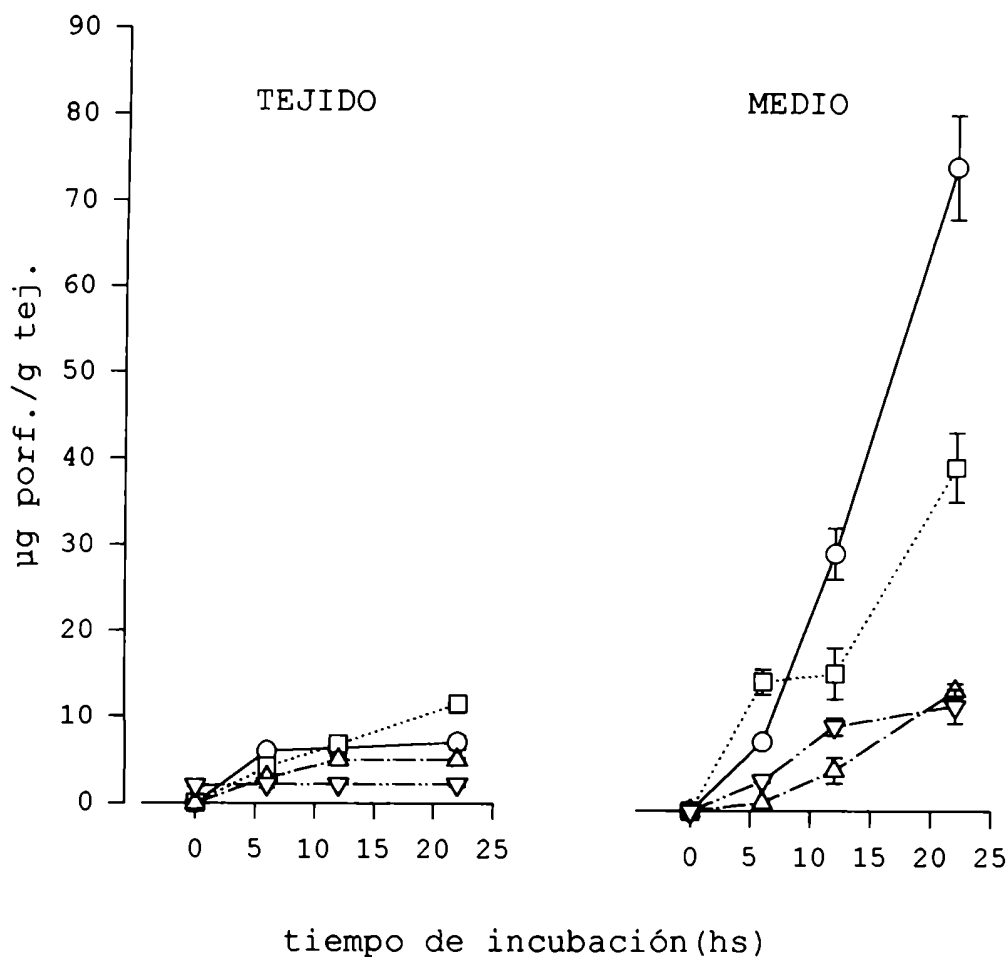


FIGURA I.1c: Síntesis y contenido de porfirinas en explantes tisulares y medios de incubación

Se incubaron explantes de tumor (○), hígado (□), piel (▽) y cerebro (Δ) de ratones portadores de tumor, a distintos tiempos en presencia de ALA 0,2 mM y se determinaron las concentraciones de porfirinas en explantes y medios de incubación. Ver detalles en Materiales y Métodos.

I.2 Síntesis de porfirinas a partir de ALA libre y encapsulado.

Con el objeto de aumentar la síntesis de porfirinas partir de ALA, se realizaron experiencias similares a las anteriores, pero vehiculizando el precursor ALA en liposomas. En la Figura I.2 se ilustran los resultados obtenidos luego de una incubación durante 22 horas con ambas formas del precursor, esto es, libre y encapsulado, en concentraciones de 0,1 y 0,4 mM, empleando diferentes tejidos tanto de animales normales como portadores de tumor.

Nuevamente observamos una buena biosíntesis de porfirinas en el tumor, la que, como ya se viera en el ítem anterior, es aproximadamente del mismo orden que la del hígado y riñón, y mucho mayor que la de piel y cerebro. Por otra parte, la actividad en todos los órganos de animales portadores de tumor, fue similar a la de los ratones normales.

Con una concentración de ALA 0,1 mM en el medio de incubación, la biosíntesis de porfirinas de vio disminuida en todos los tejidos, cuando se utilizó el precursor en su forma liposomal.

Cuando la concentración de ALA empleada fue de 0,4 mM, se observó el efecto contrario, encontrándose que en el tumor la acumulación de porfirinas aumentaba un 25% si se empleaba ALA encapsulado, respecto a cuando se lo utilizaba en su forma libre. En piel y cerebro, donde la toxicidad cutánea de las porfirinas y neurológica del ALA son fisiológicamente relevantes, el aumento de la síntesis de tetrapirroles al utilizar el ALA en liposomas, fue sólo del 10 y 15% respectivamente, por lo cual el índice terapéutico estaría aumentando con la administración de ALA encapsulado.

Hay que tener en cuenta que, además del aumento de la incorporación de las drogas contenidas en los liposomas, una de las ventajas de trabajar con estos vehículos, es la prolongación del tiempo de circulación de la droga en el organismo, aspecto que no es posible estudiar en este sistema *in vitro*. Así, Fukuda et al. (1992) encontraron que luego de administrar ALA liposomal a ratones portadores de tumor, la concentración de porfirinas alcanzada en este tejido, era mucho mayor que cuando se usaba el precursor en forma libre, y especialmente si la vía de administración era la i.t.

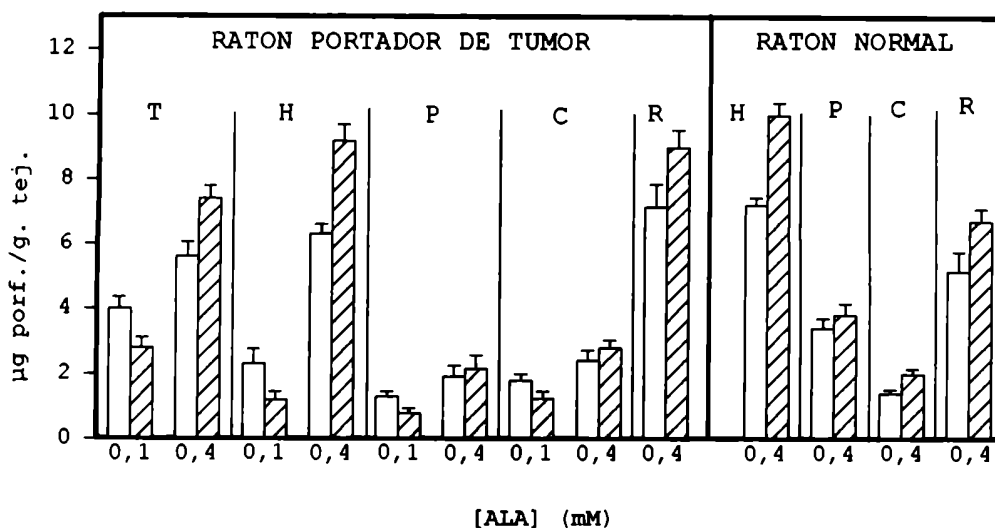


FIGURA I.2: Síntesis de porfirinas en explantes tisulares incubados con ALA libre y encapsulado.

Se incubaron durante 22 hs explantes de tumor (T), hígado (H), piel (P), cerebro (C) y riñón (R) de ratones portadores de tumor y ratones normales con ALA 0,1 mM, 0,4 mM, en forma libre (□) y encapsulada (▨). El resto de las condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos. Se grafican los promedios de 3 experiencias con 4 explantes por punto. Barras = desviaciones standard

I.3 Identificación de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA

En todas las experiencias se realizaron además, los análisis cromatográficos de las porfirinas endógenamente sintetizadas a partir de ALA, presentes tanto en los tejidos como en los medios. En todos los casos, se obtuvieron resultados similares y reproducibles. En la Tabla I.1 se muestran datos típicos obtenidos luego de 22 horas de incubación con ALA 0,2 mM.

La mayor parte de las porfirinas halladas tanto en el tejido tumoral como en el hígado corresponde a URO y COPRO; en cambio, en el medio se encuentra el espectro completo de las mismas, con predominancia de URO. La Isocoproporfirina sólo se detectó en los tumores.

El análisis cromatográfico de las porfirinas sintetizadas en explantes de tumor y en los respectivos medios de incubación, mostró la presencia de todos los intermediarios del camino

biosintético del hemo, confirmando la integridad de esta vía metabólica en dicho tejido.

Por otra parte, la mayor proporción de URO en el tumor, sugiere que la actividad enzimática de la PBG-asa podría estar aumentada en este tejido, coincidentemente con lo encontrado por Bugleski et al (1981) en tumores murinos y Navone et al. (1991) en adenocarcinoma mamario.

Bonkovsky et al. (1985) hallaron que cuando se incubaban homogenatos de hígado con ALA, la enzima PBG-asa era la enzima limitante, lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados.

A pesar de que en la mayoría de los trabajos se propone a la PROTO IX como la principal porfirina acumulada a partir de ALA, otros autores avalan el uso de otros tetrapirroles como fotosensibilizantes. Así, según El Far & Pimstone (1986), la URO I es la porfirina que más selectivamente se localiza en el tumor luego de la administración de distintas porfirinas por vía i.p. a ratas. Estos mismos autores encontraron que la relación de porfirinas acumuladas en tumor/piel fue muy superior a la alcanzada con el tratamiento con HpD.

Los espectros de emisión de fluorescencia y de excitación de la PROTO IX en la piel se distinguen claramente de aquéllos que corresponden a URO y COPRO. Sin embargo, ninguna de estas dos porfirinas se pueden detectar en la piel luego de la administración i.p., tópica o intradérmica de ALA (Pottier et al., 1986). La URO es hidrosoluble, tiene una vida media relativamente corta y se excreta principalmente por los riñones, mientras que la COPRO, menos soluble en agua, tiene una vida media más larga y se elimina principalmente por heces.

Estas características hacen que dichas porfirinas no tengan demasiada afinidad por las membranas lipídicas (Kennedy et al., 1990), y por lo tanto no se acumulen más que en el riñón o en el hígado durante el proceso de excreción, o en áreas necróticas del tumor, donde se concentrarían transitoriamente debido a una circulación más lenta. Por el contrario, la PROTO IX es poco soluble en agua al pH fisiológico, y muestra gran afinidad por las membranas lipídicas (Kennedy & Pottier, 1992).

Así, en nuestros trabajos *in vivo* vimos que la administración de ALA ya sea por vía i.p. o i.t., conduce a una acumulación de COPRO y PROTO en el tumor, con escasa contribución de URO (4%) (Fukuda et al., 1992), a diferencia de lo que ocurre *in vitro*, donde la ausencia de un sistema vascular que elimine las

porfirinas hidrofílicas estaría facilitando la permanencia de URO y COPRO en los explantes tumorales.

Malik et al. (1989) en cultivos de células leucémicas, usando técnicas de detección cromatográficas y de citometría de flujo, encontraron que se formaba exclusivamente PROTO IX. He et al. (1993) y Schoenfeld et al. (1994) hallaron que más del 90% de las porfirinas acumuladas en varias líneas celulares era también PROTO IX.

Sin embargo, un cultivo bidimensional es marcadamente distinto de un explante tridimensional, donde existen diferencias metabólicas, producto de la interacción célula-célula. Así, se vio que los cultivos de esferoides multicelulares mostraban menor acumulación de PROTO IX, comparados con las células crecidas en monocapa (Steinbach et al., 1995).

En cuanto a la eficiencia de la fotosensibilización, se sabe que el grado de agregación de las porfirinas es un factor limitante en la producción de 1O_2 . Las porfirinas monoméricas tienen mayor rendimiento cuántico que las agregadas (Moan, 1984).

Así, los tetrapirroles hidrofóbicos como URO I muestran poca agregación en agua y, por lo tanto, un alto rendimiento cuántico (Valenzeno, 1987).

Menon et al. (1990) también encontraron que URO I y III y COPRO I y III pueden actuar como potentes fotosensibilizantes.

En nuestro trabajo observamos que, en órganos tales como piel y cerebro, se detectaron todos los intermediarios, demostrando que en este sistema de cultivo de explantes, la vía del hemo se conserva en forma funcional en todos los tejidos. Además, URO, la porfirina más hidrosoluble, es la que se libera en mayor proporción al medio en todos los tejidos estudiados.

Tabla I.1: Patrón cromatográfico de las porfirinas presentes en los explantes de tumor, hígado, piel y cerebro y en los respectivos medios de incubación

	Tumor		Hígado		Piel		Cerebro	
	T	M	T	M	T*	M	T	M
Proto	4	18	-	12		15	6	16
Isocopro	4	-	-	-		-	-	-
Copro	42	5	40	1		4	25	3
Penta	-	5	-	-		-	-	-
Hexa	-	3	-	-		-	3	3
Hepta	8	18	-	8		4	11	13
Uro	42	51	60	79		77	55	65

Porcentajes de porfirinas acumuladas en los tejidos (T) y medios (M) incubados 22 hs con una concentración de ALA 0,2 mM. Ver detalles en Materiales y Métodos.

* La cantidad total de porfirinas obtenidas no fue suficiente para su análisis cromatográfico.

I.4 Conclusiones

* La biosíntesis de porfirinas en los explantes aumenta en todos los tejidos con la concentración de ALA y el tiempo de incubación. Particularmente, el tumor fue muy activo en la formación de tetrapirroles, alcanzando una concentración hasta 20 veces mayor que la hallada en piel y cerebro. Las mejores condiciones se lograron en incubaciones de 22 hs y con ALA 0,2 mM, alcanzándose en los explantes tumorales, una concentración de 7 µg porf./g tejido, y una liberación al medio del 85% del total de las porfirinas sintetizadas.

* El empleo de ALA 0,4 mM en forma liposomal en el medio de incubación, aumentó notablemente la relación de la concentración de porfirinas en el tumor respecto a cerebro e hígado, lo que indicaría que este tipo de vehículo podría ser una buena alternativa para mejorar el índice terapéutico de la TFD a partir de ALA.

- * El camino biosintético del hemo en cultivos de explantes tisulares es totalmente funcional en todos los tejidos, y en particular en el tumor, en el cual se acumulan principalmente URO y COPROporfirinas.

- * La cantidad y tipo de porfirinas liberadas al medio depende de cada tejido; URO que es la más hidrosoluble, es la que lo hace en mayor proporción.

- * La técnica de cultivo de explantes tisulares puede ser utilizada para tumores, sin compromiso en la viabilidad ni en la funcionalidad del camino biosintético del hemo hasta las 22 hs de incubación de este tejido.

- * La perfecta correlación entre la concentración de ALA utilizada y la síntesis de porfirinas, hace que esta técnica sea adecuada para la continuación con los estudios sobre la acción fotodinámica de la luz de 630 nm sobre los tetrapirroles acumulados en el tumor, con el objetivo de lograr la destrucción del tejido maligno.

CAPITULO II

CARACTERIZACION DEL ALA-D Y LA PBG-ASA Y SU POSIBLE MODULACION EN TUMOR E HIGADO DE RATONES PORTADORES DE NEOPLASIAS

II.1 ALA dehidrasa.....	168
II.1.1 Caracterización del ALA-D en el adenocarcinoma M2 y en en hígado de ratones portadores de tumor.....	168
II.1.11 Cantidad de proteína.....	168
II.1.12 Tiempo de incubación.....	169
II.1.13 Cinética de la reacción.....	170
II.1.2 Modulación de la actividad del ALA-D.....	173
II.1.21 Efecto de reactivos sulfhidrúlicos.....	173
II.1.22 Efecto del cinc.....	174
II.1.3 Modulación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tisulares.....	177
II.2 Porfobilinogenasa.....	181
II.2.1 Caracterización de la enzima porfobilinogenasa en el adenocarcinoma M2 y en hígado de ratones portadores de tumor.....	181
II.2.11 Tiempo de incubación.....	181
II.2.12 Cinética de la reacción.....	182
II.2.13 Efecto del ácido fólico sobre la PBG-asa.....	186
II.3 Conclusiones.....	187

II. CARACTERIZACION Y POSIBLE MODULACION DEL ALA-D Y PBG-ASA EN TUMOR E HIGADO DE RATONES PORTADORES DE NEOPLASIAS

En el presente capítulo se pusieron a punto las condiciones experimentales para llevar a cabo las determinaciones enzimáticas de las 2 primeras enzimas que catalizan la conversión de ALA a porfirinas: el ALA-D y la PBG-asa.

Se investigó la respuesta de las enzimas frente a modificaciones en el tiempo de incubación, concentración de sustrato, cantidad de proteína y concentración de distintos agentes moduladores de su actividad. Cuando se estudió el efecto de la variación de uno de los parámetros, los otros dos se mantuvieron constantes en los niveles descriptos para las condiciones standard de incubación detalladas en Materiales y Métodos.

Como fuente enzimática se emplearon tumor e hígado -este último sabemos que es uno de los dos órganos en los cuales ocurre la mayor biosíntesis de hemo- de ratones portadores de tumor, y como moduladores del ALA-D y de la PBG-asa se emplearon cinc y DTT; y ácido fólico respectivamente.

II.1 ALA dehidrasa

II.1.1 Caracterización del ALA-D en el adenocarcinoma M2 y en hígado de ratones portadores de tumor.

II.1.1.1 Cantidad de proteína

Se encontró que la actividad de la enzima en función de la concentración de proteína fue lineal hasta los 2 mg para la enzima hepática, mientras que para el tumor, la linealidad se extendió hasta los 4 mg (Figura II.1). De acuerdo con estos resultados, para todos los ensayos posteriores se empleó la cantidad de 0,5 mg de proteína.

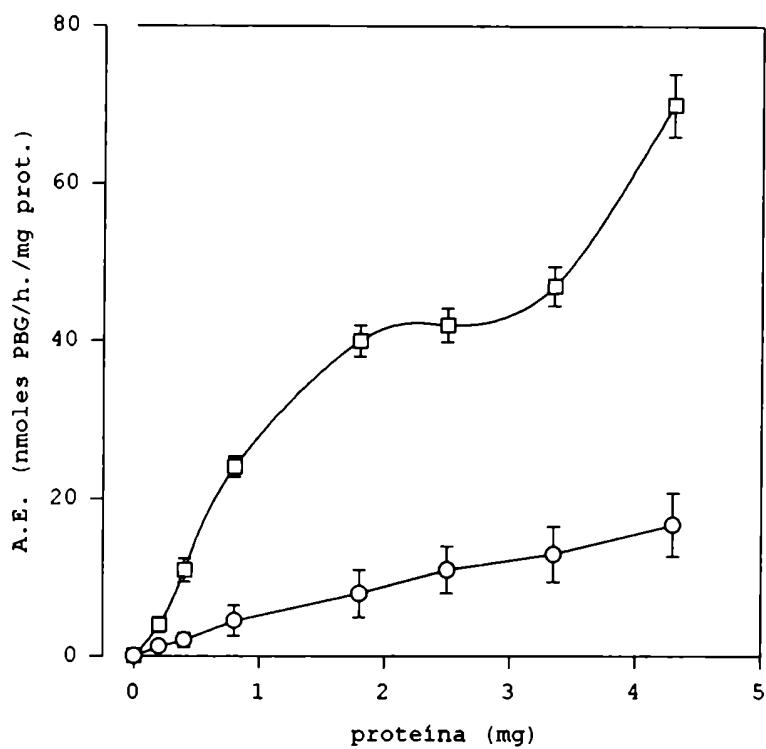


FIGURA II.2: Efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad específica (A. E.) del ALA-D de tumor (○) e hígado (□)

II.1.12 Tiempo de incubación

En ambos tejidos la cantidad de PBG formado fue lineal hasta los 150 minutos (Figura II.2); en consecuencia se empleó un tiempo de incubación de 60 min. para las siguientes determinaciones.

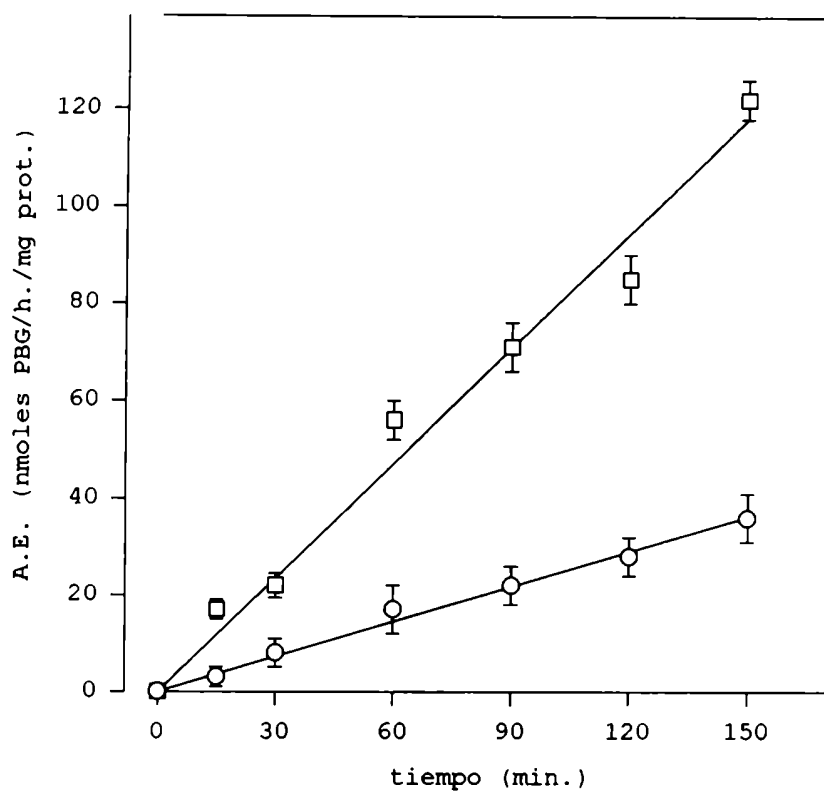


FIGURA II.3: Actividad del ALA-D de tumor (O) e hígado (□) en función del tiempo de incubación

II.1.13 Cinética de la reacción

Las curvas de saturación de sustrato (Figura II.3) muestran que la enzima en ambos tejidos exhibe un comportamiento típicamente michaeliano, alcanzando el nivel de saturación para valores de ALA de 2,5 mM en el hígado, y de 1 mM en el tumor. De acuerdo con estos resultados, se decidió trabajar con una concentración de ALA de 5 mM para la enzima de ambas fuentes.

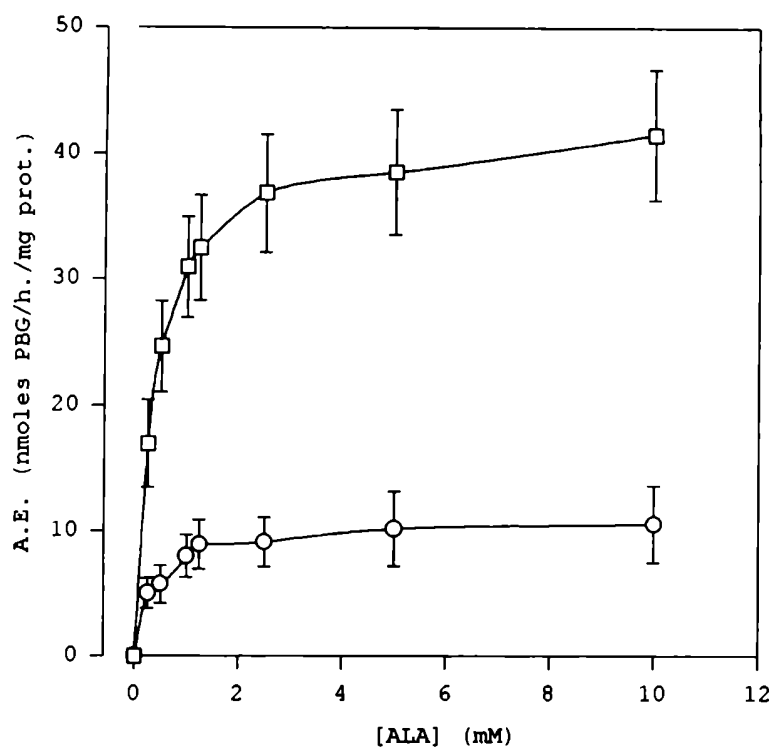


FIGURA II.3: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad del ALA-D en tumor (○) e hígado (□).

Cuando se calcularon las constantes cinéticas de la enzima utilizando la transformación de Lineweaver-Burk (Figura II.4) se obtuvieron valores de K_m similares para la enzima de ambas fuentes - (0,296 mM para tumor, 0,372 mM para hígado- (Tabla II.1), que son del mismo orden que los encontrados por otros autores en hígado de ratón (Doyle, 1971; Navone, 1990b) y en adenocarcinoma M3 (Navone, 1990b).

El índice de Hill fue cercano a 1 para ambos tejidos, indicando la existencia de un sólo sitio de unión de la enzima al sustrato. La velocidad máxima fue 4 veces mayor para la enzima proveniente del hígado, comparada con tumor.

TABLA II.1: Parámetros cinéticos del ALA-D.

TEJIDO	V max (nmoles PBG/h)	Km (mM)	n
Tumor	10	0,296	0,985
Hígado	40	0,372	0,990

Velocidad máxima (Vm), constante de Michaelis (Km) e índice de Hill (n) calculados a partir de la AE (nmoles de PBG/h/mg prot.).

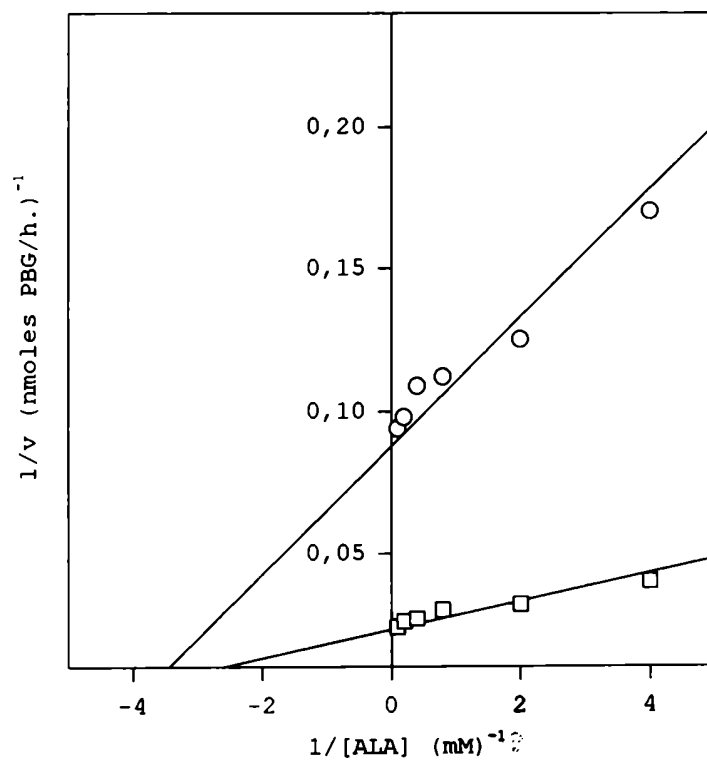


FIGURA II.4: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la enzima ALA-D. Gráfico de Lineweaver-Burk.

Se calcularon las velocidades (v) como nmoles PBG /h de la enzima proveniente de hígado (□) y tumor (○) a las distintas concentraciones de ALA ensayadas y se calcularon las inversas de la v y de la concentración de ALA. R tumor= 0,986; R hígado= 0,950.

II.1.2 Modulación de la actividad del ALA-D

II.1.21 Efecto de reactivos sulfhidrúlicos

Ya en los primeros estudios del ALA-D de hígado bovino, se describió la naturaleza sulfhidrúlica de esta enzima, y son numerosos los trabajos que confirman la existencia de grupos -SH esenciales (Batlle et al., 1967; Shemin, 1972; Gibbs & Jordan, 1985). Resultó entonces de interés estudiar el efecto de un reductor de grupos -SH como el DTT.

Como se puede apreciar en la Figura II.5, el DTT ejerce un efecto activador tanto en la enzima de tumor como en la de hígado, pero el efecto es más marcado en el primer tejido.

En tumor hay un aumento de la actividad en función de la concentración de DTT, alcanzando el máximo de actividad (200% respecto del control) con una concentración del reductor tiólico de 15 mM. A concentraciones mayores, el porcentaje de activación se mantuvo constante. Para el hígado, el porcentaje máximo de activación alcanzado fue del 150%, también con una concentración de DTT de 15 mM. Al igual que en el tumor, en este tejido el grado de activación permaneció constante hasta una concentración de 50 mM.

Es común que los tejidos malignos presenten alteraciones en los niveles de tioles intracelulares, como por ejemplo una disminución de la concentración de GSH, o cambios en la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo de estos grupos. Por ello, el estado oxidativo de las células tumorales suele ser más oxidado que el de las células normales. Como consecuencia, el tejido tumoral no dispondría de concentración de tioles suficiente como para que las enzimas sulfhidrúlicas exhiban su máxima actividad, situación que se revertiría con el agregado exógeno de DTT. Esto explicaría que la actividad de ALA-D tumoral sea relativamente más baja que la del hígado (Figura II.3) y, por consiguiente, su activación sea mayor por la presencia de DTT.

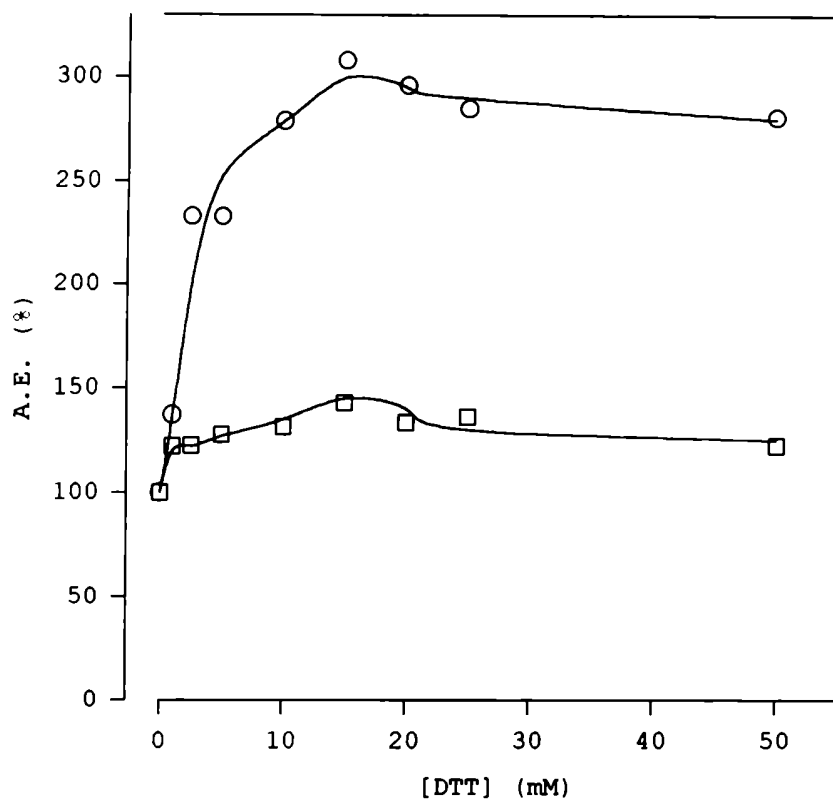


FIGURA II.5: Efecto del DTT sobre el ALA-D tumoral y hepática

Se calculó la actividad de ALA-D de tumor (○) e hígado (□) en presencia de distintas concentraciones de DTT en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como porcentaje de actividad específica (nmoles PBG/h/mg prot.) respecto al control incubado en ausencia de DTT, tomado como 100.

II.1.22 Efecto del cinc.

Además de ser sulfhidrónica, el ALA-D es también una metaloenzima atípica, que pierde su contenido de cinc durante el curso de la purificación y el tiempo de almacenamiento (Fukuda, 1988).

Se estudió la influencia de este catión divalente sobre la actividad de la enzima. Para ello se utilizaron concentraciones de cinc entre 10^{-6} M y 10^{-2} M, en presencia y en ausencia de DTT 15 mM.

En la Figura II.6a se puede observar que el cinc produjo, en presencia de DTT y a concentraciones bajas del catión (10^{-5} M), una activación de la enzima tumoral de hasta un 100% sobre el control. A medida que aumenta la concentración de cinc en el

medio de incubación, la activación disminuye y, a partir de 10^{-3} M, ocurre una inhibición de la actividad, que a 10^{-2} M alcanza el 50%.

Esta activación por cinc a bajas concentraciones, del orden de 10^{-5} a 10^{-4} M, e inhibición a concentraciones superiores a 10^{-3} M, también se había observado con la enzima purificada de hígado porcino (Fukuda, 1988).

En ausencia de DTT (15 mM), el cinc no activó a la enzima, sino que, por el contrario, tuvo un efecto notoriamente inhibitorio: 50% a 10^{-5} M y 75% con 10^{-4} M de cinc.

En el hígado (Figura II.6b), al igual que en tumor, en presencia de DTT el cinc, entre 10^{-5} M y 10^{-3} M, estimuló la actividad de ALA-D. Con 10^{-5} M la activación fue del 80% sobre el control. Las concentraciones de cinc superiores a 10^{-3} M también produjeron una marcada inhibición. En este mismo tejido, y en ausencia de DTT el cinc fue siempre inhibitorio, alcanzándose hasta un 90% de inactivación a las mayores concentraciones ensayadas.

En conclusión, en ambos tejidos este catión divalente produjo una activación del ALA-D cuando el reductor tiólico exógeno estaba presente en el medio de incubación, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que el cinc protege a los grupos histidina del sitio activo, siempre y cuando los grupos sulfhidrilos de las cisteínas se encuentren reducidos (Fukuda, 1988).

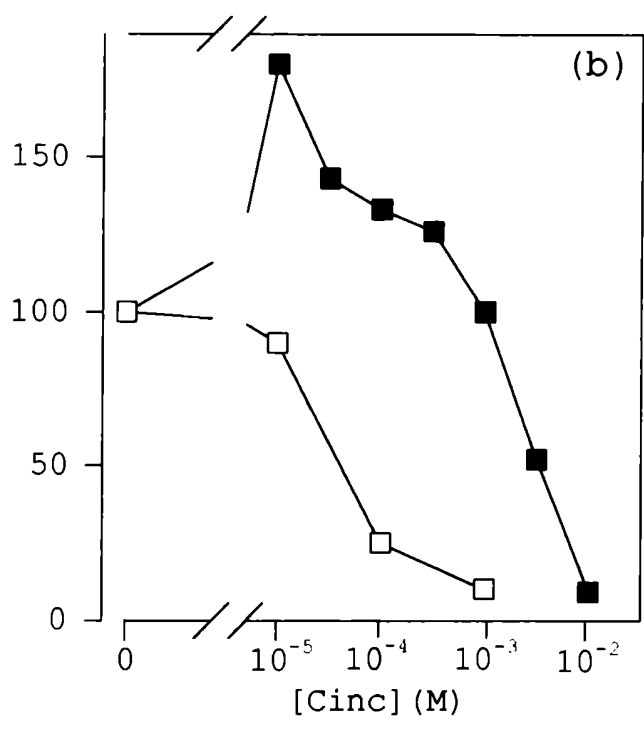
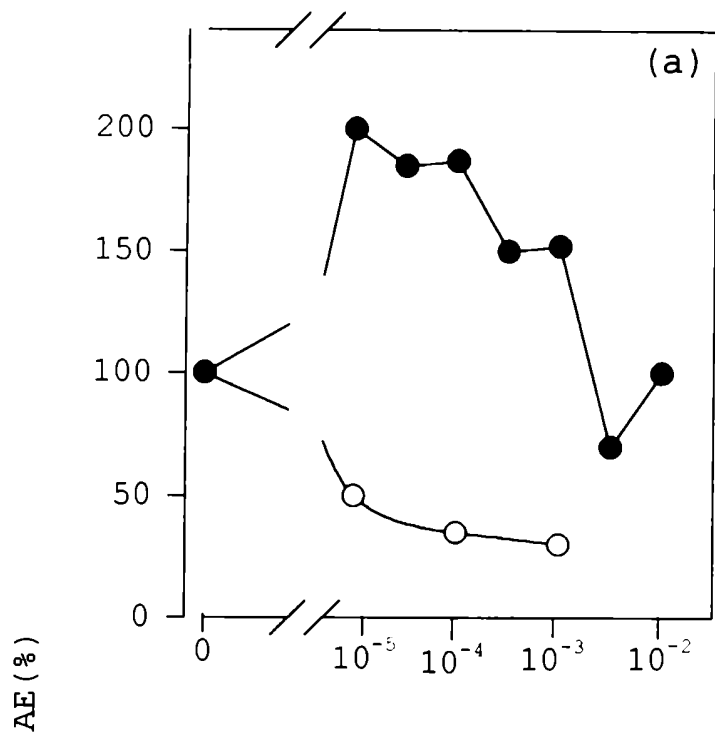


FIGURA II.6: Efecto de la concentración de cinc sobre el ALA-D tumoral y hepática.

Se determinó la actividad de ALA-D de tumor (a) e hígado (b) con distintas concentraciones de cinc en presencia (●, ■) o ausencia (○, □) de DTT 15 mM. Las demás condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como porcentaje de actividad específica (nmoles PBG/h/mg prot.) respecto al control incubado en ausencia de cinc, tomado como 100.

II.1.3 Modulación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tisulares

Con el objeto de estimular la biosíntesis de porfirinas mediante el uso de agentes exógenos, inocuos en dosis adecuadas, se decidió llevar a cabo una serie de estudios de modulación de la biosíntesis de porfirinas a partir de ALA en tumor, hígado y piel.

Para ello se utilizó la técnica de explantes tisulares anteriormente descrita, empleando el cinc -conocido activador del ALA-D- con el propósito de lograr una mayor acumulación selectiva de porfirinas en el tejido tumoral, que recordamos es uno de los principales fines de la TFD a partir de ALA.

Cuando se incubaron los explantes tisulares en presencia de ALA, se observó que la biosíntesis de porfirinas se encontraba afectada de diferente manera en los distintos tejidos, debido a la presencia de cinc en el medio de incubación.

En los explantes tumorales (Figura II.7) se observó un aumento en la síntesis de porfirinas a partir ALA con todas las concentraciones de cinc ensayadas, encontrándose el máximo valor (6,5 veces el control) con una concentración de cinc de 10^{-4} M.

En cambio, en los explantes de hígado y piel no se observaron diferencias significativas en la acumulación de porfirinas luego de la incubación con cinc, con respecto al control.

De la comparación de estos datos con lo observado antes en la Figura II.6a, surge que el rango de concentraciones activadoras del cinc sobre la síntesis de porfirinas en los explantes de tumor, es un orden mayor que el obtenido para el ALA-D proveniente del mismo tejido, por lo que se podría pensar que estaría actuando otro mecanismo adicional, diferente al de la bioestimulación de la síntesis de porfirinas. Una posibilidad es que el cinc pueda modificar el transporte de las porfirinas desde los explantes al medio. En base a ello es que se determinaron las porfirinas liberadas a los respectivos medios de incubación.

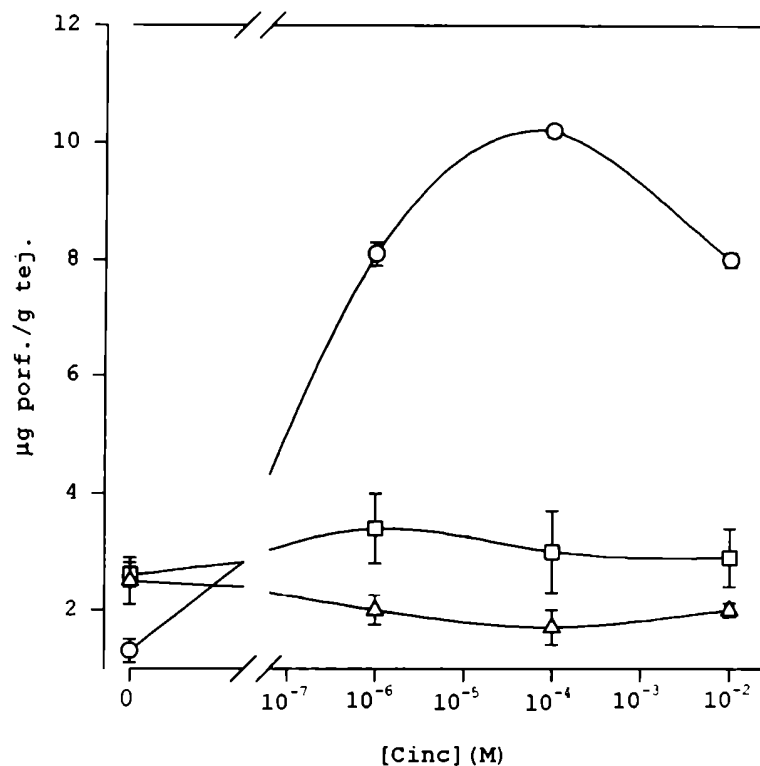


FIGURA II.7: Efecto de la concentración de cinc sobre la síntesis de porfirinas en explantes tisulares a partir de ALA.

Se incubaron explantes de tumor (○), hígado (□) y piel (Δ) durante 22 hs. en medio conteniendo ALA 0,2 mM, DTT 10 mM y distintas concentraciones de cinc, tal como se detalla en Materiales y Métodos. Se determinó la cantidad de porfirinas formadas (µg/g tejido) luego de lavar los tejidos con solución fisiológica.

En la Figura II.8 se puede observar que en los tres tejidos estudiados, la cantidad de porfirinas liberadas al medio de incubación sigue un patrón similar al de las porfirinas formadas en los tejidos.

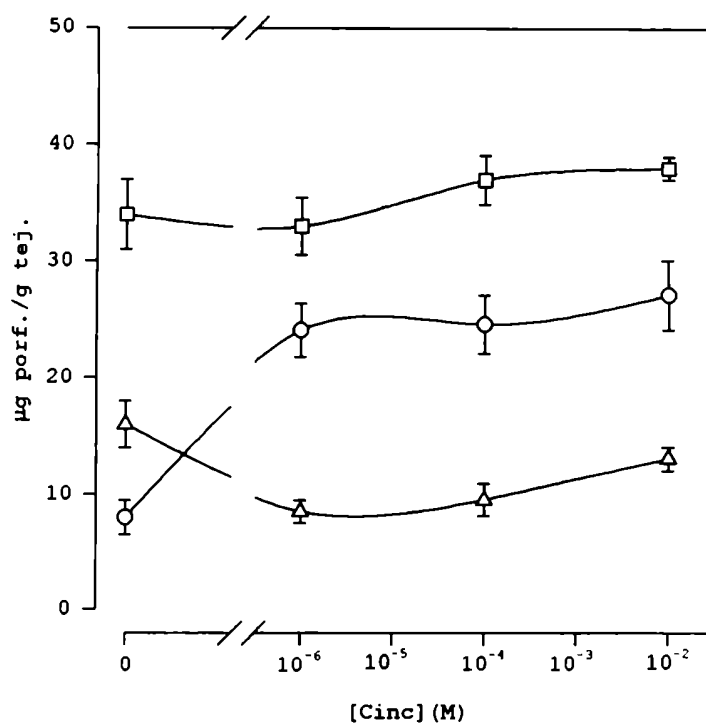


FIGURA II.8: Efecto de la concentración de cinc sobre la liberación al medio de porfirinas sintetizadas en explantes tisulares a partir de ALA.

Se incubaron explantes de tumor (○), hígado (□) y piel (Δ) durante 22 hs. en medio conteniendo ALA 0,2 mM, DTT 10 mM y distintas concentraciones de cinc, tal como se detalla en Materiales y Métodos. Se determinó la cantidad de porfirinas liberadas al medio (µg/g tejido).

En el tumor (Figura II.9), se observa que la presencia de cinc en el medio de incubación aumenta la cantidad de porfirinas retenidas en los tejidos, encontrándose que para una concentración de 10^{-4} M el porcentaje de retención de las porfirinas es el doble del control al que no se agregó cinc al medio de incubación. En explantes de piel, en cambio, no se observó ningún aumento en la retención de porfirinas sino que, por el contrario fueron liberadas al medio en mayor proporción que en el control. En el hígado no hubo cambios significativos.

Los niveles normales de cinc en plasma, que aseguran la actividad óptima del ALA-D se encuentran alrededor de $1,6 \times 10^{-3}$ M (Guolo et al., 1996). Se podría pensar que en el tejido tumoral, estas concentraciones se encuentran por debajo de los niveles necesarios para exhibir la máxima actividad, y por eso, con concentraciones bajas de dicho catión, la estimulación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA, así como la actividad de ALA-D se hace más evidente en este tejido.

En nuestro caso, de acuerdo a los resultados obtenidos, en los explantes tumorales el cinc podría estar interviniendo en la salida de las porfirinas al medio. Probablemente este catión esté involucrado en la apertura de canales iónicos asociados a receptores para porfirinas, como por ejemplo, el receptor mitocondrial hepático postulado por Snyder et al. (1987), o en otros mecanismos de transporte activo.

Por otra parte, dado que la mayor retención de porfirinas se encontró en explantes tumorales, postulamos que las LDL, proteínas transportadoras de porfirinas que se encuentran sobreexpresadas en los tejidos neoplásicos (Wilson & Van Hillesberg, 1991) podrían estar siendo moduladas de algún modo desconocido por el cinc, ya sea mediante cambios en su afinidad por las porfirinas o bien por su receptor.

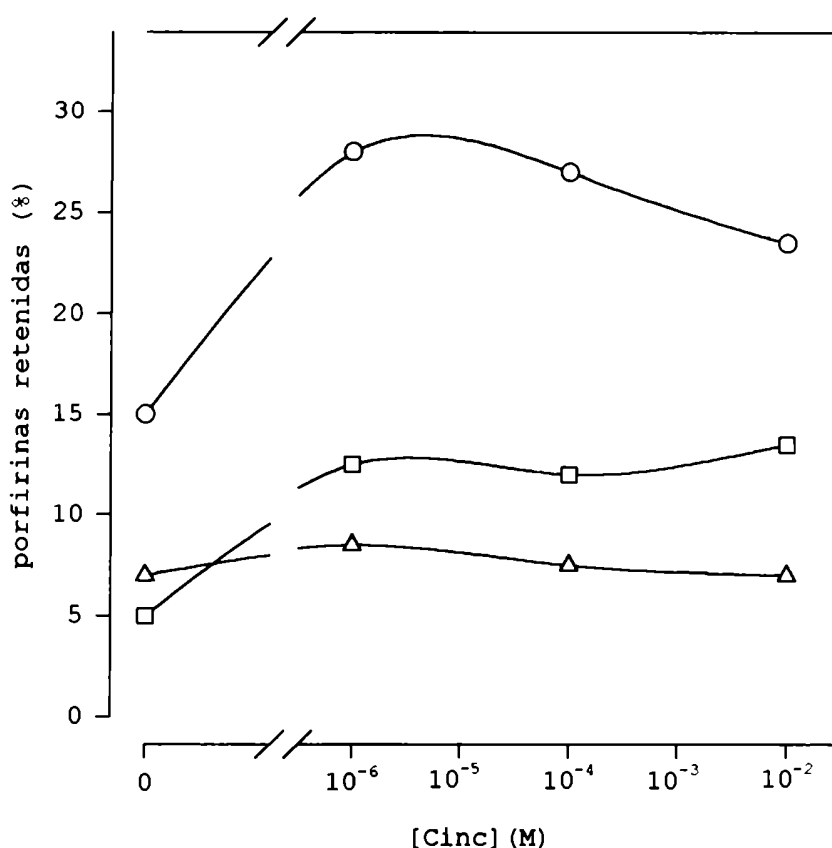


FIGURA II.9: Efecto de la concentración de cinc sobre la la retención de porfirinas sintetizadas en explantes tisulares a partir de ALA.

Se incubaron explantes de tumor (O), hígado (□) y piel (Δ) durante 22 hs. en medio conteniendo ALA 0,2 mM, DTT 10 mM y distintas concentraciones de cinc, tal como se detalla en Materiales y Métodos. Se determinó el porcentaje de porfirinas retenidas en el tejido respecto al total de porfirinas sintetizadas (medio + tejido).

II.2 Porfobilinogenasa

II.2.1 Caracterización de la enzima porfobilinogenasa en el adenocarcinoma M2 y en hígado de ratones portadores de tumor.

II.2.1.1 Tiempo de incubación

Se estudió la variación de la actividad enzimática de esta enzima proveniente de tumor y de hígado de ratón portador de tumor en función del tiempo de incubación. La enzima de las dos fuentes muestra una relación lineal entre la formación de porfirinas y el tiempo de incubación durante todo el período ensayado (Figura II.10).

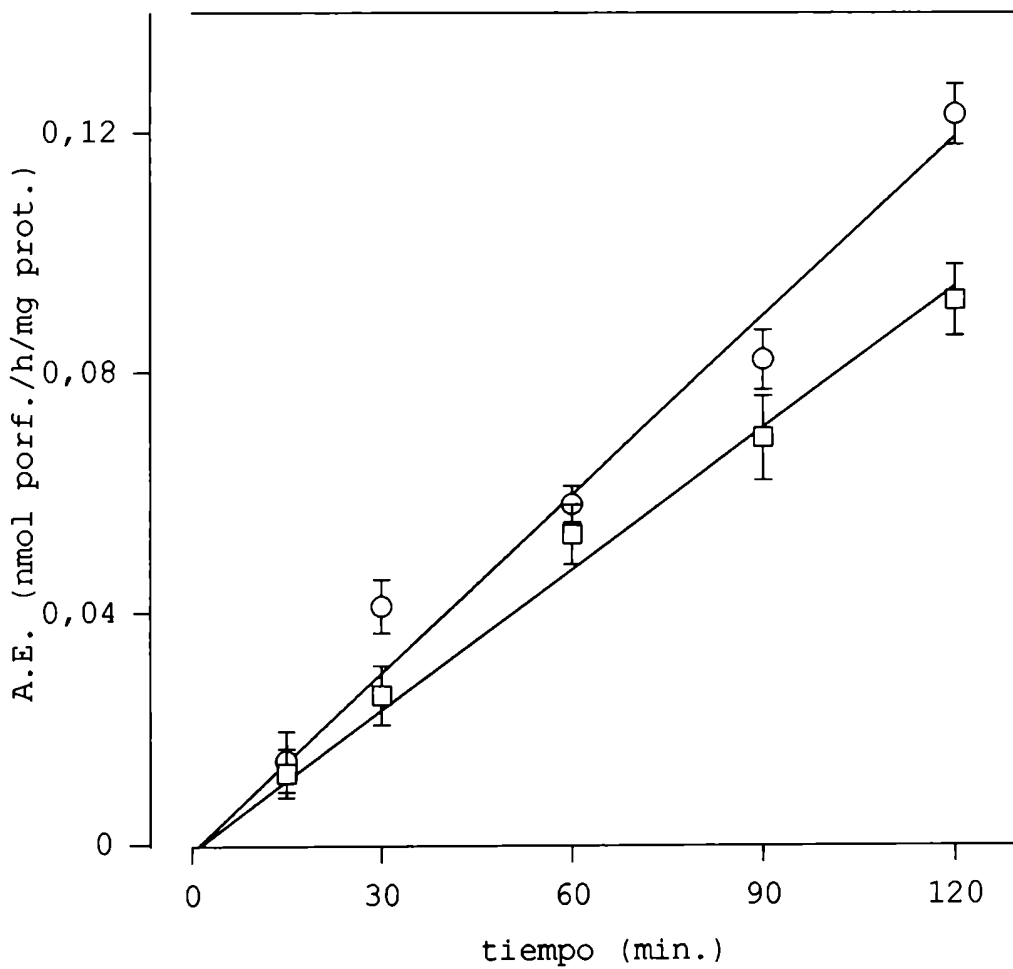


FIGURA II.11: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad específica (A. E.) de la PBG-asa de hígado (□) y tumor (○).

Considerando que hasta los 120 minutos la curva tiene un comportamiento lineal y que la cantidad de porfirinas formadas es suficiente como para permitir una buena determinación, se fijó la variable tiempo de incubación en este valor.

II.2.12 Cinética de la reacción

Cuando se estudió la actividad de la enzima en función de la concentración de PBG dentro de un rango de 10 a 80 μM , según puede observarse en la Figura II.11, el comportamiento del complejo enzimático fue semejante para los dos tejidos estudiados, presentando una cinética michaeliana. La saturación del complejo ocurre a 20 y 40 μM de PBG para tumor e hígado respectivamente.

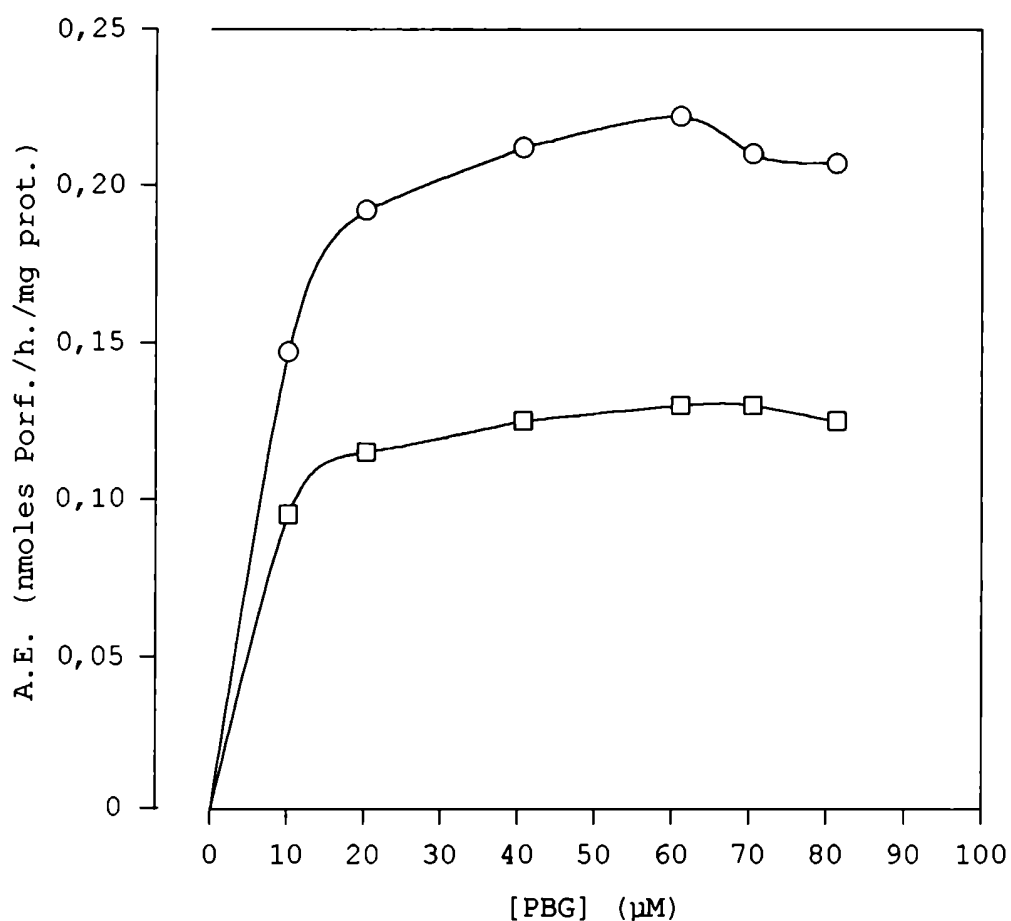


FIGURA II.11: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la PBG-asa de hígado (\square) y tumor (\circ).

Para obtener las constantes cinéticas, se realizaron los gráficos de las dobles recíprocas de Lineweaver-Burk (Figura II.12).

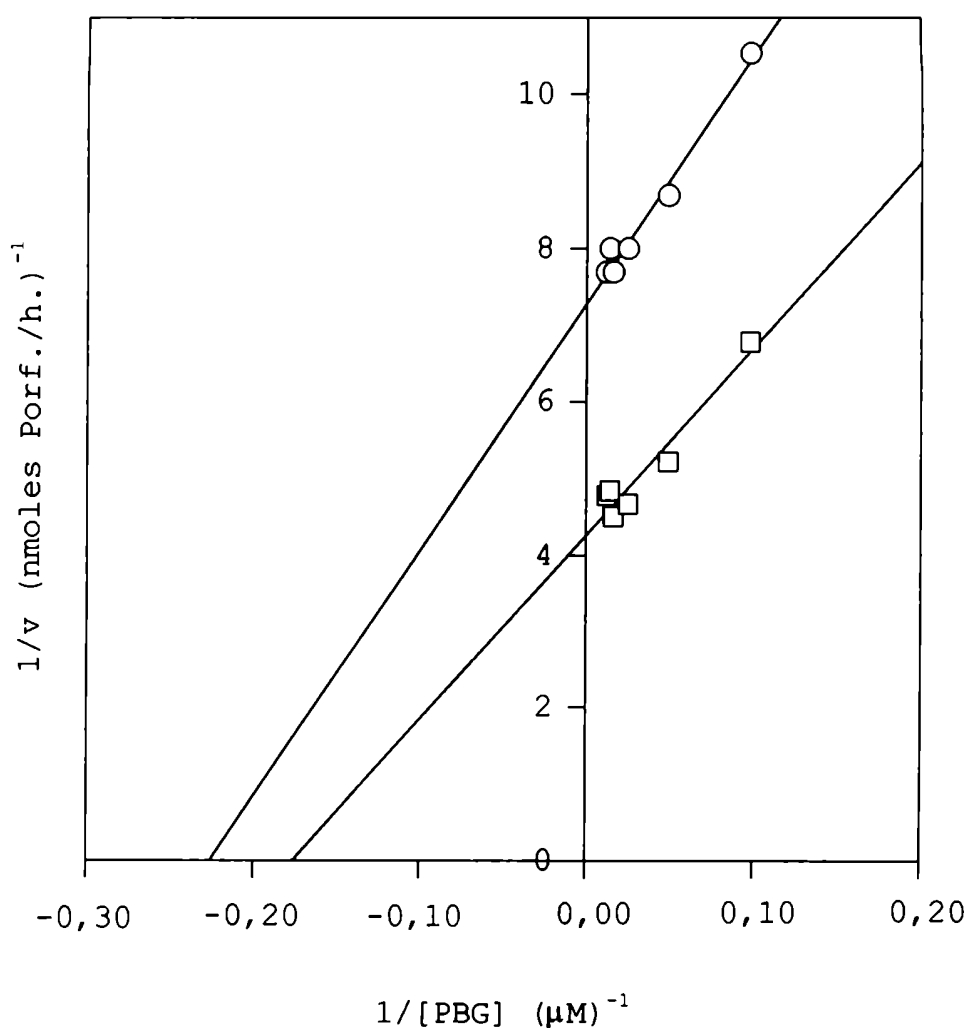


FIGURA II.12: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la PBG-asa de hígado (□) y tumor (○). Gráfico de Lineweaver-Burk.

R tumor = 0,988; R hígado = 0,965.

Los valores de K_m para PBG-asa de las dos fuentes fueron del mismo orden (11,0 μM para tumor y 14,2 μM para hígado); así la afinidad de la enzima por su sustrato es prácticamente la misma para ambos tejidos. Estos valores son menores al valor de K_m obtenido por Navone (1991) para la enzima del tumor M3 (111 μM) y del hígado de ratón portador (87 μM), y también menor que el encontrado por Fumagali (1988) para la enzima de hígado de cerdo (167 μM).

Con el objeto de confirmar la naturaleza michaeliana de la enzima se realizó la transformación logarítmica de los datos según la ecuación de Hill (Figura II.13)

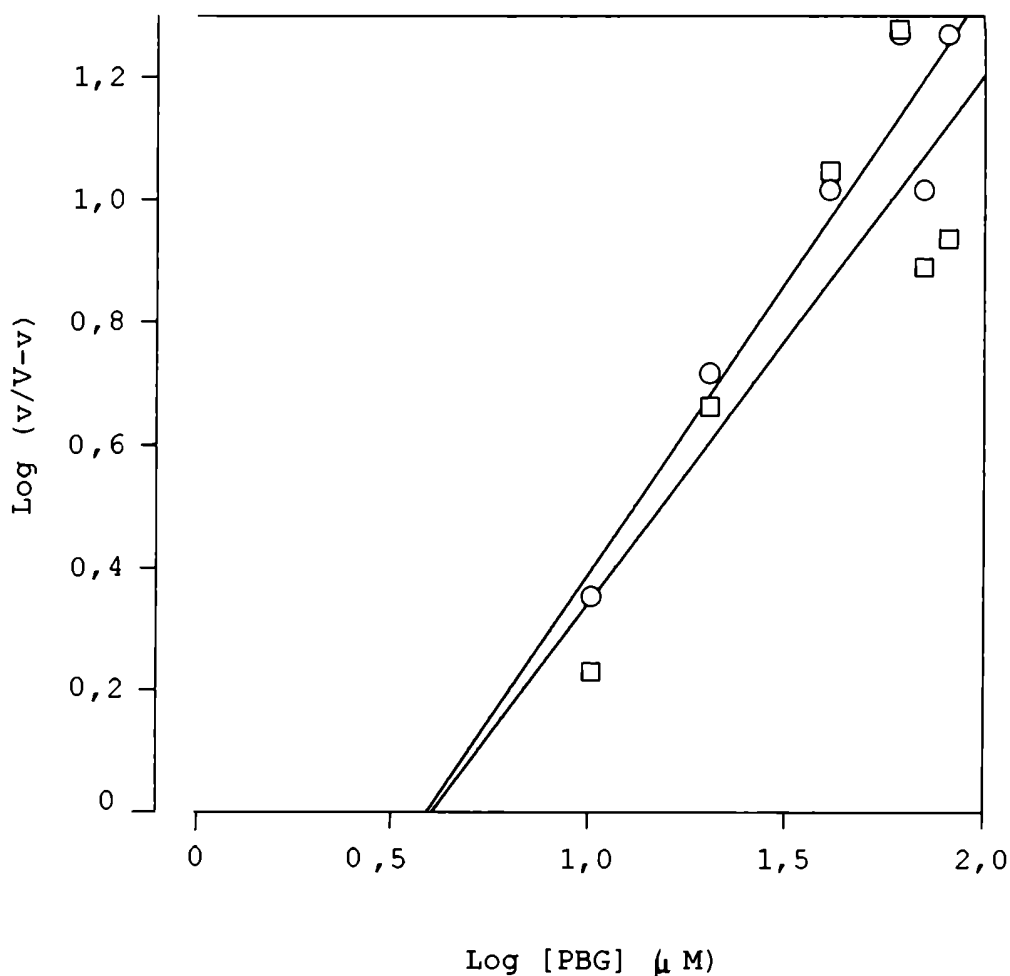


FIGURA II.13: Gráfico de Hill para PBG-asa.

Se representaron los valores correspondientes a la ecuación de Hill para la PBG-asa de hígado (□) y tumor (○). Ver detalles en el texto. R tumor = 0,998; R hígado = 0,975.

Según se ilustra en la Tabla II.2, la PBG-asa proveniente de tumor y de hígado de ratón portador de tumor presentan un índice cercano a 1, confirmando entonces su comportamiento michaeliano.

Con respecto a la velocidad máxima, encontramos que en el hígado es aproximadamente el doble que en el tumor. Navone et al. (1991) también había hallado mayor actividad en la enzima proveniente de hígado, que en la de tumor. Debido a su alta tasa de síntesis de hemoproteínas, era de esperar que en un órgano

como el hígado, se encuentren más activas las enzimas responsables de la síntesis de porfirinas, que en otros tejidos, como el de la glándula mamaria.

TABLA II.1: Parámetros cinéticos de la PBG-asa

TEJIDO	V max (nmoles porf/h)	Km (μ M)	n
Tumor	0,137	11,025	0,99
Hígado	0,239	14,21	1,27

Velocidad máxima (V_m), constante de Michaelis (K_m) e índice de Hill (n) calculados a partir de la AE (nmoles de porf. form./mg prot./h).

Si bien existen numerosos trabajos acerca de los componentes del complejo deaminasa e isomerasa, son relativamente pocos los que se ocupan del complejo mismo de la PBG-asa. En diversos estudios, con la enzima purificada de hígado bovino (Sancovich et al., 1969), eritrocitos de ave (Llambías et al., 1971) y callos de soya (Llambías & Batlle, 1970), se encontró una respuesta sigmoidea de la PBG-asa en función de la concentración de PBG, lo que llevó a identificarla como una enzima alostérica.

Fumagalli (1991) ha investigado en detalle la PBG-asa de hígado de cerdo, encontrando en este caso un comportamiento puramente michaeliano con un valor de K_m de 167 μ M y un n de Hill tendiente a 1. Estos últimos resultados coinciden con lo encontrado en nuestro trabajo, donde tanto la PBG-asa de hígado como de tumor, exhiben comportamiento michaeliano.

Es interesante destacar que las cinéticas pueden variar para un mismo tejido proveniente de distintas fuentes como ser hígado bovino y porcino, mientras que, entre distintos tejidos de la misma fuente como ser hígado y tumor de origen glandular, parecen ser semejantes.

II.2.13 Efecto del ácido fólico sobre la PBG-asa

Con el objeto de encontrar posibles moduladores de la actividad de la PBG-asa, se estudió el efecto de distintas concentraciones de ácido fólico sobre la actividad del complejo enzimático, ya que Juknat et al. (1981; 1988a; 1988b)) habían encontrado acción estimulante de dicho factor sobre la PBG-asa y deaminasa de *Euglena gracilis*. Se emplearon para ello concentraciones de ácido fólico desde 10^{-8} M a 10^{-3} M.

Pero contrariamente a lo esperado, en nuestro caso ni en tumor ni en hígado, el ácido fólico tuvo efecto alguno sobre la actividad enzimática. Más aún, en ambos casos concentraciones mayores a 10^{-4} M resultaron inhibitorias.

Piper & Van Lier (1977) encontraron una ligera estimulación de la PBG-deaminasa hepática con una concentración de ácido fólico de 10^{-4} M; sin embargo, en un trabajo posterior del mismo grupo, no se observaron cambios en la actividad de dicha enzima con una concentración de 10^{-3} M de pteroilglutamato (Christenson et al., 1988).

Juknat et al. (1981) describieron una activación de la síntesis de porfirinógenos en *Euglena gracilis* a partir de PBG con una concentración de folato de 10^{-7} M. Noriega et al. (1992) también encontraron un efecto estimulador de los folatos sobre la actividad de la PBG-deaminasa en algunas fracciones parcialmente purificadas de hígado de rata libres de isomerasa. Estudios cinéticos en este mismo trabajo mostraron un aumento en la velocidad máxima sin alteraciones en el Km de la enzima por el agregado de este factor.

Por lo tanto, la falta de activación del complejo de la PBG-asa en el rango de concentraciones ensayadas en el presente trabajo podría ser consecuencia de la presencia de la isomerasa, que, según lo propuesto por Noriega et al. (1992) estaría bloqueando el sitio de unión del fólico a la enzima.

Alternativamente, esta falta de activación por el agregado de fólico podría deberse a que el alimento de los animales contiene una buena proporción de folatos, que podría de alguna manera estar enmascarando la acción de este posible modulador sobre el complejo de la PBG-asa.

II.3 Conclusiones

En tumor e hígado de ratones portadores de adenocarcinoma M2 se observó:

- * La enzima ALA-D presenta un comportamiento michaeliano. Los Kms hallados son de 0,295 μM para el tumor y 0,372 para el hígado, y la velocidad máxima, 10 y 40 nmoles PBG/h/mg prot. respectivamente.
- * Se encontró un efecto estimulante sobre el ALA-D tumoral y hepática, con bajas concentraciones de cinc; esta acción fue más marcada en el primer tejido. La activación por cinc sólo se observó en presencia de DTT.
- * El complejo enzimático PBG-asa tanto de hígado como de tumor presenta también un comportamiento michaeliano, con un Km de 14,2 y 11,0 μM respectivamente y una velocidad máxima en el hígado (0,239 nmoles porf./h) del doble a la hallada en tumor (0,137 nmoles porf./h).
- * El ácido fólico no produjo efecto significativo sobre la PBG-asa en estos tejidos. Se piensa que el posible contenido de folatos en la dieta o la presencia de la isomerasa en el complejo podrían estar enmascarando o impidiendo la acción de este modulador.

En explantes tisulares incubados con ALA se observó:

- * El cinc provocó, en el rango de 10^{-2} M a 10^{-6} M, un aumento significativo de la concentración de porfirinas sintetizadas a partir de ALA y retenidas en explantes tumorales, sin modificar de manera importante estos parámetros ni en hígado ni en piel.
- * En este efecto doble, sobre la estimulación de la síntesis y sobre la retención de la porfirinas en el tumor,

probablemente estén involucrados mecanismos de estimulación del ALA-D y de interacción con los transportadores de porfirinas, respectivamente.

- * Es posible estimular la biosíntesis de porfirinas a partir de ALA mediante el empleo de concentraciones adecuadas de cinc.

CAPITULO III

EFFECTIVIDAD DE LA TERAPIA FOTODINAMICA

III.1 Biosíntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales a tiempos cortos de incubación.....	189
III.2 Cromatografía de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA a tiempos cortos.....	190
III.3 Modelo <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i> para determinar la eficacia terapéutica de la TFD.....	191
III.4 Efectos de la irradiación en el crecimiento tumoral.....	193
III.4.1 Índice de efectividad.....	194
III.5 Citotoxicidad del tratamiento.....	195
III.6 Conclusiones.....	198

III. EFECTIVIDAD DE LA TERAPIA FOTODINAMICA

Utilizando la técnica de cultivos de explantes tisulares, que demostró conservar la viabilidad del tejido y la funcionalidad de la biosíntesis del hemo (Capítulo I), en el presente capítulo se muestran los resultados de los estudios acerca de la efectividad de la TFD a partir de ALA en explantes tumorales, incubados a tiempos cortos en presencia de ALA.

Las experiencias sobre la determinación de la efectividad del daño fotodinámico se llevaron a cabo en 2 etapas: en la primera, se desarrolló un modelo *in vitro* - *in vivo* el cual, haciendo uso de ratones receptores normales, nos permitió seguir el crecimiento de los tumores dañados fotodinámicamente. Los resultados de este desarrollo han sido de fundamental importancia en este trabajo y los posteriores. En una segunda etapa, se midió el contenido de potasio intracelular y de LDH liberada al medio, como medida indirecta del daño en membrana.

III.1 Biosíntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales a tiempos cortos de incubación

Se intentó reducir los tiempos de incubación de los tejidos, ensayando concentraciones más altas de ALA, de manera de poder lograr una buena acumulación de porfirinas en el menor tiempo posible, simplificar así el diseño experimental y minimizar el tiempo de manipulación del tejido.

Para ello se incubaron los explantes de tumor durante 1 y 2 hs en presencia de ALA 0,2; 0,4 y 0,6 mM. Al igual que lo que hemos presentado en la sección I.1, la síntesis de porfirinas aumentó con el tiempo de incubación y con la concentración de ALA (Tabla III.1). Luego de 2 hs de incubación con ALA 0,6 mM, se alcanzó un nivel de 4,6 µg/g tej., que se consideró adecuado para el desarrollo del modelo experimental.

TABLA III.1: Contenido total de porfirinas en explantes tumorales

TIEMPO DE INCUBACION	CONCENTRACION DE ALA (mM)		
	0,2	0,4	0,6
1 hs	1,0 ± 0,3	2,6 ± 0,6	2,8 ± 0,7
2 hs	1,9 ± 0,1	3,9 ± 0,5	4,6 ± 0,6

Se incubaron explantes tumorales durante 1 y 2 hs en medio conteniendo distintas concentraciones de ALA. Se determinó el contenido de porfirinas (μg porf/g tejido) al terminar la incubación. Las demás condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

III.2 Cromatografías de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA a tiempos cortos

Se controló que la síntesis de porfirinas a tiempos cortos (2 hs) y en presencia de 0,6 mM ALA, fuera totalmente funcional en tumor y en hígado, órgano que se tomó como control (Tabla III.2).

En el caso del tumor, tanto en explantes como en el medio se aprecia un predominio de URO y COPRO, seguido de PROTO. Además de pequeños porcentajes de Isocopro, Penta y Hexaporfirinas. A diferencia de lo encontrado en la sección I.3, se ve que a tiempos cortos el porcentaje de PROTO acumulada es mayor. Ya hemos discutido la importancia de URO y COPRO como porfirinas fotosensibilizantes en la sección mencionada.

En hígado, tanto en explantes como en medios de incubación se aprecia un mayor porcentaje de URO, seguido por COPRO en explantes y Hepta y COPRO en los medios. En estos últimos también aparecen pequeñas cantidades de PROTO.

TABLA III.2: Cromatografías de explantes tumorales y hepáticos y de los correspondientes medios

	Tumor		Hígado	
	T	M	T	M
Proto	12	17	-	5
Isocopro	4	3	-	-
Copro	40	25	40	16
Penta	-	1	-	-
Hexa	-	3	-	-
Hepta	7	22	-	26
Uro	37	29	60	53

Se cromatografiaron las porfirinas sintetizadas en explantes de tumor e hígado luego de 2 hs de incubación con ALA 0,6 mM. Las cromatografías se desarrollaron y se expresaron en porcentajes, según se indica en Materiales y Métodos. T =tejido; M =medio.

III.3 Modelo in vitro - in vivo para determinar la eficacia terapéutica de la TFD

Se incubaron explantes de tumor de 2 mg en un medio salino a 37°C con ALA 0,6 mM por períodos de 1 y 2 hs.

Sólo se usaron explantes no necróticos y no hemorrágicos. Luego de la incubación, se irradiaron durante 30 min. con un láser de He-Ne (632,8 nm; 3,5 mW de potencia) con un haz de 2 mm de diámetro, ubicado a una distancia de 10 cm de la muestra.

Se realizaron los correspondientes controles incubando explantes de tumor con y sin ALA y no irradiados. Durante el proceso de irradiación se monitoreó la temperatura ($19 \pm 2^\circ\text{C}$). Inmediatamente después de la iluminación o no, se inyectaron subcutáneamente inóculos de 1 mm³ de explantes irradiados y no irradiados, en los flancos derecho e izquierdo respectivamente, de un mismo ratón receptor (Figura III.1).

Debido a la conocida variabilidad en el crecimiento de los tumores, cabe destacar la importancia del modelo, en el cual cada ratón porta en sí mismo su propio control de tumor no irradiado.

Luego de su implantación se monitoreó el crecimiento del tumor a partir del día en que éste era palpable, y se determinó el volumen, calculado como longitud x ancho x espesor x 0.5.

Teniendo en cuenta los volúmenes tumorales de los explantes irradiados y no irradiados para un mismo ratón, se calculó el índice de efectividad según la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de efectividad (IE)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{vol. irradiado}}{\text{vol. no irradiado}} \right)$$

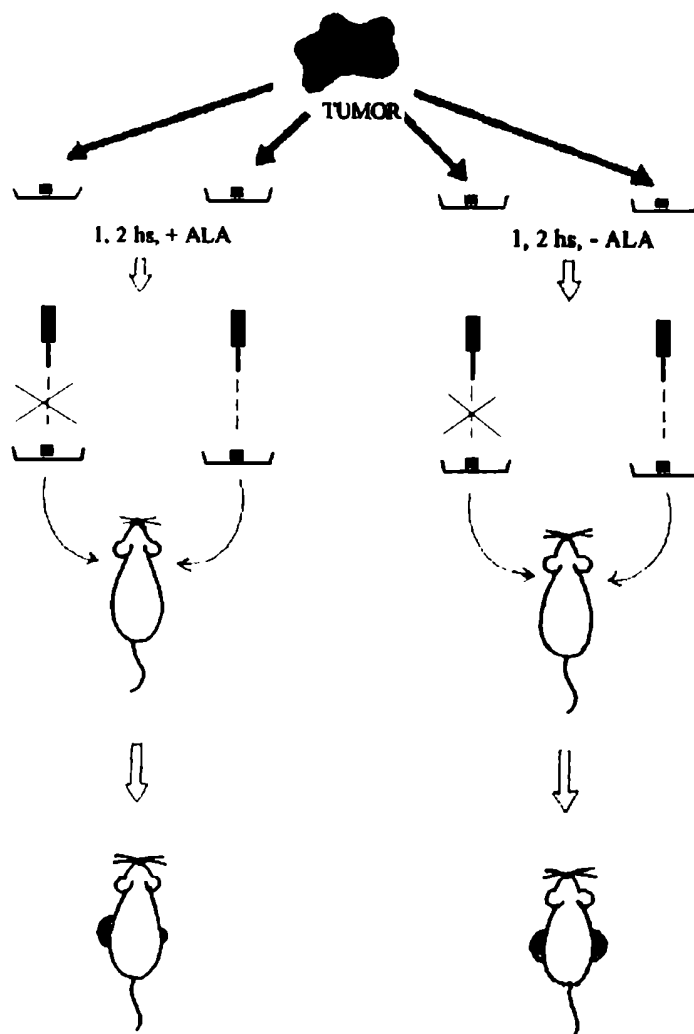


FIGURA III.1: Diseño experimental para determinar la eficacia de la TFD

Luego del sacrificio de los animales, se extrajo el tumor y se incubaron 2 explantes durante 1 y 2 hs en presencia de ALA 0,6 mM o en ausencia (control S/ALA). Luego se irradió uno, mientras que el otro permaneció en iguales condiciones pero sin recibir irradiación. El primero se transplantó subcutáneamente en el flanco derecho de un ratón receptor y, el segundo, en el flanco izquierdo del mismo. Se siguió el crecimiento mediante medición con calibre.

III.4 Efectos de la irradiación sobre el crecimiento tumoral

En la Figura III.2 se muestran curvas de crecimiento típicas de explantes incubados durante 1 hora (a) y 2 horas (b) en medio con ALA, irradiados y transplantados en un ratón receptor, y de los respectivos controles no irradiados.

Tanto en a) como en b) se observa que durante los 10 primeros días luego de su inoculación, todos los explantes crecieron lentamente. Al décimo día la masa tumoral se podía detectar por palpación pero no era medible. Luego de esta primera etapa siguió otra fase de crecimiento rápido; en la cual se observó que el crecimiento fue mucho más lento en los ratones que habían recibido tumores irradiados e incluso en algunos animales no hubo crecimiento alguno (datos no ilustrados).

Los explantes que habían sido incubados con ALA durante 1 h e irradiados, y que contenían una concentración de porfirinas de 2,8 $\mu\text{g/g}$ de tejido, mostraron una reducción del 30 al 50% en la masa tumoral comparados con los controles no irradiados e incubados con ALA. En la Figura II.2a se muestra un caso en el cual la reducción del crecimiento es del 25% al día 25 post implantación en un ratón receptor.

En los explantes incubados por 2 hs, que alcanzaban una concentración de 4,6 μg de porfirinas por g de tejido, hubo una reducción desde el 60% hasta la ausencia total de crecimiento. En la Figura II.2b se ve un caso en el que la reducción del crecimiento fue del 45% al día 25 post implantación. No se hallaron diferencias en el crecimiento tumoral entre los animales inoculados con explantes a 25 post implantación irradiados y no irradiados incubados en medio libre de ALA y que por lo tanto, contenían sólo niveles basales de porfirinas; en estos casos, los tumores crecieron normalmente.

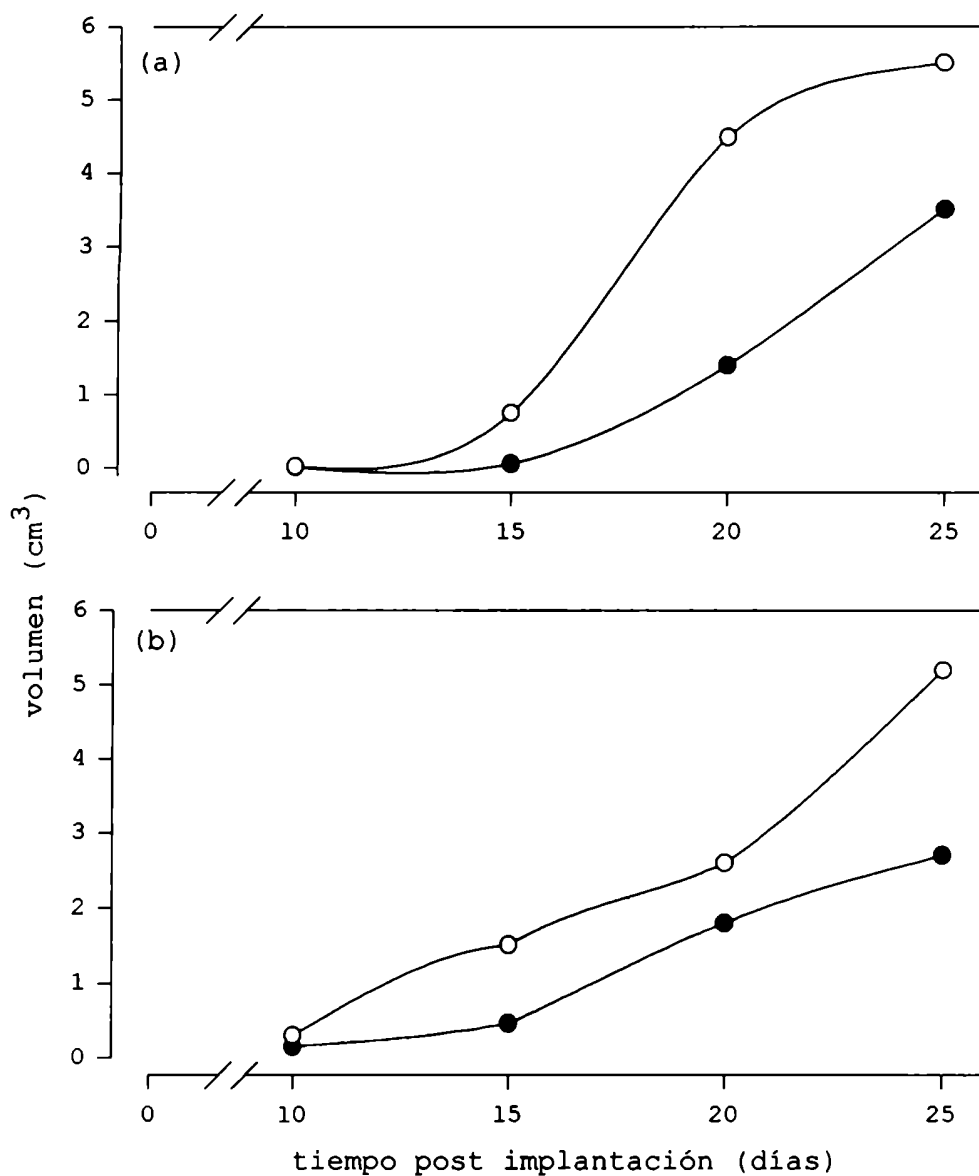


FIGURA III.2: Crecimiento tumoral en función del tiempo luego del cual explantes tratados con TFD fueron implantados en ratones receptores.

Se inocularon los ratones con explantes irradiados (●) y no irradiados (○) incubados con ALA 0,6 mM por períodos de 1 hora (a) y 2 hs (b) y se midió el crecimiento tumoral. Ver detalles en el texto. Se representan curvas de crecimiento tipo obtenidas para un animal representativo de cada grupo.

III.4.1 Índice de efectividad

En la Figura III.3 se muestra el promedio de los índices de efectividad para todos los ratones que se incluyeron en las experiencias de efectividad de la TFD. Se puede observar que el IE para las 2 hs de incubación con ALA fue del 90 al 100% según

el tiempo post implantación que se considere. Este valor es significativamente mayor ($p < 0,01$) que el 50 a 60% obtenido cuando la incubación con ALA fue sólo de 1 hora.

El tiempo de incubación con ALA más adecuado para realizar las experiencias de irradiación empleando este modelo *in vitro* - *in vivo* sería de 2 horas, ya que en este lapso se acumulan mayor cantidad de porfirinas y, como consecuencia, el daño fotodinámico es mayor.

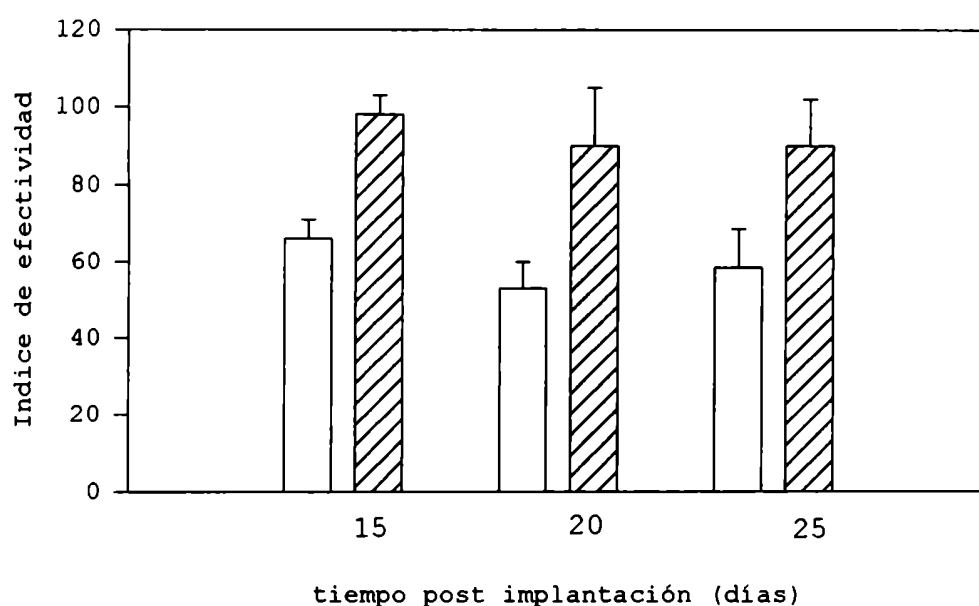


FIGURA III.3: Índice de efectividad de la TFD a partir de ALA, luego de 1 y 2 hs de irradiación

Este índice se calculó según la expresión indicada en el texto, para los animales transplantados con explantes incubados con ALA 0,6 mM durante 1 h (\square) y 2 hs (hatched). Los valores representan la media \pm SD de cuatro animales en dos experimentos diferentes. Un índice de efectividad del 100% indica la destrucción total del tumor.

III.5 Citotoxicidad del tratamiento

Debido al amplio consenso que existe en señalar a la membrana plasmática como uno de los blancos principales del daño fotodinámico, se decidió determinar la actividad de LDH en el medio de incubación y el contenido de potasio intracelular (Tabla III.3).

Sabemos que la liberación de LDH al medio es un indicador de lisis celular. Se puede observar que los explantes que habían sido incubados con ALA e irradiados (+ALA +LUZ), liberan una cantidad significativamente mayor de LDH al medio con respecto al control sin irradiar ($p < 0,005$); mientras que los que habían sido incubados sin ALA e irradiados (-ALA +LUZ), no presentaron diferencias significativas respecto al control +ALA -LUZ.

Otro parámetro indicador de daños sobre membrana, no necesariamente por lisis, es el dosaje de K^+ intracelular. En la tabla se observa que el contenido de K^+ luego de la irradiación de los explantes que habían sido incubados con ALA (+ALA +LUZ) es un 30% menor que en el control sin irradiar ($p < 0,001$). También se observan daños *per se* por la incubación con ALA ya que, en ausencia del mismo y con irradiación (-ALA +LUZ), la pérdida de K^+ en los explantes es un 25% menor que en el control incubado sin ALA e irradiado (-ALA + LUZ).

En este modelo *in vitro* - *in vivo* la lisis celular estaría implicada en el daño fotodinámico, con la consiguiente disipación de gradientes electroquímicos y disminución del contenido de potasio intracelular. Esto estaría de acuerdo con los resultados de Malik et al. (1993), quienes encontraron salida de K^+ intracelular como primera consecuencia del daño fotodinámico en membranas.

TABLA III.3: Actividad de LDH y contenido de potasio intracelular

Condiciones experimentales		Actividad LDH			Potasio intracelular
ALA	LUZ	(1)		(2)	(3)
		(a)	(b)		
+	+	0,006	0,023	3,6 ± 0,4	10,0 ± 1,2
+	-	0,005	0,011	2,1 ± 0,4	14,4 ± 1,5
-	+	0,006	0,016	2,5 ± 0,5	19,3 ± 0,4

Se determinó la actividad de LDH y el contenido de potasio intracelular en explantes tumorales según lo descrito en Materiales y Métodos. (1) Representa el promedio de la variación de absorbancia/30 seg./50 mg de tejido determinado antes (a) y 4 horas después (b) de la irradiación. Los controles de tejido no irradiado se mantuvieron en oscuridad durante el mismo periodo. (2) Representa la relación de LDH liberada al medio calculada como $1b/1a$. (3) Contenido de potasio intracelular expresado en $\mu\text{g/g}$ de tejido determinado 4 hs después de la irradiación.

El uso de este sistema de explantes tisulares, contribuye a aclarar la discusión acerca del rol que cumple la vasculatura tumoral en el daño fotodinámico. Si bien en un explante de 50 mg se conserva la microvasculatura, y no se puede descartar la existencia de daño directo a las células vasculares, la hipoxia como causa de muerte celular está minimizada, debido al aislamiento del tumor de su entorno.

Hampton y Selman (1992) usando cortes de tejido tumoral, también observaron destrucción celular en ausencia de un sistema vascular funcionando, indicando que el efecto fotodinámico tuvo lugar a través de un mecanismo de daño celular directo. Estos autores encontraron asimismo pérdida de K^+ intracelular como evidencia de daño directo sobre membranas tumorales y no sobre vasculatura.

En estos momentos estamos llevando a cabo estudios de microscopía electrónica que contribuirán a dilucidar la naturaleza del daño fotodinámico y a distinguir qué organelas se encuentran principalmente afectadas por la TFD a partir del ALA.

III.6 Conclusiones

- * Empleando el modelo *in vitro* - *in vivo* que hemos desarrollado, fue posible utilizar un láser de baja potencia, y demostrar una correlación entre la concentración de porfirinas y el daño celular. Los explantes tumorales incubados con ALA 0,6 mM durante 1 hora, que acumularon una concentración de porfirinas de 2,6 µg/g tej., luego de ser irradiados, sufrieron un daño tal que condujo a una reducción del 30% al 50% de la masa tumoral al ser implantado en los ratones receptores, comparado con los explantes no irradiados e incubados sin ALA.

- * Cuando los explantes se incubaron bajo las mismas condiciones durante 2 horas, acumulando por lo tanto una mayor concentración de porfirinas (4,6 µg/g tej.), el mismo tratamiento produjo una reducción del 60% al 100%.

- * COPRO, URO y PROTO, porfirinas presentes en el tejido tumoral, son las responsables de la fotosensibilización y destrucción del tejido.

- * La lisis celular y/o los cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática serían las consecuencias inmediatas del daño fotodinámico. En este modelo queda prácticamente descartada la existencia de daño sobre la vasculatura.

- * El modelo *in vitro* - *in vivo* que hemos desarrollado nos permite determinar con un costo reducido, y haciendo uso de láseres de muy baja potencia, la efectividad del tratamiento fotodinámico empleando como fotosensibilizador las porfirinas sintetizadas a partir de ALA. De esta manera es posible seguir con un parámetro fiable, la eficacia de la destrucción de los tumores, en distintas condiciones experimentales y en el caso de combinaciones de esta terapia con otros tratamientos antineoplásicos.

CAPITULO IV

COMBINACION DE LA TFD A PARTIR DE ALA CON DIVERSOS AGENTES ANTINEOPLASICOS

IV.1 Diseño experimental para determinar la eficacia de la TFD combinada con los antineoplásicos.....	199
IV.2 5-Fluorouracilo.....	201
IV.2.1 Efecto del 5-Fu sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos.....	201
IV.2.2 Efecto de 5-Fu sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales.....	201
IV.2.3 Efecto del 5-Fu sobre la efectividad de la TFD del cáncer.....	204
IV.2.4 Conclusiones.....	205
IV.3 Ciclofosfamida.....	206
IV.3.1 Efecto de la CY sobre el camino del hemo.....	206
IV.3.11 Efecto de la CY sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos.....	207
IV.3.12 Efecto de la CY sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tisulares.....	210
IV.3.121 Explantes tumorales.....	210
IV.3.122 Explantes de hígado.....	213
IV.3.13 Efecto de la CY sobre la actividad de la Porfobilinogenasa.....	215
IV.3.14 Efecto de la CY sobre la actividad del ALA dehidrasa.....	216
IV.3.15 Efecto de la CY sobre los niveles de ALA y PBG hepáticos.....	219
IV.3.16 Efecto de la CY sobre el citocromo P ₄₅₀	220
IV.3.17 Conclusiones.....	222
IV.3.2 Efecto de la Ciclofosfamida sobre la eficacia de la TFD.....	223
IV.3.21 TFD con 30 minutos de irradiación.....	223
IV.3.22 TFD con 15 minutos de irradiación.....	225
IV.3.23 Conclusiones.....	229
IV.3.3 Efecto de la CY sobre el metabolismo del glutathion.....	230
IV.3.31 Efecto de la CY sobre los niveles de glutathion intracelular.....	230
IV.3.32 Efecto de la CY sobre la actividad de la glutathion reductasa.....	237
IV.3.33 Efecto de la CY sobre la actividad de la glutathion S-transferasa.....	239
IV.3.34 Conclusiones.....	241
IV.4 Doxorubicina.....	242
IV.4.1 Efectos de la DOX sobre el camino del hemo.....	242
IV.4.11 Efecto de la DOX sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos.....	242
IV.4.12 Efecto de la DOX sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes.....	244
IV.4.13 Efecto de la DOX sobre la actividad del ALA dehidrasa.....	247
IV.4.14 Efecto de la DOX sobre la actividad de la Porfobilinogenasa.....	248
IV.4.2 Efectos de la DOX sobre la LPO.....	249
IV.4.3 Efectos de la DOX sobre la eficacia terapéutica de la ALA-TFD.....	254
IV.4.4 Conclusiones.....	259

IV. COMBINACION DE LA TFD A PARTIR DE ALA CON DIVERSOS AGENTES ANTINEOPLASICOS

Debido a las limitaciones que presenta la práctica de la TFD en tumores de difícil acceso o de gran tamaño, se consideró interesante analizar los efectos antitumorales resultantes de la combinación de esta terapia con algunos agentes quimioterápicos.

La quimioterapia, a diferencia de la TFD, es adecuada para reducir grandes masas tumorales, aunque difícilmente con este tratamiento solo, se logra la erradicación completa de todas las células malignas. En consecuencia, se está investigando la posibilidad de una combinación de ambos tratamientos como una alternativa de interés (Nahabedian, 1988; Cho et al., 1992; Ma et al., 1995).

Con el objetivo de potenciar la TFD a partir de ALA, se seleccionaron 3 drogas antineoplásicas de uso difundido: el alquilante ciclofosfamida, por sus propiedades porfirinogénicas (Wainstok & San Martín de Viale, 1988), el antibiótico antraciclínico doxorubicina, por sus propiedades fotosensibilizantes (Andreoni et al., 1990) y el 5-Fluorouracilo, droga aún no relacionada en ningún aspecto con la TFD.

Para determinar la efectividad del tratamiento combinado ALA-TFD con antineoplásicos, se utilizó el modelo *in vitro* - *in vivo* desarrollado en este trabajo (sección III.3), y además se determinaron los distintos efectos del empleo de las drogas señaladas sobre la biosíntesis del hemo y sobre otros parámetros considerados de importancia para cada droga.

IV.1 Diseño experimental para determinar la eficacia de la TFD combinada con los antineoplásicos

Para determinar la efectividad de la combinación de la ALA-TFD con los agentes antineoplásicos, se adaptó el modelo *in vitro* - *in vivo* desarrollado en este trabajo (sección III.3) a la nueva situación experimental.

Se administró el antineoplásico en estudio a los animales portadores de tumor. A distintos tiempos luego de la última inyección de la droga -según se indique en cada caso- se

sacrificaron los animales y se prepararon 2 explantes de tumor de aproximadamente 2 mg, por cada ratón.

Dichos explantes se incubaron en un medio salino a 37°C con o sin ALA (0,6 mM) durante 2 horas. Al cabo de este tiempo se irradiaron durante 15 ó 30 min. según lo descrito en III.3, mientras que los respectivos controles permanecieron sin irradiar. Inmediatamente después se transplantaron los tumores así tratados, en un ratón receptor para el seguimiento del crecimiento tumoral tal como se ilustra en la Figura IV.1.

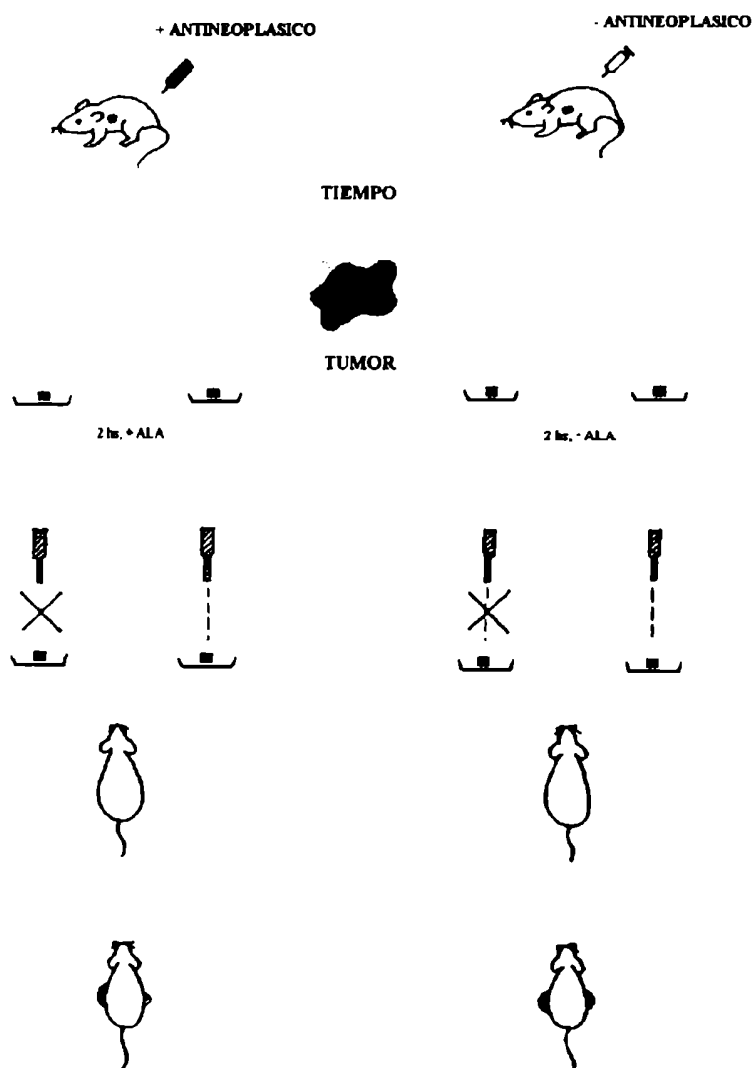


FIGURA IV.1: Diseño experimental para determinar la eficacia de la TFD combinada con antineoplásicos.

Se administraron los antineoplásicos a los ratones, en forma i.p. o i.t. según se indique, y se sacrificaron luego de distintos tiempos de la última dosis de la droga. También se incluyeron controles tratados con solución salina. Se extrajeron los tumores y se cortaron explantes de 2 mg de cada tumor.

Por cada ratón se incubaron dos explantes durante 2 hs en presencia de ALA 0,6 mM o en su ausencia (control S/ALA). De estos, un explante fue irradiado mientras que el otro se mantuvo en las mismas condiciones pero sin irradiar. El primero se transplantó subcutáneamente en el flanco derecho del ratón y el segundo, en el flanco izquierdo del mismo animal. Se siguió el crecimiento del tumor mediante medición de su volumen con un calibre.

IV.2 5-Fluorouracilo

El 5-Fluorouracilo (5-Fu), antimetabolito que se une a la timidilato sintetasa formando un complejo irreversible, sólo ha sido empleado *in vivo* en los trabajos de Cowled et al. (1985; 1987) , en bajas dosis, combinándolo con la TFD. Bajo estas condiciones no se encontró potenciación de la acción antitumoral.

En esta etapa del trabajo, se decidió investigar si la efectividad de la TFD a partir de ALA podía aumentarse con la administración de 5-Fu y si esta droga tenía alguna acción sobre los niveles basales de porfirinas o sobre su síntesis a partir de ALA en explantes tumorales.

IV.2.1 Efecto del 5-Fu sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos

Se administró una dosis de 5-Fu (100 mg/kg) por las vías i.p. e i.t., y se determinó la concentración de porfirinas en tumor, piel, riñón, hígado y bazo hasta las 24 hs post inyección.

De acuerdo a los valores obtenidos (datos no mostrados), el tratamiento con 5-Fu no provocaría cambio alguno en los niveles de porfirinas en ninguno de los tejidos analizados.

IV.2.2 Efecto de 5-Fu sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales

En la Figura IV.2.1a vemos que a las 2 hs post-inyección i.p. se encuentra la máxima concentración de porfirinas en explantes, si bien ésta no es significativamente mayor que el control sin tratar con 5-Fu (-F+A). A las 6 hs se aprecia un mínimo que sí es significativo respecto al control ($p < 0,01$), y hacia las 24 hs se recuperan los los niveles normales.

Cuando el tratamiento fue i.t., no se aprecian cambios significativos, al menos 1 y 2 hs post inyección. El control tratado con 5-Fu i.p. e incubado sin ALA (+F-A) prácticamente no forma porfirinas.

En cambio, vemos que los medios de incubación (Figura IV.2.1b) no muestran los mismos patrones que los explantes, produciéndose una disminución gradual de la concentración de porfirinas a medida que pasa el tiempo después del tratamiento con 5-Fu tanto i.p. (2,6 y 24 hs) como i.t (2 hs) ($p < 0,01$) respecto al control -F+A. El control sin inyectar con 5-Fu (-F+A) presenta valores más altos en comparación con todos los tratados, y el control inyectado con 5-Fu pero incubado sin ALA (+F-A), no forma porfirinas, como ya se había observado para explantes.

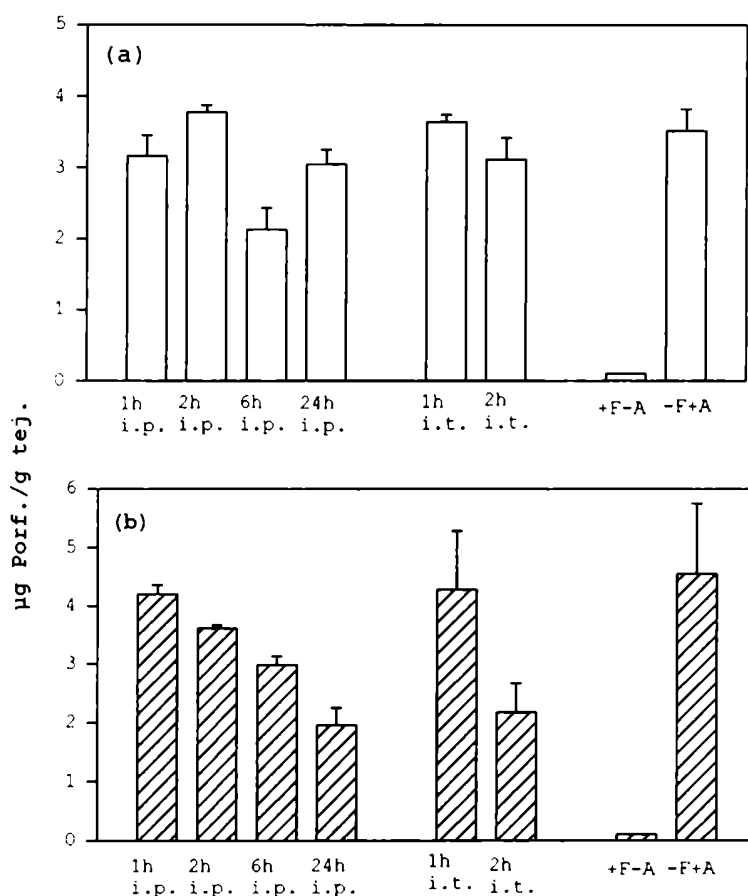


FIGURA IV.2.1: Concentración de porfirinas en explantes y en los respectivos medios de incubación de tumores tratados con 5-Fu

Los valores graficados son un promedio \pm SD de las determinaciones de porfirinas ($\mu\text{g/g}$ de tejido) en los explantes (a) y en los respectivos medios (b) provenientes de ratones sacrificados 1, 2, 6 y 24 hs después de una dosis i.p. de 5-Fu (100 mg/kg) y luego de 1 y 2 hs de una inyección i.t (25 mg/kg). Los explantes de 50 mg se incubaron 2 hs en presencia de ALA 0,6 mM según lo descrito en Materiales y Métodos. Se realizaron controles de explantes incubados sin ALA y provenientes de ratones tratados con 5-Fu i.p. (+F-A) y de ratones no tratados con 5-Fu e incubados con ALA (-F+A).

En la Figura IV.2.2 vemos que, en general, la concentración total de porfirinas es casi del mismo orden que la del control sin tratar con 5-Fu (-F+A) luego de 1 y 2 hs del tratamiento i.p.; a las 6 y 24 hs disminuye significativamente ($p < 0,01$).

En el caso de la administración i.t., se encuentra una disminución a las 2 hs con respecto al control ($p < 0,01$).

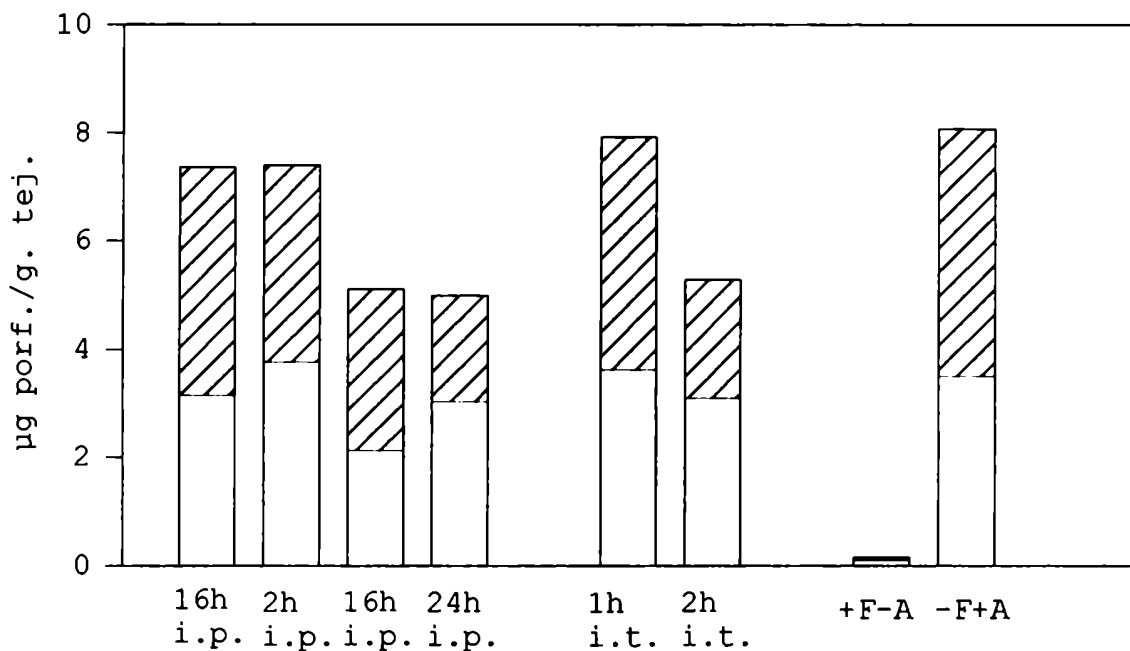


FIGURA IV.2.2: Porfirinas totales sintetizadas en explantes de tumores tratados con 5-Fu.

Los valores graficados son un promedio de la suma de las porfirinas sintetizadas ($\mu\text{g/g}$ de tejido) en explantes tumorales (\square) y en los respectivos medios de incubación (///) luego de 1, 2, 6 y 24 hs de una dosis i.p. de 100 mg/kg de peso, y luego de 1 y 2 hs de una inyección i.t. de 25 mg/kg de peso.

+F-A: control de explantes incubados sin ALA y provenientes de ratones tratados con 5-Fu ; -F+A: control proveniente de ratones sin tratar con 5-Fu e incubados con ALA (-F+A).

Del análisis de estos datos, surge que, a tiempos largos después de la inyección i.p. de 5-Fu (6 y 24 hs) así como también a las 2 hs después de la dosis i.t., la síntesis de porfirinas en explantes de tumor, en lugar de estar exacerbada, se encuentra disminuida. Un efecto inmediato a la administración del 5-Fu es el consumo de folatos intracelulares, debido a la formación del

complejo ternario 5-Fu- Timidilato sintetasa -5,10-CH₂-FH₄ (ver Introducción Figura IV.2) De esta manera, el antineoplásico podría estar depletando a la célula del cofactor necesario para la acción de la PBG-asa.

Por otra parte, esta falta de activación del camino biosintético del hemo, está de acuerdo con lo encontrado por Wainstok & San Martín de Viale (1988) en embriones de pollo, sistema sumamente sensible a los compuestos porfirinogénicos, donde no se encontró un aumento en el contenido de porfirinas hepáticas luego de la administración de 5-Fu.

IV.2.3 Efecto del 5-Fu sobre la efectividad de la TFD del cáncer.

Usando el diseño experimental descrito en IV.1, se calcularon los índices de efectividad para los explantes provenientes de ratones tratados con 5-Fu, e irradiados durante 30 min. Los mayores índices se encontraron en los ratones transplantados con explantes correspondientes a las 2 hs post-tratamiento con 5-Fu i.t. e i.p., siendo del mismo orden que los índices de los controles sin tratar con 5-Fu (datos no mostrados). En todos los demás casos los IE fueron menores que los del control.

En consecuencia, el 5-Fu no produciría ningún efecto potenciador de la acción antineoplásica de las porfirinas al menos en la dosis y tiempos estudiados. Nuestros hallazgos coinciden con los de Cowled et al. (1985; 1987), quienes empleando bajas dosis de 5-Fu (12-50 mg/kg) no encontraron sinergismo con la TFD empleando HpD como fotosensibilizador, en el tratamiento de ratones portadores de carcinoma de Lewis.

IV.2.4 Conclusiones

- * La administración i.p. del 5-Fu no modificó los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos de animales portadores de tumor.

- * El 5-Fu en las dosis y tiempos ensayados no produjo ningún efecto potenciador de la acción fotodinámica de las porfirinas sintetizadas endógenamente a partir de ALA, según nuestro modelo para evaluar la efectividad del tratamiento.

- * Debido a que no se encontró ni un aumento en la síntesis de porfirinas a partir de ALA con la administración de 5-Fu, ni tampoco un incremento en el grado de daño tumoral, se concluye que el 5-Fu no es una droga adecuada para administrar simultáneamente con la TFD con el objetivo de lograr una mayor respuesta a éste último tratamiento.

IV.3 Ciclofosfamida

Entre los antineoplásicos seleccionados para estudiar la eficacia de su combinación con la TFD a partir de ALA, se seleccionó la ciclofosfamida (CY), droga que ejerce su acción alquilante sobre el ADN, luego de la activación hepática por el Cit P₄₅₀. Además, ya hemos señalado que también se han descripto propiedades porfirinogénicas para la CY.

Se estudiaron los efectos de la CY sobre la biosíntesis del hemo y sobre el metabolismo de GSH, luego de su administración a ratones portadores de tumor.

También se analizó la respuesta de los tumores al tratamiento secuencial CY-TFD, usando el modelo *in vitro* - *in vivo* que se ha desarrollado en este trabajo, para determinar la eficacia de la TFD a partir de ALA.

IV.3.1 Efecto de la CY sobre el camino del hemo.

Los trabajos que postulan que la CY puede provocar desórdenes en el camino del hemo (Palma-Carlos et al., 1971; Rizzardini et al., 1983; Wainstok & San Martín de Viale, 1988) y los casos descriptos de pacientes porfíricos con cambios en los parámetros clínicos y bioquímicos (Bhutani et al., 1985; Manzione et al., 1988) por la administración de dicho antineoplásico, nos llevaron a pensar que la CY podría llegar a aumentar la síntesis de porfirinas en nuestro modelo con explantes tisulares, y de esta manera, aumentar la eficacia de la TFD a partir de ALA.

Con estas bases, se decidió estudiar la acción de dicho antineoplásico sobre el camino del hemo. Para ello se midieron niveles basales de porfirinas, ALA, PBG, Cit P₄₅₀; actividad de las enzimas PBG-asa y ALA-D en ratones tratados con CY; y biosíntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tisulares de esos mismos animales.

IV.3.11 Efecto de la CY sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos.

En la Figura IV.3.1 se observa que la CY no provoca cambios significativos en la formación de porfirinas en ninguno de los tejidos analizados.

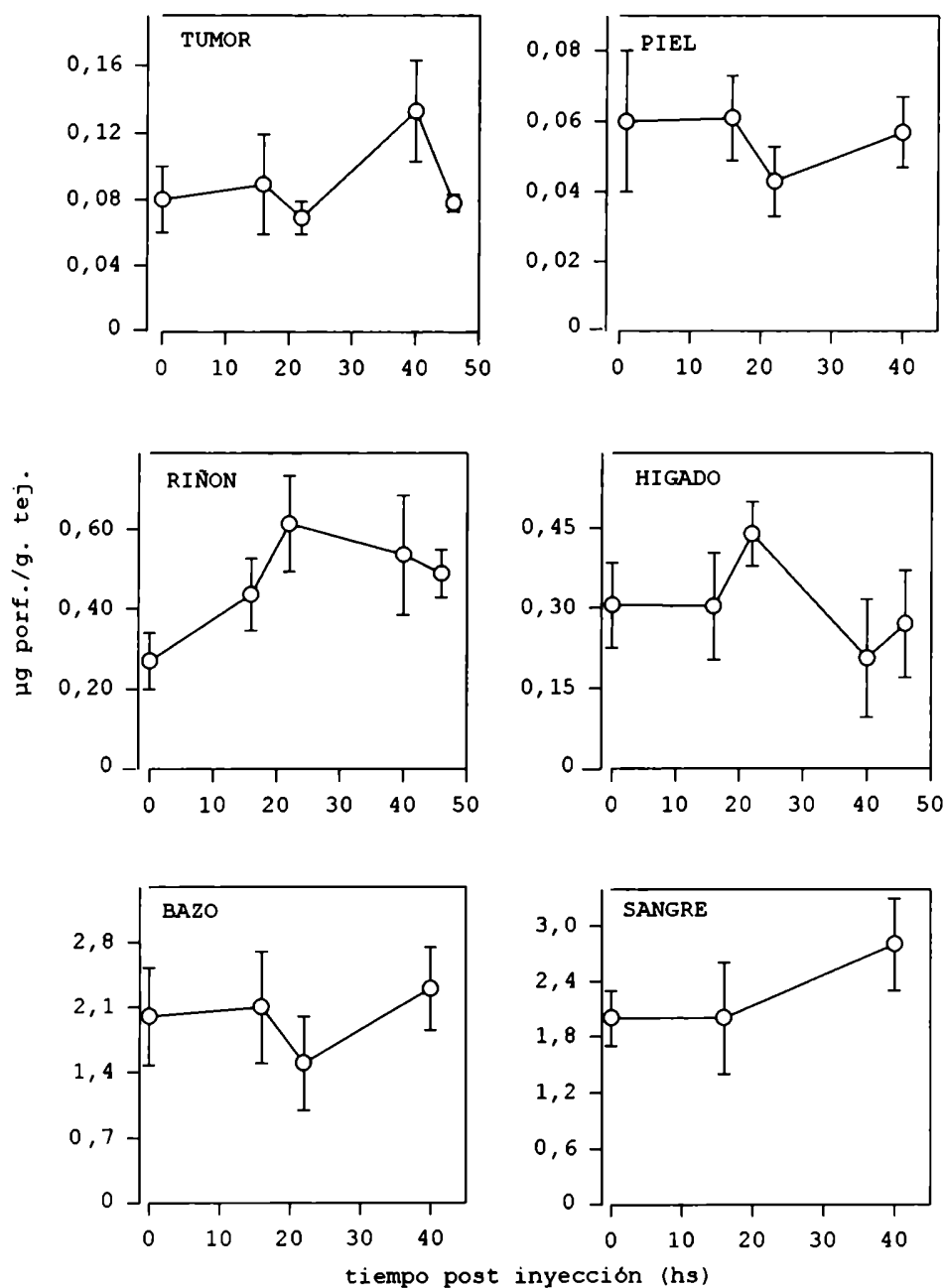


FIGURA IV.3.1: Concentración de porfirinas en hígado, tumor, bazo, piel, sangre y riñón de ratones tratados con CY i.p.

Los valores son un promedio \pm SD de las determinaciones espectrofotométricas y espectrofluorométricas de la cantidad de porfirinas acumuladas a los tiempos indicados luego de dos dosis i.p. de 35 mg de CY/kg de peso. El valor a tiempo 0 corresponde al control sin inyectar. Las demás condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos. Las concentraciones de porfirinas en sangre están expresadas en $\mu\text{g porf./ml}$.

Cabe notarse, sin embargo, que en los ratones tratados con CY se apreció un efecto tóxico importante, reflejado en un 75% de disminución en el tamaño del bazo.

En la Figura IV.3.2 vemos que tanto en sangre como en bazo y riñón, que son los tejidos en los que queda mayor cantidad de sangre luego de la perfusión, hay un aumento en la concentración de porfirinas luego de las 16 hs post inyección i.t. en comparación con el control sin inyectar.

En hígado, tumor y piel no hay diferencias significativas entre los animales tratados y no tratados.

En los ratones inyectados con CY independientemente de la vía de administración y de los distintos tiempos post-inyección, los niveles de porfirinas en orina y materia fecal, aún teniendo en cuenta la gran dispersión en los datos, no revelaron tampoco diferencias significativas con respecto al control (datos no ilustrados).

A diferencia de nuestros resultados, Palma-Carlos et al. (1971), encontraron que la CY inducía en ratas un aumento irregular en la eliminación renal e intestinal de porfirinas así como también un leve aumento en las porfirinas hepáticas; aunque debe observarse que en ese trabajo la CY se administró en forma crónica (18 días, 10 mg/kg) y por intubación gástrica.

También se calcularon los índices de porfirinas plasmáticas en los ratones inyectados con una dosis de 35 mg/kg de ratón, y se encontró que tanto los animales tratados como los controles presentan índices de 1, que corresponde a valores normales, es decir, a concentraciones normales de porfirinas circulantes.

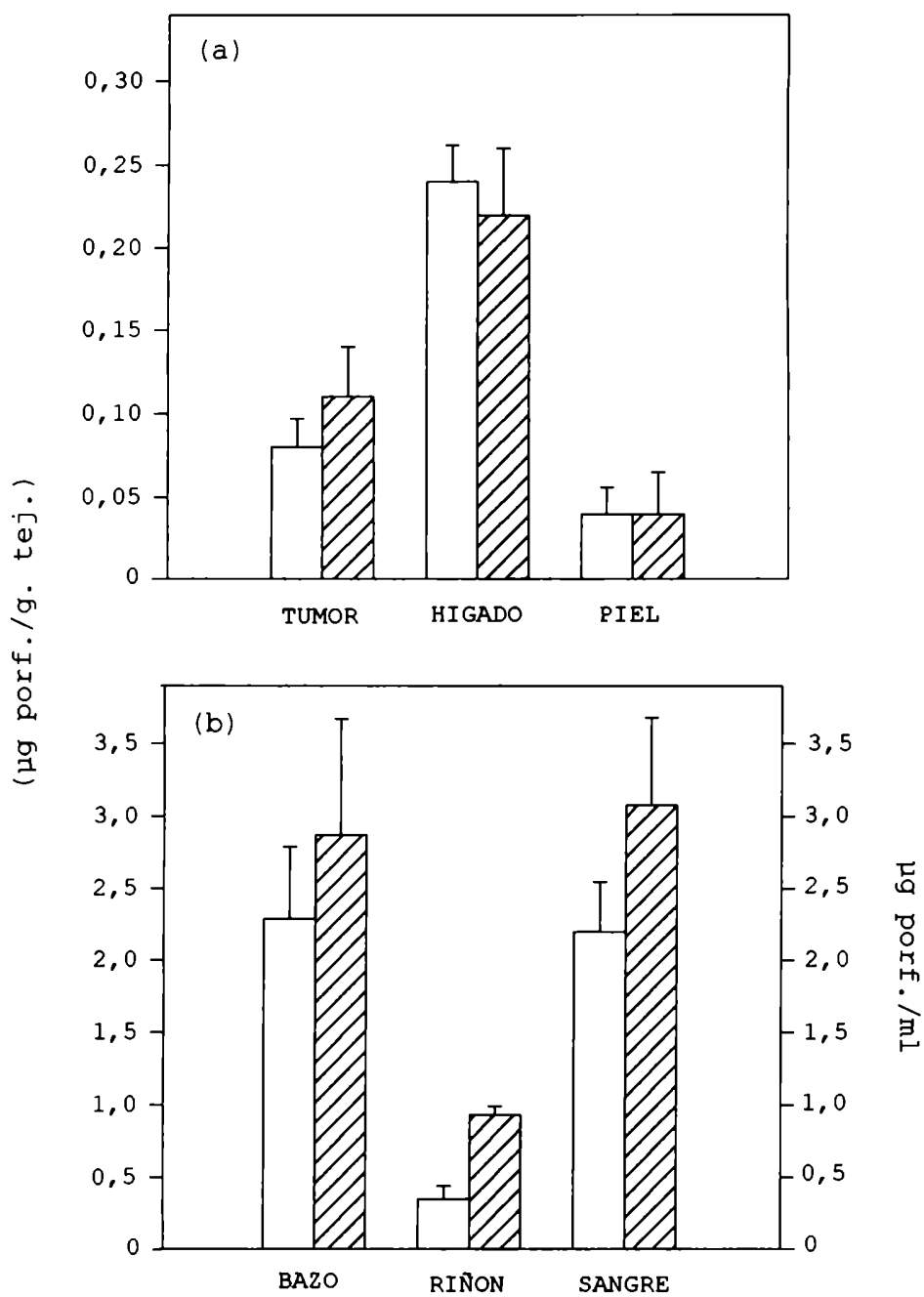


FIGURA IV.3.2: Concentración de porfirinas en tumor, hígado y piel y en bazo, riñón y sangre de ratones tratados con CY i.t..

Los valores representan un promedio \pm SD de la cuantificación espectrofluorométrica y espectrofotométrica de la cantidad de porfirinas (expresada en $\mu\text{g/g}$ de tejido), acumulada en los distintos tejidos luego de 16 hs de la última dosis i.t. de 9 mg de CY/kg de peso (▨) y en los controles sin inyectar (□). La concentración en sangre está expresada como μg porfirinas/ml.

IV.3.12 Efecto de la CY sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tisulares.

IV.3.121 Explantes tumorales

En los explantes de tejido tumoral (Figura IV.3.3a) se observa que a las 16 hs post inyección i.p. de CY, la concentración de porfirinas es un 30% menor que la del control sin inyectar (-C+A); a las 22 hs sigue habiendo una disminución del 20%, pero a las 40 hs, la concentración supera en un 20% a la del control.

En los explantes correspondientes a las 16 hs post inyección i.t. de CY, la concentración de porfirinas es sólo ligeramente mayor que la del control no tratado con CY.

Estos resultados de la síntesis de porfirinas a tiempos cortos, podrían atribuirse a una inhibición por metabolitos de la CY. Esta situación se revertiría hacia las 40 hs, cuando las células se han recuperado y/o eliminado la droga. El 20% de aumento en la acumulación de porfirinas a tiempos largos respecto al control, podría deberse a una activación o aún a un bloqueo de alguna de las enzimas del camino del hemo por la CY.

Los controles sin ALA, tanto en el caso de haber recibido o no la CY forman alrededor de 0,10 μg de porfirinas/g de tejido, concentraciones correspondientes a los niveles basales en tumor; y los explantes incubados en presencia de ALA + CY en el medio de incubación muestran valores similares a los de los explantes del ratón control incubado con ALA y sin tratar con CY, indicando que la CY *per se*, es decir agregada al medio de incubación, no altera la capacidad de síntesis de porfirinas por el tumor a partir de ALA.

En los medios de incubación de los explantes tumorales (Figura IV.3.3b), vemos patrones similares a los de los explantes correspondientes, indicando que la cantidad de porfirinas liberadas al medio es proporcional a su síntesis. Se puede observar que en el caso de las 40 hs post inyección i.p., la liberación de porfirinas al medio es más del doble de la correspondiente a las 16 y 22 hs.

Al igual que en en explantes, se observa que la concentración de porfirinas es un 20% mayor en el medio correspondiente a las

40 hs i.p. que en el control -C+A; mientras que en el correspondiente a las 16 hs i.t. y a la placa conteniendo CY + ALA (+C+A) se encuentra una acumulación de porfirinas similar al control.

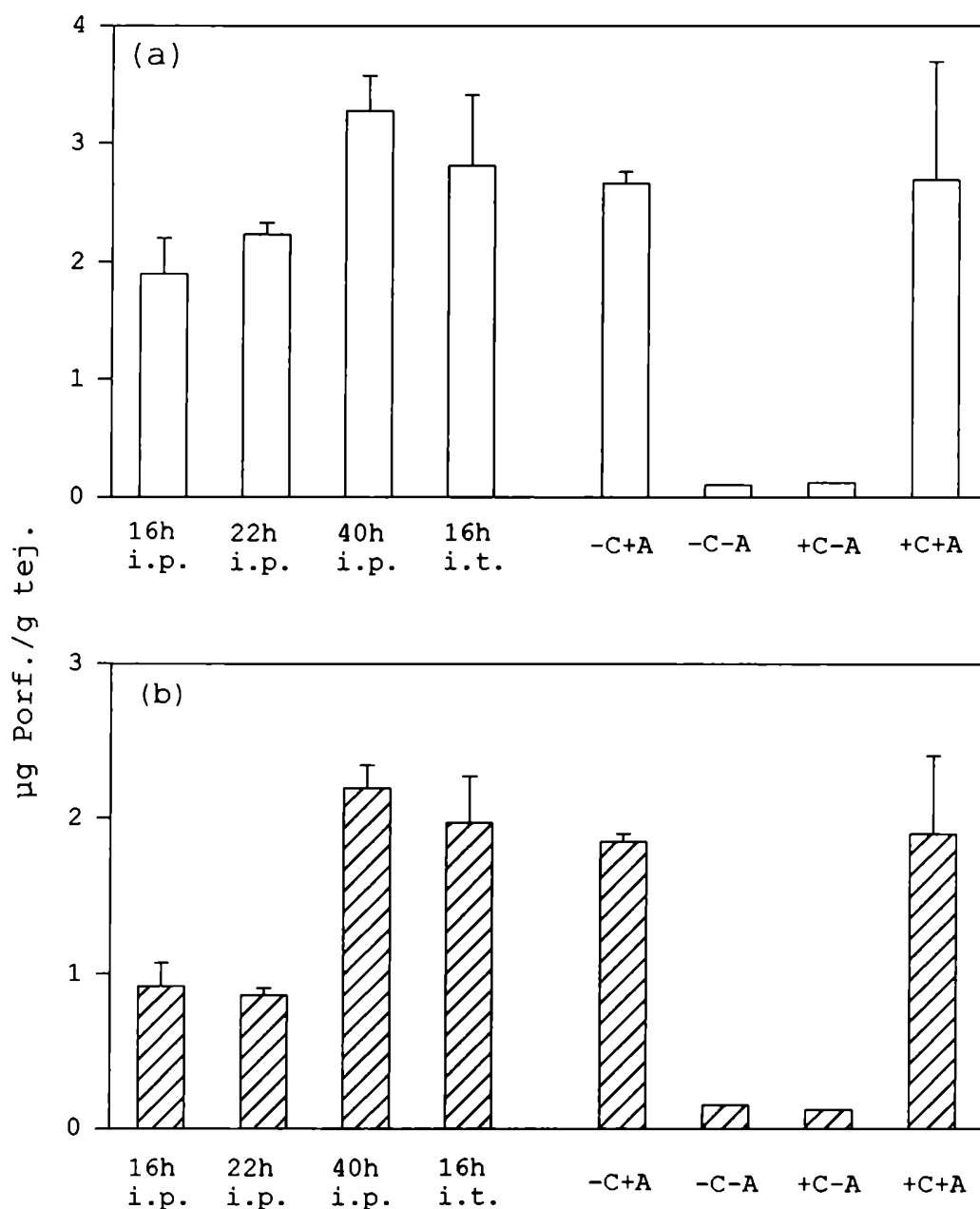


FIGURA IV.3.3: Concentración de porfirinas en explantes de tumores tratados con CY y en los respectivos medios de incubación.

Los valores graficados son un promedio \pm SD de las determinaciones de porfirinas ($\mu\text{g/g}$ de tejido), en los explantes tumorales (a) y en los respectivos medios de incubación (b), de ratones sacrificados luego de 16 y 40 hs desde la última dosis i.p. de CY (35 mg/kg), y luego de 16 hs de la última inyección i.t. (9 mg/kg) incubados 2 hs con ALA 0.6 mM. Se realizaron controles de explantes incubados sin ALA de ratones tratados con CY (+C-A); de ratones sin tratar con CY e incubados con ALA (-C+A); y de ratones sin tratar con CY e incubados sin ALA (-C-A). También se incubaron explantes en medio conteniendo simultáneamente ALA 0.6 mM y CY en una relación de 140 mg/kg de tejido (+C+A). por cada punto.

En la Figura IV.3.4 vemos una diferencia marcada entre la cantidad total de porfirinas sintetizadas endógenamente a las 40 hs i.p. respecto a los demás tiempos post-inyección tanto i.p. como i.t., superando significativamente ($p < 0,05$) los niveles del control sin tratar con CY (-C+A).

También podemos observar que no existen diferencias entre los niveles de porfirinas hallados en los explantes incubados con CY directamente (+C+A) respecto al control sin tratar con CY (-C+A); ni tampoco entre los controles incubados sin ALA previa inyección (+C-A) o no (-C-A) de CY.

La CY podría tener algún efecto sobre la liberación de porfirinas al medio, ya que en el control -C+A la liberación de porfirinas es del 60% del total, mientras que en los tratados el porcentaje de liberación sube al 70%.

Los medios de las placas incubadas sin ALA, al igual que los explantes correspondientes, prácticamente no acumulan porfirinas.

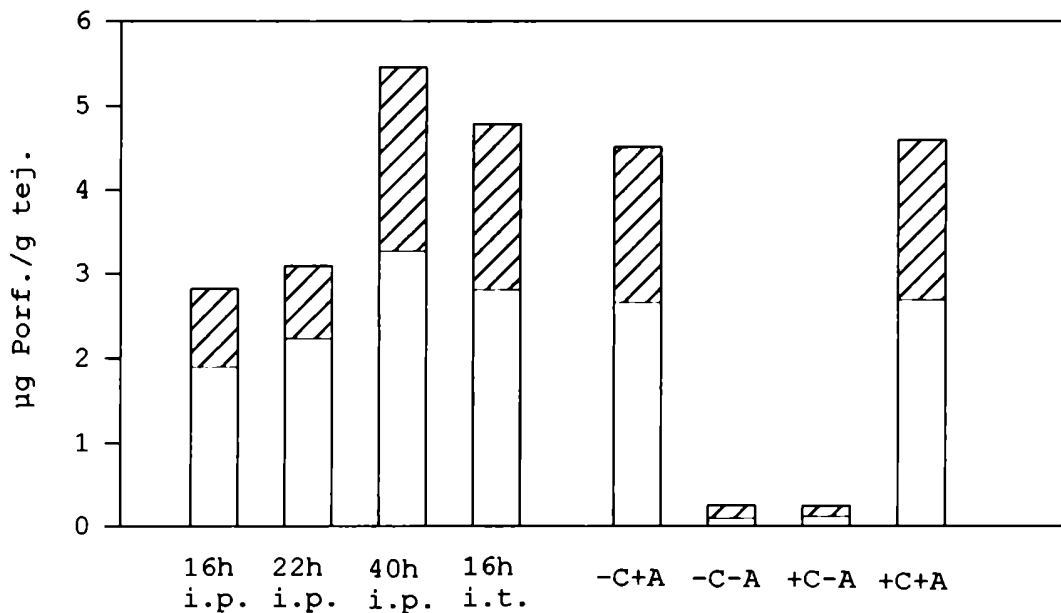


FIGURA IV.3.4: Porfirinas totales sintetizadas en explantes de tumores tratados con CY.

Los valores graficados son un promedio de la suma de las porfirinas sintetizadas ($\mu\text{g/g}$ de tejido) en explantes tumorales (\square) y en los respectivos medios de incubación (hatched), luego de 16 y 40 hs desde la última dosis i.p. de 35 mg de CY por kg de peso, y luego de 16 hs de la última inyección i.t. de 9 mg CY por kg de peso.

IV.3.122 Explantes de hígado

Debido a que el órgano donde se activa la CY es el hígado, se consideró de interés estudiar la síntesis de porfirinas a partir de ALA no sólo en el tumor, sino también en explantes hepáticos de animales tratados con esa droga.

En el caso de los explantes de hígado (Figura IV.3.5a), al igual que en tumor, pero más marcadamente, se observa que el tratamiento con CY disminuye la síntesis de porfirinas a tiempos cortos (16 hs, $p < 0,05$) luego de la última inyección, recuperándose a las 40 hs, donde se encuentra una concentración cercana a la del control sin inyectar con CY, aunque sin alcanzarla.

A las 16 hs después de la última inyección i.t. de CY también hay una caída en la acumulación de porfirinas en los explantes hepáticos ($p < 0,012$), si bien no tan marcada como en el caso i.p.

Los controles incubados sin ALA forman sólo niveles basales de porfirinas. La presencia de CY junto con ALA en el medio de incubación lleva a la síntesis de la mitad de porfirinas (1,44 $\mu\text{g/g}$) del control no tratado con CY (2,99 $\mu\text{g/g}$), probablemente debido a un efecto tóxico de la CY en contacto directo con el tejido hepático y en una relación alta de dosis/tejido.

Los medios de incubación (Figura IV.3.5b) se comportan de manera similar a los explantes correspondientes, pero, y a diferencia de lo que ocurre en el tumor, la cantidad de porfirinas liberadas al medio es más del doble de la que es retenida en el tejido. Se ve una concentración más baja de porfirinas a las 16 hs post-inyección de CY y una más alta a las 40 hs, aunque sin llegar al valor del control no tratado.

Los medios de las placas incubadas sin ALA muestran, al igual que los explantes correspondientes, concentraciones casi nulas de porfirinas.

Los medios de la placa incubada con CY y ALA muestran una concentración de porfirinas marcadamente inferior a la del control no tratado con CY.

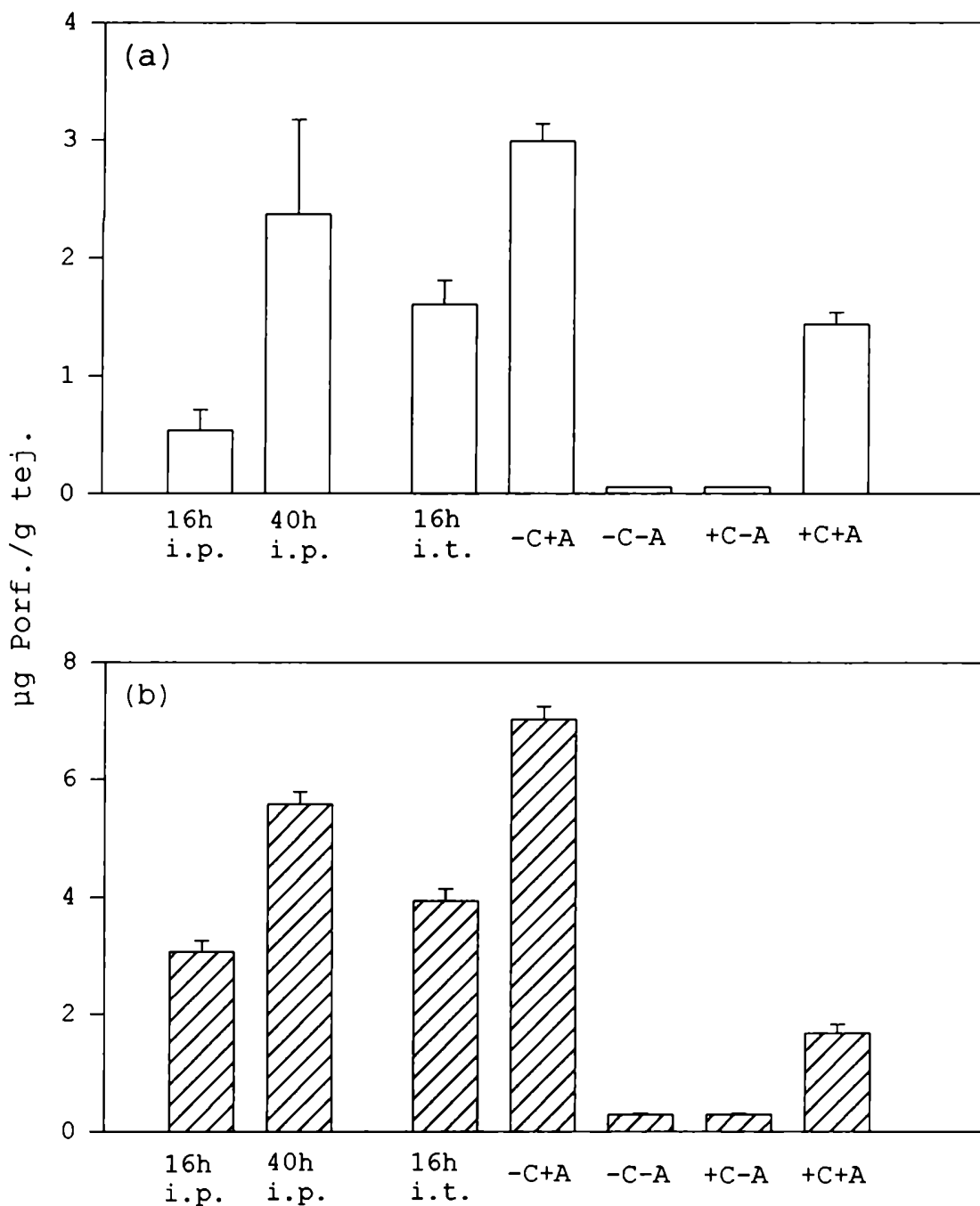


FIGURA 3.5: Concentración de porfirinas en explantes de hígado tratados con CY y en los respectivos medios de incubación.

Los valores graficados son un promedio \pm SD de las determinaciones de porfirinas ($\mu\text{g/g}$ de tejido) en los explantes hepáticos (a) y en los respectivos medios de incubación (b) de ratones sacrificados luego de 16 y 40 hs desde la última dosis i.p. de CY (35 mg/kg), y luego de 16 hs de la última inyección i.t. (9 mg/kg) incubados 2 hs con ALA 0.6 mM. Se realizaron controles de explantes incubados sin ALA de ratones tratados con CY (+C-A); de ratones sin tratar con CY e incubados con ALA (-C+A); y de ratones sin tratar con CY e incubados sin ALA (-C-A). También se incubaron explantes en medio conteniendo ALA 0.6 mM y CY en una relación de 140 mg/kg de tejido (+C+A).

IV.3.13 Efecto de la CY sobre la actividad de la Porfobilinogenasa.

La actividad de la PBG-asa en hígado de ratones tratados con CY y sacrificados 16 hs después, disminuyó un 15% con respecto al control sin tratar; mientras que en los tumores se vio una inhibición del 20% a las 40 hs post CY (Figura IV.3.6).

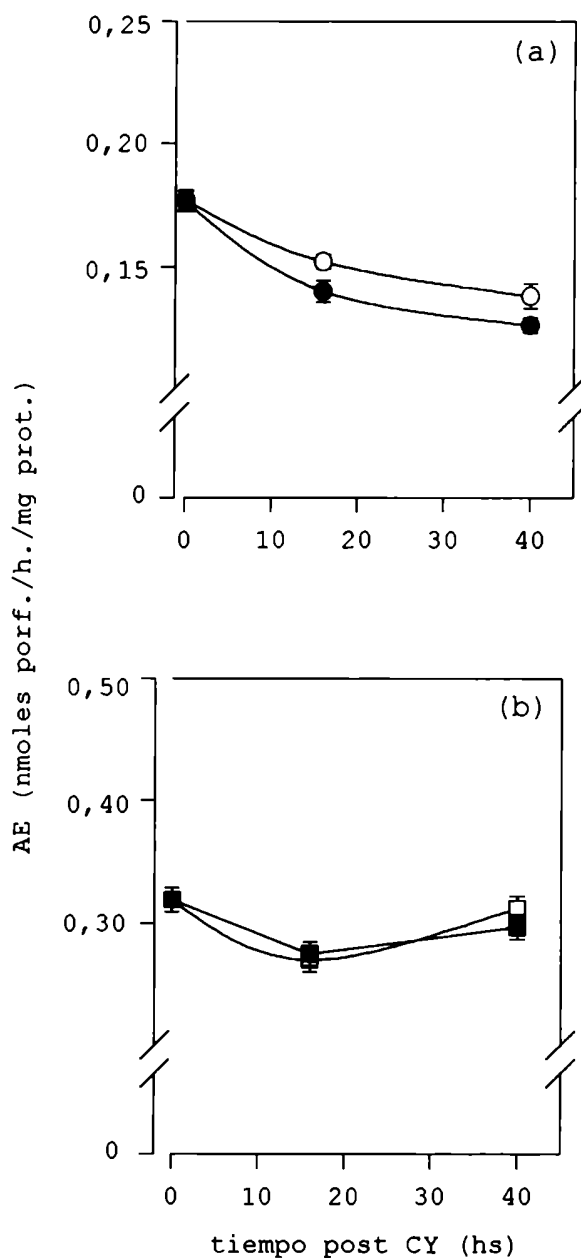


FIGURA IV.3.6: Efecto de la Ciclofosfamida sobre la actividad de PBG-asa en tumor e hígado.

Se inyectó un grupo de ratones con dos (○, □) o tres (●, ■) dosis de 150 mg/kg de CY con un intervalo de 24 hs. Los animales fueron sacrificados 16 y 40 hs a partir de la última dosis y se calculó la actividad específica (nmol porfirinas form./h/mg prot) para el tumor (a) y el hígado (b). Los controles se inyectaron con solución fisiológica.

IV.3.14 Efecto de la CY sobre la actividad del ALA dehidrasa.

Se puede observar en la Figura IV.3.7 que, como consecuencia de la administración de CY, la actividad del ALA-D hepática disminuyó un 15% después de 2 dosis y un 30% con 3 dosis, a las 40 hs luego de la última inyección.

En el tumor, 40 hs después de la administración de 2 dosis de CY se observó una disminución del 30% en la actividad de ALA dehidrasa, y del 40% con 3 dosis. Esta inhibición, sin embargo ya se detectaba a partir de las 16 hs luego de la última inyección.

En este trabajo hemos encontrado disminución en la actividad del ALA-D tumoral y hepática por administración de CY. En contraste con estos resultados, Palma-Carlos et al. (1971), habían descripto la inducción de esta enzima por el agregado *in vitro* de CY a eritrocitos. La discrepancia entre nuestros hallazgos y los del grupo de Palma-Carlos, puede deberse a la carencia de un sistema microsomal activador de la droga en los glóbulos rojos.

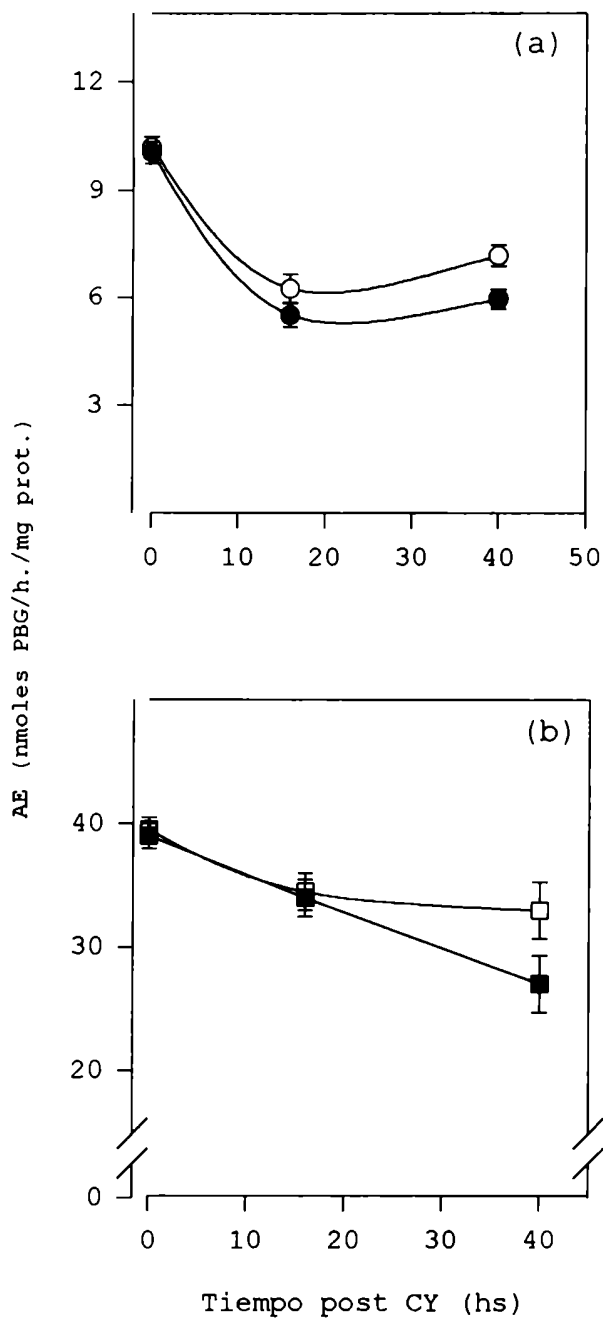


FIGURA IV.3.7: Efecto de la Ciclofosfamida sobre la actividad de ALA-D en tumor e hígado.

Se inyectó un grupo de ratones con dos (○, □) o tres (●, ■) dosis de 150 mg/kg de CY con un intervalo de 24 hs. Los animales fueron sacrificados 16 y 40 hs a partir de la última dosis y se calculó la actividad específica (nmol PBG/h./mg prot.) en el tumor (a) y en el hígado (b). Los controles se inyectaron con solución fisiológica.

En ambos tejidos la disminución en la actividad enzimática tanto del ALA-D como de la PBG-asa, se correlaciona con el mayor número de dosis.

Por otro lado, cabe señalar que las enzimas del tumor son más sensibles a la acción de la CY que las hepáticas, probablemente porque todo el metabolismo en este tejido está exacerbado, o bien por cambios mediados por la CY en el estado oxidativo del tejido, como se discutirá más adelante.

La enzima más sensible al tratamiento con CY es el ALA-D, que como se sabe, es de naturaleza sulfhidrónica. Una explicación a este hecho es la posible alquilación de los grupos sulfhidrilos del sitio activo de la proteína, mediada por uno de los metabolitos de la CY, la acroleína, tal como había sido propuesto para la inactivación del citocromo P₄₅₀ (McClure & Stupans, 1992). Además, Marinello et al. (1981) ya habían descrito la reacción de la acroleína con los grupos -SH de varias enzimas.

Sobre estas bases, y con el objeto de determinar si la acroleína podría ejercer alguna acción inhibitoria sobre el ALA-D, se determinó la actividad de la enzima en presencia de distintas concentraciones de este metabolito, agregado a la mezcla de reacción.

Se observó (Tabla IV.3.1) que la acroleína inhibía la actividad de ALA-D en los tejidos analizados. Mientras que en el tumor una concentración de acroleína de 0,15 mM produjo una inhibición del 52%, en el hígado, esa misma concentración sólo produjo una inhibición del 11%. En este último tejido, el 50% de inhibición recién se logró con una concentración de 0,45 mM del metabolito. En sangre, a bajas concentraciones la acroleína no inhibió el ALA-D, probablemente por el efecto protector del GSH circulante, mientras que con concentraciones mayores, la inhibición llegó, al igual que en el hígado, a un 80%.

La concentración de acroleína plasmática, luego de 40 hs de una dosis de 150 mg/kg de CY, se calculó que era del orden de 0,2 mM (Wagner et al., 1986). De acuerdo con estos datos y en nuestras condiciones experimentales, este metabolito estaría inhibiendo en mayor porcentaje al ALA-D de tumor con respecto a la de hígado, y no habría ningún efecto sobre la enzima de la sangre. Es posible, entonces que sea la acroleína y no la CY per se la responsable de la inactivación del ALA-D.

TABLA VI.3.1: Actividad de ALA-D en presencia de acroleína.

	ACROLEINA (mM)			
	-	0,15	0,45	0,90
TUMOR	100	48	35	40
HIGADO	100	89	53	20
SANGRE	100	100	43	20

Se midió la actividad de ALA-D en tumor, hígado y sangre de ratones portadores de tumor, agregando distintas concentraciones de acroleína en la mezcla de reacción. Los resultados están expresados como porcentaje de actividad respecto al control sin acroleína. Las demás condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

IV.3.15 Efecto de la CY sobre los niveles de ALA y PBG hepáticos

En la Tabla IV.3.2 se puede apreciar que no existen cambios significativos en los niveles de ALA y PBG hepáticos como consecuencia de la administración de CY.

De estos resultados surge que la disminución de la actividad del ALA-D observada en este trabajo (Figura IV.3.7) o del ALA-S, hallada por Rizzardini et al. (1983), no llevaría a la acumulación de sus respectivos sustratos, el ALA y el PBG.

TABLA IV.3.2: Concentración de ALA y PBG en hígado de ratones tratados con CY.

	nmol ALA/g tejido	nmol PBG/g tejido
CONTROL	9,6 ± 0,9	2,41 ± 1,41
16 hs CY	10,6 ± 6,4	1,90 ± 1,16
40 hs CY	11,9 ± 5,4	3,21 ± 2,50

Los ratones fueron tratados con dos dosis de CY de 150 mg/kg y se sacrificaron 16 y 40 hs después de la última inyección. Los hígados fueron perfundidos y se dosaron los niveles de ALA y PBG, según se describe en Materiales y Métodos. Los controles se inyectaron con solución fisiológica.

IV.3.16 Efecto de la CY sobre el citocromo P₄₅₀.

Se ha postulado que la CY, que es activada por el Cit P₄₅₀, inactiva al mismo citocromo, en una reacción de sustrato autosuicida (Leblanc & Waxman, 1990; McClure & Stupans, 1992). La destrucción de esta hemoproteína podría ser el mecanismo inductor de la biosíntesis del hemo (ver Introducción Figura IV.4). Por eso se consideró de interés determinar los niveles de dicho citocromo en tumor e hígado de ratones tratados con CY.

En la Tabla IV.3.2 podemos ver que no existen cambios significativos en los niveles de Cit P₄₅₀ hepático entre los ratones tratados con CY y los controles, descartando así la hipótesis de que la CY estaría inactivando o destruyendo este citocromo y, mediante cambios en el pool de hemo regulatorio, estimulando la síntesis de porfirinas, como ocurre con otras drogas porfirinogénicas (Lim et al., 1980).

Por lo tanto, el aumento del 20% en el contenido de porfirinas en los explantes tumorales (Figura IV.3.3) a las 40 hs post tratamiento con CY, no puede atribuirse a la destrucción y/o inactivación del sistema microsomal.

Sinclair et al. (1987) encontraron que la oxidación de UROgen a UROporfirinas mediada por el Cit P₄₅₀ puede aumentar luego de la administración de ciertas drogas. Esta podría ser una

explicación alternativa al aumento en el contenido de porfirinas que se observa.

Como era de esperar, no se detectó Cit P₄₅₀ en los tumores de animales controles o tratados, de acuerdo con lo encontrado por Navone (1990a) en el adenocarcinoma mamario M3.

TABLA IV.3.2: Niveles de Citocromo P₄₅₀ en hígado de ratones tratados con CY.

	Control	16 HS post CY	40 HS post CY
nmol Cit P ₄₅₀ / mg proteína	0,75 ± 0,46	0,73 ± 0,61	1,13 ± 0,51

Los ratones fueron inyectados con dos dosis de CY (150 mg/kg) y se sacrificaron 16 y 40 hs después de la última inyección. El contenido de citocromo P₄₅₀ se determinó según lo descrito en Materiales y Métodos. Los controles se inyectaron con solución fisiológica

No habiendo indicios de una exacerbación por la CY del camino metabólico del hemo, teniendo en cuenta la actividad de las enzimas estudiadas (ALA-D y PBG-asa), la concentración de los precursores ALA y PBG y los niveles de citocromo P₄₅₀, se postula que el aumento de la síntesis de porfirinas a partir de ALA observada en los explantes 40 hs post CY, se podría deber a una disminución en la metabolización y degradación de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA.

IV.3.17 Conclusiones

- * La CY *in vivo* no provocó cambios notorios en los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos, ni en la concentración de las porfirinas circulantes o su excreción.

- * Explantes tumorales incubados en presencia de ALA, provenientes de ratones tratados con CY 40 hs antes, acumularon un 20% más de porfirinas que los controles.

- * La administración i.p. de CY provocó inhibición de la actividad de PBG-asa y ALA-D, siendo el ALA-D de tumor la enzima más afectada. La acroleína, uno de los metabolitos activos de la CY, podría ser responsable de la inhibición del ALA-D por interacción con sus grupos -SH esenciales.

- * Los niveles de ALA, PBG y Cit P₄₅₀ no fueron afectados por la droga, descartando la hipótesis de que la CY estaría inactivando o destruyendo este citocromo y, mediante cambios en el pool de hemo regulatorio, estimulando la síntesis de porfirinas.

- * No habiendo indicios de exacerbación de la biosíntesis del hemo mediada por la CY, se postula que el aumento en la acumulación de porfirinas a partir de ALA a las 40 hs post inyección se podría deber a una disminución en la metabolización y degradación de las mismas.

IV.3.2 Efecto de la Ciclofosfamida sobre la eficacia de la TFD

Existen muy pocos trabajos acerca de la potenciación de la TFD con el alquilante CY. Cowled et al. (1985; 1987) observaron que el tiempo de recurrencia de tumores murinos no se veía modificado, mediante la administración de 10 mg CY/kg 24 hs antes de la TFD con HpD.

Sin embargo, hasta el momento no se habían ensayado dosis mayores de este antineoplásico, ni combinaciones con otros fotosensibilizantes.

Teniendo en cuenta el aumento de la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales obtenidos de ratones tratados 40 hs antes con CY, observado en la sección IV.3.121, se determinó la efectividad del tratamiento combinado TFD-CY, usando nuevamente el modelo *in vitro* - *in vivo* desarrollado en este trabajo.

IV.3.21 TFD con 30 minutos de irradiación

En la Figura IV.3.8 se muestran las curvas de crecimiento de un explante tumoral de un animal tratado con CY e incubado con ALA 40 hs después y de otro no tratado con CY e incubado en las mismas condiciones. Vemos que a pesar de no haber sido irradiados, el tratamiento con CY produce por sí mismo un retraso en el crecimiento del tumor.

Cuando se llevaron a cabo irradiaciones de 30 min., los explantes irradiados provenientes de 40 y 46 hs post-tratamiento i.p., al igual que los irradiados no tratados con CY, no crecieron al ser transplantados en el flanco derecho de un ratón receptor, a diferencia de los respectivos controles sin irradiar, implantados en el flanco izquierdo del mismo animal que, como se mostró en la Figura IV.3.8, crecieron, aunque unos más que otros.

Esto implica un IE del 100% por irradiación, tanto para el control sin tratar con CY como para los explantes obtenidos a tiempos largos post-inyección, que son los que habían acumulado mayor cantidad de porfirinas.

Como la concentración de porfirinas en los explantes no tratados con CY ya era suficiente para producir un 100% de

destrucción de las células tumorales con 30 min. de irradiación, y con el objeto de visualizar todos los posibles cambios ocurridos, en el protocolo siguiente sólo se irradiaron los explantes durante 15 minutos.

A tiempos cortos (16 hs y 22 hs) post tratamiento i.p. los índices de efectividad varían entre un 80 y un 60% a los distintos tiempos a los que se determinaron los volúmenes tumorales luego de la implantación en un ratón receptor (datos no mostrados). Esta efectividad, menor que el 100% del control sin tratar con CY, era de esperar debido a la menor concentración de porfirinas que se forman a las 16 hs.

En el caso de la administración i.t. de la droga, los IE también son menores que los del control. Este resultado era de esperar, ya que, debido a que el Cit P₄₅₀ no es detectable en el tumor, la activación de la droga por esta vía sería muy baja.

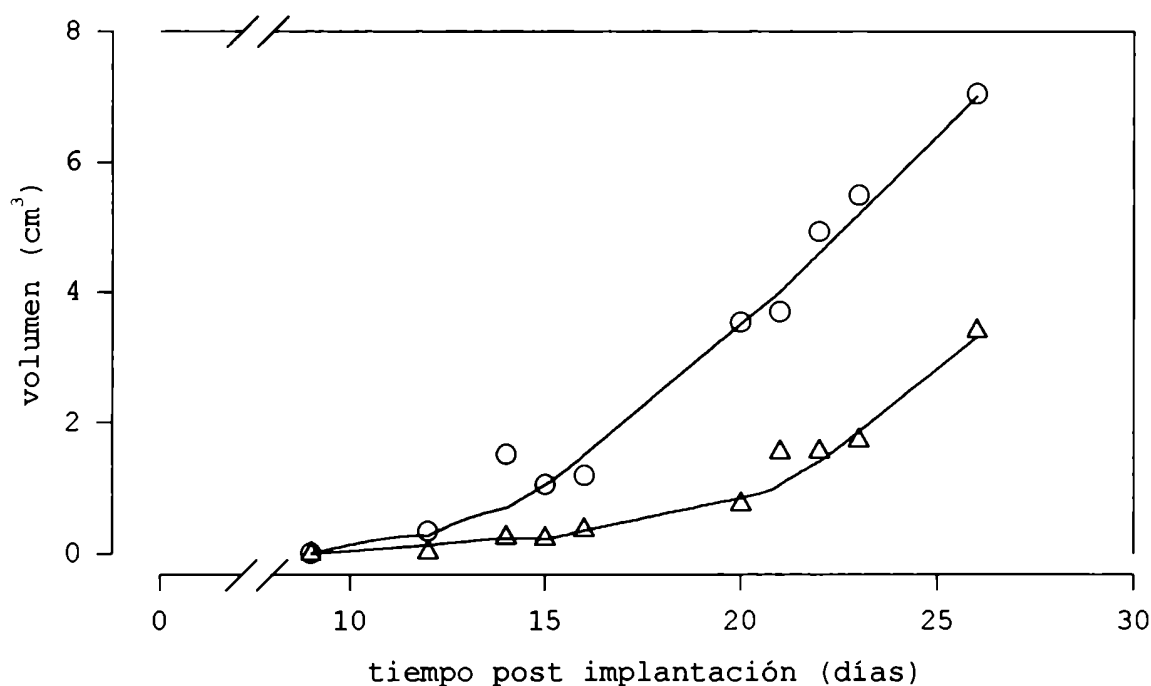


FIGURA IV.3.8: Crecimiento tumoral de explantes irradiados durante 30 minutos.

Los volúmenes tumorales se calcularon a partir del día 9 desde la implantación, cuando los tumores fueron palpables.

(○) Corresponde a un explante incubado con ALA sin tratar previamente con CY y no irradiado.

(△) Corresponde a un explante incubado con ALA luego de 40 hs de la última inyección de CY y no irradiado.

Los respectivos explantes irradiados no crecieron.

Se grafican las curvas de crecimiento tipo de un animal representativo de cada grupo.

IV.3.22 TFD con 15 minutos de irradiación

En este ensayo encontramos que con una irradiación de 15 min. se repite la respuesta del protocolo anterior, donde los explantes irradiados a tiempos largos post tratamiento y el control sin tratar con CY muestran un IE del 100%. A tiempos cortos, así como en el caso de la inyección i.t., los índices son menores.

También se analizó el crecimiento de explantes provenientes de animales tratados i.p. con CY e incubados sin ALA y de animales no tratados e incubados sin ALA, en ambos casos la efectividad fue nula, y los tumores transplantados y a partir de estos explantes crecieron normalmente.

En la Figura IV.3.9 se representa el crecimiento de los explantes incubados post 40 hs de la última dosis de CY, ya que a este tiempo se forma la mayor cantidad de porfirinas endógenamente e, irradiado durante 15 min., es el explante que mayores índices de efectividad presenta.

Vemos que, tanto para los tratados con CY como para los no tratados, la incubación con ALA y el tratamiento lumínico (+CY + ALA +L) conduce a una disminución muy importante en el crecimiento del tumor con respecto a los explantes no irradiados (+CY +ALA -L), que se va haciendo cada vez más marcada a través del tiempo.

Si comparamos entre sí el crecimiento de los dos explantes irradiados, vemos que el tratamiento conjunto (+CY +ALA + L) es más efectivo que el tratamiento con TFD solamente (-CY +ALA +L).

En la curva del explante sin tratar con CY y sin irradiar (-CY +ALA -L), a los 25 días se observa una reducción en el volumen del tumor producto de una necrosis espontánea, debido al gran tamaño del mismo.

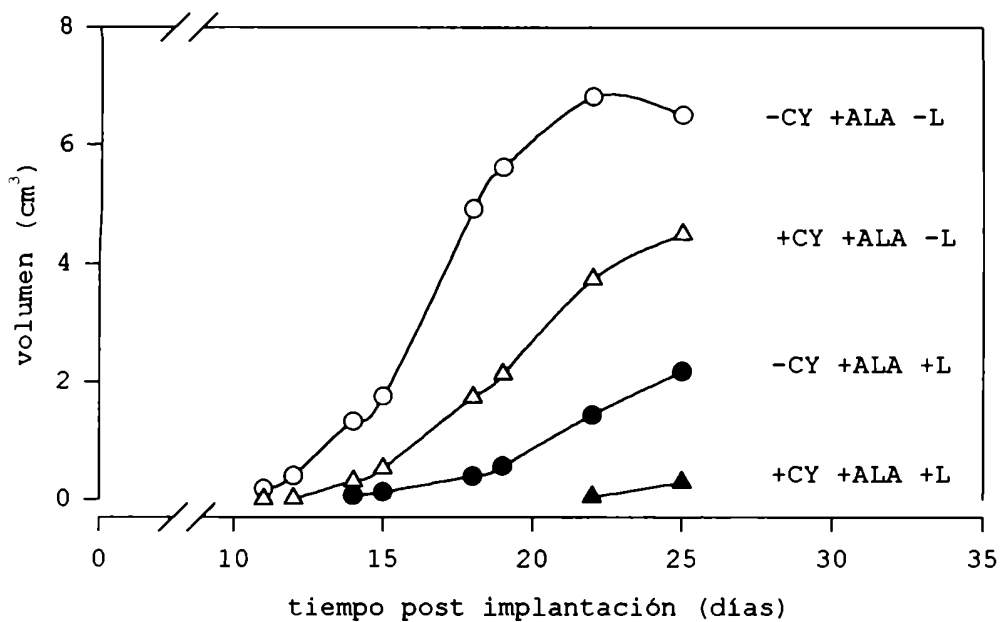


FIGURA IV.3.9: Crecimiento tumoral de explantes irradiados durante 15 minutos.

Los volúmenes tumorales se calcularon a partir del día 10 después de la implantación, cuando los tumores fueron palpables. L = láser 630 nm.

(○) Corresponde a un explante incubado con ALA sin tratar previamente con CY y no irradiado (-CY +ALA -L).

(●) Corresponde a un explante incubado con ALA sin tratar previamente con CY e irradiado (-CY +ALA +L).

(△) Corresponde a un explante incubado con ALA luego de 40 hs de la última inyección de CY y no irradiado (+CY +ALA -L).

(▲) Corresponde a un explante incubado con ALA luego de 40 hs de la última inyección de CY e irradiado (+CY +ALA +L).

Cada curva corresponde al crecimiento de un explante representativo de cada tipo.

En la Figura IV.3.10 vemos que el índice de efectividad es del 100% en los primeros días; esto es debido a que hasta el día 14 no hubo crecimiento de los tumores irradiados, tanto para los explantes tratados con CY como para los controles.

Del día 14 en adelante se empiezan a ver diferencias entre los índices, que son cada vez más marcadas con el transcurso del tiempo. Al día 25, último día que se midieron los volúmenes, hay un 30% más de eficiencia en el tratamiento conjunto +CY +ALA respecto al control -CY +ALA.

Como ya se mencionara, Cowled et al (1987), a diferencia de lo aquí hallado, no habían encontrado mejora en la respuesta de

un tumor transplantable de pulmón, como consecuencia de la administración de una dosis baja de CY (5-10 mg/kg) 24 hs antes del tratamiento fotodinámico con HpD.

Sin embargo, notemos que el uso de bajas dosis de antineoplásico y de un fotosensibilizante exógeno como el HpD, constituyen las condiciones experimentales bastante distintas de las de nuestro trabajo. A diferencia de aquél, en nuestro modelo experimental, donde ocurre una síntesis endógena de porfirinas, se descarta toda posible interacción de la CY con la entrada de las porfirinas a la célula. En este caso, la droga antitumoral podría estar modificando, o bien la entrada de ALA a la célula, o bien la salida de porfirinas.

Los mecanismos por los cuales la asociación de la TFD con agentes antineoplásicos estaría actuando sobre la respuesta de las células tumorales, se podrían dividir arbitrariamente en fotodinámicos, citotóxicos y genéticos (Dima et al., 1990).

Así, el tratamiento fotodinámico podría estar modificando la acción farmacológica de los antineoplásicos a nivel molecular, ya sea interviniendo en la distribución y transporte hacia el tumor, o modificando su actividad en un corto o largo plazo.

A su vez, los agentes antitumorales podrían estar potenciando los efectos de la TFD, mediante la estabilización de hidroperóxidos y otros radicales libres, modificando los receptores subcelulares para el fotosensibilizante, o intensificando los daños subletales producidos en membranas y organelas.

Aparentemente, la CY y la TFD a partir de ALA actuarían sobre sitios subcelulares diferentes, ya que la CY es un alquilante que actúa a nivel del ADN, y la TFD a partir de ALA ejerce su acción principalmente a nivel de membranas y organelas como mitocondrias y lisosomas (Gaulhier et al., 1995). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de un ataque fotodinámico del 1O_2 , producido por la PROTO IX, sobre ácidos nucleicos y proteínas (Foote et al., 1984). Además, recientemente se encontró que en el daño fotodinámico también estarían involucrados mecanismos de apoptosis (He et al. 1994). Resulta difícil, entonces, discernir si la aditividad del efecto de ambos tratamientos se debe a que no comparten los sitios blanco de ataque.

Sin embargo, la adición de los efectos antitumorales, no se observa a todos los tiempos post tratamiento, sino que existe una correlación directa entre concentración de porfirinas y el daño fotodinámico, indicando que la droga estaría actuando principalmente a nivel de la biosíntesis del hemo.

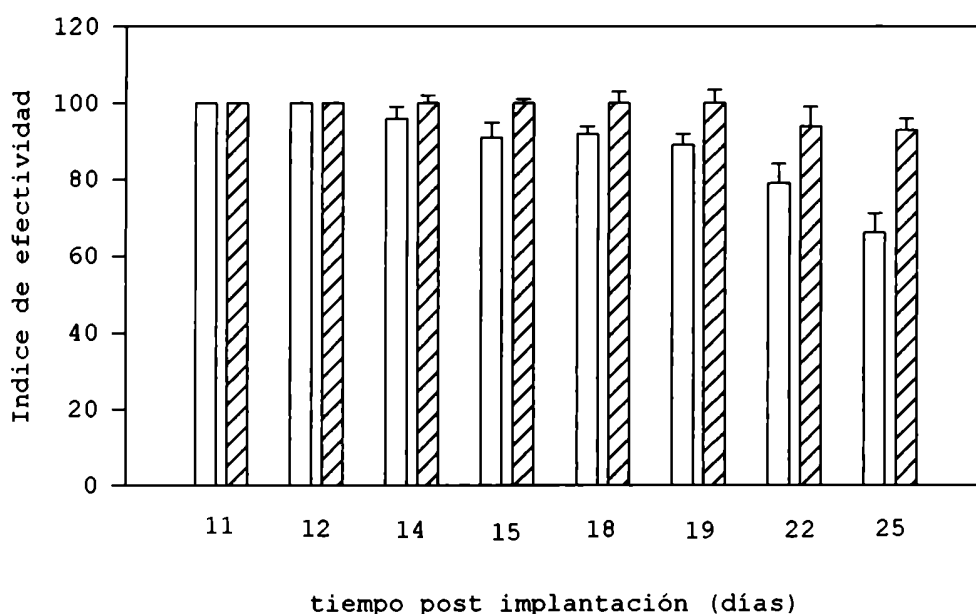


FIGURA IV.3.10: Índice de efectividad del tratamiento con CY.

Teniendo en cuenta los volúmenes de los tumores desarrollados en las condiciones indicadas en la Figura IV.3.9, se calculó el índice de efectividad para los explantes provenientes de ratones sacrificados 40 hs luego de la última inyección de CY (▨), y para los controles inyectados con solución fisiológica (□).

El 100% de IE corresponde a la falta absoluta de crecimiento del explante irradiado.

IV.3.23 Conclusiones

- * La irradiación de un explante tumoral de 1 mm³ durante 30 min., proveniente de un animal control no tratado con CY, que forma 2,8 µg porfirinas/g de tejido, es suficiente para provocar la destrucción o inviabilidad del total de las células tumorales.

- * La irradiación durante 15 min. de un explante tumoral de 1 mm³ proveniente de un animal tratado 40 hs antes con CY y con una concentración de 3,2 µg porf/g tej. es suficiente para producir de un 93 a un 100% de efectividad en el retraso del crecimiento, mientras que el control sin tratar con CY muestra correspondientemente un IE del 63 al 100% a los distintos tiempos en los que se evaluaron los volúmenes tumorales.

- * La correlación entre mayores índices de efectividad y mayor concentración de porfirinas, nos lleva a postular que el efecto aditivo del tratamiento fotodinámico más el alquilante, se debe principalmente a la acción de la CY sobre el camino del hemo.

- * En conclusión, la CY potencia la acción tumoricida fotodinámica de las porfirinas, por lo tanto este antineoplásico puede ser usado en combinación con la TFD a partir de ALA, teniendo en cuenta que la secuencia de administración entre ambos tratamientos sea la adecuada.

IV.3.3 Efecto de la CY sobre el metabolismo del glutathion.

El glutathion, compuesto tiólico que actúa como detoxificante y como antioxidante, protege a las células de la acción citotóxica de la TFD (Rougee et al., 1988; Siemann et al., 1989).

Los mecanismos que median esta acción antioxidante, si bien no están totalmente esclarecidos, se sabe que están relacionados con la capacidad de unirse a radicales libres (Arrick & Nathan, 1984), mientras que, para ejercer su acción detoxificante, en el caso de la CY, lo hace uniéndose a metabolitos activos de la droga, inactivándolos (ver Introducción Figura IV.3).

Además, se han observado aumentos en la actividad de las enzimas GR y G-ST luego de la administración de PROTO IX (Imai et al., 1993) y de CY (Institoris et al., 1993).

Sin embargo, existe información contradictoria acerca de las modificaciones en los niveles de GSH ocasionadas por el tratamiento alquilante. Mientras que algunos autores encontraron depleción del compuesto por conjugación con metabolitos de la CY (Adams et al., 1985; Lee et al., 1991), otros, en cambio, hallaron aumento por inducción de las enzimas que regulan la síntesis (Lock & Ishmael, 1981; Adams et al., 1985).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió determinar el contenido de glutathion total, y las cantidades relativas de GSH y GSSG, además de la actividad de las enzimas GR y G-ST, en tumor e hígado de ratones tratados con CY, evaluando de este modo, los cambios en el estado oxidativo de la célula. Con la información obtenida en este capítulo, se podría, en un futuro, manipular el metabolismo del GSH con el objeto de mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento combinado TFD-CY.

IV.3.31 Efecto de la CY sobre los niveles de glutathion intracelular.

En la Figura IV.2.11a se observa que el contenido de glutathion total (GSH + GSSG) del hígado aumenta como consecuencia del tratamiento i.p. con CY ($p < 0,05$). Estos resultados son

similares a los de Carmichael et al (1986), quienes hallaron un aumento en la concentración de glutathion en granulocitos de ratón, luego de una dosis de CY de 75 mg/kg.

Varios autores han encontrado que la administración *in vivo* de compuestos tiólicos tales como la CY, que inicialmente deprivan a la célula de GSH en el tejido blanco (Lock & Ishmael, 1982; Adams et al., 1985), terminan induciendo un aumento en los niveles de GSH. Este sería el caso del hígado, donde se activa la CY.

Este aumento podría deberse, o bien a una inducción de la síntesis a corto plazo (ya que ese incremento de glutathion se observa a las 16 hs), o a la interconversión proveniente de otras fuentes de tioles intracelulares.

También se puede observar que la presencia del tumor no altera significativamente los niveles de glutathion hepático, ya que los hallados en hígado de ratones no portadores de tumor (NPT) son del mismo orden que los del ratón portador, sin tratamiento (S/CY).

A diferencia de nuestros hallazgos, Boveris et al. (1985) encontraron una disminución del 20% en la concentración total de glutathion en hígado de ratones portadores de un tumor ascítico. Sin embargo, tanto este parámetro, como los otros indicadores de stress oxidativo, se encontraron en las fases tempranas luego de la implantación del tumor.

En la Figura IV.2.11b se puede observar que en tumor no hay cambios significativos en los niveles totales de glutathion luego del tratamiento con el alquilante, si bien se aprecia una ligera disminución a las 40 hs después de la última dosis.

Los niveles de glutathion en hígado (6-8 $\mu\text{mol/g}$ tej.) son mayores que los hallados en tumor (4-5 $\mu\text{mol/g}$); esto es razonable ya que el M2 es un adenocarcinoma mamario, que por su origen glandular no tendría funciones de detoxificación.

Comparando estos valores con los obtenidos por otros autores en ratones Balb/C (7,5 $\mu\text{mol/g}$ hígado y 3,1 $\mu\text{mol/g}$ adenocarcinoma M3) (Navone et al., 1988), hay coincidencia con los datos en hígado y valores ligeramente mayores para el tumor, que a pesar de ser también un adenocarcinoma mamario, se trata sin embargo de una neoplasia con características distintas.

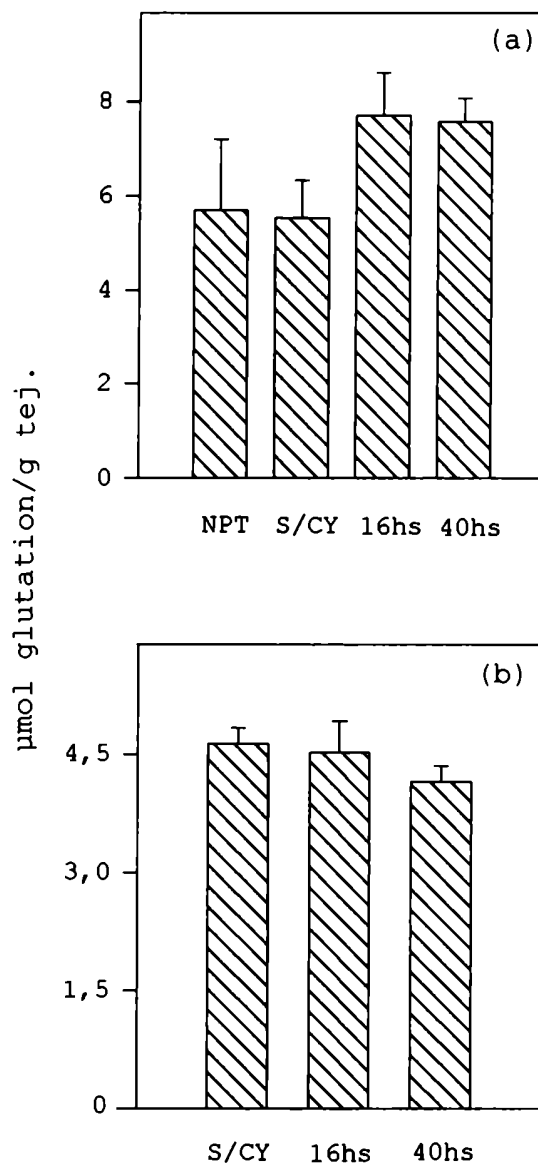


FIGURA IV.3.11: Concentración de glutathione total en hígado y tumor de ratones tratados con CY i.p.

Los animales fueron sacrificados luego de 16 y 40 hs de la última inyección i.p. de 150 mg/kg de peso de CY y se determinaron los niveles de GSH y GSSG en el hígado (a) y el tumor (b) por el método fluorométrico descrito en Materiales y Métodos. Se representan los promedios de las sumas de ambas formas con los desvíos standard correspondientes (barras). Se realizaron controles inyectados i.p. con solución fisiológica (S/CY), y para el caso del hígado se incluyeron también los niveles de glutathione de ratones no portadores de tumores (NPT).

En la Figura IV.3.12 vemos que el aumento en los niveles de glutathione hepático por el tratamiento con CY se debe tanto a una mayor concentración de GSH (Figura IV.3.12a) como de GSSG (Figura IV.2.12b) a las 16 y 40 hs post inyección.

Las diferencias entre los niveles de GSH o de GSSG entre ratones no portadores de tumor y ratones portadores sin tratar con la droga no son significativas, a diferencia de lo hallado por Navone (1988), que encontró una disminución del GSH hepático en los ratones portadores de tumor.

Las discrepancias entre los distintos autores en cuanto a las alteraciones en el estado oxidativo de las células, dependen en gran medida del tiempo al cual se realicen las determinaciones y del tamaño del tumor. Mientras que a tiempos cortos luego de la implantación del tumor, es de esperar que ocurra una respuesta al stress oxidativo con disminución de la concentración de glutation, en particular GSH, a tiempos largos este comportamiento se podría llegar a revertir debido a la inducción de las enzimas del metabolismo del glutation, como parte de la respuesta adaptativa del organismo a la presencia del tumor.

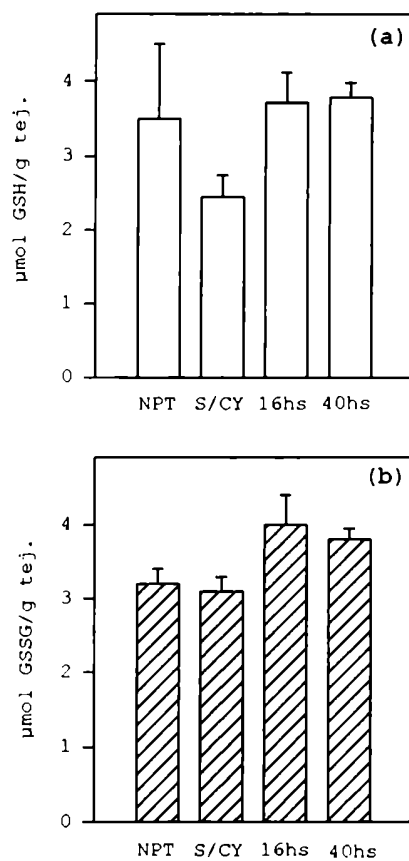


FIGURA IV.3.12: Concentración de GSH y GSSG en hígado de ratones tratados con CY i.p..

Los animales fueron sacrificados luego de 16 y 40 hs de la última inyección i.p. de 150 mg/kg de peso de CY y se determinaron los niveles de GSH y GSSG por el método fluorométrico descrito en Materiales y Métodos. Se representan por separado las concentraciones de glutation reducido (a) y oxidado (b) con los desvíos standard correspondientes (barras). Se realizaron controles inyectados i.p. con solución fisiológica (S/CY), y se incluyeron también los valores de glutation de ratones no portadores de tumor (NPT).

La Figura IV.3.13 muestra que en tumor hay una disminución en los niveles de GSH con la administración de CY, sobre todo a las 16 hs. Dicha disminución es compensada con un aumento en la cantidad de GSSG, lo que hace que los niveles totales permanezcan sin cambios.

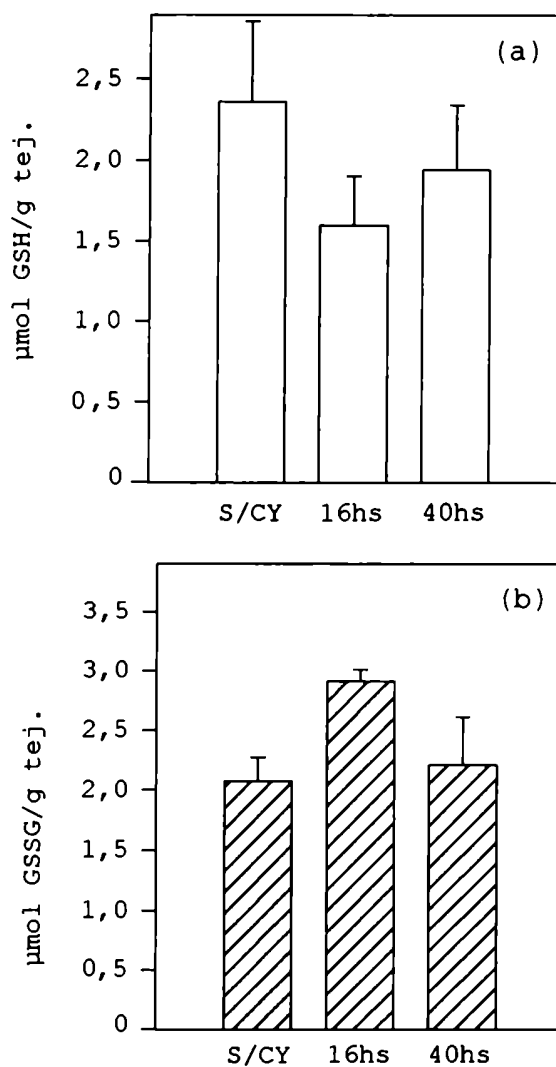


FIGURA IV.3.13: Concentración de GSH y GSSG en tumor de ratones tratados con CY i.p..

Los animales fueron sacrificados luego de 16 y 40 hs de la última inyección i.p. de 150 mg/kg de peso de CY y se determinaron los niveles de GSH y GSSG por el método fluorométrico descrito en Materiales y Métodos. Se representan por separado las concentraciones de glutation reducido (a) y oxidado (b) con los desvíos standard correspondientes

En la Figura IV.3.14 se ve que en hígado los porcentajes de GSH y GSSG son idénticos para ratón portador de tumor y ratón normal y además se observa una tendencia al aumento del

porcentaje de GSH intracelular a expensas de una disminución de GSSG a medida que pasa el tiempo desde el tratamiento con CY. Además en todos los casos el porcentaje de GSSG es mayor que el de GSH.

En el tumor, en cambio, vemos que el porcentaje de GSH es mayor en los animales no tratados (55% GSH y 45% GSSG), relación que se invierte con la administración de CY, haciéndose máxima la diferencia a las 16 hs post inyección (35% GSH y 65% GSSG). Esto nos habla de cambios en el estado oxidativo de la célula.

El glutatión intracelular se encuentra normalmente en su forma reducida en más del 90%, reteniendo un porcentaje menor al 10% para su forma oxidada. En nuestro caso el porcentaje de GSSG es mucho mayor, tanto para hígado como para tumor, aunque hay que considerar que dichos valores podrían estar sobreestimados, ya que el método fluorométrico empleado puede dar valores más altos de GSSG (Beutler et al., 1977). Además, existen trabajos en los cuales se ha encontrado una mayor proporción de GSSG, tanto en plasma como en bilis (Tietze, 1969).

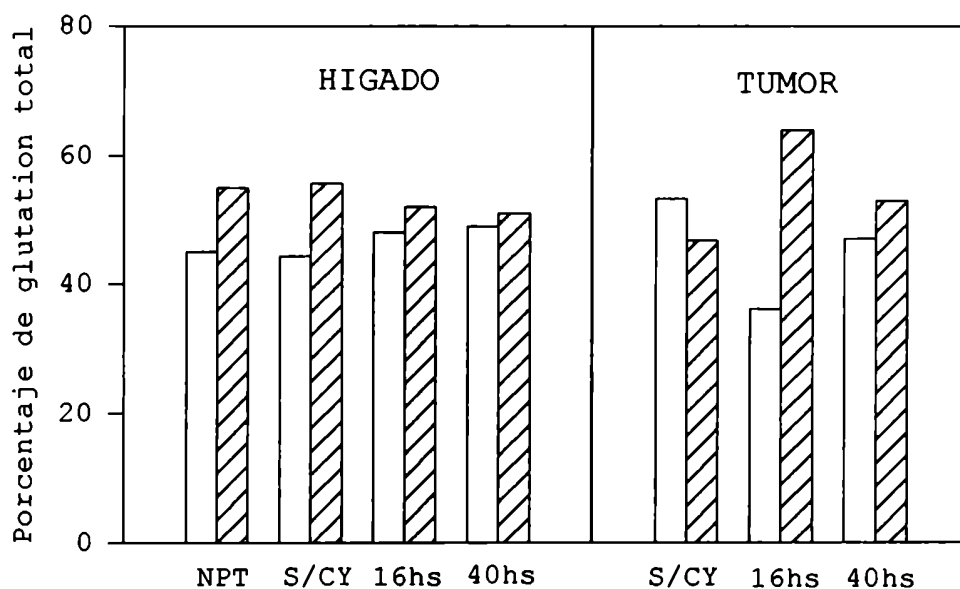


FIGURA IV.3.14: Porcentajes de GSH y GSSG en hígado y tumor de ratones tratados con CY i.p.

Se representan los porcentajes de GSH (□) y GSSG (▨) en hígado y tumor de los ratones tratados con CY, sacrificados 16 y 40 hs después de la última dosis. Se incluyen controles inyectados con solución fisiológica i.p. (S/CY) y, para el hígado, controles de ratón no portador de tumor (NPT).

Aún teniendo en cuenta que los valores absolutos de GSSG podrían estar sobreestimados, comparando los distintos grupos de animales vemos que en tumor, el porcentaje de GSH disminuye con el tratamiento de CY, aumentando el de GSSG.

Se sabe que la producción de GSSG a partir de GSH es un índice de un aumento de toxicidad o de stress oxidativo (Arrick & Nathan, 1984), y que dicha reacción es catalizada por peroxidasas a expensas de la reducción de H_2O_2 y otros peróxidos. Además el GSSG también puede producirse por reacción del GSH con radicales libres.

Estos cambios en el estado oxidativo del tumor mediados por la CY, podrían estar relacionados de alguna manera con la susceptibilidad de las enzimas del camino del hemo a la acción de la CY, observada en las secciones IV.3.13 y IV.3.14.

En particular, la enzima que más se vio afectada por el tratamiento alquilante es el ALA-D, que como ya hemos mencionado, es sulfhidrónica, y necesita de la presencia de reductores tiólicos para exhibir su máxima actividad. Entonces, la deprivación de GSH de las células tumorales dejaría a los grupos -SH más desprotegidos y más fácil de ser atacados por algún metabolito de la CY, o la CY misma.

Apoyando esta hipótesis, también se observó en la sección IV.3.14, que los tejidos más susceptibles a la acción de la acroleína, en concentraciones bajas, son el hígado y la sangre, tejidos que poseen mayor cantidad de GSH intracelular. En cambio, a concentraciones más altas, esta protección se perdería debido a que la acroleína misma se une al GSH (Figura IV.3 Introducción), agotando la protección tiólica de la célula y dejando al ALA-D expuesta a la acción del metabolito activo.

Postulamos entonces que las células tumorales reaccionan ante la presencia de la CY con un cambio en su estado oxidativo, y sería importante estudiar qué cambios se producirían luego de la Terapia Fotodinámica.

IV.3.32 Efecto de la CY sobre la actividad de la glutatión reductasa.

La glutatión reductasa (GR), enzima que cataliza la conversión de GSSG a GSH, contribuye a mantener la proporción correcta de tioles celulares reducidos, y es de suma importancia para la conservación de la integridad celular.

Como enzima de defensa ante la presencia de radicales libres, es inducida en presencia de compuestos extraños como la CY (Institoris et al., 1993).

Sin embargo en la Figura V.3.15 se observa que no existen cambios significativos en la actividad de la GR de tumor ni en la de hígado a los tiempos considerados post tratamiento con CY. La actividad específica de la GR es similar en el hígado y tumor (aproximadamente 60 nmoles de GSSG reducidos/min./mg proteína).

Teniendo en cuenta que ocurre un aumento del porcentaje de GSSG en tumor luego de 16 hs del tratamiento con CY, según se muestra en la Figura IV.3.14, y que estos datos no se correlacionan con una disminución en la actividad de la GR, se podría pensar que esos cambios en los niveles de GSSG podrían deberse a modificaciones en la actividad de otras enzimas involucradas en el metabolismo del GSH, tales como la GPx o bien a la oxidación no enzimática del GSH mediada por radicales libres.

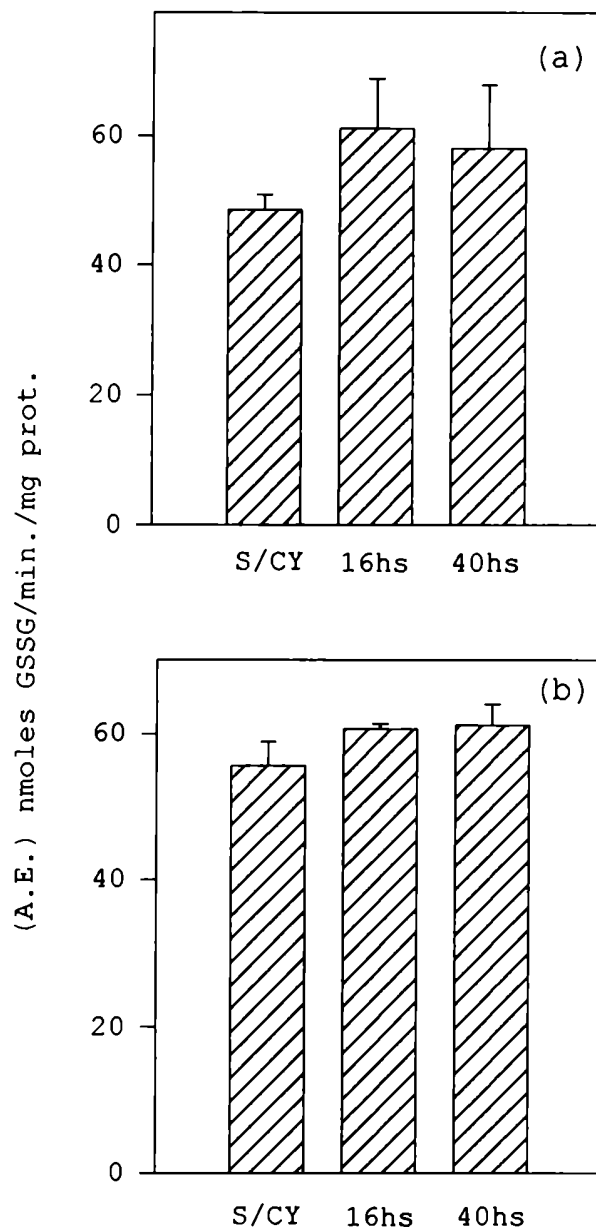


FIGURA IV.3.15: Efecto de la CY sobre la actividad de glutathione reductasa en tumor e hígado.

Se inyectó un grupo de ratones con dos dosis de 150 mg/kg de CY con un intervalo de 24 hs. Los animales fueron sacrificados 16 y 40 hs a partir de la última dosis y se calculó la actividad específica de GR del tumor (a) e hígado (b) como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de un nmol de GSSG por minuto por mg de proteína. Los controles (S/CY) fueron inyectados con solución fisiológica.

IV.3.33 Efecto de la CY sobre la actividad de la glutatión S-transferasa.

La glutatión S-transferasas (G-ST) son una familia de isoenzimas que cataliza la conjugación de sustancias extrañas al organismo, para ser convertido a ácidos mercaptúricos (Figura VI.1 Introducción), que son fácilmente eliminados del organismo, con pérdida irreversible de GSH. Por eso es muy común que estas isoenzimas se encuentren alteradas ante una situación de stress oxidativo (Institoris et al., 1993).

En la Figura IV.3.16 se observa un aumento significativo ($p < 0,005$) en la actividad específica de la G-ST tumoral a las 40 hs luego de la última dosis de CY. En cambio, en el hígado no hubo cambios significativos en la actividad de dicha enzima.

El aumento en la enzima de origen tumoral estaría indicando la formación de conjugados del GSH con metabolitos de la CY, aunque esta producción aumentada de dichos conjugados en las células tumorales no se correlaciona en el tiempo con la caída en los niveles de GSH en dicho tejido (Figura IV.3.13a).

Observando los cambios en el metabolismo del GSH tumoral con el tiempo, se puede apreciar que a las 16 hs post CY, cuando los niveles de GSH disminuyeron a un mínimo, la actividad de G-ST sólo se incrementó levemente, y a las 40 hs, cuando la concentración de GSH se recuperó parcialmente, la actividad de G-ST se incrementó en un 100% respecto del control sin tratar con CY (Figura IV.3.16a). Esto estaría indicando una recuperación de las células, luego de un tiempo de la injuria, del stress causado por la droga.

Nuestros resultados están de acuerdo con los de Institoris et al. (1993) y Colvin et al. (1993), quienes encuentran una correlación entre la depleción de glutatión y un aumento de las G-ST en células leucémicas.

La actividad G-ST en hígado (4 ± 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot.) es mayor que en el tumor ($0,2 \pm 0,1$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot.), siendo estos valores similares a los encontrados por Smith (1987) para hígado normal murino y diversos tumores humanos; éstos últimos presentan que presentaban una variación desde 0,21 hasta 0,81 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot.

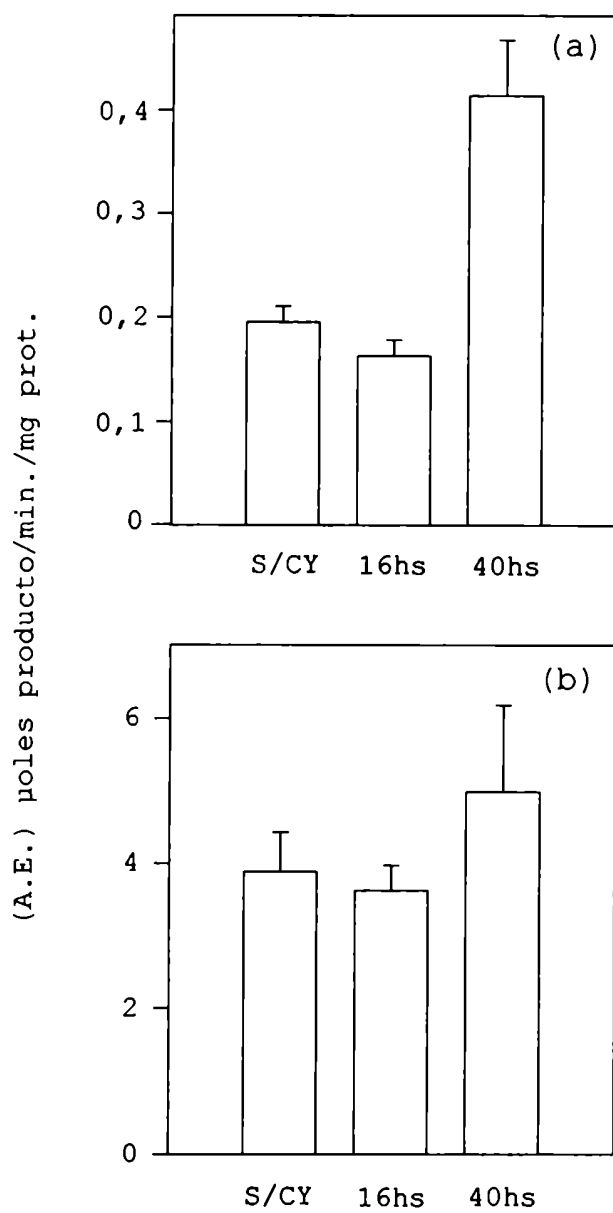


FIGURA IV.3.16: Efecto de la Ciclofosfamida sobre la actividad de glutathione S-transferasa en tumor e hígado.

Se inyectó un grupo de ratones con dos dosis de 150 mg/kg de CY con un intervalo de 24 hs. Los animales fueron sacrificados 16 y 40 hs a partir de la última dosis y se calculó la actividad específica de G-ST en el tumor (a) e hígado (b) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de producto por minuto por mg de proteína. Los controles (S/CY) fueron inyectados con solución fisiológica.

IV.3.34 Conclusiones

- * Si bien el tratamiento con CY no modificó significativamente los niveles de glutathion total en tumor, la relación GSH/GSSG se vio afectada, observándose una disminución de la misma, lo que estaría indicando un cambio en el estado oxidativo del tejido como respuesta a la presencia de la droga.
- * Los cambios en el estado oxidativo del tumor podrían explicar la mayor susceptibilidad de las enzimas del camino del hemo, en particular el ALA-D, al tratamiento con el alquilante.
- * En el hígado, órgano donde la CY es activada, en cambio, se observa un aumento en la concentración total de glutathion, sin modificaciones importantes en la relación GSH/GSSG.
- * La actividad de G-ST aumentó significativamente a las 40 hs post CY, probablemente debido a la formación de conjugados con la droga.
- * No se observaron cambios significativos en la actividad enzimática de la GR.
- * A tiempos largos (40 hs) de la administración de la CY, la célula se recuperaría del stress oxidativo, regulando la relación GSH/GSSG y aumentando la actividad de G-ST.
- * Teniendo en cuenta la cinética de la depleción del GSH de las células tumorales mediada por la CY, resultaría de interés estudiar el comportamiento del metabolismo de tioles tumorales frente al daño fotodinámico, y de acuerdo a ello, considerar la posibilidad de modular los niveles de tioles intracelulares mediante la administración de compuestos generadores de los mismos o inhibidores de su síntesis.

IV.4 Doxorubicina

Existen numerosas evidencias sobre la fotosensibilidad inducida por las antraciclinas (Andreoni et al., 1990); también hay trabajos acerca de la combinación de la TFD empleando HpD con la DOX (Cowled et al, 1990; Nahabedian et al., 1988). Además, tanto la TFD como la DOX ejercerían su acción tumoricida por reacciones mediadas por radicales libres (Weishaupt, 1976; Gray, 1982).

Sobre estas bases, se decidió llevar a cabo un estudio con el antineoplásico DOX, siempre con el objetivo aumentar la citotoxicidad de la TFD a partir de ALA.

En una primera etapa se analizaron los efectos de la DOX sobre la biosíntesis del hemo y sobre la oxidación de las membranas biológicas. En una segunda etapa, se estudió la eficacia del uso combinado de la DOX junto con la TFD a partir de ALA.

IV.4.1 Efectos de la DOX sobre el camino del hemo.

IV.4.1.1 Efecto de la DOX sobre los niveles basales de porfirinas en los distintos tejidos

El tratamiento con DOX en dosis bajas (datos no mostrados) o en altas dosis (Figura IV.4.1) no produjo cambios significativos en la concentración de porfirinas en tumor, hígado y corazón a los tiempos ensayados.

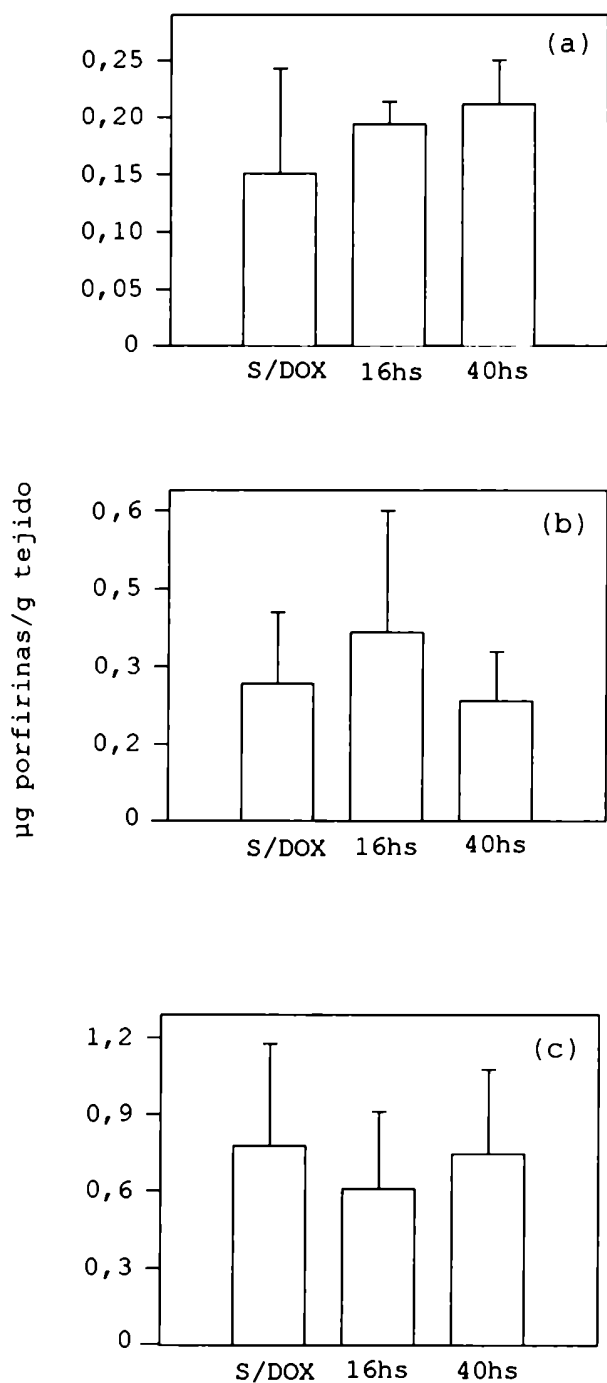


FIGURA IV.4.1: Contenido de porfirinas en tumor, hígado y corazón de ratones tratados con DOX

Los ratones fueron tratados con una sólo dosis de 30 µg/kg de DOX y se sacrificaron luego de 16 y 40 hs. Se determinó por espectrofotometría el contenido de porfirinas (mg/g de tejido) en tumor (a), hígado (b) y corazón (c) como se describe en Materiales y Métodos. Los ratones controles se inyectaron con solución fisiológica (S/DOX).

IV.4.12 Efectos de la DOX sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes

En la Figura IV.4.2a se observa que la DOX no provoca cambios significativos en la acumulación de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales con respecto a los controles provenientes de ratones sin tratar (-D+A). Por otra parte, cuando los controles de explantes provenientes de ratones tratados y no tratados con DOX (+D-A; -D-A), se incubaron en ausencia de ALA, prácticamente no sintetizaron porfirinas.

En cuanto a los medios de incubación (Figura IV.4.2b), se puede observar que el explante de tumor tratado 40 hs antes con DOX libera al medio una cantidad de porfirinas significativamente menor que la del control (-D+A). Sin embargo, esto no implica una mayor retención de las mismas en el tejido, y en definitiva la concentración total de porfirinas sintetizadas en este explante es menor (Figura IV.4.3). Como era de esperar, los medios de los controles sin ALA, tampoco liberaron porfirinas al medio.

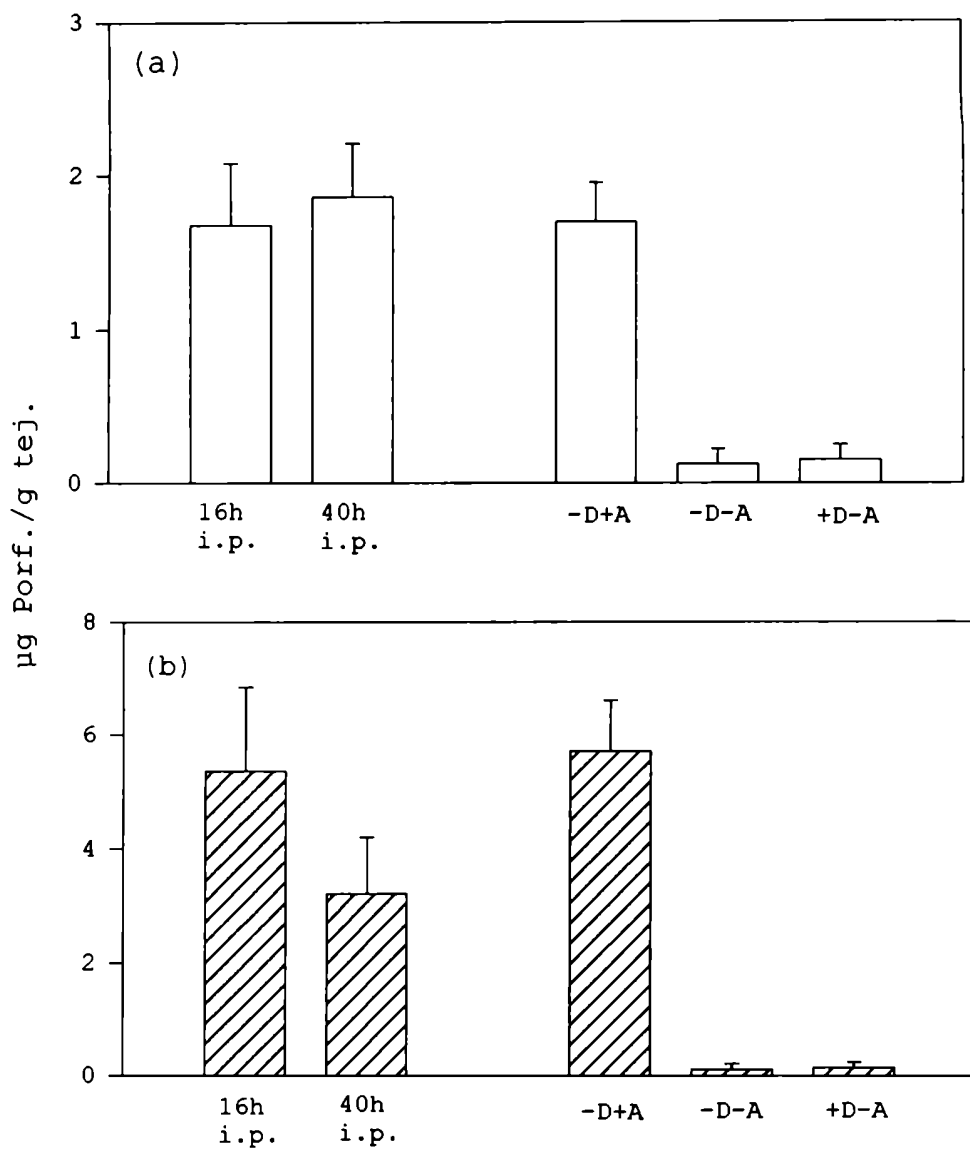


FIGURA IV.4.2: Concentración de porfirinas en explantes de tumores tratados con DOX y en los respectivos medios de incubación.

Los valores graficados son un promedio \pm SD de las determinaciones espectrofotométricas y espectrofluorométricas (expresadas en μg porfirinas/g de tejido), en los explantes tumorales (a) de ratones sacrificados luego de 16 y 40 hs de una dosis de 5 mg/kg de DOX incubados 2 hs con ALA 0.6 mM, y en los respectivos medios de incubación (b). Se realizaron controles de explantes incubados sin ALA de ratones tratados con DOX (+D-A); de ratones sin tratar con DOX e incubados con ALA (-D+A); y de ratones sin tratar con DOX e incubados sin ALA (-D-A).

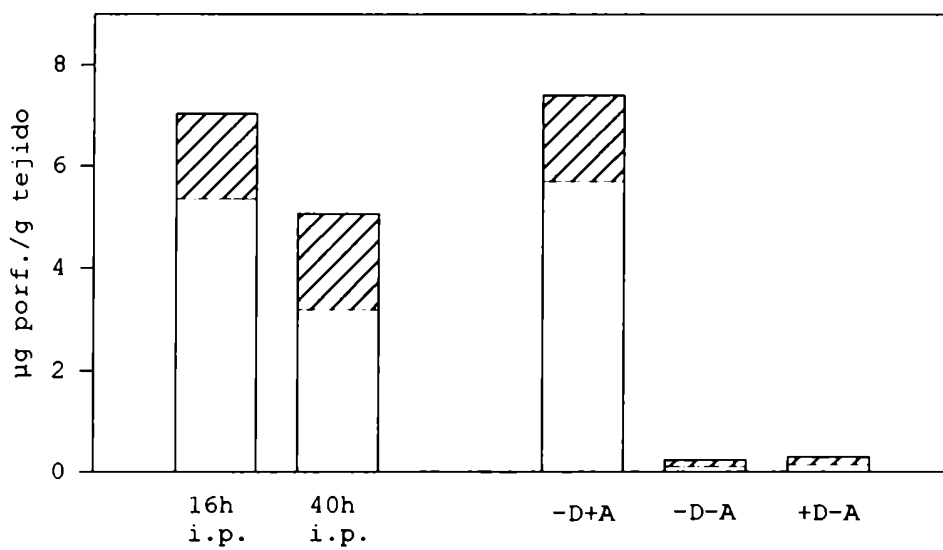


FIGURA IV.4.3: Porphirinas totales sintetizadas en explantes de tumores tratados con DOX.

Los valores graficados son un promedio de la suma de las porfirinas sintetizadas (μg porfirinas/g de tejido) en explantes tumorales (\square) y en los respectivos medios de incubación (hatched), luego de 16 y 40 hs de la dosis i.p. de 5 mg/kg de DOX.

IV.4.13 Efecto de la DOX sobre la actividad del ALA dehidrasa

La actividad de ALA-D proveniente de tumor no sufrió grandes modificaciones por el tratamiento con el antineoplásico a ninguna de las dos dosis administradas (Figura IV.4.4a). Sin embargo, el ALA-D hepática sufrió una inhibición del 24 al 34% a las 40 y 16 hs respectivamente, luego del tratamiento con la dosis alta (Figura IV.4.4b), mientras que con una dosis baja, recién a las 40 hs se observa una inhibición del 50%.

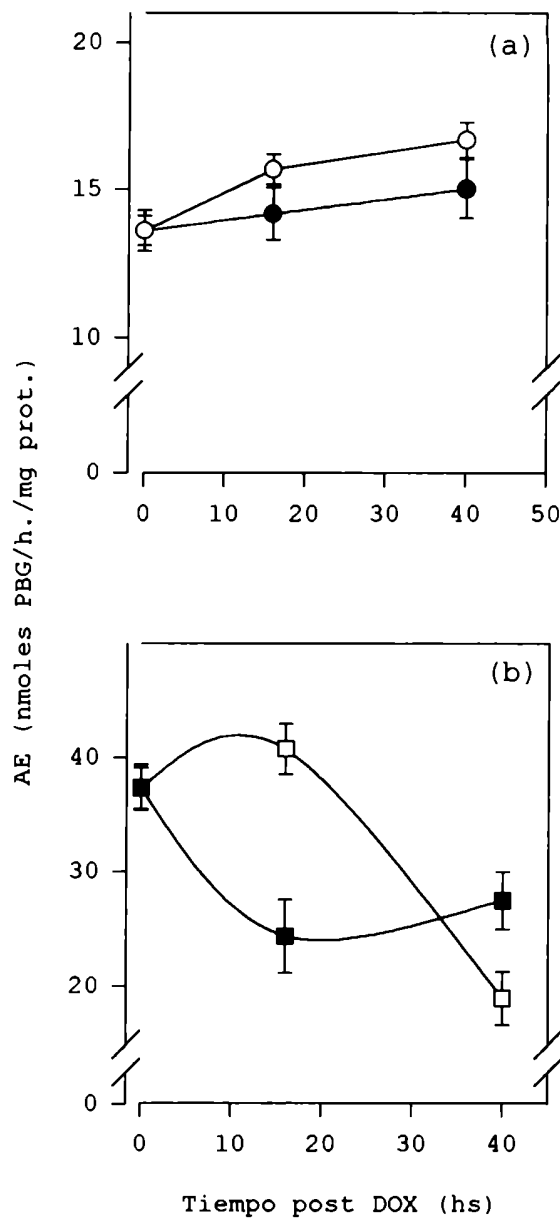


FIGURA IV.4.4: Efectos de la DOX sobre la actividad de ALA-D tumoral y hepática

Los ratones fueron tratados con una única dosis de 5 mg/kg (○, □) o de 30 mg/kg (●, ■) de DOX y se sacrificaron luego de 16 y 40 hs del tratamiento. Se determinó la actividad específica de ALA-D en tumor (a) e hígado (b). Los controles se inyectaron con solución fisiológica (tiempo = 0).

IV.4.14 Efecto de la DOX sobre la actividad de la Porfobilinogenasa

Ni en la PBG-asa tumoral ni en la hepática se observaron diferencias en ratones tratados con DOX, comparada con los niveles del control sin inyectar (Figura IV.4.5).

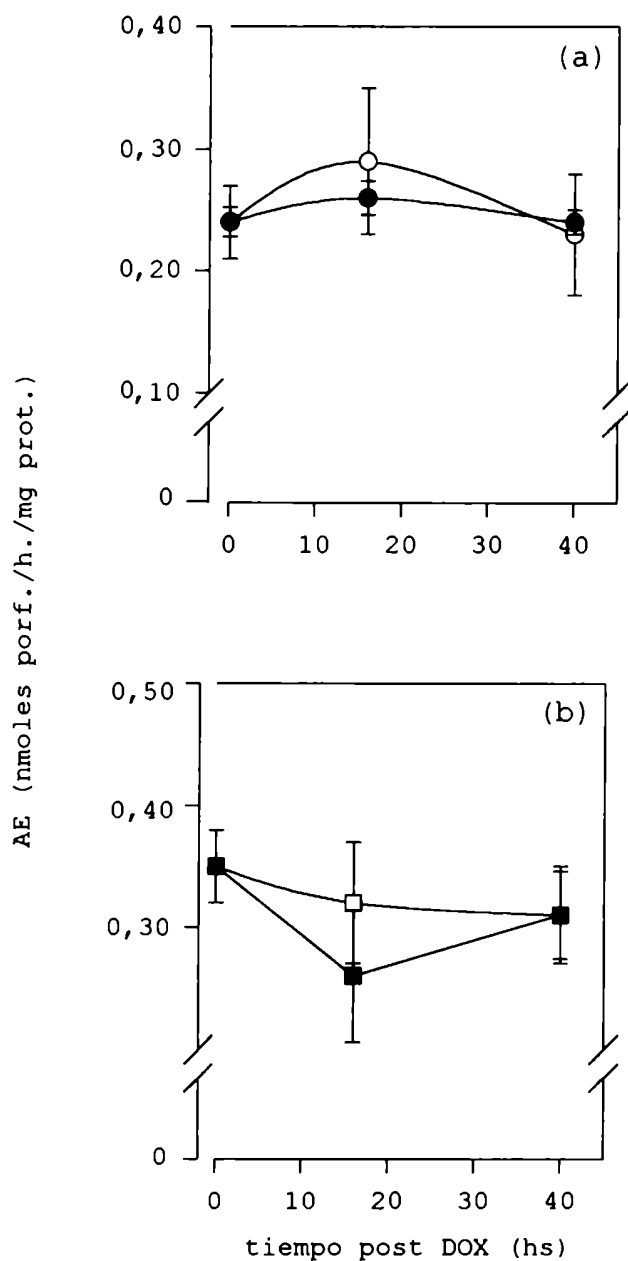


FIGURA IV.4.5: Efectos de la DOX sobre la actividad de PBG-asa tumoral y hepática

Los ratones fueron tratados con una única dosis de 5 mg/kg (○, □) o de 30 mg/kg (●, ■) de DOX y se sacrificaron luego de 16 y 40 hs del tratamiento. Se determinó la actividad de PBG-asa en tumor (a) e hígado (b). Los controles se inyectaron con solución fisiológica (tiempo = 0).

Se ha observado entonces que, en general, la DOX no provocó alteraciones en el camino biosintético del hemo, exceptuando una ligera disminución en la actividad del ALA-D hepática a las 16 hs del tratamiento, que se va recuperando a hacia las 40 hs. Una posible explicación para este fenómeno es la hepatotoxicidad de la DOX (Ganey et al., 1988), que llevaría a una disminución de la actividad de ciertas enzimas, aunque sin ser esta alteración significativa como para modificar los niveles de porfirinas sintetizadas. Avalando esta hipótesis, se ha encontrado una correlación entre la administración de DOX y disfunciones hepáticas con cambios en la histología del tejido (Wierzba & Hanano, 1986).

Nuevamente, como en el caso de la CY, el ALA-D resultó ser la enzima más sensiblemente afectada por el tratamiento con hepatotoxinas. Es probable que su presencia en altas concentraciones -ya que no es una enzima regulatoria- y su sensibilidad a los cambios en el estado oxidativo de la célula -debido a la presencia de grupos SH en su sitio activo- la haga blanco preferencial del ataque de compuestos exógenos que llegan al hígado para ser detoxificadas.

IV.4.2 Efectos de la DOX sobre la LPO.

Por cuanto los datos acerca de los mecanismos de acción de la DOX son contradictorios (Myers et al., 1977; Miura et al., 1994), se intentó determinar si la administración de la droga producía un aumento de los ROS en el tumor, medidos indirectamente a través del MDA, producto de la lipoperoxidación, y además establecer qué tipo de interacción puede existir entre estas especies reactivas y la TFD, luego de incubar el tejido con ALA y someterlo a irradiación.

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que existe en cambio, amplio consenso con respecto al rol fundamental de los ROS en la inducción de la cardiotoxicidad (Lenaz & Page, 1976; Miura et al., 1994). Por eso se consideró importante determinar si la droga afectaba los niveles basales de LPO en el corazón. Por otro lado, usando explantes del mismo tejido, se trató de saber si la administración de ALA, que se postula que por autooxidación puede generar ROS (Hermes-Lima et al., 1991), es capaz de modificar la LPO en el corazón, órgano que no está expuesto a la luz durante la TFD.

Los productos de lipoperoxidación incluyen una amplia variedad de compuestos. Entre los aldehídos, se ha puesto especial atención en el MDA, por ser de fácil determinación. Sin embargo, no es éste el único producto que reacciona con el TBA, y, en general se los denomina TBARS, es decir, especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Los niveles basales de MDA en tumor y corazón no variaron con la inyección previa de 30 mg/kg de DOX (Figura IV.3.6) ni de 5 mg/kg (datos no mostrados). De la observación de la figura, surge que la peroxidación lipídica en el corazón es mayor que en el tumor, si bien este dato no es para tener en cuenta, ya que el contenido de MDA varía con la composición lipídica del tejido.

Otros autores han encontrado aumentos en los niveles basales de MDA en corazón recién luego de 4 días de una dosis de 15 mg/kg de DOX (Arnaiz & Llesuy, 1993). Es probable, entonces, que hasta las 40 hs no se hayan percibido daños significativos a nivel de la LPO, que tal vez puedan manifestarse a tiempos más largos.

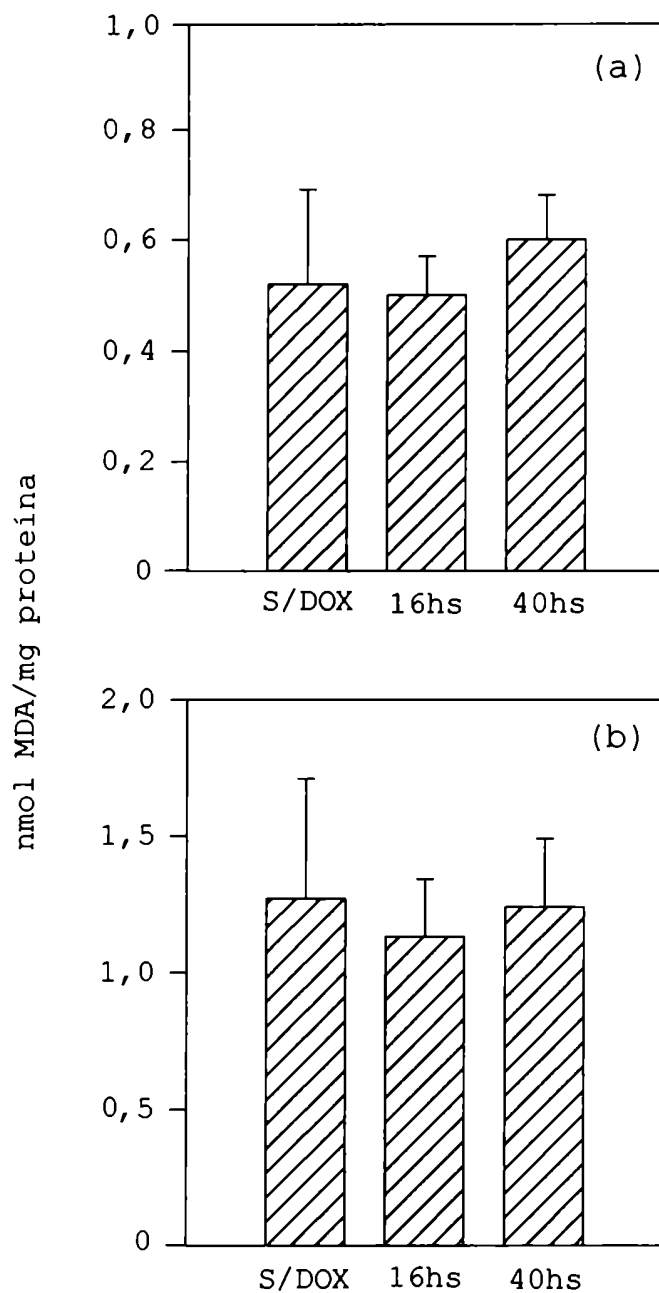


FIGURA IV.4.6: Efectos de la DOX sobre los niveles basales de MDA en tumor y corazón

Los ratones fueron tratados con una única dosis de 30 mg/kg de DOX y se sacrificaron luego de 16 y 40 hs del tratamiento. Se determinó el contenido de MDA (nmoles/mg proteína) en tumor (a) y corazón (b) según lo descrito en Materiales y Métodos. Los controles se inyectaron con solución fisiológica (S/DOX).

Empleando nuestro modelo *in vitro* - *in vivo*, se incubaron con ALA y después se irradiaron, explantes tisulares de tumor provenientes de ratones previamente tratados con DOX, (Figura IV.4.7a), encontrándose que con bajas dosis de la droga el grado

de LPO aumentó un 300% a las 16 y 40 hs post inyección, respecto al control sin tratar. En cambio, cuando se emplearon dosis altas, no hubo cambios significativos.

Este aumento de la sensibilidad al daño, que produce el ALA-TFD sobre los lípidos de membrana, puede deberse a una disminución en el contenido o en la actividad de algunas enzimas antioxidantes u otros secuestrantes de ROS, inducidos por la DOX.

Así, existen evidencias de que la DOX disminuye las actividades de la GPx (Revis & Marusic, 1978), la SOD, y catalasa, (Llesuy & Arnaiz, 1990), además de privar las células de GSH, por formación de aductos con la DOX (Sinha & Gregory, 1981), haciéndolas así más susceptibles al daño por la TFD.

Los explantes de corazón tratados en las mismas condiciones pero sin irradiar (Figura IV.4.7b) mostraron sólo un aumento significativo en el contenido de MDA a las 40 hs después de la dosis alta de DOX, no encontrándose diferencias a los otros tiempos ni con la otra dosis.

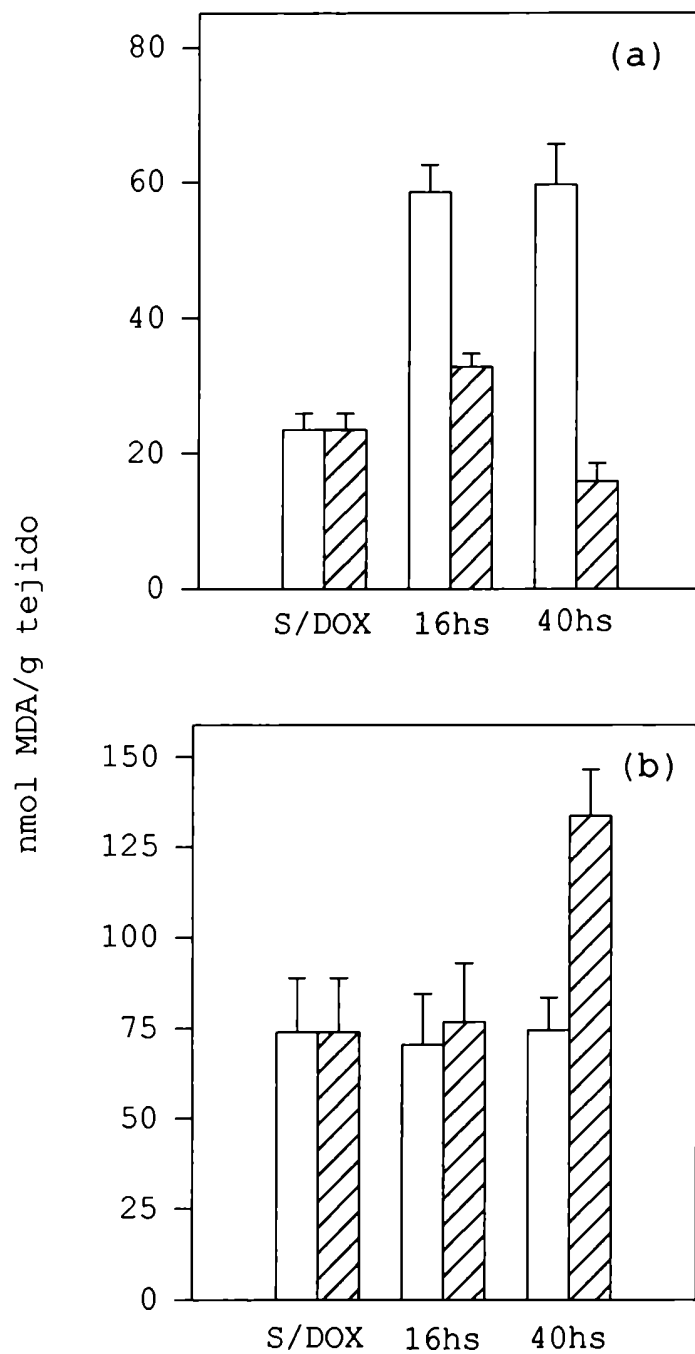


FIGURA IV.4.7: Efectos de la DOX sobre la LPO en explantes de tumor y corazón

Los ratones se trataron con una única dosis de 5 mg/kg (□) o de 30 mg/kg (▨) de DOX y se sacrificaron luego de 16 y 40 hs del tratamiento. Los controles se inyectaron con solución fisiológica (S/DOX). Explantes de tumor (a) y corazón (b) de 50 mg provenientes de estos animales, fueron incubados durante 2 hs en presencia de ALA en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos. Todos los explantes tumorales se irradiaron durante 15 min, en tanto que los de corazón permanecieron en oscuridad. Luego se determinó el contenido de MDA (nmoles/g de tejido).

IV.4.3 Efectos de la DOX sobre la eficacia terapéutica de la ALA-TFD

Empleando siempre nuestro modelo *in vitro* - *in vivo* para ensayar la eficacia de la TFD, encontramos que sólo se vio un aumento de la efectividad de la TFD con dosis bajas de DOX (Figura IV.4.8). Los demás tratamientos (altas dosis, 16 hs y altas dosis, 40 hs) no mejoraron la eficacia de la TFD sola (datos no mostrados). Es interesante comentar que otros autores (Ma et al, 1995) también encontraron sinergismo de la TFD empleando HpD, combinada con bajas dosis de otro antineoplásico (mitomicina C) y no así con altas dosis.

Como era de esperar, los explantes provenientes de animales no tratados previamente con DOX y no irradiados (-DOX -L) son los que mostraron mayor crecimiento tumoral (Figura IV.4.8). En todos los casos, los explantes irradiados se desarrollaron menos que los respectivos controles no irradiados.

Los explantes provenientes de ratones que recibieron tratamiento previo con DOX tanto 16 (+DOX 16 h -L) como 40 hs antes (+DOX 40 hs -L) y no se irradiaron, crecieron menos que los correspondientes controles sin tratar con el antineoplásico (-DOX -L). Los explantes de ratones tratados con DOX ya sea 16 o 40 hs antes, que además fueron irradiados (+DOX 16,40 hs +L) prácticamente no se desarrollaron, aún medidos a los 17 y 21 días después de implantados.

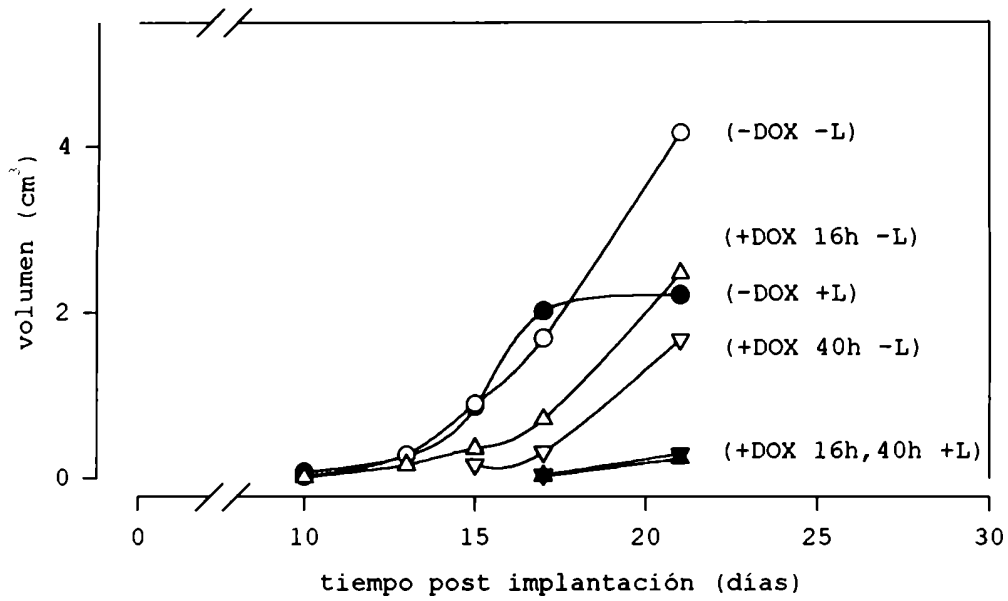


FIGURA IV.4.8: Curvas de crecimiento de explantes tumorales tratados con TFD y DOX-TFD

(▼) Crecimiento de un explante tumoral obtenido del animal 16 hs después de la administración de una dosis de 5 mg/kg de DOX, incubado con ALA 0,6 mM y luego irradiado (+DOX 16h +L).

(▽) Idem anterior pero no irradiado (+DOX 16h -L).

(▲) Crecimiento de un explante tumoral obtenido del animal 40 hs después de la administración de una dosis de 5 mg/kg de DOX, y luego irradiado (+DOX 40h +L).

(Δ) Idem anterior pero no irradiado (+DOX 40h -L)

(●) Crecimiento tumoral de un explante obtenido de un animal sin tratamiento previo, incubado con ALA 0,6 mM y luego irradiado (- DOX +L).

(○) Idem anterior pero no irradiado (-DOX -L).

Cada curva corresponde al crecimiento de un explante representativo de cada tipo.

Con la misma dosis usada en este trabajo, Nahabedian et al (1988) encontraron un aumento de la acción antitumoral de la TFD usando HpD en la línea tumoral murina EMT-6, pero no en la línea RIF-1.

Cowled et al (1987) hallaron que con dosis de 0,5 y 4 mg/kg de DOX administradas simultáneamente con HpD potenciaban el efecto fotodinámico *in vivo*, pero no había efecto aditivo alguno cuando la DOX se administraba después de la TFD. No obstante los mismos autores observaron que *in vitro* la droga inhibía el daño fotodinámico sobre las células tumorales.

El hecho de que los efectos antitumorales de la DOX y la TFD se sumen, no descarta la posibilidad de que ambas terapias compartan sitios blancos de destrucción del tumor, ya que con altas dosis de DOX no se produce un efecto aditivo en la citotoxicidad. Tanto la DOX como la PROTO IX se acumulan en la mitocondria y los mecanismos de acción de la TFD y de las antraciclinas están mediados por radicales libres, por lo tanto, es posible que con altas dosis de alguno de los dos compuestos empleados en estas terapias, haya competencia por los sitios de acción.

Empleando siempre nuestro modelo experimental, se quiso comprobar si la DOX, poseía propiedades fotosensibilizantes que estuvieran contribuyendo al aumento en la eficacia de la TFD. Para ello se incubaron explantes tumorales de ratones tratados y no tratados con DOX en ausencia de ALA (Figura IV.4.9).

Se encontró que los explantes tumorales de ratones tratados 40 hs antes con DOX, y que habían sido incubados en ausencia de ALA, crecieron menos cuando habían sido irradiados (+DOX 40h +L) que cuando no se irradiaban (+DOX 40h -L), confirmando la fotosensibilidad conferida por las antraciclinas ante la exposición del tejido a luz de 630 nm.

Por otra parte, los explantes provenientes de ratones tratados con DOX, incubados sin ALA y no irradiados (-DOX 40h -L), crecieron más que los controles sin tratar con la droga (-DOX -L) y no irradiados. Según estos resultados, la DOX *per se*, sin irradiación del tejido tumoral, en este modelo, y al tiempo y dosis ensayados, no produce retraso en el crecimiento tumoral.

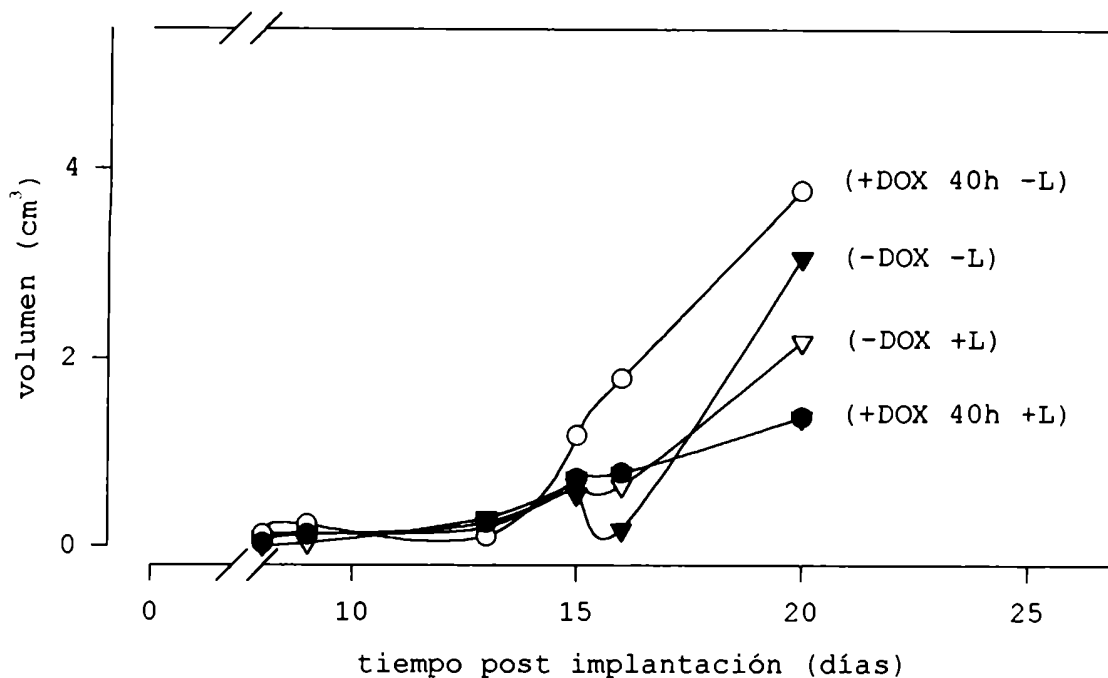


FIGURA IV.4.9: Acción fotodinámica de la DOX: curvas de crecimiento de explantes tumorales incubados en ausencia de ALA.

(●) Crecimiento de un explante tumoral obtenido de un animal 40 hs después de la administración de una dosis de 5 mg/kg de DOX incubado sin ALA y luego irradiado (+DOX 40h +L).

(○) Idem anterior pero no irradiado (+DOX 40h -L).

(▼) Crecimiento de un explante tumoral obtenido de un animal sin tratamiento antineoplásico, incubado sin ALA e irradiado (-DOX -L).

(▽) Idem anterior pero no irradiado (-DOX +L).

Cada curva corresponde al crecimiento de un explante representativo de cada tipo.

Cohen et al (1985) encontraron *in vivo*, potenciación de la TFD a partir de HpD combinada con DOX. En ese mismo trabajo, los autores confirmaron que la antraciclina posee *per se* propiedades fotosensibilizantes, ya que los tumores murinos experimentaban un mayor retraso en el crecimiento cuando se aplicaba luz luego de la administración de la droga.

Si se postula que en la potenciación de la TFD por la DOX está implicada la absorción de luz por la DOX y una reacción fotoquímica, uno esperaría ver un pico de absorción de la droga en la región de los 630 nm; sin embargo los espectros de absorción de la droga sólo presentan bandas en la región UV y a los 500 nm. Por otra parte, la acción de la DOX puede potenciarse por el calor (Hahn, 1979). De esta forma, pensamos

que es posible que la leve hipertermia observada durante la irradiación podría explicar ese aumento de la actividad fotodinámica.

Se pueden plantear otras hipótesis para justificar la potenciación de la TFD con drogas antineoplásicas. En una de ellas se propone que dichas drogas podrían estar aumentando la entrada del ALA a la célula o disminuyendo su salida, ya que los daños de los ROS sobre la membrana plasmática pueden afectar la permeabilidad de las células tumorales o de los capilares.

Al respecto, si bien no están claros los mecanismos de transporte del ALA, se sabe que el mismo es incorporado a células eucariotas por transporte activo, compartiendo el ALA las proteínas traslocadoras de otros compuestos como el GABA (Bermúdez Moretti et al, 1993; 1995a; 1995b).

Es probable, entonces, que daños producidos en la membrana celular, estén alterando la estructura o función de estos traslocadores. También puede ser que la TFD complemente el proceso de destrucción de las células tumorales iniciado por las drogas antineoplásicas.

La observación de que las células con genotipo MDR -que presentan resistencia múltiple a drogas- no ofrecen resistencia cruzada con la TFD (Kessel & Erickson, 1992) fundamenta una vez más la posibilidad de la combinación de la quimioterapia con la TFD. Además se ha visto que la glicoproteína P es inhibida durante el proceso fotodinámico, ya sea por disminución de la síntesis, degradación parcial de la proteína formada o acción directa sobre el ADN que la codifica (Dima et al., 1990).

Por otra parte, el aumento de la eficacia de la TFD en combinación con ciertas drogas antineoplásicas podría estar asociado con la suma del daño inducido por ambas modalidades, o bien con el efecto citotóxico de las drogas sobre los capilares, de manera de inhibir su recuperación luego del daño fotodinámico (Cho et al., 1992).

IV.4.4 Conclusiones

- * La administración de dosis bajas (5 mg/kg) o altas (30 mg/kg) de DOX no provocó alteraciones en el camino biosintético del hemo; sólo se observó una ligera disminución en la actividad de ALA-D hepática. Tampoco se observaron modificaciones en la biosíntesis de porfirinas a partir de ALA en explantes tumorales.

- * La administración de una dosis baja de DOX 40 hs antes de la TFD aumenta significativamente la eficacia de la TFD sola. La DOX provoca, en ausencia de ALA, un daño fotodinámico que podría estar contribuyendo a la potenciación de la TFD observada.

- * Ni en corazón ni en tumor la administración de DOX produjo cambios significativos en la biosíntesis del hemo o en los niveles basales de MDA. Sin embargo, la incubación de explantes tumorales con ALA y su irradiación provocó un aumento en la LPO. La potenciación de la ALA-TFD con la DOX podría deberse en parte a una mayor producción de radicales libres a partir del ALA y/o de las porfirinas.

- * Una dosis baja de DOX indujo potenciación del efecto antitumoral de la TFD y aumento de la LPO en tumor, sin inducir cambios en la LPO de corazón; por lo tanto, esta combinación de terapias, con esta secuencia de administración y dosis, sería beneficiosa y segura para el tratamiento de tumores.

CAPITULO V

CONCLUSIONES FINALES

- * Un aumento de la síntesis de porfirinas a partir de ALA en los tumores, conduciría a la formación endógena del agente sensibilizante en el tejido blanco, evitando así la indeseable fotosensibilidad cutánea provocada por la administración directa de las porfirinas. Aunque las porfirinas se forman también en otros órganos tales como el hígado, el riñón y el bazo, la luz solar no constituye un problema para los órganos internos, ya que ésta no penetra en la cavidad abdominal como para iniciar el proceso fotodinámico. En nuestro caso, importa señalar que hemos encontrado además, una alta relación de concentración de porfirinas tumor/piel.

- * En este trabajo se ha desarrollado un novedoso y sumamente útil modelo *in vitro* - *in vivo* mediante el cual se ha demostrado que ocurre una importante y hasta completa destrucción de las células tumorales por combinación de la síntesis endógena de porfirinas a partir de ALA y un tratamiento lumínico de baja potencia.

- * Nuestros resultados plantean la importante posibilidad del uso combinado de antineoplásicos como la Ciclofosfamida y la Doxorubicina con la Terapia Fotodinámica del cáncer, empleando las porfirinas sintetizadas endógenamente a partir de ALA, siendo ésta la primera vez que se desarrolla la posibilidad de combinar la TFD a partir de ALA con la quimioterapia.

- * En los regímenes de la aplicación combinada de TFD y quimioterapia, es de fundamental importancia el intervalo de tiempo transcurrido entre la administración de la droga y el tratamiento fotodinámico; de este lapso depende que pueda ocurrir potenciación o disminución de la citotoxicidad.

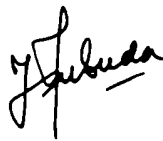
- * Dos alternativas adicionales que podrían contribuir a mejorar la eficacia de la TFD a partir de ALA serían la administración del precursor usando liposomas como vehículo y el aumento de cinc en la dieta; con ello se lograría un incremento de la cantidad de porfirinas acumuladas en tumor, sin modificar la concentración de las mismas en los demás tejidos.

- * Dada la gran diversidad de tipos tumorales, es claro que los resultados obtenidos no pueden ser extrapolados en forma directa a todos los tumores; sin embargo, la aplicación del modelo experimental desarrollado en este trabajo, a biopsias provenientes de distintas neoplasias permitiría obtener importante y útil información acerca del uso del ALA en la TFD del cáncer.

- * En conclusión, los resultados presentados en este estudio indican que el empleo del ALA en la detección temprana de células malignas y en la TFD es una modalidad de diagnóstico y tratamiento del cáncer que merece aplicarse en la clínica.



Dra. ALCINA BALLE de ALBERTONI
Profesor Titular O. Biología



Dra. HAYDEE FUKUDA

CAPITULO VI

REFERENCIAS

- Adams, D.; Carmichael, J. & Wolf, C. Altered mouse bone marrow glutathione transferase levels in response to cytotoxins. *Cancer Res.*, 45: 1669-1674 (1985).
- Andreoni, A.; Colasanti, A.; Malatesta, V. & Giuseppe, R. A method for enhancing the cytotoxicity of anthracyclines through photoactivation. European Patent Application EP400480 (1990).
- Arnaiz, S. & Llesuy, S. Oxidative stress in mouse heart by antitumoral drugs: a comparative study of doxorubicin and mitoxantrone. *Toxicol.*, 77: 31-38 (1993).
- Arrick, B.; Nathan, F. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res.*, 44: 4224-4232 (1984).
- Batlle, A.; Ferramola, A. & Grinstein, M. Purification and general properties of 5-aminolevulate dehydratase from cow liver. *Biochem. J.*, 104: 244-249 (1967).
- Bermúdez Moretti, M.; Correa García, S.; Stella, C.; Ramos, E. & Batlle, A. 5-aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.*, 25: 1917-1924 (1993).
- Bermúdez Moretti, M.; Correa García, S.; Chianelli, M.; Ramos, E.; Mattoon, J. & Batlle, A. Evidence that 4-aminobutyric acid and 5-aminolevulinic acid share a common transport system into *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27: 169-173 (1995a).
- Bermúdez Moretti, M.; Correa García, S.; Ramos, E. & Batlle, A. GABA uptake in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Cell. molec. Biol.*, 41: 843-849 (1995b).
- Beutler, E. & West, C. Comment concerning a fluorometric assay for glutathione. *Anal. Biochem.*, 81: 458-460 (1977).
- Bhutani, L.; Deshpande, S.; Bedi, T.; Malhotra, Y.; Kumar, A.; Malhotra, K. & Sood, S. Cyclophosphamide and congenital erythropoietic porphyria. *Photodermatol.*, 2: 394-398 (1985).
- Bonkovsky, H.; Healey, J.; Sinclair, P. & Sinclair, J. Conversion of 5-aminolevulinate into haem by homogenates of human liver: comparison with rat and chick embryo liver homogenates. *Biochem. J.*, 27: 893-901 (1985).
- Boveris, A.; Llesuy, S. & Fraga, C. Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 1: 131-138 (1985).
- Bugleski, P.; Porter, C. & Dougherty, T. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res.*, 41: 4606-4612 (1981).
- Carmichael, J.; Adams, D.; Ansell, J. & Wolf, R. Glutathione and glutathione transferase levels in mouse granulocytes following cyclophosphamide administration. *Cancer Res.*, 46: 735-739 (1986).
- Cho, Y.; Straight, R. & Smith, J. Effects of photodynamic therapy in combination with intravesical drugs in a murine bladder tumor model. *J. Urol.*, 147: 743-746 (1992).
- Cohen, R.; Nahabedian, M.; Terem, T.; Glenn, D.; Contino, M.; Berns, M. & Wile, A. Potentiation of laser photoradiation therapy by chemotherapy. *Curr. Surg.*, 42: 379-381 (1985).
- Colvin, O.; Friedman, H.; Gamcsik, M.; Fenselau, C. & Hilton, J. Role of glutathione in cellular resistance to alkylating agents. *Adv. Enzyme Regul.*, 33: 19-26 (1993).

- Cowled, P.; Mackenzie, L. & Forbes, I. Pharmacological modulation of photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative and light. *Cancer Res.*, 47: 971-974 (1987).
- Christenson, W.; Reddy, V. & Piper, W. Reversal of sulfamerazine inhibition of rat hepatic uroporphyrinogen synthesis by folic acid. *Life Sci.*, 38: 1679-1684 (1986).
- Dima, V.; Mihailescu, I.; Dima, S.; Chivu, L.; Stirbet, M.; Udrea, M. & Popa, A. . Studies on the effects of associated photodynamic therapy and drugs on macromolecular synthesis of tumoral cells grown *in vitro*. *Arch. Roum. Pat. Exp. Microbiol.*, 49: 156-175 (1990).
- Doyle, D. Subunit structure of 5-aminolevulinatase dehydratase from mouse liver. *J. Biol. Chem.*, 246: 4465-4972 (1971).
- El-Far, M. & Pimstone, N. Selective *in vivo* tumor localization of uroporphyrin isomer I in mouse mammary adenocarcinoma: Superiority over other porphyrins in a comparative study. *Cancer Res.*, 46: 4390-4394 (1986).
- Fukuda, H. Acerca de la actividad de la delta aminolevúlico dehidrasa en relación con su estructura molecular y el contenido de iones metálicos. Tesis doctoral (1988). Universidad de Buenos Aires.
- Fukuda, H.; Paredes, S. & Batlle, A. Tumor-localizing properties of porphyrins. *In vivo* studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 102: 433-436 (1992).
- Fumagalli, S.; Kotler, M.; Rossetti, M. & Batlle, A. Studies on Uroporphyrinogen biosynthesis in pig liver. *Z. Naturforsch.*, 46: 1101-1108 (1991).
- Ganey, P.; Kauffman, F. & Thurman, R. Oxygen-dependent hepatotoxicity due to doxorubicin: role of reducing equivalent supply in perfused rat liver. *Mol. Pharmacol.*, 134: 695-699 (1988).
- Gaullier, J.; Geze, M.; Santus, R.; Melo, T.; Maziere, J.; Bazin, M.; Morliere, P. & Dubertret, L. Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX in human keratinocytes and fibroblasts cultivated with 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.*, 62: 114-122 (1995).
- Gibbs, P.; Gore, M. & Jordan, P. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinatase. *Biochem. J.* (1985) 225: 573-850.
- Gomer, C. & Dougherty, T. Determination of (³H)- and (¹⁴C)-hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.*, 39: 146-151 (1979).
- Gray, P.; Phillips, D. & Wedd, A. Photosensitized degradation of DNA by daunomycin. *Photochem. Photobiol.*, 49-57 (1982).
- Guolo, M.; Stella, A.; Melito, V.; Parera, V. & Batlle, A. Altered 5-aminolevulinic acid metabolism leading to pseudoporphyria in hemodialysed patients. *Int. J. Cell. Biol.*, 28: 311-317 (1996).
- Hahn, G. Potential for therapy of drugs and hiperthermia. *Cancer Res.*, 39: 2264-2268 (1979).
- He, D.; Sassa, S. & Lim, H. Effect of UVA and blue light on porphyrin biosynthesis in epidermal cells. *Photochem. Photobiol.*, 57: 825-829 (1993).

He, X.; Sikes, R.; Thomsen, S.; Chung, L. & Jacques, S. Photodynamic therapy with Photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem. Photobiol.*, 59: 468-473 (1994).

Hermes-Lima, M.; Valle, V.; Vercesi, A. & Bechara, E. Damage to rat liver mitochondria promoted by 5-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta*, 1056: 57-63 (1991).

Imai, K.; Aimoto, T.; Sato, M. & Kimura, R. Antioxidative effect of protoporphyrin and increase of glutathione in protoporphyrin-administered rat liver. *Biochem. Pharm. Bull.*, 16: 759-761 (1993).

Jori, G.; Reddi, E.; Cozzani, I. & Tomio, L. Controlled targeting of different subcellular sites by porphyrins in tumor bearing mice. *Br. J. Cancer*, 53: 615-621 (1986).

Institoris, E.; Tretter, L. & Gaal, D. Severe depletion of cellular thiol and glutathione-related enzymes of a carmustine-resistant L1210 strain associates with collateral sensitivity to cyclophosphamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 33: 85-88 (1993).

Juknat, A.; Rossetti, M. & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis*-IV. An endogenous factor controlling the enzymic synthesis of porphyrinogens and its possible role in the treatment of some porphyrias. *Int. J. Biochem.*, 13: 343-353 (1981).

Juknat, A.; Dörnemann, D. & Senger, H. Biosynthesis of porphyrinogens in etiolated *Euglena gracilis* Z. I. Isolation and purification of an endogenous factor, stimulating the formation of porphyrinogens. *Z. Naturforsch.*, 43: 351-356 (1988a).

Juknat, A.; Dörnemann, D. & Senger, H. Biosynthesis of porphyrinogens in etiolated *Euglena gracilis* Z. II. Identification of a regulatory pteridine. *Z. Naturforsch.*, 43: 357-362 (1988b).

Kennedy, J.; Jin, Y. & Pottier, R. Effect of extracellular pH upon the uptake of porphyrins by malignant cells. *Photochem. Photobiol.*, 51 (Suppl.) 4s (1990).

Kennedy, J. & Pottier, R. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B*, 14: 275-292 (1992).

Kessel, D. & Erickson, C. Porphyrin photosensitization of multidrug resistant cell types. *Photochem. Photobiol.*, 55: 397-399 (1992).

Leblanc, G. & Waxman, D. Mechanisms of cyclophosphamide action on hepatic P-450 expression. *Cancer Res.*, 50: 5720-5726 (1990).

Lee, F. Glutathione diminishes the anti-tumour activity of 4-hydroperoxycyclophosphamide by stabilising its spontaneous breakdown to alkylating metabolites. *Br. J. Cancer*, 63: 45-50 (1991).

Lenaz, L. & Page, J. Cardiotoxicity of adriamycin-related anthracyclines. *Cancer Treat. Rev.*, 3: 111-1205 (1976).

Lim, L.; Srivastava, G.; Brooker, J.; May, B. & Elliot, W. Evidence that in chick embryos destruction of hepatic microsomal cytochrome P-450 haem is a general mechanism of induction of 5-aminolevulinic synthase by porphyria-causing drugs. *Biochem. J.* (1980) 190: 519-526.

- Llambías, E.; Locascio, G. & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis. IX. Porphobilinogen deaminase-uroporphyrinogen III cosynthetase from avian erythrocytes. *Anal. Asoc. Quím. Arg.*, 59: 271-278 (1971).
- Llambías, E. & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis in soybean callus. V. The porphobilinogen deaminase-uroporphyrinogen III cosynthetase system. Kinetic studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 220: 552-559 (1970).
- Llesuy, S. & Arnaiz, S. Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicol.*, 63: 187-198 (1990).
- Lock, E. & Ishmael, J. Hepatic and renal non-protein sulfhydryl concentration following toxic doses of hexachloro-1,3-butadiene in the rat: the effect of Arochlor 1254, phenobarbitone or SKF 525A treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1981) 57: 79-87.
- Ma, L.; Moan, J.; Steen, H. & Iani, V. Anti-tumour activity of photodynamic therapy in combination with mitomycin C in nude mice with human colon adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*, 71: 950-956 (1995).
- Malik, Z.; Ehrenberg, B. & Faraggi, A. Inactivation of erythrocytic, lymphocytic and myelocytic leukemic cells by photoexcitation of endogenous porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 4: 195-205 (1989).
- Malik, Z.; Babushkin, T.; Sher, S.; Hanania, J.; Ladan, H.; Nitzan, Y. & Salzberg, S. Collapse of K⁺ and ionic balance during photodynamic inactivation of leukemic cells, erythrocytes and *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem.*, 25: 1399-1406 (1993).
- Manziona, N.; Wolkoff, A. & Sassa, S. Development of porphyria cutanea tarda after treatment with cyclophosphamide. *Gastroenterology*, 95: 1119-1122 (1988).
- Marinello, A.; Berrigan, M.; Struck, F.; Guengerich, F. & Gurtoo, H. Inhibition of NADPH-cytochrome P-450 reductase by cyclophosphamide and its metabolites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1981) 99: 399-407.
- McClure, M. & Stupans, I. Investigation of the mechanism by which cyclophosphamide alters cytochrome P-450 in male rats. *Biochem. Pharmacol.*, 43: 2655-2658 (1992).
- Menon, J.; Becker, S.; Persad, S. & Haberman, H. Quantitation of hydrogen peroxide formed during UV-visible irradiation of protoporphyrin, coproporphyrin and uroporphyrin. *Clin. Chim. Acta*, 186: 375-381 (1990).
- Miura, T.; Muraoka, S. & Ogiso, T. Effect of ascorbate on adriamycin-Fe³⁺-induced lipid peroxidation and DNA damage. *Pharmacol. & Toxicol.*, 74: 89-94 (1994).
- Moan, J. The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. *Photochem. Photobiol.*, 39: 445-449 (1984).
- Moan, J. Porphyrin-sensitized photodynamic inactivation of cells: A review. *Laser Med. Sci.*, 1: 1-8 (1986).
- Moan, J.; Rognan, S.; Evensen, J. & Malik, Z. Cell photosensitization by porphyrins. *Photobiochem. Photobiophys. Suppl.*, 385-395 (1987).
- Myers, C.; McGuire, W.; Liss, R.; Ifrim, I. & Grotzinger, K. & Young, R. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197: 165-167 (1977).

- Nahabedian, M.; Cohen, R.; Contino, M. Combination cytotoxic chemotherapy with cisplatin or doxorubicin and photodynamic therapy in murine tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 80: 739-743 (1988).
- Navone, N. Porfirinas y neoplasias. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires (1988).
- Navone, N.; Polo, C.; Dinger, R. & Batlle, A. Heme regulation in mouse mammary adenocarcinoma. I. Effect of allyl isopropyl acetamide and veronal on ALA-S, cyt P₄₅₀ and cytochrome oxidase. *Int. J. Biochem.*, 22: 1005-1008 (1990a).
- Navone, N.; Polo, C. Frisardi, A. & Batlle, A. Mouse mammary carcinoma ALA-D. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 96: 729-731 (1990b).
- Navone, N.; Polo, C.; Frisardi, A. & Batlle, A. Mouse mammary carcinoma PBGase and hydroxymethylbilane synthetase. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 98: 67-71 (1991).
- Noriega, G.; Juknat, A. & Batlle, A. Non-essential activation of rat liver porphobilinogen-deaminase by folic acid. *Z. Naturforsch.*, 47: 416-419 (1992).
- Palma-Carlos, A.; Palma-Carlos, M.; Lourenço, M. & Martins-Silva, J. Effect of alkylating agents on haem metabolism. *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.*, 25: 81-84 (1971).
- Piper, W. & Van Lier, R. Pteridine regulation of inhibition of hepatic uroporphyrinogen I synthetase by lead chloride. *Molec. Pharmacol.*, 13: 1126-1135 (1977).
- Pottier, R.; Chow, Y.; LaPlante, J.; Truscott, T.; Kennedy, J. & Beiner, L. Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra *in vivo*. *Photochem. Photobiol.*, 44: 679-687 (1986).
- Princ, F. Biosíntesis de porfirinas en corteza y cerebro de rata. Estudios sobre la porfobilinógeno-deaminasa. Empleo del ácido 5-aminolevúlico como generador de especies reactivas de oxígeno. Tesis doctoral, UBA (1995).
- Revis, N. & Marusic, N. Glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the hearts of doxorubicin-treated rabbits. *J. Mol. Cell Card.*, 10: 945-951 (1978).
- Rizzardini, M.; Ferraroli, A.; Dal Fiume, D. & Cantoni, L. Cyclophosphamide-impaired regulation of hepatic heme metabolism. *Experientia*, 40: 1390-1392 (1983).
- Rougee, M.; Benasson, R.; Land, E. & Pariente, R. Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. *Photochem. Photobiol.*, 47: 485-489 (1988).
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. The porphobilinogen deaminase uroporphyrinogen III cosynthetase system (porphobilinogenase) from bovine liver. Kinetic studies. *FEBS Lett.*, 3: 223-226 (1969).
- Schoenfeld, N.; Mamet, R.; Nordenberg, Y.; Shafran, M.; Babushkin, T. & Malik, Z. Protoporphyrin biosynthesis in melanoma B16 cells stimulated by 5-aminolaevulinic acid and chemical inducers: characterization of photodynamic inactivation. *Int. J. Cancer*, 56: 106-112 (1994).
- Shemin, D. δ -Aminolevulinic acid dehydratase, en *The enzymes*, 3rd edn. Ed. Boyer P. Academic Press. New York, p. 7: 322-337 (1972).

Siemann, D.; Flaherty, A. & Penney, D. Effect of thiol manipulation chemopotential by nitroimidazoles. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 16: 1341-1348(1989).

Sinha, B. & Gregory, J. Role of one-electron and two-electron reduction products of adriamycin and daunomycin in deoxyribonucleic acid binding. *Biochem. Pharmacol.*, 30: 2626-2630 (1981).

Smith, A. Mechanisms of toxicity of photoactivated artificial porphyrins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 514: 309-322 (1987).

Snyder, H.; Verma, A. & Trifiletti, R. The peripheral α -type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. *FASEB J*, 1: 282-297 (1987).

Steinbach, P.; Weingandt, H.; Baumgartner, R.; Kriegmair, M.; Hofstädter, F. & Knüchel, R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer Protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.*, 62: 887-895 (1995).

Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Application to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, 27: 502-522 (1969)

Valenzeno, D. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem. Photobiol.*, 46: 147-160 (1987).

Vázquez, E.; Buzaleh, A.; Polo, C.; Schoua, E.; Afonso, S. & Batlle, A. Cultivos de explantes tisulares II: grado de lisis y su protección por el ácido 5-aminolevulinico. *An. Med. Intern. (Madrid)*, 6: 258-262 (1986).

Wagner, T.; Mittendorff, F. & Walter, E. Intracavitary chemotherapy with activated cyclophosphamides and simultaneous systemic detoxification with protector thiols in sarcoma 180 ascites tumor. *Cancer Res.*, 46: 2214-2219 (1986).

Wainstok, R. & San Martín de Viale, L. Effect of some antineoplasics on metabolic heme pathway. *Int. J. Biochem.*, 20: 1015-1020 (1988).

Weishaupt, K.; Gomer, C. & Dougherty, T. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoactivation of a murine tumour. *Cancer Res.*, 36: 2326-2329 (1976).

Wierzba, K. & Hanano, M. Cytostatics and immunosuppressive drugs, en Side Effects of drugs. Ed. Dukes, M. Elsevier, Amsterdam, p. 400-460 (1986).

Wilson, J., Van Hillesberg, R. ; Van der Berg, J.; Kort, W. & Terpstra, O. Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors. *Scand. J. Gastroenterol.*, 188: 20-25 (1991).

5/21/86
1458

