

Tesis Doctoral

# Estudios sobre la terapia fotodinámica a partir de ALA en células leucémicas sensibles y resistentes a drogas de quimioterapia

Diez, Berenice Andrea

2012

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Diez, Berenice Andrea. (2012). Estudios sobre la terapia fotodinámica a partir de ALA en células leucémicas sensibles y resistentes a drogas de quimioterapia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Diez, Berenice Andrea. "Estudios sobre la terapia fotodinámica a partir de ALA en células leucémicas sensibles y resistentes a drogas de quimioterapia". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **Estudios sobre la terapia fotodinámica a partir de ALA en células leucémicas sensibles y resistentes a drogas de quimioterapia**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área de Química Biológica

**Berenice Andrea Diez**

Directores de Tesis: Dra. Haydée Fukuda  
Dra. Silvia Hajos

Consejero de estudios: Dra. María Victoria Rossetti

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Hospital de Clínicas "José de San Martín". Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2012

**Estudios sobre la Terapia Fotodinámica a partir de ALA en células leucémicas sensibles y resistentes a drogas de quimioterapia**

***Resumen***

La Terapia Fotodinámica (TFD) es utilizada para el tratamiento del cáncer y otras patologías no malignas. Se basa en la administración un compuesto fotosensibilizante (FS) que se acumula selectivamente en el tejido maligno y al recibir fotones interactúa con el O<sub>2</sub> produciendo especies reactivas del oxígeno (ROS), que son altamente tóxicas y desencadenan la muerte celular. La administración exógena del ácido 5-aminolevúlico (ALA), precursor biológico de la síntesis de los tetrapirroles, induce la acumulación de protoporfirina IX (PpIX), un FS muy eficiente.

La quimioterapia administrada en altas dosis, seguida del trasplante autólogo de médula ósea es una de las modalidades terapéuticas más utilizadas para el tratamiento de la leucemia. Sin embargo, una pequeña proporción de células leucémicas indiferenciadas que se encuentran en un estado quiescente, pueden resultar resistentes a la quimioterapia y ser reinsertadas en el paciente luego del trasplante. Por este motivo actualmente se estudian métodos de purgado potencialmente efectivos para eliminar a las células malignas remanentes. Además, el uso de quimioterapia presenta otras limitaciones como el desarrollo de fenotipos celulares resistentes a drogas y efectos secundarios no deseados.

En esta tesis hemos estudiado los efectos de la TFD basada en ALA (TFD-ALA) en tres líneas celulares leucémicas murinas, LBR-, sensible a drogas de quimioterapia, LBR-D160 y LBR-V160, resistentes a doxorubicina (DOX) y vincristina (DOX), respectivamente.

Para ello evaluamos la síntesis y acumulación de PpIX sintetizada a partir de ALA, y observamos que en las tres líneas estudiadas esta síntesis aumentó en función de la concentración y del tiempo de incubación con ALA. Estudios de microscopía confocal indicaron que las mitocondrias son el principal sitio de localización de PpIX.

Mediante estudios de viabilidad celular demostramos la eficacia de la TFD-ALA en las tres líneas celulares, indicando la falta de resistencia cruzada en el caso de las líneas resistentes a drogas de quimioterapia.

Por otra parte estudiamos los mecanismos involucrados en la muerte celular producida por la TFD, donde observamos un aumento en los parámetros de estrés oxidativo como la despolarización de la membrana mitocondrial, la producción de oxígeno singlete y de anión superóxido, indicando la importancia de las mitocondrias en los efectos de la TFD. El análisis de parámetros tanto morfológicos como bioquímicos demostró la predominancia de apoptosis como principal mecanismo de muerte, en particular a través de la vía intrínseca, lo que concuerda con el rol activo de las mitocondrias previamente mencionado.

Evaluamos además los efectos al combinar la TFD-ALA con los agentes antineoplásicos DOX y VCR, en un modelo *in vitro in vivo*, utilizando la línea LBR-. En ambos casos observamos un beneficio significativo al utilizar las terapias combinadas, evidenciando la ventaja de esta modalidad frente a las terapias utilizadas en forma independiente.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran el beneficio potencial de utilizar la TFD-ALA como método de purgado de la médula ósea de pacientes con leucemia, especialmente para eliminar fenotipos resistentes a drogas. Además, los estudios utilizando las terapias combinadas indican la posibilidad de disminuir las dosis de drogas de quimioterapia, minimizando así las limitaciones ocasionadas por este tratamiento.

**Palabras claves:** Terapia fotodinámica; Ácido 5-aminolevúlico; Leucemia; Resistencia a drogas; Terapias combinadas.

## **Photodynamic therapy studies using ALA in leukemia cells sensitive and resistant to chemotherapy drugs**

### ***Abstract***

Photodynamic therapy (PDT) is a cancer treatment modality which involves the administration of a given photosensitizing agent (PS), its preferential accumulation in malignant tissue and the subsequent activation by light of appropriate wavelength. Interaction between the excited PS and molecular oxygen produces singlet oxygen as well as other reactive oxygen species (ROS) selectively destroying the target cells. Exogenous administration of 5-aminolevulinic acid (ALA) induces the accumulation of protoporphyrin IX (PpIX), a highly photosensitive compound.

Autologous bone marrow transplantation (ABMT) after high dose chemotherapy is a widely accepted therapeutic modality for the management of hematologic malignancies. The major disadvantage of this approach is the possible contamination of the autograft with remaining leukemic cells which leads to recurrence of the disease. Besides, the use of chemotherapy agents promotes the development of drug resistant phenotypes and produces serious side adverse effects in many patients.

In this work we studied the effects of ALA-based PDT (ALA-PDT) in three leukemic murine cell lines: LBR-, drug sensitive, LBR-D160 resistant to doxorubicin (DOX) and LBR-V160, resistant to vincristine (VCR). The synthesis and accumulation of PpIX after ALA administration was evaluated, which increased with the concentration and incubation time with ALA. Confocal microscopy studies revealed that PpIX was mainly localized in mitochondria. Cell viability studies demonstrated that ALA-PDT was effective in the three cell lines, indicating the lack of cross-resistance in LBR-D160 and LBR-V160 cells. The mechanisms involved in the death caused by ALA-PDT were also studied. It was observed an increase in oxidative stress parameters, such as mitochondrial membrane depolarization, singlet oxygen and superoxide anion production. Morphological and

biochemical studies showed that apoptosis, especially involving intrinsic pathway, was the main death mechanism induced by ALA-PDT.

We also evaluated on the LBR- cell line the effects of ALA-PDT combined with DOX or VCR using an *in vitro-in vivo* model, and a significant benefit for combination therapies, with respect to each one independently, was found.

The results obtained in this work show that ALA-PDT could be useful as a purging method during ABMT in leukemia patients, especially to eliminate drug resistant cells. Besides, the use of combined therapies allows the possibility of reducing the doses of chemotherapeutic agents, thus minimizing the limitations of this therapy.

**Key words:** Photodynamic therapy; 5-aminolevulinic acid; Leukemia; Drug resistance; Combined therapies.

## ***Agradecimientos***

- A la Dra. Haydée Fukuda, por confiar en mí y por haberme brindado la oportunidad y las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo.
- A la Dra. Silvia Hajos, por su colaboración durante estos años.
- A la Dra. María Victoria Rossetti, por su buena predisposición.
- A la Dra. Alcira Batlle por su apoyo y las correcciones realizadas sobre esta tesis.
- Al Dr. Roberto Meiss, por su valioso aporte con el análisis histológico.
- A Julieta Teijo, por su invaluable apoyo y amistad durante estos años.
- A Mariana García, Rosalía Cordo Russo y Glenda Ernst, quienes generosamente me enseñaron muchas técnicas que hicieron posible este trabajo.
- A Gabriela y Lorena por su paciencia y ayuda, sobre todo en las primeras etapas de mi trabajo y por su agradable compañía diaria.
- A Jimena y Leda por su ayuda con los Western Blots.
- Al resto de mis compañeros del CIPYP que me han brindado su apoyo y compañía durante estos años.
- A mis padres y a mi hermano Pablo, por haber alentado siempre mi progreso profesional por sobre todas las cosas.
- A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por las becas otorgadas para la realización de esta tesis.
- A todas aquellas personas que a lo largo de la vida me han demostrado, a través de su ejemplo, que el esfuerzo y la dedicación constituyen el único medio posible para el progreso y la dignidad.

## **Abreviaturas**

ALA: Ácido 5-aminolevúlico

ALA-D: ALA dehidrasa

ALA-S: ALA sintetasa

ASC: Ascorbato

BE: Bromuro de etidio

COPROgen: Coproporfirinógeno III

CPGasa: Coproporfirinógeno oxidasa

DAU: Daunorubicina

DiOC<sub>6</sub> : Ioduro de dihexilcarbocianida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOX: Doxorubicina

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

FCCP: trifluorometoxi carbonil cianida fenil hidrazona

Fe-Quel: Ferroquelatasa

FS: Fotosensibilizante

FSs: Fotosensibilizantes

FSC: Forward side scatter

GSH: Glutati3n reducido

H<sub>2</sub>DCF-DA: Diclorohidrofluoresce3n diacetato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Per3xido de hidr3geno

HE: Hidroetidina

Hp: Hematoporfirina

HpD: Derivado de hematoporfirina

IP: Ioduro de propidio

LD<sub>50</sub>: Dosis letal 50

MAN: Manitol

MDR: Resistencia a multidroga

MME: Membrana mitocondrial externa

MMI: Membrana mitocondrial interna



MO: Médula ósea

m-THPC: tetrahidroxifenil clorina

MTT: Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolio)

MVP: Trans-1-(2'-Metoxivinil) pireno

NA: Naranja de acridina

•OH: Radical hidroxilo

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: Oxígeno singulete

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido

PA: Pepstatina A

PgP: Glicoproteína P

PMM: Permeabilización de la membrana mitocondrial

PBG: Porfobilinógeno

PBGasa: Porfobilinógeno deaminasa

PBR: Receptor periférico de benzodiazepinas

PBS: Buffer fosfato de sodio

PPGasa: Protoporfirinógeno oxidasa

PpIX: Protoporfirina IX

PROTOgen IX: Protoporfirinógeno IX

PT: Poro de transición

RC: Remisión completa

RE: Retículo endoplasmático

RM: Receptor de muerte

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: Medio Roswell Memorial Park Institute

SFB: Suero fetal bovino

SSC: Side Scatter

TFD: Terapia fotodinámica

TFD-ALA: Terapia fotodinámica basada en ALA

TMO: Transplante de médula ósea

TRP: Triptofano

URO-D: Uroporfirinógeno decarboxilasa

UROgen III: Uroporfirinógeno III

UROgen III-S: Uroporfirinógeno III-isomerasa

URO-I-S: Uroporfirinógeno I-sintetasa

VCR: Vincristina

# INDICE

## *Objetivos*

Objetivo general .....	1
Objetivos específicos .....	1

## *Introducción*

<b>I. CÁNCER</b> .....	2
I.1. Definiciones básicas y nomenclatura .....	2
I.2. Características generales .....	5
I.3. Bases moleculares del cáncer .....	8
<i>I.3.1. Proto-oncogenes y oncogenes</i> .....	8
<i>I.3.2. Genes supresores de tumores</i> .....	9
<i>I.3.3. Defectos en la reparación del ADN</i> .....	9
I.4. Epidemiología del cáncer. Distribución y estado actual .....	10
I.5. Leucemias y Linfomas .....	14
<i>I.5.1. Tratamientos actuales de las neoplasias hematológicas</i> .....	17
I.6. Alcances y limitaciones de la quimioterapia: desarrollo del fenotipo MDR .....	19
Bibliografía .....	21
<b>II. TERAPIA FOTODINAMICA</b> .....	24
II.1. Generalidades .....	24
II.2. Antecedentes de la Terapia Fotodinámica .....	27
II.3. Aplicaciones médicas de la TFD .....	28
<i>II.3.1. Aplicaciones oncológicas</i> .....	29
<i>II.3.2. Aplicaciones no oncológicas</i> .....	32
II.4. Porfirinas. Generalidades .....	33
<i>II.4.1. Biosíntesis del Hemo.</i> .....	34
II.5. Terapia Fotodinámica basada en ALA. ....	36
Bibliografía .....	39

<b>III. ESTRÉS OXIDATIVO .....</b>	<b>46</b>
III.1. Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno .....	46
III.2. Defensas antioxidantes.....	47
III.3. Reacciones fotoquímicas en la Terapia Fotodinámica .....	49
Bibliografía.....	51
<b>IV. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR LA TFD .....</b>	<b>53</b>
IV.1. Apoptosis.....	54
IV.1.1. Participación de los lisosomas en la apoptosis .....	56
IV.2. Apoptosis y TFD .....	57
IV.3. Necrosis .....	58
IV.4. Necrosis y TFD .....	59
IV.5. Autofagia .....	60
IV.6. Autofagia y TFD .....	60
Bibliografía.....	62

## *Material es y Métodos*

I. Reactivos.....	66
<b>Experimentos <i>in vitro</i>.....</b>	<b>66</b>
II. Líneas celulares.....	66
III. Determinación del número de células .....	67
IV. Extracción y cuantificación de porfirinas .....	67
V. Tratamiento con TFD .....	67
V.1. <i>Incubación con ALA</i> .....	67
V.2. <i>Irradiación</i> .....	68
VI. Ensayo de viabilidad mediante MTT .....	68
VII. Localización intracelular de PpIX.....	68
VIII. Evaluación directa del estrés oxidativo.....	69
VIII.1. <i>Detección de oxígeno singulete</i> .....	69
VIII.2. <i>Detección de anión superóxido</i> .....	69
VIII.3. <i>Detección de peróxido de hidrógeno</i> .....	69
VIII.4. <i>Despolarización de la membrana mitocondrial</i> .....	70

IX. Evaluación indirecta del estrés oxidativo utilizando secuestrantes de ROS .....	70
X. Tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE).....	70
XI. Análisis de la externalización de fosfatidilserina .....	71
XII. Determinación de la morfología mitocondrial post-TFD .....	71
XIII. Preparación de extractos celulares para análisis mediante Western Blot .....	71
XIV. Cuantificación de proteínas de lisados celulares .....	72
XV. Ensayos de Western Blot .....	72
XVI. Estudios con Pepstatina A (PA) .....	73
XVII. Ensayos con DOX y VCR .....	74
XVIII. Ensayos de terapias combinadas .....	74
XIX. Estudios con daunorubicina (DAU). .....	75
<b>Experimentos <i>in vivo</i></b> .....	75
XX. Animales de experimentación .....	75
XXI. Inoculación de células en ratones.....	75
XXII. Análisis citológico mediante la tinción con Giemsa .....	75
XXIII. Análisis histológico de los órganos.....	76
XXIV. Métodos estadísticos .....	76
Bibliografía.....	77

## *Resultados y Discusión*

<b>I. DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE PORFIRINAS ENDÓGENAS A PARTIR DE ALA .....</b>	<b>78</b>
I.1. Síntesis y acumulación de porfirinas.....	78
I.2. Citotoxicidad inducida por la TFD-ALA en condiciones de oscuridad.....	85
I.3. Citotoxicidad inducida por la TFD-ALA en condiciones de irradiación .....	87
I.4. Localización intracelular de la PpIX .....	91
Conclusiones.....	94
Bibliografía.....	95
<b>II. ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR LA TFD-ALA .....</b>	<b>97</b>
II.1. Evaluación directa del estrés oxidativo.....	97
II.1.1 Producción de oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) .....	97
II.1.2 Producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ).....	99

II.1.3 Despolarización de la membrana mitocondrial.....	101
II.1.4 Producción de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	103
II.2. Evaluación indirecta del estrés oxidativo utilizando secuestrantes de ROS.....	105
Conclusiones.....	111
Bibliografía.....	112
<b>III. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LA TFD-ALA .....</b>	<b>114</b>
III.1. Estudios de microscopía de fluorescencia .....	114
III.2. Estudio de la morfología celular mediante el análisis de la dispersión lumínica, utilizando citometría de flujo .....	120
III.3. Análisis de la externalización de fosfatidilserina mediante citometría de flujo .....	122
III.4. Rol de las mitocondrias en la muerte celular inducida por la TFD-ALA.....	125
III.5. Liberación de citocromo c en respuesta a la TFD-ALA .....	127
III.6. Activación de caspasas en respuesta a la TFD-ALA .....	128
III.7. Efecto de la TFD-ALA sobre la expresión de Bcl-2.....	130
III.8. Participación de los lisosomas en la muerte celular inducida por la TFD .....	131
Conclusiones.....	134
Bibliografía.....	135
<b>IV- EFECTOS <i>IN VITRO</i>-<i>IN VIVO</i> DE LAS TERAPIAS COMBINADAS: QUIMIOTERAPIA + TFD-ALA. 137</b>	
<b><i>Experimentos in vitro</i> .....</b>	<b>137</b>
IV.1. Determinación de la LD <sub>50</sub> para los agentes quimioterápicos doxorubicina y vincristina en la línea sensible a drogas LBR-.....	137
IV.2. Viabilidad celular utilizando TFD-ALA, quimioterapia y la combinación de ambas en la línea celular LBR-.....	139
IV.3. Efecto de las terapias combinadas en las líneas celulares resistentes: LBR-D160 y LBR-V160 .....	142
IV.4. Inducción de apoptosis y necrosis utilizando TFD-ALA, quimioterapia y la combinación de ambas en la línea celular LBR- .....	146
IV.5. Estrés oxidativo inducido por TFD-ALA, quimioterapia y la combinación de ambas en la línea celular LBR- .....	151
<b><i>Experimentos in vivo</i>.....</b>	<b>155</b>

IV.7. Efectos de la TFD-ALA, quimioterapia y la combinación de ambas sobre la infiltración leucémica en distintos órganos .....	155
Conclusiones.....	162
Bibliografía.....	163
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>166</b>
<b>CONCLUSIÓN FINAL .....</b>	<b>167</b>

---

# ***Objetivos***



---

## OBJETIVO GENERAL

---

Estudiar los efectos de la terapia fotodinámica basada en ácido 5-aminolevúlico (TFD-ALA) en líneas celulares de leucemia murina sensibles y resistentes a drogas de quimioterapia.

---

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- Estudiar la síntesis, acumulación y localización intracelular de las porfirinas endógenas sintetizadas a partir de ALA.
- Evaluar la efectividad de la TFD-ALA en células sensibles y resistentes a drogas de quimioterapia.
- Dilucidar la participación de las especies reactivas de oxígeno involucradas en el fotodaño y establecer la protección ejercida por diversos agentes antioxidantes en la muerte celular inducida por TFD-ALA.
- Evaluar los cambios morfológicos y bioquímicos inducidos por esta terapia, para poder modularlos y así proteger a las células no tumorales.
- Estudiar la interacción entre la TFD-ALA y la quimioterapia, tanto en un modelo *in vitro*, como en un modelo *in vivo*.

---

# ***Introducción***

## I. CÁNCER

### I.1. Definiciones básicas y nomenclatura

*Neoplasia*: deriva del griego y significa “nuevo crecimiento”. Constituye una masa anormal de tejido, con crecimiento autónomo, descoordinado, excesivo, y que persiste después de cesar el estímulo que le dio origen.

*Cáncer*: Enfermedad neoplásica con transformación de las células, que proliferan de manera anormal e incontrolada. Se utiliza como sinónimo de tumor maligno. El término “cáncer” proviene del latín y significa cangrejo, en referencia a que los tumores malignos se adhieren a las superficies donde crecen en forma pertinaz, de manera parecida al comportamiento de un cangrejo (Cotran y Kumar, 2005).

*Oncología*: Del griego “oncos”, tumor, es la rama de la medicina que estudia los tumores o neoplasias, sobre todo malignos (cáncer).

Todos los tumores, ya sean benignos o malignos, tienen dos componentes básicos en su estructura: 1) las células neoplásicas o transformadas que constituyen el parénquima y 2) su estroma de soporte, derivado del huésped y no neoplásico, constituido por tejido conectivo, vasos sanguíneos y células inflamatorias.

La nomenclatura oncológica se basa en el componente parenquimatoso. El estroma es fundamental para el desarrollo de la neoplasia, dado que brinda el aporte sanguíneo y la base del crecimiento para las células parenquimatosas.

- **Tumores benignos**: se designan agregando el sufijo *-oma* al tipo celular del que se origina el tumor. Según su origen pueden ser: fibroma (tejido conjuntivo fibroso), mixoma (tejido conjuntivo laxo), lipoma (tejido adiposo), condroma (tejido cartilaginoso), osteoma (tejido óseo), hemangioma o angioma (tejido vascular), linfangioma (tejido linfático), meningioma (meninges), tumor glómico (tejido nervioso de sostén), leiomioma (tejido muscular liso), rabdomioma (tejido muscular estriado), papiloma (tejido epitelial

formando papilas), adenoma (tejido glandular), teratoma (células totipotenciales), nevus (melanocitos). Algunos de los tumores benignos derivados de tejido epitelial terminan con el sufijo “adenoma”, aunque se debe tener en cuenta que existen múltiples excepciones a las normas de nomenclatura tumoral. Por ejemplo, las neoplasias benignas de melanocitos se denominan nevus y su forma maligna melanoma.

- **Tumores malignos o cáncer:** la nomenclatura de los tumores malignos sigue reglas similares a las de los tumores benignos, y se pueden clasificar según el origen del tejido del cual se originan.

Los cánceres que derivan de los tejidos mesenquimatosos se denominan sarcomas (del griego *sarcos*, “carnoso”), por ejemplo fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma, angiosarcoma, lifangiosarcoma, sinoviosarcoma, mesotelioma (cavidad pleural, pericárdica o abdominal), leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma.

Las neoplasias malignas de origen epitelial, derivadas de cualquiera de las tres capas germinales del embrión, se denominan carcinomas, por ejemplo carcinoma epidermoide o escamoso, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, cistoadenocarcinoma, coriocarcinoma.

Los tumores que proceden del tejido nervioso son los gliomas (realmente no se trata de un tumor derivado de células nerviosas sino de uno de los tipos celulares encargados de su sostén, las células gliales).

Los cánceres hematológicos son los linfomas y las leucemias, siempre malignos (derivados del tejido linfoide y el mieloide respectivamente).

Los tumores malignos que no cumplen las reglas anteriores y acaban en -oma son: el melanoma, el hepatoma, el seminoma (Cotran y Kumar, 2005; Britannica, 2011).

## **Criterios morfológicos para diferenciar un tumor benigno de un tumor maligno**

Diferenciación y anaplasia: la diferenciación se refiere a la similitud que presentan las células neoplásicas con respecto a las normales equivalentes, tanto a nivel morfológico como funcional. La falta de diferenciación se denomina anaplasia. Por lo general los tumores benignos están bien diferenciados, mientras que las neoplasias malignas pueden ser diferenciadas o indiferenciadas (anaplasia).

Las células anaplásicas se caracterizan por una serie de cambios morfológicos:

- Pleomorfismo: variación en el tamaño y la forma tanto de la célula como de los núcleos. Suelen observarse “células tumorales gigantes” con un enorme núcleo polimórfico y otras con dos o más núcleos.
- Morfología nuclear anormal: los núcleos suelen ser hipercromáticos debido al gran contenido de ADN y desproporcionadamente grandes para la célula.
- Mayor tasa de mitosis: refleja una elevada proliferación de las células parenquimatosas. También suelen observarse mitosis atípicas o aberrantes, con la presencia de husos multipolares.
- Pérdida de polaridad: la orientación de las células anaplásicas se encuentra distorsionada, es decir, pierden su polaridad normal, dando lugar a grandes masas de células creciendo en forma anárquica.

En general, cuanto más rápidamente crezca y más anaplásico sea un tumor, menor es la probabilidad de que haya actividades funcionales especializadas. Las células de los tumores benignos siempre están bien diferenciadas, asemejándose a las células de origen (Cotran y Kumar, 2005).

## I.2. Características generales

El cáncer es una enfermedad compleja caracterizada por la proliferación de células anormales con la capacidad de invadir y colonizar territorios que normalmente son reservados para otras células. Actualmente se asume que el cáncer se origina a partir de una célula que ha sufrido una mutación somática, que modifica su potencial de crecimiento y la respuesta a los mecanismos de control (origen monoclonal del cáncer) (García et al., 1999). Estos cambios pueden implicar mutaciones en uno o más genes, anormalidades cromosómicas graves o anomalías en la transcripción genética que conducen a la desdiferenciación y alteración de las propiedades de crecimiento de la célula. Sin embargo, estas alteraciones en una célula no son suficientes para el desarrollo del cáncer, sino que se requieren cambios genéticos posteriores en su progenie, fenómeno conocido como progresión tumoral (Ellisen y Haber, 2010).

Los efectos del cáncer se evidencian por un conjunto de signos y síntomas de pronóstico y tratamiento diferentes, dependiendo de diversos factores.

Debido a la gran complejidad de esta enfermedad resulta difícil encontrar características generales que definan a la malignidad celular; sin embargo, se han descrito algunas propiedades compartidas por todos los tipos de células cancerígenas (Hanahan y Weinberg, 2000; Schultz, 2005):

- **Proliferación celular aumentada:** por un lado las células cancerígenas presentan una mayor sensibilidad a las señales que estimulan el crecimiento y por otra parte presentan una mínima o nula respuesta a las señales inhibitorias del crecimiento. Como consecuencia, estas respuestas alteradas producen un crecimiento celular incrementado y autónomo.
- **Apoptosis insuficiente:** la proliferación celular en el cáncer depende del balance entre tres factores: el aumento en la proporción de células con mayor tasa de crecimiento (1), el descenso en la tasa de muerte celular debido a una disminución de la apoptosis (2) y la falta de diferenciación celular, que también se asocia a un aumento en la proliferación celular, ya que las células diferenciadas presentan tasas de crecimiento

menores que las indiferenciadas (3). Estos tres factores intervienen en distinta medida según el tipo de cáncer.

- **Diferenciación celular alterada:** las células malignas no siguen el curso natural de la diferenciación, algunas pueden asemejarse al tipo celular que les dio origen, otras pueden presentar estadíos intermedios de diferenciación, o incluso pueden expresar marcadores específicos de otros tejidos. La diferenciación en las células normales se asocia estrechamente a la proliferación, ya que va acompañada de una disminución o pérdida del potencial replicativo celular. En las células cancerígenas la falta de diferenciación promueve el aumento en la proliferación celular.

- **Metabolismo alterado:** las células cancerígenas presentan un aumento en la biosíntesis lipídica y proteica, así como numerosas alteraciones enzimáticas, la mayoría de ellas relacionadas con la gran demanda energética que requiere la alta proliferación celular. Estas alteraciones metabólicas traen como consecuencia la producción de productos de desecho, hormonas o citoquinas que muchas veces resultan tóxicas para el organismo.

- **Inestabilidad genómica:** las células cancerígenas en general presentan múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas tales como la poliploidía, aneuploidía, mutaciones puntuales o alteraciones en los patrones de metilación del ADN y a medida que el cáncer progresa, el número de alteraciones tiende a incrementarse. El cáncer consiste en clones de células que difieren muy poco en sus características genéticas. Las variantes de clones se encuentran sometidas a un proceso selectivo continuo en el cual el clon mejor adaptado al medio es el que sobrevive.

- **Immortalización:** las células tumorales poseen diferencias en la expresión de la telomerasa con respecto a las células normales, lo cual les confiere el potencial de dividirse infinitas veces, de la misma manera que las células madre y las células de la línea germinal.

- **Invasión y metástasis:** esta propiedad constituye el principal criterio que determina la malignidad celular y la letalidad del cáncer. Durante la invasión las células cancerígenas se desprenden de su sitio de origen y se dispersan en distintos sitios del mismo tejido, eventualmente creciendo por encima del mismo e incluso en tejidos adyacentes. Esta etapa normalmente va acompañada de inflamación y neoangiogénesis, que consiste en la formación de nuevos capilares o reconstrucción de vasos sanguíneos preexistentes, con el fin de proveer de oxígeno y nutrientes al nuevo tejido tumoral. Durante la metástasis las células tumorales se separan del tejido de origen o tumor primario y migran a través de los vasos sanguíneos o linfáticos a otros órganos, donde pueden formar nuevos tumores. Existen puntos que limitan la metástasis como la capacidad de las células para atravesar los capilares (extravasación), o la capacidad de sobrevivir y proliferar en un nuevo microambiente. En general, los órganos más susceptibles de metástasis suelen ser los que presentan una alta irrigación, como el hígado, pulmón y hueso; sin embargo cada tipo de cáncer presenta patrones metastásicos diferentes.



### **I.3. Bases moleculares del cáncer**

El daño genético no letal es el responsable de la carcinogénesis. Este daño generalmente se produce en los genes que regulan la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Las alteraciones pueden heredarse en la línea germinal, o bien pueden adquirirse por agentes ambientales, radiación o virus. Sin embargo algunas mutaciones no están inducidas por el ambiente, y se producen en forma espontánea y estocástica (Cotran y Kumar, 2005). La mayoría de los cánceres son producidos por mutaciones en células somáticas, mientras que sólo una pequeña proporción se deben a mutaciones en la línea germinal, y éstos son principalmente los cánceres que se desarrollan en la niñez (Schultz, 2005).

Los genes que regulan el crecimiento celular se dividen en: proto-oncogenes, que favorecen el crecimiento celular, y genes supresores de tumores, que lo inhiben. Ciertas mutaciones en los proto-oncogenes pueden llevar a la célula a un estado proliferativo, cuando ésta normalmente debería estar en reposo. Las mutaciones en genes supresores de tumores eliminan los puntos de restricción en el crecimiento celular, estimulando así la proliferación. Si a estas alteraciones genéticas se suman fallas en la ejecución de la apoptosis y fallas en los mecanismos de reparación del ADN, las mutaciones se acumulan y se transmiten a las células hijas durante la división celular (Ellisen y Haber, 2010).

#### **I.3.1. Proto-oncogenes y oncogenes**

Un oncogen es un gen anormal o activado que procede de la mutación o activación de un gen normal llamado proto-oncogen. Los proto-oncogenes codifican para proteínas de señalización que estimulan la división celular y pueden ser factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señal y factores de transcripción. Uno de los oncogenes mejor caracterizados es el oncogen *ras*, que presenta un único defecto en su secuencia nucleotídica, resultando en un cambio de aminoácido en la proteína codificada. La proteína *ras* mutada se encuentra presente en aproximadamente el 25% de los cánceres humanos, incluyendo cáncer de páncreas, de pulmón y de colon.

La transformación de un proto-oncogen en oncogen puede deberse a tres mecanismos: translocaciones cromosómicas (Ej.: en algunos tipos de leucemias y linfomas) (Gostissa et al., 2011), amplificación de genes (Ej: en algunos casos de neuroblastoma y cáncer de mama) (Mengs et al., 2004; Bell et al., 2010) y mutaciones puntuales (Ej: oncogen *ras* en distintos tipos de cáncer) (Wong, 2010).

### **I.3.2. Genes supresores de tumores**

A diferencia de los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores constituyen los mecanismos de freno de la proliferación celular. Las alteraciones en estos genes pueden dar lugar a proteínas defectuosas, que no cumplen su función normal, y de esa manera actúan en forma similar a los oncogenes. Algunos de los genes supresores más estudiados son: RB, asociado a retinoblastoma, p53, mutado en un 50% de distintos tipos de tumores (Ej: cáncer de pulmón, de mama, de piel, de hígado, de esófago, de cabeza y cuello, entre otros) (Sábado Alvarez, 2008; Ozaki y Nakagawara, 2010; Mogi y Kuwano, 2011) y BCRA1 y BCRA2, asociados principalmente al cáncer de mama (Da Silva y Lakhani, 2006).

### **I.3.3. Defectos en la reparación del ADN**

Los mecanismos de reparación del ADN son los responsables de mantener su integridad frente a los numerosos errores que ocurren normalmente en la replicación. Cuando se producen alteraciones en estos mecanismos, la tasa de mutaciones, y por ende la probabilidad de desarrollar cáncer, aumenta. Un ejemplo de estas alteraciones son las mutaciones producidas en los genes MSH2 y MLH1, asociadas al cáncer de colon hereditario no poliposo (Vaughn et al., 2008).

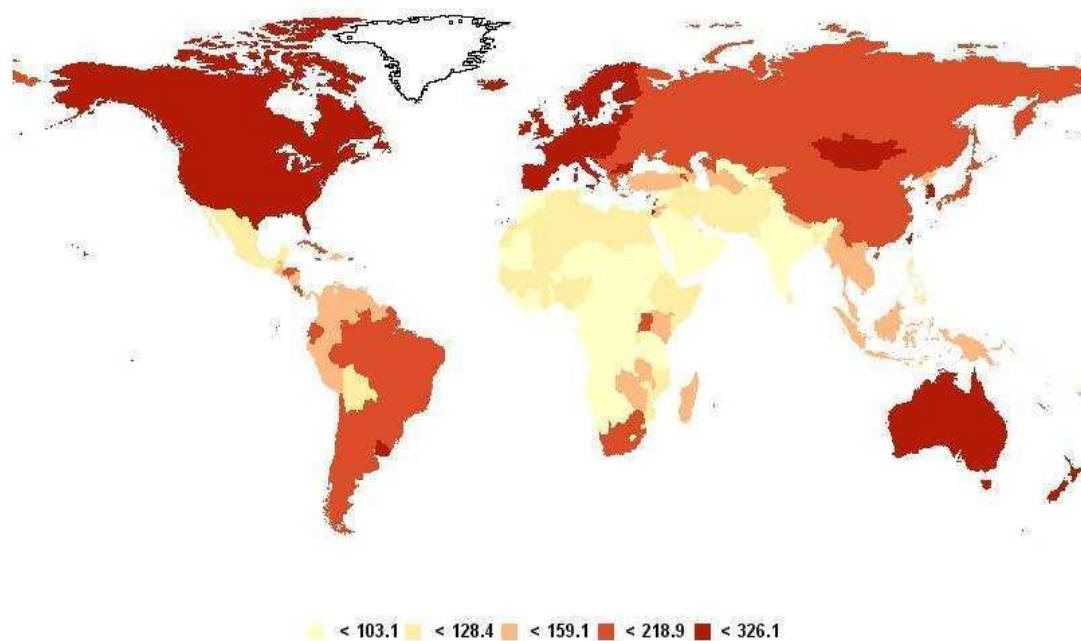
#### **I.4. Epidemiología del cáncer. Distribución y estado actual**

A pesar de que cada vez sabemos más sobre la manera de prevenir y tratar el cáncer, cada año aumenta el número de personas que lo padecen. Si la tendencia continúa como hasta ahora, en el año 2020 se reportarán 16 millones de nuevos casos, de los cuales dos tercios vivirán en países en desarrollo o en países de industrialización reciente. El cáncer actualmente es la segunda causa de muerte en los países desarrollados y en los países en desarrollo figura entre las tres principales causas de muerte de los adultos. Un 12.5% del total de causas de muerte se atribuye al cáncer, porcentaje que supera al total de muertes debidas al SIDA, la tuberculosis y la malaria consideradas conjuntamente. El cáncer es un problema de salud pública en todo el mundo y afecta a personas de todas las edades y condiciones (Acción Mundial Contra el Cáncer, 2005).

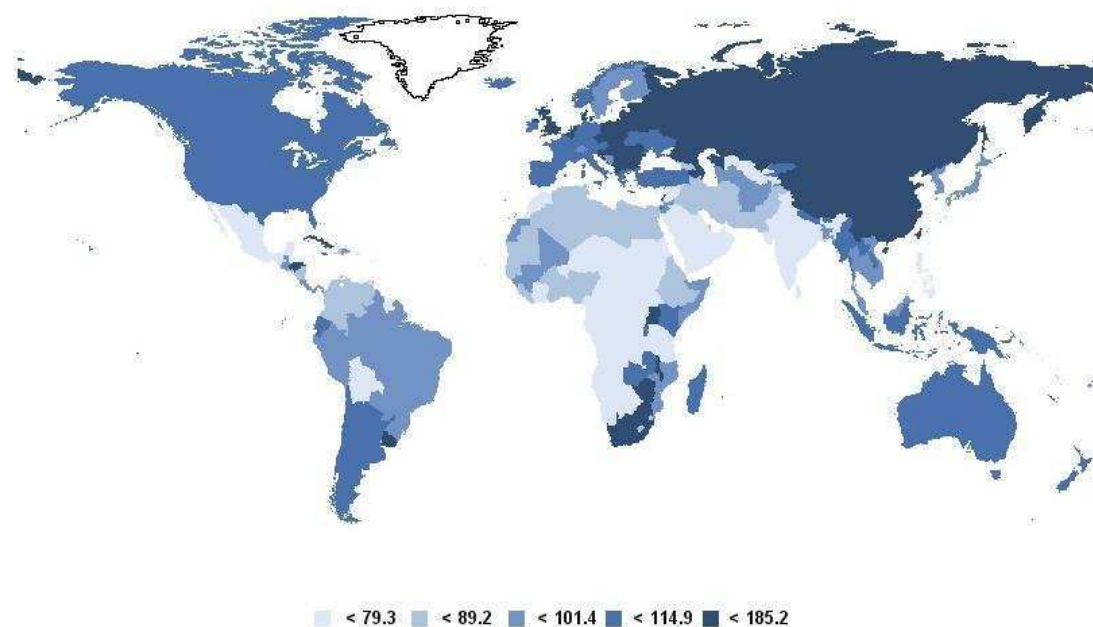
Durante el año 2008 se reportaron en todo el mundo cerca de 12,7 millones de nuevos casos de cáncer y 7,6 millones de muertes debidas a esta enfermedad.

Algunos tipos de cáncer están asociados con una alta sobrevida en los países desarrollados (próstata, mama y cáncer colorrectal), mientras que otros con peor pronóstico (hígado, estómago y de esófago) son más comunes en regiones de menor desarrollo (GLOBOCAN, IARC, 2008).

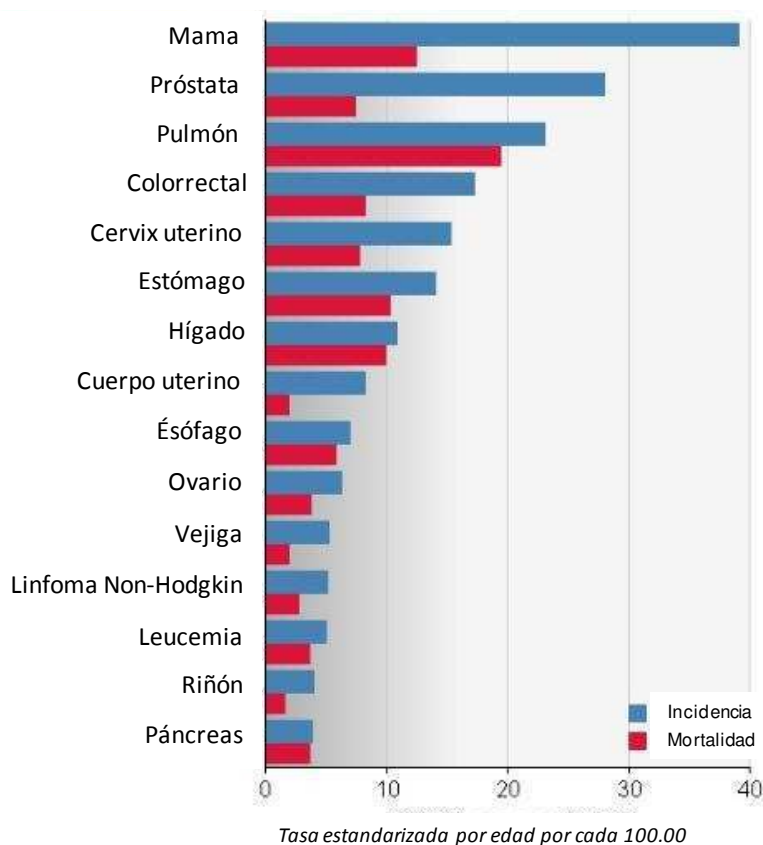
En los países en desarrollo y en los países de industrialización reciente se observan las mayores tasas de aumento del cáncer. El aumento relativo ha sido menor en algunos países industrializados en los que ha disminuido el consumo de tabaco y donde la población está adoptando estilos de vida más saludables (Acción Mundial Contra el Cáncer, 2005).



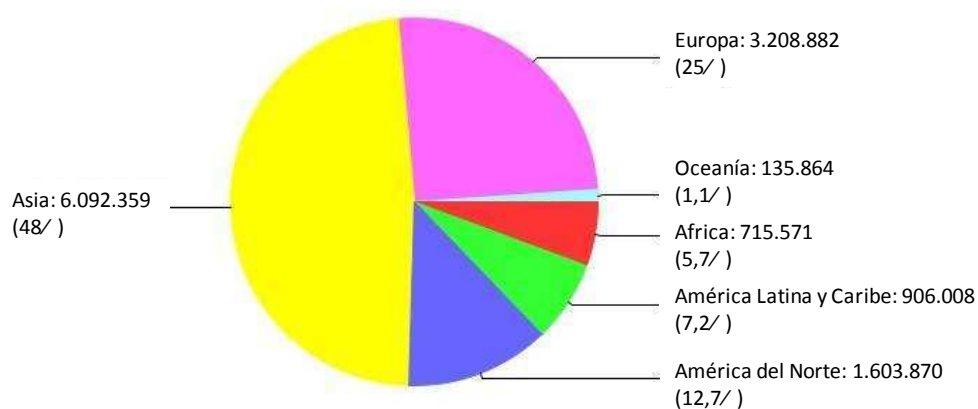
**Fig. 1.** Tasa estimada de incidencia de cáncer (estandarizada por edades) por cada 100.000 habitantes. Fuente: GLOBOCAN (IARC), 2008.



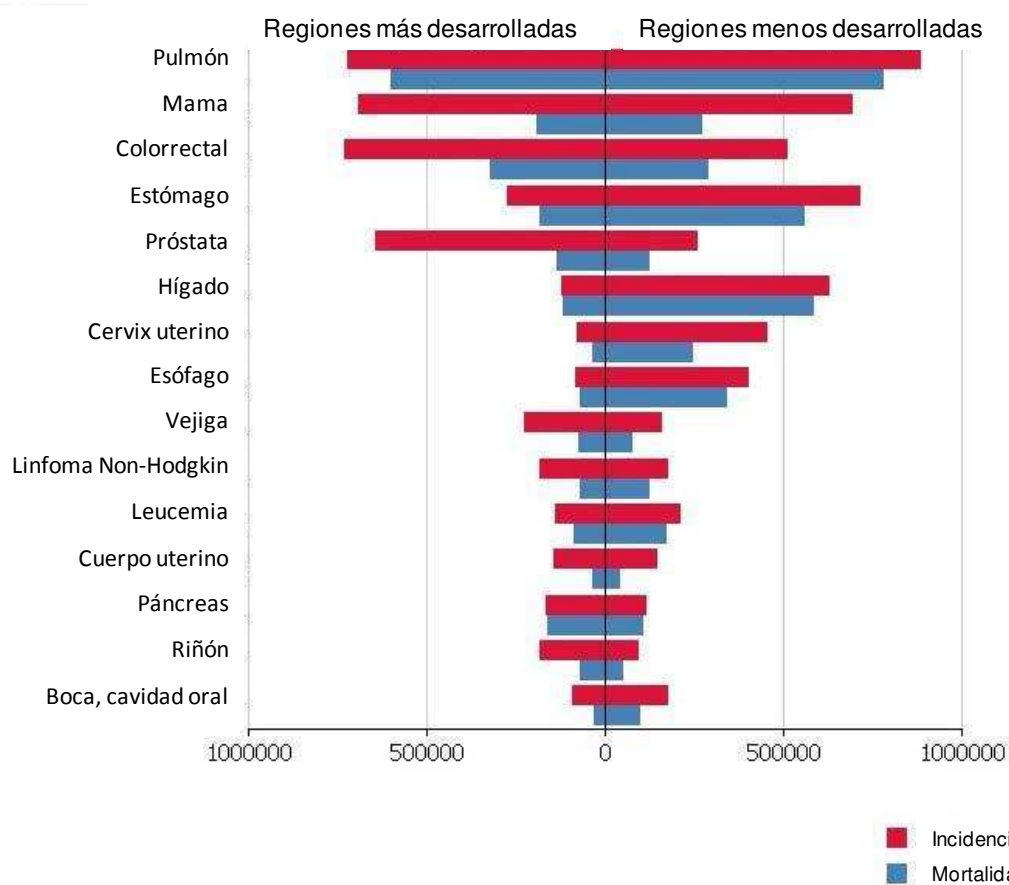
**Fig. 2.** Tasa estimada de mortalidad por cáncer (estandarizada por edad) por cada 100.000 habitantes. Fuente: GLOBOCAN (IARC), 2008.



**Fig.3.** Tasa de incidencia y mortalidad en ambos sexos (estandarizada por edad) cada 100.000 habitantes, para distintos tipos de cáncer en todo el mundo. Fuente: GLOBOCAN (IARC), 2008.



**Fig.4.** Nº de casos de cáncer estimados para ambos sexos y todas las edades en distintas regiones del mundo. Fuente: GLOBOCAN (IARC), 2008.



**Fig.5.** Tasa de incidencia y mortalidad en ambos sexos (estandarizada por edad) cada 100.000 habitantes, para distintos tipos de cáncer en regiones con diferente grado de desarrollo. Fuente: GLOBOCAN (IARC), 2008.

## **I.5. Leucemias y Linfomas**

Las neoplasias hematológicas son un grupo heterogéneo de enfermedades malignas que afectan a las células provenientes del linaje hematopoyético, y comprenden a las leucemias y a los linfomas. Se clasifican según el tipo celular que les dio origen. Las leucemias se originan a partir de células madre o células en distintas etapas de diferenciación del linaje mieloide o linfoide (leucemias mieloides y linfoides, respectivamente), mientras que los linfomas se desarrollan en los órganos linfáticos a partir de células linfoides, formando masas celulares (Schultz, 2005).

Las leucemias también se clasifican según la velocidad de desarrollo de la enfermedad. Las leucemias agudas se caracterizan por un aumento muy rápido de las células sanguíneas inmaduras. La progresión celular y la dispersión celular pueden desarrollarse muy velozmente, por lo cual es importante que el tratamiento sea precoz. Esta forma de leucemia es la más común en niños. Las leucemias crónicas en cambio, se caracterizan por una proliferación excesiva de glóbulos blancos maduros, aunque anormales. La progresión es más lenta que en el caso de las agudas, por lo que no siempre se administra el tratamiento inmediatamente, si no que a veces se monitorea la situación para ver cuál es el momento más efectivo para la terapia. Aunque pueden ocurrir en cualquier grupo de edad, la leucemia crónica ocurre más a menudo en personas mayores.

Teniendo en cuenta los parámetros anteriormente descritos, una de las clasificaciones propuestas para las leucemias es la siguiente:

1. Leucemia mieloide aguda: se origina en las células mieloides inmaduras (mieloblastos).
2. Leucemia linfoide aguda: se origina en los linfocitos B o T inmaduros (linfoblastos).
3. Leucemia mieloide crónica: se desarrolla en células mieloides inmaduras que normalmente darían lugar a granulocitos. Pertenece al conjunto de enfermedades conocido como desórdenes mieloproliferativos.
4. Leucemia linfática crónica: afecta a los linfocitos B.

Si bien no se conocen con exactitud las causas de la leucemia, se sabe que ciertos factores predisponen al desarrollo de la enfermedad, entre ellos la exposición a radiaciones

ionizantes, ciertos factores genéticos y congénitos, exposición a productos químicos mutagénicos como el benceno, e infecciones con algunos virus (Duarte-Davidson et al., 2001; Schubauer-Berigan y Wenzl, 2001; Kadow et al., 2002; Plass et al., 2008).

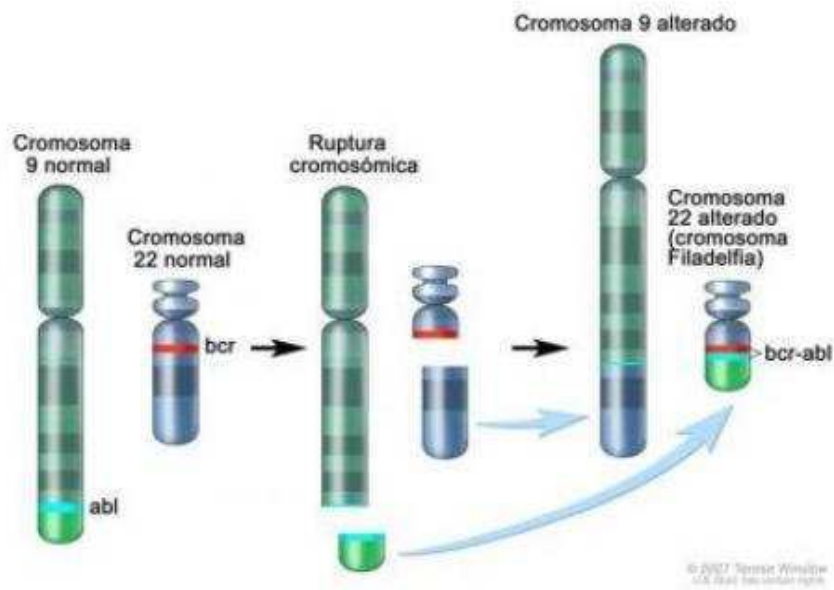
Estudios epidemiológicos han demostrado una alta incidencia de algunos tipos de leucemias en las poblaciones expuestas a radiaciones ionizantes, como el caso de Hiroshima y Nagasaki en Japón, y Chernobyl en la ex Unión Soviética (Little, 2009).

También se demostró una alta incidencia de leucemia en individuos expuestos a radiaciones como consecuencia del tratamiento de ciertas patologías (Renella et al., 2006).

Las neoplasias hematológicas se caracterizan por presentar ciertas alteraciones genéticas, que pueden ser pérdidas o ganancias cromosómicas, pero principalmente translocaciones. Estas últimas llevan a la activación de proto-oncogenes o a la formación de proteínas de fusión que promueven el desarrollo de la enfermedad (Schulz, 2005).

Algunas translocaciones permiten diferenciar los distintos tipos de leucemias, por ejemplo la translocación entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 (cromosoma Filadelfia o fusión BCR-ABL) se encuentra presente en más del 90% de los casos de leucemia mieloide crónica (Fig. 6). La región BCR-ABL codifica para un número de proteínas y enzimas que controlan el ciclo celular; también inhibe la reparación del ADN, causando inestabilidad genómica.





**Fig.6.** Translocación entre cromosomas 9 y 22, dando origen al cromosoma Philadelphia con la fusión BCR-ABL.

### **I.5.1. Tratamientos actuales de las neoplasias hematológicas**

Todos los tratamientos para las neoplasias hematológicas persiguen un mismo fin: lograr la remisión completa (RC), es decir la desaparición de todos los síntomas de la enfermedad, de células neoplásicas detectables y el restablecimiento de las funciones normales de la médula ósea. Sin embargo, la RC no siempre significa la cura de la enfermedad, debido a que pueden quedar células malignas remanentes no detectables que con el tiempo pueden proliferar y producir una recaída de la enfermedad. Los casos que no responden a los tratamientos se denominan refractarios.

La quimioterapia es el tratamiento más utilizado para las leucemias, y consiste en la administración sistémica de dos o más drogas cuya vía de administración puede ser oral, intravenosa o intratecal (directamente al líquido cefalorraquídeo). Algunas de las drogas utilizadas actualmente son la doxorubicina, ciclofosfamida, citarabina, prednisona, daunorubicina y vincristina (Woolridge, 2008).

La radioterapia se basa en la utilización de rayos de alta energía para destruir a las células tumorales. Puede consistir en la aplicación localizada, cuando en ciertos tipos de neoplasias hematológicas se conoce la ubicación precisa de las células target, o bien radiación total del cuerpo, que se utiliza previo al trasplante de médula ósea. Esta última generalmente se realiza en múltiples dosis o en el transcurso de varios días.

El trasplante de médula ósea (TMO) permite administrar altas dosis de quimioterapia o de radioterapia y también la posibilidad de proveer al paciente de células libres de enfermedad provenientes de un donante sano. En el caso de los trasplantes alogénicos, la médula es provista por un donante y reinfundida en la sangre del paciente. Las células llegan a la médula ósea (MO) a través del torrente sanguíneo, donde se vuelven funcionales. El éxito de este tipo de trasplantes depende de la cercanía genética entre el donante y el receptor, debido al posible rechazo ocasionado por los antígenos de histocompatibilidad, que puede dar lugar al fenómeno denominado “enfermedad del injerto contra el huésped” (las células del donante atacan inmunológicamente al receptor) . Este riesgo potencialmente fatal se puede eliminar cuando el trasplante es autólogo, es decir, transplantando células del mismo paciente. Durante la remisión de la enfermedad, se extrae médula ósea y se congela hasta reinsertarse en el paciente cuando

éste presenta una recaída. Para asegurar que no se reinsertan células leucémicas, la médula debe ser tratada mediante un proceso denominado “purgado”. En la actualidad se están investigando nuevos métodos para optimizar este proceso y garantizar así la eficacia del trasplante (Shustov et al., 2011; Huang et al., 2011; Rahman et al., 2011).

En los últimos años, las terapias biológicas o inmunoterapias han alcanzado un gran desarrollo y se han convertido en formas de tratamiento convencional para distintos tipos de cáncer. Se utilizan moléculas dirigidas a células target, desarrolladas con el fin de optimizar la eficacia del tratamiento y de reducir la toxicidad no específica que se observa comúnmente en la quimioterapia. Dentro de los tratamientos biológicos están los anticuerpos monoclonales, que reconocen antígenos específicos de las células tumorales y se utilizan actualmente para el purgado de médula ósea; también se utilizan citoquinas, como el interferón y las interleuquinas, que actúan sobre la respuesta inmune del paciente, y los denominados factores de crecimiento.

## **I.6. Alcances y limitaciones de la quimioterapia: desarrollo del fenotipo MDR**

Desde un punto de vista oncológico el término “quimioterapia” involucra la administración de drogas citotóxicas, habitualmente con efectos secundarios no deseados, como tratamiento a pacientes con enfermedades malignas. El sitio de acción de las drogas citotóxicas tradicionales es el ADN o procesos asociados al ADN. Algunas drogas pueden actuar directamente con el ADN, intercalándose entre sus bases (Ej.: antraciclinas, actinomicina D), alterando su estructura química (formación de aductos) (Ej.: agentes alquilantes, mitomicina C, compuestos de platino) o sustituyendo las bases con estructuras análogas (Ej.: 5-fluoracilo, citarabina, gemcitabina). Otras drogas pueden actuar disminuyendo el pool de bases requerido para la síntesis del ADN (y ARN) (Ej.: 5-fluoracilo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina). También puede ocurrir que las drogas interactúen directamente con proteínas asociadas al ADN como la topoisomerasa I (Ej.: irinotecan, topotecan) o con la topoisomerasa II (Ej.: etopósidos, doxorubicina). Otros agentes citotóxicos pueden afectar los microtúbulos que organizan los cromosomas durante la mitosis (Ej.: alcaloides de la vinca, taxanos) (Camidge y Jodrel, 2005).

Si bien se han dilucidado los principales sitios de acción para la mayoría de las drogas utilizadas actualmente en la clínica, poco se conoce actualmente de los mecanismos precisos que desencadenan la muerte celular.

La resistencia a quimioterapia constituye un gran obstáculo en el tratamiento de los pacientes con cáncer. Múltiples mecanismos contribuyen a la resistencia y aunque los investigadores coinciden en que el principal sitio de acción de la droga es el sitio más probable involucrado en la resistencia a dicha droga, se han reportado casos exhibiendo resistencia cruzada con drogas estructuralmente diferentes y que no comparten un target común. Este fenómeno, conocido como resistencia a multidroga (MDR) también puede provenir de otros mecanismos celulares como: defectos en los genes que controlan la apoptosis, un incremento en la detoxificación celular, alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN y activación o sobreexpresión de proteínas que expulsan drogas (Rumanjek et al., 2001).

Dentro de la variedad de mecanismos identificados en el fenotipo MDR, el mejor caracterizado involucra la expresión de un producto del gen MDR, la glicoproteína P (Pgp) (Teodori et al., 2006). La Pgp, al igual que la proteína relacionada con MDR (MRP) y el transportador de péptidos antigénicos, todos involucrados en el fenotipo MDR, son miembros de la superfamilia de genes “cassette de unión al ATP” que codifica para proteínas de transmembrana dependientes de ATP. Las células que sobreexpresan Pgp muestran una reducida concentración intracelular de drogas que son sustrato para ese transportador. La Pgp al actuar como bomba extrusora de drogas es capaz de eliminar una gran variedad de drogas no relacionadas estructuralmente que ingresan a la célula mediante difusión pasiva y de esta manera, los niveles de droga intracelulares no llegan a alcanzar una concentración tóxica.

Se han realizado numerosos estudios buscando la posibilidad de modular la actividad de Pgp, y de esta manera evitar la aparición de resistencia a multidrogas. Algunas drogas mostraron poseer efectos moduladores, como las ciclosporinas, vinblastina y fenotiazina (Lopes et al., 2003; Nagy et al., 2004).

En numerosos trabajos se ha reportado que Pgp no interviene en la extracción de ALA o PpIX desde el interior de la célula, pero en algunos tipos celulares se observó resistencia cruzada entre TFD basada en ALA (TFD-ALA) y quimioterapia (Moorehead et al., 1994; Kessel et al., 1994). Por este motivo resulta importante esclarecer si la TFD resulta efectiva para optimizar el proceso de purgado en el trasplante autólogo de médula ósea.

---

## Bibliografía

Bell E, Chen L, Liu T, Marshall GM, Lunec J, Tweddle DA. MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential. *Cancer Lett.* 2010; 293(2):144-57.

"Cancer." *Encyclopedia Britannica. Encyclopedia Britannica Online*, 2011. <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/92230/cancer>>. *Acción Mundial Contra el Cáncer*. Editor: World Health Organization. 2005. P1-24.

Camidge R y Jodrel DI. Chemotherapy. En Knowles M y Selby P. Introduction to The Cellular and Molecular Biology of Cancer. 4° Ed. Estados Unidos. *Editorial: Oxford University Press, UK*. 2005. P 399-413.

Cotran R, Kumar V, Collins T. Neoplasia. En: Robbins S, Cotran R. Patología Estructural y Funcional. *Editorial: Elsevier, España*. 2005. P 271-6.

Da Silva L, Lakhani SR. Pathology of hereditary breast cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 2008; 10(7):389-94.

Duarte-Davidson R, Courage C, Rushton L, Levy L. Benzene in the environment: an assessment of the potential risks to the health of the population. *Occup. Environ. Med.* 2001; 58(1):2-13.

Ellisen LW, Haber DA. Basic Principles of Cancer Genetics. En: Chung D. The Massachusetts General Hospital Guide To Clinical Cancer Genetics. *Editorial: Springer-Verlag, USA*. 2010. P 1-22.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10* [Internet].

Garcia SB, Park HS, Novelli M, Wright NA. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. *J Pathol.* 1999; 187(1):61-81.

Gostissa M, Alt FW, Chiarle R. Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:319-50.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1):57-70.

Huang H, Chen Y, Chen W, Wu Y. Purging efficacy of ZnPcH(1) -based photodynamic therapy on chronic myeloid leukemia bone marrow. *Int. J. Lab. Hematol.* 2011; 33(5):477-82.

Kadow JF, Regueiro-Ren A, Weinheimer SP. The role of viruses in human cancer development and antiviral approaches for intervention. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2002; 3(11):1574-9.

Kessel D, Woodburn K, Skalkos D. Impaired accumulation of a cationic photosensitizing agent by a cell line exhibiting multidrug resistance. *Photochem. Photobiol.* 1994; 60(1):61-3.

Little MP. Leukaemia following childhood radiation exposure in the Japanese atomic bomb survivors and in medically exposed groups. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 2008; 132(2):156-65.

- Lopes EC, Garcia M, Benavides F, Shen J, Conti CJ, Alvarez E, Hajos SE. Multidrug resistance modulators PSC 833 and CsA show differential capacity to induce apoptosis in lymphoid leukemia cell lines independently of their MDR phenotype. *Leuk. Res.* 2003; 27(5):413-23.
- Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(25):9393-8.
- Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011:583929.
- Moorehead RA, Armstrong SG, Wilson BC, Singh G. Cross-resistance to cisplatin in cells resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.* 1994; 54(10):2556-9.
- Nagy H, Goda K, Fenyvesi F, Bacsó Z, Szilasi M, Kappelmayer J, Lustyik G, Cianfriglia M, Szabó G Jr. Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 315(4):942-9.
- Ozaki T, Nakagawara A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *Mod. Pathol.* 2010; 23 Suppl 2:S46-51.
- Plass C, Oakes C, Blum W, Marcucci G. Epigenetics in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* 2008; 35(4):378-87.
- Rahman MM, Madlambayan GJ, Cogle CR, McFadden G. Oncolytic viral purging of leukemic hematopoietic stem and progenitor cells with Myxoma virus. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21(2-3):169-75.
- Renella R, Verkooijen HM, Fioretta G, Vlastos G, Kurtz J, Sappino AP, Schäfer P, Neyroud-Caspar I, Bouchardy C. Increased risk of acute myeloid leukaemia after treatment for breast cancer. *Breast.* 2006; 15(5):614-9.
- Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC, Capella MA. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2001; 73(1):57-69.
- Sábado Alvarez C. Molecular biology of retinoblastoma. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011:603925.
- Schubauer-Berigan MK, Wenzl TB. Leukemia mortality among radiation-exposed workers. *Occup. Med.* 2001; 16(2):271-87.
- Schultz, WA. An Introduction to Human Cancers. En: Schultz, WA. *Molecular Biology of Human Cancers*. Estados Unidos. Editorial: Springer. 2005. P 11-22.
- Shustov A, Cherian S, Shaw A, Lupinacci TA, Maloney D, Holmberg L, Gopal AK. *In-vivo* purging of the circulating clonal T-cells with Alemtuzumab prior to autologous peripheral blood hematopoietic cell mobilization and transplantation. *Br. J. Haematol.* 2011; 154(3):415-8.

Teodori E, Dei S, Martelli C, Scapecchi S, Gualtieri F. The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR). *Curr. Drug Targets*. 2006; 7(7):893-909.

Vaughn CP, Lyon E, Samowitz WS. Confirmation of single exon deletions in MLH1 and MSH2 using quantitative polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn*. 2008; 10(4):355-60.

Wong KK. Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/ MEK/ERK pathway. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov*. 2009; 4(1):28-35.

Woolridge JE. Acute Myeloid Leukemia, Acute Lymphoblastic Leukemia, and Chronic Lymphocytic Leukemia. En: Perry MC. *The Chemotherapy Source Book*. 3° Ed. Editorial: Lippincott, Williams Wilkins. 2008. P 534-51.



## II. TERAPIA FOTODINAMICA

### II.1. Generalidades

Los compuestos fotosensibilizantes (FSs) poseen la capacidad de absorber fotones y transferir esa energía absorbida a moléculas de O<sub>2</sub>, las cuales incrementan su reactividad y se convierten en oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), un poderoso agente oxidante. La terapia fotodinámica (TFD) es una terapia antineoplásica relativamente nueva, que utiliza este principio fotoquímico para causar daño oxidativo en importantes estructuras biológicas, destruyendo así el tejido maligno. Involucra el pre-tratamiento del tejido con un FS y la posterior irradiación del mismo con luz de una determinada longitud de onda (Fig.9 y 10) (Weishaupt et al., 1976; Ackroyd et al., 2001; Agostinis et al., 2011).

Los estados excitados tanto del FS como del O<sub>2</sub> tienen vidas medias muy cortas, por lo cual, para garantizar la efectividad de la TFD, es preciso que ambas moléculas se encuentren próximas a estructuras biológicas importantes.

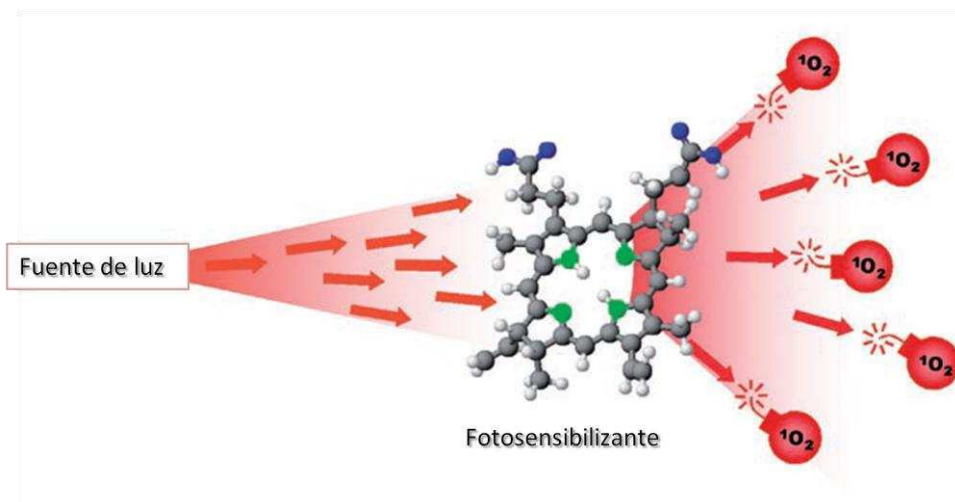
Un FS ideal debe ser biológicamente estable, fotoquímicamente eficiente, no debe tener toxicidad sistémica y debe ser captado y retenido exclusivamente por el tejido maligno (Kalca et al., 2000; Fernandez-Guarino, 2007).

Actualmente no existe un agente ideal, pero hay varias sustancias potencialmente útiles como sulfuro de berbecina, fluoresceína-eosina, tetraciclinas, naranja de acridina y, en especial, las porfirinas (Pushpan et al., 2002).

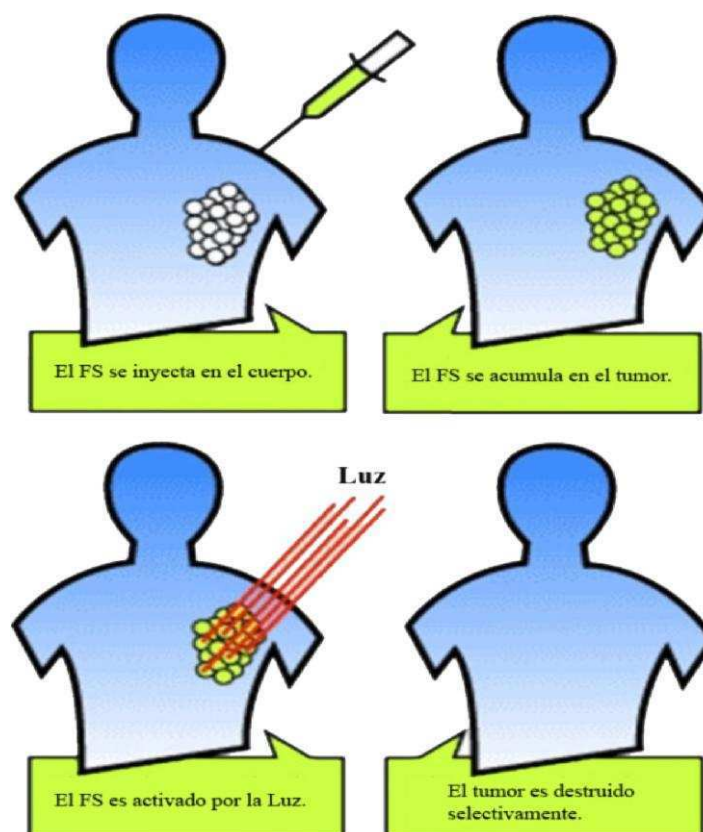
Las ventajas terapéuticas que presenta la TFD respecto a las demás modalidades antitumorales, es que puede ser repetida muchas veces o usada luego de otros tratamientos, por no exhibir resistencia cruzada con otras drogas. Además, el riesgo de generación de nuevas neoplasias es bajo, ya que el daño al ADN es limitado, así como lo es también el riesgo de perforar o reducir la fuerza mecánica de órganos internos (Kennedy, 2006).

Para que la TFD sea efectiva es necesario un daño oxidativo significativo que produzca la muerte celular. La magnitud del daño producido depende de ciertos factores:

- Disponibilidad de O<sub>2</sub>: es fundamental una adecuada concentración de O<sub>2</sub> en el interior de la célula target inmediatamente antes de la TFD, la cual va a ir decreciendo a medida que las moléculas de O<sub>2</sub> se utilicen en los procesos oxidativos. Uno de los posibles efectos de la TFD es la formación de edemas en la zona tratada, lo cual puede limitar la circulación sanguínea, y por lo tanto, la reposición de O<sub>2</sub>. Por este motivo en la TFD se suelen utilizar dosis lumínicas más bajas durante un período de tiempo mayor, o dosis lumínicas fraccionadas para permitir la reoxigenación de los tejidos (Middelburg et al., 2010).
- FS: debido a la corta vida media que presentan las moléculas de FS y el oxígeno singlete, para garantizar la efectividad de la terapia, es fundamental que el FS se encuentre localizado en estructuras vitales de la célula. Si la reacción tiene lugar a cierta distancia de las estructuras target, el FS activado por la luz perderá su energía y el oxígeno singlete su capacidad reactiva, sin llegar a producir la muerte celular deseada.
- Luz: existen tres factores importantes a tener en cuenta: la longitud de onda, la dosis total de luz en el sitio target y la intensidad de la misma. La longitud de onda empleada debe ser la adecuada para poder ser absorbida por el FS deseado. No siempre coincide con el pico máximo de absorción del FS, ya que en ese rango del espectro lumínico suelen absorber gran cantidad de luz otras estructuras distintas al target, como la sangre o ciertos pigmentos; o bien la luz se puede dispersar demasiado y no llega a penetrar adecuadamente en los tejidos. La dosis lumínica total es tan importante como la intensidad empleada. Si la dosis es demasiado baja las células van a lograr reparar gran parte del daño oxidativo. Cuando se emplean dosis demasiado altas, en ciertos casos puede producirse el calentamiento de los tejidos (Kennedy, 2006).



**Fig. 9.** Excitación del FS al absorber luz de una apropiada longitud de onda y producción de oxígeno singlete.



**Fig. 10.** Mecanismo de la TFD para lograr la destrucción tumoral selectiva.

## **II.2. Antecedentes de la Terapia Fotodinámica**

Las investigaciones científicas relacionadas con la TFD tuvieron comienzo en 1900 en el Instituto Farmacológico de la Universidad de Munich, Alemania, bajo la dirección de Hermann von Tappeiner. Estudiando la toxicidad de posibles agentes anti-maláricos, Oscar Raab descubrió que la acridina poseía mayor efecto tóxico sobre organismos ciliados cuando se encontraba en presencia de luz. Este descubrimiento llevó a numerosas investigaciones relacionadas con el fenómeno (Krammer et al., 2006). En pocos años se identificaron varias sustancias cuya toxicidad se incrementaba con la luz, como la eosina, que además era relativamente segura para el uso en humanos, ya que se había utilizado previamente para el tratamiento de la epilepsia. La primera aplicación clínica de la TFD utilizando eosina la llevaron a cabo Hermann von Tappeiner y Albert Jesionek en 1903, para el tratamiento de lesiones malignas de piel. En el mismo año, Georges Dreyer, en Copenhague, reportó la inducción de necrosis tisular utilizando eritrosina como FS. En 1904 von Tappeiner introdujo por primera vez el término “acción fotodinámica” y asoció este proceso con la presencia de O<sub>2</sub> (Triesscheijn et al., 2006).

Las primeras aplicaciones clínicas no fueron del todo satisfactorias, y aunque posteriormente se siguió investigando y se descubrió la hematoporfirina (Hp) como un potente FS, no se observaron grandes avances hasta 1973, año en el que Tom Dougherty de Buffalo, Nueva York, fundó un grupo de investigación sobre la TFD. El FS empleado en sus estudios fue un porfímero sódico, derivado de la Hp, y se convirtió en la primera droga aprobada para el tratamiento oncológico mediante TFD (Dougherty, 2010). Con el fin de optimizar la terapia y minimizar los efectos secundarios, se estudiaron y desarrollaron nuevas drogas, como el m-THPC y el ácido 5-aminolevúlico (ALA).

Uno de los primeros trabajos que anticiparon al ALA como un FS prometedor para la TFD proviene de nuestro laboratorio, cuando en 1975 Batlle describió la destrucción selectiva de callos de soya, tejido considerado como un tumor vegetal dada su alta división celular, cuando se agregaba ALA al medio de cultivo y luego se iluminaba (Batlle et al., 1975). Posteriormente, en 1987 Malik y Lugaci estudiaron la síntesis de porfirinas inducida por ALA en células eritroleucémicas, observando muerte celular tanto necrótica como apoptótica dependiente de la dosis lumínica aplicada en la TFD (Malik y Lugaci, 1987). En

ese mismo año, Johan Moan reportó la utilización de ALA como FS en ratones, aunque en esa oportunidad no logró obtener concentraciones de porfirinas que produjeran fotosensibilización en los tumores, y tampoco en los tejidos normales (Moan et al., 1987). En los años siguientes se realizaron numerosas investigaciones que contribuyeron a comprender con mayor claridad los mecanismos de acción y las posibles aplicaciones terapéuticas de la TFD-ALA. Algunos ejemplos de esas contribuciones son los trabajos realizados en nuestro laboratorio: Empleando células epiteliales de mamífero se demostró que la incorporación de ALA resultaba mayor en células proliferativas y era sensible a cicloheximida, sugiriendo que la captación diferencial podría estar a nivel del transporte a través de membrana (Fukuda et al., 1993a). También se desarrolló un modelo *in vitro-in vivo* que permitió confirmar el daño celular directo por irradiación de las células previamente incubadas con ALA (Fukuda et al., 1993b). Utilizando ese mismo modelo se demostró que el daño fotodinámico inducido por ALA combinado con ciclofosfamida o doxorubicina, podía aumentar la efectividad de la TFD (Casas et al., 1997; Casas et al., 1998). También se comparó la administración de ALA liposomal y ALA libre (Fukuda et al., 1992), se estudió la acumulación de porfirinas y la efectividad de la TFD utilizando derivados de ALA, como hexil-ALA, undecanoil-ALA y tetrahidropiranyl-ALA (Perotti et al., 2001; Di Venosa et al., 2006). En trabajos más recientes se estudiaron los mecanismos de muerte ocasionados por la TFD-ALA (Diez et al., 2009) así como también mecanismos de resistencia asociados a esta terapia (Casas et al., 2011; Di Venosa et al., 2012).

### **II.3. Aplicaciones médicas de la TFD**

Actualmente la TFD se encuentra aprobada para una gran variedad de patologías utilizando distintos FSs.

Los compuestos aprobados hasta el momento para el uso clínico incluyen: porfímero sódico (Photofrin<sup>®</sup>, Axan Pharma Inc.), ALA (Levulan<sup>®</sup>, DUSA Pharmaceuticals, Inc), metil-éster de ALA (Metvix<sup>®</sup>, PhotoCure ASA), hexil-éster de ALA (Hexvix<sup>®</sup>, PhotoCure ASA), m-THPC (Foscan<sup>®</sup>, Biolitec AG), verteporfirina (Visudyne<sup>®</sup>, Novartis Pharmaceuticals).

### II.3.1. Aplicaciones oncológicas

La TFD presenta numerosas ventajas con respecto a los tratamientos tradicionales: requiere la administración de la droga y posterior iluminación de la zona a tratar, pudiendo realizarse de manera ambulatoria, mientras que los regímenes de radiación o de quimioterapia resultan más complejos, ya que requieren tiempos más prolongados de tratamiento, y en muchos casos, hospitalización. Los efectos localizados de la TFD también constituyen una gran ventaja, ya que a diferencia de la radioterapia, no se ponen en riesgo los tejidos sanos adyacentes y se evita la toxicidad sistémica que produce la administración de drogas en la quimioterapia. Otra gran ventaja consiste en que la TFD se puede repetir en la misma zona en caso de recurrencia del tumor, mientras que repetir la radioterapia o la quimioterapia puede resultar extremadamente complejo, con un gran riesgo de dañar los tejidos circundantes (Triesscheijn et al., 2006).

*Cáncer de vejiga:* fue el primer tipo de cáncer en el que se aprobó el uso de la TFD, en 1993, utilizando un porfímero sódico como FS. Ensayos realizados tanto con derivado de hematoporfirina (HpD) como con un porfímero sódico, demostraron que la TFD producía una respuesta inicial mejor que los tratamientos convencionales en cáncer de vejiga superficial y recurrente (Dougherty, 1984; Benson, 1986). Sin embargo, debido a ciertos efectos adversos como la irritación y contracción de la vejiga, y la relativamente alta tasa de reincidencia a un año (70-80%), se propusieron otros protocolos utilizando menores dosis de droga y de luz (Mc Bridge, 2002). Más recientemente se realizaron ensayos clínicos utilizando ALA como tratamiento único, o en combinación con mitomicina c, en los que se obtuvo una respuesta completa en el 40% -52% de los casos a los 18-24 meses, sin reducción persistente de la vejiga (Waideleich et al., 2003; Skyrme et al., 2005).

*Cáncer de piel:* en el primer ensayo clínico con TFD se obtuvieron tasas de respuesta > 85% utilizando HpD como FS y luz roja (Dougherty et al., 1978). Desde entonces, numerosos estudios han confirmado que las tasas de respuesta de cáncer de piel superficial a la TFD son equivalentes a las obtenidas con los métodos tradicionales

(crioterapia, escisión quirúrgica), pero con mejores resultados cosméticos (Rhodes et al., 2004). Para lesiones bien focalizadas, la aplicación tópica de FSs, como el ALA y el metil-ALA, constituye una buena alternativa, evitando la administración sistémica que presenta mayores limitaciones. El uso de ALA a nivel local ha demostrado ser sumamente efectivo para el carcinoma de células basales, con escasos efectos adversos (Taub, 2004). Este pro-FS también ha generado tasas de respuesta altas (75/ -88/ ) en el tratamiento de la enfermedad de Bowen (Morton et al., 2000; Salim et al., 2003). Para el tratamiento de lesiones múltiples, o de grandes superficies, se considera más apropiada y efectiva la administración sistémica del porfímero sódico o mTHPC (Zeitouni et al., 2001; Baas et al., 2001).

*Cáncer de cabeza y cuello:* la cirugía y la radioterapia son los tratamientos convencionales para este tipo de cáncer en etapas tempranas. La TFD presenta la misma efectividad que estas terapias, pero con la ventaja de resultar menos invasiva, no afectar a los tejidos sanos circundantes y ofrecer excelentes resultados cosméticos (Copper et al., 2003; Hopper et al., 2004). Actualmente el FS más utilizado es el mTHPC. En el tratamiento con TFD de tumores primarios en etapas tempranas de la cavidad oral y orofaringe se han obtenido tasas de respuesta del 85/ a un año, y del 96/ en cáncer de labio. También se obtuvieron muy buenas respuestas en el tratamiento de tumores recurrentes o primarios múltiples, así como en la terapia de rescate para pacientes que no respondieron a las terapias convencionales (Schuller et al., 1985; Kubler et al., 2001; Hopper et al., 2004).

*Cáncer de esófago:* Es una enfermedad con mal pronóstico, con una tasa de sobrevida de 12,5/ a 5 años (Sihvo et al., 2004). Los primeros estudios sobre el uso de la TFD en esófago se realizaron para el tratamiento paliativo de tumores obstructivos, obteniéndose buenos resultados (Mc Caughan et al., 1984). Para el tratamiento de tumores superficiales se realizaron estudios utilizando porfímero sódico y mTHPC, con buenas tasas de respuesta en ambos casos (85/ a los 6 meses), y una tasa de sobrevida del 25/ a 5 años (Sibille et al., 1995; Grosjean et al., 1996).

*Esófago de Barrett:* Se considera una condición pre-maligna, ya que el 50% de los casos de cáncer de esófago desarrollan previamente esta enfermedad (Brown y Devesa, 2002). En ensayos clínicos se demostró que la TFD con el porfímero sódico brinda mejores resultados que el tratamiento sólo con omeprazol, disminuyendo significativamente el riesgo de desarrollar cáncer (Overholt et al., 2005). Teniendo en cuenta que esta enfermedad se desarrolla a nivel superficial, el uso de ALA en forma local ofrece una alternativa menos tóxica, aunque aún no se han logrado los resultados deseados (Ortner et al., 2002; Overholt et al., 2003).

*Cáncer endobronquial:* La TFD ha demostrado ser útil en distintas etapas de esta enfermedad. La utilización del porfímero sódico o HpD en el tratamiento paliativo de tumores obstructivos resultó segura y alivió los síntomas en casi todos los pacientes estudiados (Kato et al., 1998; Moghissi et al., 1999). La TFD también ha sido utilizada en el tratamiento de cáncer de pulmón en estadios tempranos, logrando una tasa de supervivencia promedio a 5 años en el rango de 56% -70% , y del 90% en pacientes con carcinoma *in situ* (Furuse et al., 1993; Kato et al., 1998, Moghissi et al., 2004).

*Otras aplicaciones oncológicas:* La TFD presenta un gran potencial terapéutico para el tratamiento de otros tipos de cáncer, sobre todo aquellos de peor pronóstico y también cuando los tratamientos convencionales producen alta morbilidad. Se han realizado ensayos clínicos utilizando porfímero sódico en pacientes con colangiosarcoma, en los que se obtuvieron buenos resultados paliativos. Este FS también demostró eficacia en el tratamiento de tumores pituitarios recurrentes (Wiedmann et al., 2004). El uso de mTHPC resultó efectivo y seguro para el tratamiento de cáncer de próstata recurrente, en estudios de fase I, y también para cáncer de páncreas (Bown et al., 2002). Otras aplicaciones oncológicas de la TFD incluyen: neoplasia cervical, neoplasia vulvar, carcinoma anal *in situ*, neoplasia de pene y cáncer de mama metastásico (Taub, 2007).



### II.3.2. Aplicaciones no oncológicas

- *Enfermedades infecciosas:* la capacidad de la TFD de eliminar bacterias, hongos, virus y parásitos se denomina inactivación fotodinámica. En los últimos años esta técnica ha adquirido importancia debido a la aparición de múltiples resistencias a los antibióticos convencionales. (Wainwright, 2002; Jori et al., 2011).
- *Estética:* El desarrollo cosmético exitoso de esta terapia, sentó las bases para la aplicación de los FSs como fotorejuvenecedores. Esto ha surgido a partir de la observación de las significativas mejoras en los signos de fotoenvejecimiento en la piel adyacente a lesiones causadas por queratosis actínica, tratadas con TFD (Gold, 2008)
- *Desórdenes inflamatorios/inmunológicos:* Algunos ejemplos de estas patologías que han sido exitosamente tratadas con TFD son: psoriasis, acné, liquen plano, escleroderma, alopecia y degeneración macular de la retina (Taub, 2007).
- *Ginecología:* La ablación del endometrio mediante TFD es una técnica que evita la cirugía y constituye una alternativa a la histerectomía para mujeres con hemorragias uterinas disfuncionales (Soergel et al., 2008).
- *Diagnóstico:* La fluorescencia de algunos FSs puede servir como método diagnóstico, permitiendo la visualización del tejido maligno (Juzeniene et al., 2007).

#### II.4. Porphirinas. Generalidades

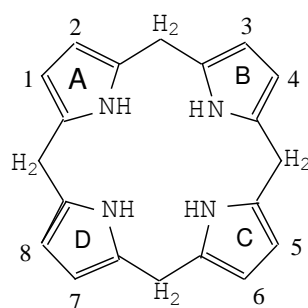
Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se utilizó ALA como pro-FS en la TFD, resulta importante describir a las porfirinas y al camino de biosíntesis del hemo, con el fin de comprender el origen y el rol biológico de esta molécula.

Las porfirinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y juegan un rol central en los sistemas vivientes, debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Son tetrapirroles cíclicos que contienen 4 anillos pirrólicos unidos a través de 4 puentes metileno (Fig.7). Poseen una estructura plana rígida con cadenas laterales que determinan sus características físicas. Exhiben una distribución de dobles ligaduras alternadas, altamente conjugadas, que le confieren una notable coloración rojiza y emisión de una intensa fluorescencia también roja a la luz UV.

Las porfirinas, forma oxidada de los porfirinógenos, pueden combinarse fácilmente con metales como hierro, magnesio ó cobalto, dando lugar a quelatos de gran importancia biológica, como la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos, las clorofilas y las corrinas. Las hemoproteínas son aquellas proteínas que poseen como grupo prostético un quelato tetrapirrólico de hierro, en el caso del grupo hemo, que es una hierro-protoporfirina.

Las porfirinas tienen la capacidad de controlar el desplazamiento de electrones y de aumentar así la eficiencia de las reacciones de óxido reducción. Es por ello que han tenido un rol clave en la evolución de los sistemas vivos terrestres.

Se sintetizan en todas las células de todos los organismos, aunque en mamíferos dicha síntesis se encuentra incrementada en MO e hígado.



**Fig.7.** Estructura química de un porfirinógeno

### II.4.1. Biosíntesis del Hemo.

El hemo interviene en importantes procesos celulares, siendo el principal componente de la hemoglobina, y responsable del transporte de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el organismo. Como se ha señalado, la mayoría de las células sintetizan hemo; en humanos, la mayor fuente son los eritrocitos, que producen un 85% del hemo total.

La biosíntesis de los tetrapirroles comprende varios pasos enzimáticos, algunos de los cuales tienen lugar en la mitocondria y otros en el citosol (Fig. 8). En eucariotas que no realizan fotosíntesis y en algunos procariontes, el precursor ácido 5-aminolevulínico (ALA), se forma a partir de la condensación de la glicina con el succinil CoA, ambas moléculas derivadas del ciclo de Krebs. Este proceso es catalizado por la enzima ALA sintetasa (ALA-S), usando fosfato de piridoxal como cofactor.

El pool de hemo libre ejerce un doble control por retroinhibición y represión sobre el ALA-S, por lo cual ésta es la enzima limitante y reguladora en el camino de la biosíntesis del hemo. La actividad basal del ALA-S es baja en tejidos normales. La formación de ALA ocurre en la mitocondria y luego, por transporte activo, es trasladado al citoplasma, 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 (PBG-D) o Uroporfirinógeno I-sintetasa (URO-I-S), formando el tetrapirrol lineal hidroximetilbilano, que luego es isomerizado y ciclado por la Uroporfirinógeno III-isomerasa (UROgen III-S) para formar el uroporfirinógeno III (UROgen III).

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

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

El producto final, con cuatro carboxilos de sustituyentes propionato, recibe el nombre de coproporfirinógeno III ó I (COPROgen), que reingresa a la mitocondria, y allí la

Coproporfinógeno oxidasa (CPGasa) cataliza la descarboxilación oxidativa de dos de los grupos propionatos ubicados en las posiciones 2 y 4 de los anillos pirrólicos A y B para dar dos grupos vinilos, formándose el protoporfinógeno IX (PROTOgen IX).

La PROTOgen oxidasa (PPGasa), también mitocondrial, oxida el PROTOgen IX a protoporfirina IX (PpIX). El paso final de esta biosíntesis es la inserción del hierro en estado ferroso en la PpIX, catalizada por la enzima ferroquelatasa (Fe-Quel), para formar el hemo (Batlle, 1997).

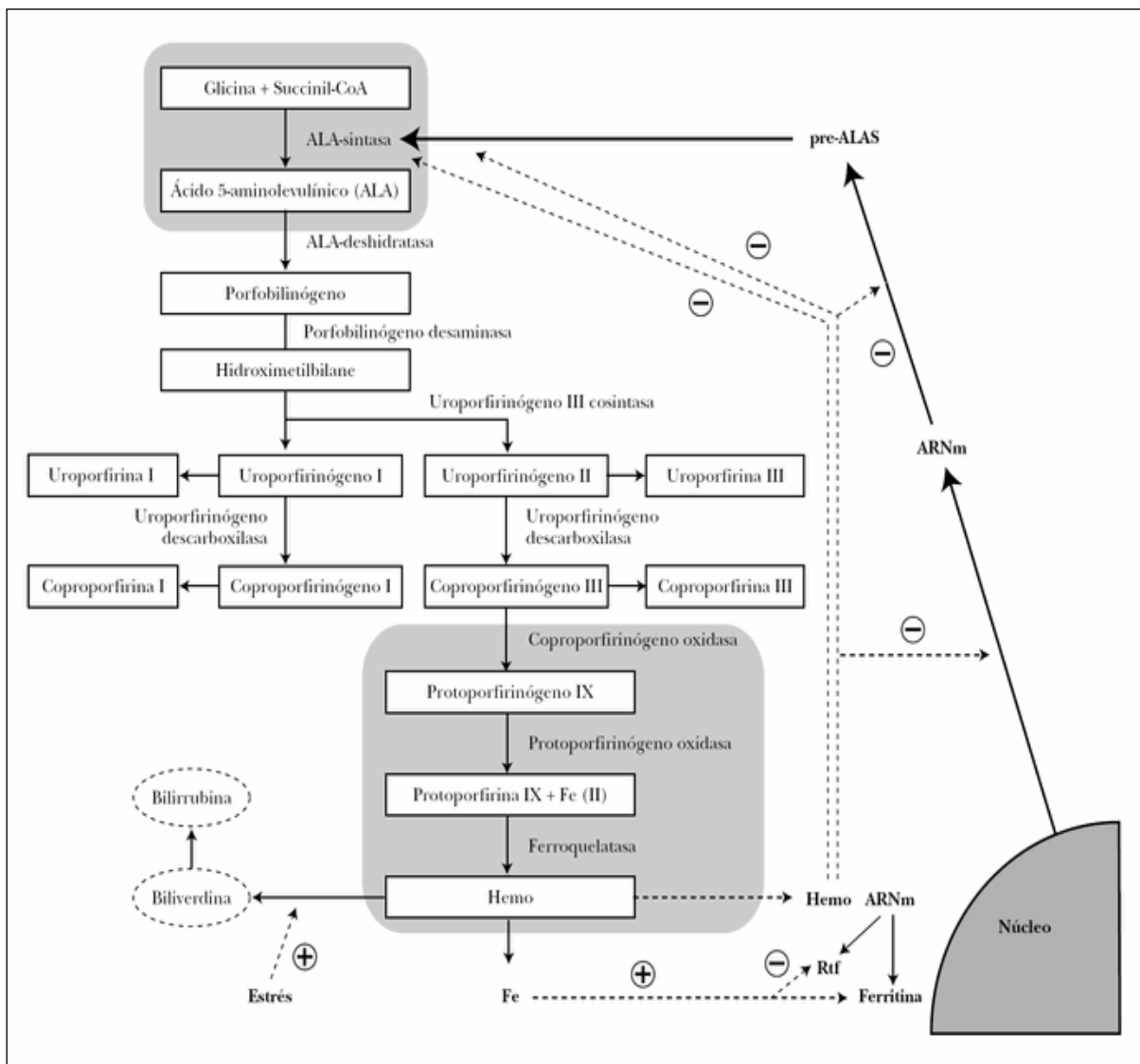


Fig. 8. Camino biosintético del hemo

## **II.5. Terapia Fotodinámica basada en ALA.**

El ALA no es un FS en sí mismo, sino que produce la síntesis intracelular de PpIX. Su empleo en la TFD se basa en que la administración exógena del ALA como pro-droga induce la acumulación de tetrapirroles sintetizados endógenamente, en particular, el potente FS PpIX. Si bien todas las células poseen la capacidad de sintetizar porfirinas a partir de precursores del hemo, varios tejidos malignos y en regeneración poseen características enzimáticas que favorecen la acumulación de PpIX frente a los tejidos normales, lo cual representa una gran ventaja con respecto a otras terapias anticancerígenas (Fukuda et al., 1989; Kennedy et al., 1990). Esta selectividad se basa en que los tejidos malignos exhiben una actividad disminuida de la Fe-Quel, al mismo tiempo que la de la PBG-asa se encuentra aumentada, lo cual favorece una acumulación selectiva de la PpIX en estos tejidos (Leibovici et al., 1988; Navone et al., 1990; El-Sharabasy et al., 1992; Gibson et al., 1998). En algunas patologías no malignas como la psoriasis y la queratosis actínica, también se evidencia mayor síntesis de PpIX que en tejidos normales (Smits et al., 2009), ésto les brinda posibilidades terapéuticas o de diagnóstico utilizando ALA.

El ALA es captado por las distintas células mediante diferentes mecanismos. En levaduras, se demostró por primera vez que el ALA y el GABA comparten un sistema de transporte activo, y que la captación de ALA está mediada por la permeasa UGA 4, específica para el GABA (Bermudez-Moretti et al., 1995a; 1995b; 1996a; 1996b). En células de adenocarcinoma de colon se observó que el ALA también ingresa a la célula por un mecanismo dependiente de energía a través de transportadores de GABA y  $\beta$ -aminoácidos (Gederaas et al., 2000). En células de pancreatoma se demostró la participación de los transportadores peptídicos PEPT1 y PEPT2 en este proceso (Whitaker et al., 2000), mientras que en células de adenocarcinoma colorrectal se demostró recientemente la incorporación de ALA a través del transportador SLC36A1 (Frolund et al., 2010). También se observó en otras líneas celulares la implicancia de los transportadores BETA en este proceso (Rud et al., 2000; Bermudez-Moretti et al., 2002).

La eficiencia en la síntesis de PpIX una vez que el ALA ingresa a la célula y su posterior acumulación, depende de varios factores, como las actividades de algunas enzimas involucradas en la síntesis del hemo, la tasa de degradación y excreción de PpIX, su localización intracelular, el pH de la célula, el tipo y la densidad celular y la presencia o ausencia de suero en el medio (Bartosová y Hrkal, 2000; Kennedy, 2006; Ji et al., 2006).

La PpIX se sintetiza en la mitocondria, y con el tiempo puede redistribuirse hacia otras regiones como el citosol, el retículo endoplasmático o a la membrana nuclear, pero no al núcleo. También se ha observado la relocalización de PpIX a la membrana plasmática y a lisosomas. El sitio de localización de la PpIX, su concentración y la dosis lumínica empleada en la TFD, determinan el tipo y la intensidad de daño producido al activarse el FS (Boyle et al., 1996; Jori et al., 1996).

La síntesis *in situ* de PpIX hace que esta molécula tenga una distribución intracelular diferente de aquellos FSs administrados directamente como moléculas ya preformadas (Ji et al., 2006).

La fluorescencia de la PpIX la convierte en una herramienta útil para el diagnóstico, por ejemplo para evaluar cambios cuantitativos en el tejido maligno luego de una cirugía (Ladner et al., 2001).

Entre otras ventajas de la utilización del ALA se pueden mencionar:

- La corta vida media de los efectos fotosensibilizantes de la PpIX comparado con otros compuestos, que no duran más de 48 horas (Fukuda et al., 1993; Triesscheijn et al., 2006).
- La PpIX tiene una estructura molecular definida, con un máximo de absorción en la zona roja del espectro en los 630 nm (Pottier et al., 1986).
- El ALA se puede administrar de diversas formas que resultan inocuas: sistémica, intravesical, topicación, inhalación y oral. Otra vía utilizada en animales de experimentación es la intra-tumoral, en la cual el ALA se aplica directamente en tumores accesibles.

Si bien muchas posibles aplicaciones de la TFD basada en ALA (TFD-ALA) aún se encuentran en proceso de investigación, otras ya han sido aceptadas y son utilizadas en la clínica, como: tratamiento de lesiones premalignas de la piel, mucosa oral, esófago, vejiga, vulva y cérvix (Kelty et al., 2002); tratamiento, paliación, control o detección de

lesiones malignas de distintos tipos (ej. gliomas); infecciones bacterianas (Ej. *Propionibacterium acne*); infecciones fúngicas (Ej. oncomicosis); infecciones virales (Ej. *Verucca vulgaris*), infecciones parasitarias (Ej. leishmaniasis cutánea); cuantificación de respuesta a tratamientos (Ej. leucemia, linfoma de células T, cáncer de mama recurrente, malaria); procedimientos cosméticos (Ej: rejuvenecimiento de la piel, hirsutismo) (Fernandez-Guarino et al., 2007).

En el tratamiento de neoplasias hematológicas, la TFD-ALA se propone como un método potencialmente eficaz para el purgado *ex vivo* en el trasplante autólogo de MO, por su capacidad de destruir selectivamente a las células malignas, preservando a las células normales. A pesar del gran potencial que presenta esta terapia, en la bibliografía existen pocos trabajos en los que se hayan estudiado los efectos de la TFD-ALA en este grupo de enfermedades.

Malik y Lugaci describieron por primera vez la destrucción selectiva de células eritroleucémicas mediante esta terapia (Malik y Lugaci, 1987). Posteriormente el grupo de Grevenobá, estudió los mecanismos de acción de la TFD-ALA en distintas líneas celulares leucémicas, como JURKAT y HL60. Estos trabajos demostraron, entre otras cosas, la cinética de acumulación de PpIX a partir de ALA y los mecanismos de acción subyacentes a la terapia (Grebenová et al., 1998; Grebenová et al., 2000; Kuzelová et al., 2004). Por otra parte Li et al. (2001) estudiaron los efectos de la TFD-ALA en células leucémicas resistentes a multidrogas, demostrando su eficacia y la falta de resistencia cruzada con quimioterapia. En otros trabajos también se reportó la eficacia de la TFD-ALA en diversos modelos de leucemia *in vitro* (Luksiene et al., 2001; Zhang y Zhang, 2004; Gamaleia et al., 2008).

---

## Bibliografía

- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 2001; 74(5):656-69. Review.
- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA. Cancer J. Clin.* 2011; 61(4):250-81.
- Baas P, Saarnak AE, Oppelaar H, Neering H, Stewart FA. Photodynamic therapy with metatetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study. *Br. J. Dermatol.* 2001; 145:75-8.
- Bartosová J, Hrkal Z. Accumulation of protoporphyrin-IX (PpIX) in leukemic cell lines following induction by 5-aminolevulinic acid (ALA). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2000; 126(3):245-52.
- Batlle A, Llambias EBC, Xifra EW, Tigier HA. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system-XV. The effect of growth conditions. *Int. J. Biochem.* 1975; 6:591-606.
- Benson RC Jr. Laser photodynamic therapy for bladder cancer. *Mayo Clin. Proc.* 1986; 61:859-64.
- Bermúdez Moretti M, Correa García SR, Chianelli MS, Ramos EH, Mattoon JR, Batlle A. Evidence that 4-aminobutyric acid and 5-aminolevulinic acid share a common transport system into *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995a; 27(2):169-73.
- Bermúdez Moretti M, Correa García S, Perotti C, Batlle A, Casas A. Delta-Aminolevulinic acid transport in murine mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *Br. J. Cancer.* 2002; 87(4):471-4.
- Bermúdez Moretti M, Correa García S, Ramos E, Batlle A. delta-Aminolevulinic acid uptake is mediated by the gamma-aminobutyric acid-specific permease UGA4. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 1996a; 42(4):519-23.
- Bermúdez Moretti M, Correa García S, Ramos EH, Batlle A. GABA uptake in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 1995b; 41(6):843-9.
- Bermúdez Moretti M, Correa García SR, Rouvier Garay MV; Ramos E, Batlle A. Transporte del ácido 5-aminolevulínico en levaduras. *Anal. Soc. Cientif. Arg.* 1996b; 226: 17-25
- Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, Lees WR, Lovat LB, Ripley P, Jones L, Wyld P, Gillams A, Hatfield AW. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut* 2002; 50:549-57.
- Boyle, RW, Dolphin, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 1996; 64(3):469-85.
- Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2002; 11:235-56.



- Casas A, Fukuda H, Riley P, Batlle A. Enhancement of ALA-based photodynamic therapy by Adriamycin. *Cancer Lett.* 1997; 121:105-13.
- Casas A, Fukuda H, Batlle A. Potentiation of ALA-based photodynamic therapy with cyclophosphamide. *Cancer Biochem. Biophys.* 16: 183-96, 1998.
- Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Batlle A. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* 2011;18(16):2486-515.
- Copper MP, Tan IB, Oppelaar H, Ruevekamp MC, Stewart FA. Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2003; 129:709–11.
- Di Venosa G, Fukuda H, Batlle A, Mac Robert A, Casas A. Photodynamic therapy: regulation of porphyrin synthesis and hydrolysis from ALA esters. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2006; 83(2):129-36.
- Di Venosa G, Rodriguez L, Mamone L, Gándara L, Rossetti MV, Batlle A, Casas A. Changes in actin and E-cadherin expression induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in normal and Ras-transfected human mammary cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2012; 106:47-52.
- Diez B, Cordo Russo R, Teijo MJ, Hajos S, Batlle A, Fukuda H. ROS production by endogenously generated Protoporphyrin IX in murine leukemia cells. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 2009; 55(2):15-9.
- Dougherty TJ. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1984; 2:83–116.
- Dougherty T. *Photodynamic Therapy, Methods and Protocols.* Humana Press, Los Angeles, CA, USA, 2010.
- Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 1978; 38:2628–35.
- El-Sharabasy MM, El-Waseef AM, Hafez MM, Salim SA. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br. J. Cancer.* 1992; 65(3):409-12.
- Evensen JF, Moan J. A test of different photosensitizers for photodynamic treatment of cancer in a murine tumor model. *Photochem. Photobiol.* 1987; 46(5):859-65.
- Fernández-Guarino M, García-Morales I, Harto A, Montull C, Pérez-García B, Jaén P. Photodynamic therapy: new indications. *Actas Dermosifiliogr.* 2007; 98(6):377-95. Review.
- Frølund S, Marquez OC, Larsen M, Brodin B, Nielsen CU. Delta-aminolevulinic acid is a substrate for the amino acid transporter SLC36A1 (hPAT1). *Br. J. Pharmacol.* 2010; 159(6):1339-53.
- Fukuda H, Paredes S, Batlle A. Tumour-localizing properties of porphyrins. *In vivo* studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp Biochem Physiol B.* 1992; 102(2):433-6.

Fukuda H, Batlle A, Riley PA. Kinetics of porphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA. *Int. J. Biochem.* 1993a; 25:1407-10.

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.* 1989; 5(2):133-9.

Fukuda H, Casas A, Chueke F, Paredes S, Batlle A. Photodynamic action of endogenously synthesized porphyrins from aminolevulinic acid, using a new model for assaying the effectiveness of tumoral cell killing. *Int. J. Biochem.* 1993b; 25(10):1395-8.

Furuse K, Fukuoka M, Kato H, Horai T, Kubota K, Kodama N, Kusunoki Y, Takifuji N, Okunaka T, Konaka C, et al. A prospective phase II study on photodynamic therapy with photofrin II for centrally located early-stage lung cancer. The Japan Lung Cancer Photodynamic Therapy Study Group. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11:1852-7.

Gamaleia NF, Shishko ED, Gluzman DF, Sklyarenko LM. Sensitivity of normal and malignant human lymphocytes to 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic damage. *Exp. Oncol.* 2008; 30(1):65-9.

Gibson S, Cupriks D, Havens J, Nguyen M, Hilf R. A regulatory role for porphobilinogen deaminase (PBGD) in  $\delta$ -aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA)-induced photosensitization. *Br. J. Cancer.* 1998; 77:235-243.

Gold MH. Therapeutic and aesthetic uses of photodynamic therapy part one of a five-part series: the use of photodynamic therapy in the treatment of actinic keratoses and in photorejuvenation. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2008; 1(2):32-7.

Grebenová D, Cajthamlová H, Bartosová J, Marinov J, Klamová H, Fuchs O, Hrkal Z. Selective destruction of leukaemic cells by photo-activation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin-IX. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1998; 47(1):74-81.

Grebenová D, Halada P, Stulík J, Havlíček V, Hrkal Z. Protein changes in HL60 leukemia cells associated with 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Early effects on endoplasmic reticulum chaperones. *Photochem. Photobiol.* 2000; 72(1):16-22.

Grosjean P, Savary JF, Mizeret J, Wagnieres G, Woodtli A, Theumann JF, Fontolliet C, Van den Bergh H, Monnier P. Photodynamic therapy for cancer of the upper aerodigestive tract using tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 1996; 14:281-7.

Hopper C, Kübler A, Lewis H, Tan IB, Putnam G. mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2004; 111:138-46.

Ji Z, Yang G, Vasovic V, Cunderlikova B, Suo Z, Nesland JM, Peng Q. Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2006; 84(3):213-20.

- Jori G, Magaraggia M, Fabris C, Soncin M, Camerin M, Tallandini L, Coppellotti O, Guidolin L. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water-borne diseases. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2011; 30(3):261-71.
- Jori, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1996 Nov;36(2):87-93.
- Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007; 6(12):1234-45.
- Kalca K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000; 42:389-413.
- Kato H. Photodynamic therapy for lung cancer—a review of 19 years' experience. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1998; 42:96–9.
- Kelty CJ, Brown NJ, Reed MW, Ackroyd R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002; 1(3):158-68.
- Kennedy JC. Introduction. En: *Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook*. Pottier R, Kramer B, Baumgartner R, Stepp H. Reino Unido. Editor: Royal Society of Chemistry. 2006. P 1-14.
- Kessel D. Adventures in photodynamic therapy: 1976-2008. *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 2008; 12(8):877-880.
- Krammer B, Malik Z, Pottier R, Stepp H. Basic Principles. En: *Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook*. Pottier R, Kramer B, Baumgartner R, Stepp H. Reino Unido. Editor: Royal Society of Chemistry. 2006. P 15-77.
- Kübler AC, de Carpentier J, Hopper C, Leonard AG, Putnam G. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001; 30:504–9.
- Kuzelová K, Grebenová D, Pluskalová M, Marinov I, Hrkal Z. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2004; 73(1-2):67-78.
- Ladner DP, Steiner RA, Allemann J, Haller U, Walt H. Photodynamic diagnosis of breast tumours after oral application of aminolevulinic acid. *Br. J. Cancer.* 2001; 84:33–37.
- Leibovici L, Schoenfeld N, Yehoshua HA, Mamet R, Rakowsky E, Shindel A, Atsmon A Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer.* 1988; 62 (11):2297-300.
- Li W, Zhang WJ, Ohnishi K, Yamada I, Ohno R, Hashimoto K. 5-Aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in multidrug resistant leukemia cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001; 60(2-3):79-86.

Luksiene Z, Eggen I, Moan J, Nesland JM, Peng Q. Evaluation of protoporphyrin IX production, phototoxicity and cell death pathway induced by hexylester of 5-aminolevulinic acid in Reh and HPB-ALL cells. *Cancer Lett.* 2001; 169(1):33-9.

Malik Z, Lugaci H. Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br. J. Cancer.* 1987; 56(5):589-95.

Middelburg TA, Van Zaane F, De Bruijn HS, Van Der Ploeg-van den Heuvel A, Sterenberg HJ, Neumann HA, De Haas ER, Robinson DJ. Fractionated illumination at low fluence rate photodynamic therapy in mice. *Photochem. Photobiol.* 2010; 86(5):1140-6.

McBride G. Studies Expand Potential Uses of Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94:1740–1742.

McCaughan JS Jr, Hicks W, Laufman L, May E, Roach R. Palliation of esophageal malignancy with photoradiation therapy. *Cancer* 1984; 54:2905–10.

Moan J, Peng Q, Evensen JF, Berg K, Western A, Rimington C. Photosensitizing efficiencies, tumor, and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* 1987; 46, 713–721

Moghissi K, Dixon K, Stringer M, Freeman T, Thorpe A, Brown S. The place of bronchoscopic photodynamic therapy in advanced unresectable lung cancer: experience of 100 cases. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 1999; 15:1–6.

K. Moghissi, Kate Dixon, J.A.C. Thorpe, C. Oxtoby, M.R. Stringer. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer: the Yorkshire Laser Centre experience. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2004;1(3):253-62.

Morton CA, Whitehurst C, Moore JV, MacKie RM. Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.* 2000; 143:767–72.

Navone NM, Frisardi AL, Resnik ER, Batlle A, Polo CF. Porphyrin synthesis in human breast cancer. Preliminary mimetic *in vitro* studies. *Med. Sci. Res.* 1988; 16: 61–62.

Navone NM, Polo CF, Frisardi AL, Andrade NE, Batlle A. Heme biosynthesis in human breast adenocarcinoma – mimetic *in vitro* studies and some heme enzymic activity levels. *Int. J. Biochem.* 1990; 22 (12):1407-11.

Ortner MA, Zumbusch K, Liebetruth J, Ebert B, Fleige B, Dietel M, Lochs H. Is topical delta-aminolevulinic acid adequate for photodynamic therapy in Barrett's esophagus? A pilot study. *Endoscopy* 2002; 34:611–6.

Overholt BF, Lightdale CJ, Wang KK, Canto MI, Burdick S, Haggitt RC, Bronner MP, Taylor SL, Grace MG, Depot M. Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial. *Gastrointest. Endosc.* 2005; 62:488–98.

Overholt BF, Panjehpour M, Halberg DL. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus with dysplasia and/or early stage carcinoma: long-term results. *Gastrointest. Endosc.* 2003; 58:183–8.

Perotti C, Casas A, Fukuda H, Sacca P, Batlle A. ALA and ALA hexyl ester induction of porphyrins after their systemic administration to tumour bearing mice. *Br. J. Cancer.* 2002; 87(7):790-5.

Pottier RH, Chow YF, LaPlante JP, Truscott TG, Kennedy JC, Beiner LA. Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra in vivo. *Photochem. Photobiol.* 1986; 44(5):679-87.

Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S, Chandrashekar TK. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 2002; 2(2):187-207.

Rhodes LE, de Rie M, Enström Y, Groves R, Morken T, Goulden V, Wong GA, Grob JJ, Varma S, Wolf P. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch. Dermatol.* 2004; 140:17–23.

Rud E, Gederaas O, Høgset A, Berg K. 5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochem. Photobiol.* 2000; 71(5):640-7.

Salim A, Leman JA, McColl JH, Chapman R, Morton CA. Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *Br. J. Dermatol.* 2003; 148:539–43.

Schuller DE, McCaughan JS Jr, Rock RP. Photodynamic therapy in head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol.* 1985; 111:351–5.

Sibille A, Lambert R, Souquet JC, Sabben G, Descos F. Long-term survival after photodynamic therapy for esophageal cancer. *Gastroenterology* 1995; 108:337–44.

Sihvo EI, Luostarinen ME, Salo JA. Fate of patients with adenocarcinoma of the esophagus and the esophagogastric junction: a population-based analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 2004; 99:419–24.

Skyrme RJ, French AJ, Datta SN, Allman R, Mason MD, Matthews PN. A phase-1 study of sequential mitomycin C and 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in recurrent superficial bladder carcinoma. *BJU Int.* 2005; 95:1206–10.

Smits T, van Laarhoven AI, Staassen A, van de Kerkhof PC, van Erp PE, Gerritsen MJ. Induction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. *Br. J. Dermatol.* 2009; 160(4):849-57.

Soergel P, Löning M, Staboulidou I, Schippert C, Hillemanns P. Photodynamic diagnosis and therapy in gynecology. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2008; 27(4):307-20.

Taub AF. Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons. *J. Drugs Dermatol.* 2004; 3(1):S8–S25.

Taub AF. Photodynamic therapy: other uses. *Dermatol. Clin.* 2007; 25(1):101-9.

Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist.* 2006; 11(9):1034-44. Review.

Waidelich R, Beyer W, Knüchel R, Stepp H, Baumgartner R, Schröder J, Hofstetter A, Kriegmair M. Whole bladder photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid using a white light source. *Urology.* 2003; 61:332–337.

Wainwright M. Pathogen inactivation in blood products. *Curr. Med. Chem.* 2002; 9(1):127-43.

Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 1976; 36(7 PT 1):2326-9.

Whitaker CJ, Battah SH, Forsyth MJ, Edwards C, Boyle RW, Matthews EK. Photosensitization of pancreatic tumour cells by delta-aminolaevulinic acid esters. *Anticancer Drug Des.* 2000; 15(3):161-70.

Wiedmann M, Berr F, Schiefke I, Witzigmann H, Kohlhaw K, Mössner J, Caca K. Photodynamic therapy in patients with non-resectable hilar cholangiocarcinoma: 5-year follow-up of a prospective phase II study. *Gastrointest. Endosc.* 2004; 60:68–75.

Wilson BC. Photodynamic therapy: light delivery and dosage for second-generation photosensitizers. *Ciba Found Symp.* 1989; 146:60-73. Review.

Zeitouni NC, Shieh S, Oseroff AR. Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. *Clin. Dermatol.* 2001; 19:328–38.

Zhang SJ, Zhang ZX. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in leukemia cell HL60. *Photochem. Photobiol.* 2004; 79(6):545-50.

### III. ESTRÉS OXIDATIVO

#### III.1. Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es esencial en la vida de los organismos aeróbicos. La mayor parte se destina a los procesos de fosforilación oxidativa que tienen lugar en la mitocondria, mientras que una pequeña parte se convierte en formas altamente reactivas y tóxicas para la célula, denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las ROS incluyen los radicales libres y los peróxidos, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y se encuentran presentes en concentraciones basales en todos los organismos aeróbicos. La mayor fuente de ROS son los procesos metabólicos normales de las células, pero otra parte puede provenir de factores externos como la radiación solar, fungicidas o pesticidas (Clifford, 1999).

La presencia de ROS es importante para el metabolismo, ya que ciertas cantidades de estas moléculas son necesarias para el desarrollo de muchos procesos fisiológicos que ocurren normalmente en el organismo (Ej: participación del  $O_2^{\cdot-}$  en el proceso de fagocitosis, o del  $H_2O_2$  en la síntesis de hormona tiroidea o en la maduración de los espermatozoides) (Ford, 2004; Song et al., 2007; Bylund et al., 2010).

Sin embargo cuando la producción de ROS excede las necesidades fisiológicas, éstas resultan nocivas para las células, ya que pueden causar daño en lípidos, proteínas y ADN. Para protegerse de este potencial daño oxidativo, las células poseen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Thannikal et al., 2000).

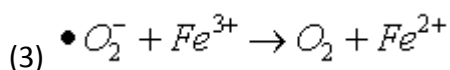
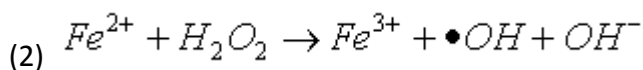
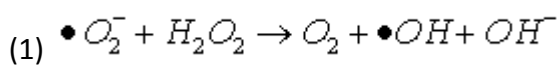
El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción de especies oxidantes y la capacidad antioxidante de la célula (Ross et al., 2000).

Las principales ROS son el ozono ( $O_3$ ), el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), el  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$  y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ).

Las ROS pueden generarse por reducciones univalentes sucesivas y no necesariamente tienen que ser siempre radicalarias. El oxígeno en estado basal se encuentra en estado triplete y al absorber una cantidad de energía suficiente puede pasar a formar  $^1O_2$ , el cual

es altamente reactivo y puede transferir sus electrones a una gran diversidad de moléculas orgánicas. El oxígeno puede activarse por otras vías, como la reducción monovalente para formar  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$  y finalmente  $H_2O$ .

En el siglo pasado Fenton había descrito el potencial de oxidación del  $H_2O_2$  en presencia de sales ferrosas (Fenton, 1899). En los sistemas biológicos en presencia de trazas de hierro, la reacción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  prosigue a la formación de  $\bullet OH$ , el cual es altamente destructivo y es capaz de iniciar la oxidación de sustratos orgánicos:



### III.2. Defensas antioxidantes.

Debido a que todos los componentes celulares son susceptibles de ser atacados por las ROS, los organismos aerobios disponen de una amplia batería de defensas antioxidantes. Un antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que presente a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato, retrasa significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell et al., 1989).

Básicamente existen dos grandes grupos de defensas antioxidantes: las enzimáticas y las no enzimáticas.

Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), que presenta una forma dependiente de cobre y zinc (CuZnSOD) y otra forma dependiente de manganeso (MnSOD), y la catalasa (CAT). La SOD convierte al  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , mientras que la catalasa degrada el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Sanders et al., 2003). Por otro lado se encuentra la glutatión peroxidasa (GPx), que también se encuentra en dos formas, una selenio dependiente y la otra selenio independiente, la primera encargada de la detoxificación de



los peróxidos (Simmons y Jamall, 1988) y la segunda de la degradación de los hidroperóxidos (Ahmad et al., 1989).

Existen otras enzimas involucradas en la defensa antioxidante que son las relacionadas con el metabolismo del GSH: la glutatión S transferasa que conjuga la unión del GSH a los componentes celulares dañados por ROS para su detoxificación, la glutatión reductasa que repone el pool de GSH a partir del GSSG.

Cuando la formación de ROS excede la capacidad secuestrante del sistema de defensa antioxidante de los tejidos, da como resultado el daño a la membrana celular. Este proceso es mediado por la peroxidación lipídica (Sander et al., 2003). La peroxidación lipídica conduce básicamente a la formación de malondialdehído, el cual se ha demostrado que es mutagénico y carcinogénico (Marnet, 1999). La formación excesiva de malondialdehído puede llevar a la formación de aductos como resultado de la combinación con grupos amino libres de las proteínas, lo cual a su vez se puede usar como índice del estrés oxidativo (Hartley et al., 1999).

Los antioxidantes no enzimáticos están presentes en la dieta ingerida por los animales, sobre todo en las frutas y verduras. Entre sus principales características podemos citar que son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula, sólo actúan a concentraciones elevadas, y tienen un papel despreciable frente a las defensas enzimáticas. Entre ellos podemos mencionar al GSH y al ascorbato, que pueden actuar como pro o como antioxidantes según el caso, y a las vitaminas liposolubles (Kappus, 1981).

### III.3. Reacciones fotoquímicas en la Terapia Fotodinámica

Las porfirinas muestran una intensa absorción alrededor de los 400 nm en la región azul, llamada banda de Soret, y cuatro bandas de menor absorción entre los 500 y los 650 nm. El rango comprendido entre los 600 nm y los 1000 nm se conoce como “ventana fototerapéutica” de los FSs y en él los tejidos presentan una baja absorción por parte de otras biomoléculas.

Se observó que la penetración de la luz en los tejidos aumenta con longitudes de onda mayores, por lo cual, para irradiar generalmente se usa la banda de absorción más débil que es la de 630 nm.

Cuando los FSs absorben luz, se produce una transferencia de energía a diferentes niveles de excitación, dependiente de los cuantos de luz absorbidos.

Los electrones orbitales excitados pueden pasar a un orbital de mayor energía y esta transición puede suceder de dos maneras (Fig. 11):

- Estado de excitación singulete: se produce sin modificación del spin del electrón en su estado basal.
- Estado de excitación triplete: se produce cuando cambia el spin del electrón. Este estado es mucho más estable que el anterior. Cuando los electrones retornan a su nivel normal, también pueden producirse dos eventos:

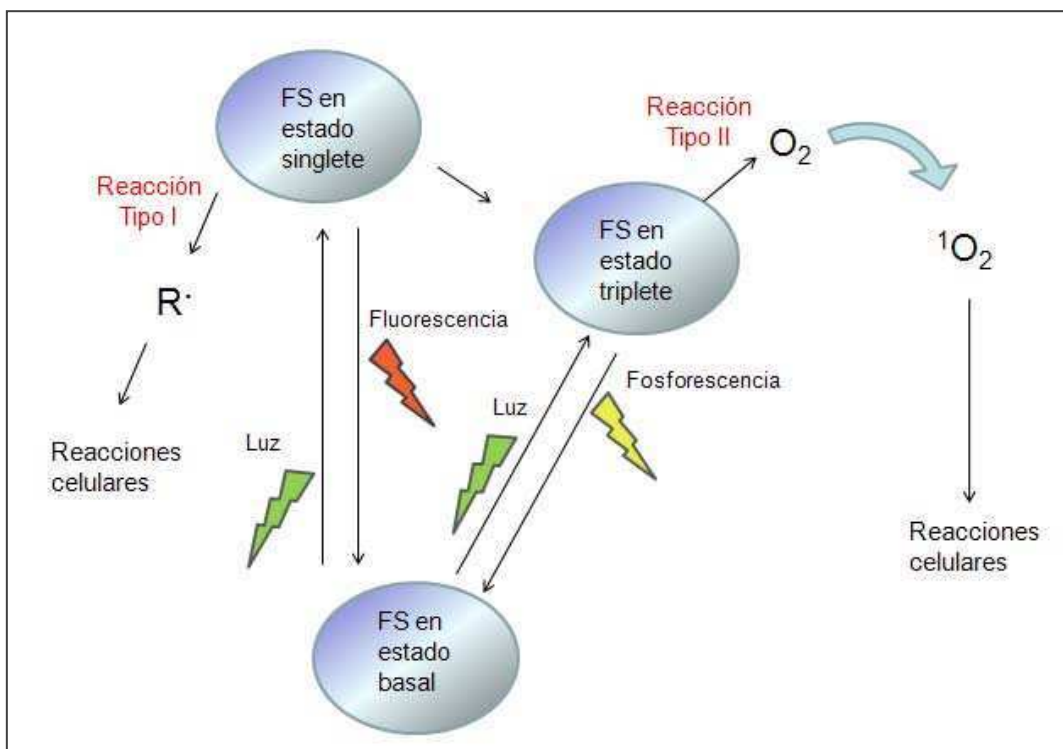
-Producción de fluorescencia roja con emisión de longitud de onda de alrededor de 620 nm, si la caída es desde el estado singulete.

-Producción de fosforescencia a mayores longitudes de onda, si la caída es desde el estado triplete. En ocasiones puede ocurrir una conversión del estado singulete al triplete, donde generalmente el estado triplete formado sufre una reacción fotoquímica.

La absorción de luz lleva a la porfirina a los estados singulete y triplete. Las porfirinas excitadas en singulete pueden reaccionar directamente con los tejidos o las células (reacción fotoquímica tipo I), mientras que en el estado triplete transfieren su energía al oxígeno molecular, produciendo  $^1\text{O}_2$  (reacción fotoquímica tipo II). Ambos tipos de reacciones pueden tener lugar simultáneamente, y la proporción en que ocurre cada una de ellas depende principalmente de la naturaleza del FS y del sustrato (Sun et al., 2009).

La fotoexcitación de porfirinas en presencia de oxígeno, resultará entonces en la formación de ROS, en particular  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ , y  $\bullet\text{OH}$  (Golab et al., 2003). Estas moléculas pueden desencadenar la muerte celular mediante el daño oxidativo a proteínas, lípidos insaturados y ácidos nucleicos (Josefsen y Boyle, 2008).

La eficacia de la TFD depende inicialmente de la formación de  $^1\text{O}_2$ , y dado que esta molécula presenta una baja tasa de difusión y una vida media muy corta, el sitio de daño fotodinámico se produce en un sector muy próximo al sitio de acumulación del FS (Castano et al., 2004).



**Fig.11.** Esquema de las reacciones tipo I y II de los fotosensibilizantes.

---

## Bibliografía

- Ahmad S, Beilstein MA, Pardini RS. Glutathione peroxidase activity in insects: a reassessment. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 1989; 12: 39-49.
- Bylund J, Brown KL, Movitz C, Dahlgren C, Karlsson A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 49(12):1834-45.
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry, and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004; 1(4): 279–293.
- Clifford AA. Nutricines: Food components in health and nutrition. *Nottingham University Press. Nottingham, UK*. 1999.
- Fenton H. Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. *Proc. Chem. Soc.* 1899; 25: 224.
- Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update*. 2004; 10(5):387-99.
- Golab J, Nowis D, Skrzycki M, Czeczot H, Baranczyk-Kuzma A, Wilczynski GM, Makowski M, Mroz P, Kozar K, Kaminski R, Jalili A, Kopec' M, Grzela T, Jakobisiak M. Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(1):407-14.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in Biology and Medicine. 2nd. edition *Clarendon Press Oxford UK*. 1989.
- Hartley D, Kolaja K, Reichard J, Petersen D. 4-Hydroxynonenal and malondialdehyde hepatic protein adducts in rats treated with carbon tetrachloride: immunochemical detection and lobular localization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999; 161: 23–33.
- Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met. Based Drugs*. 2008; 2008:276109.
- Kappus H, Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*. 1981. 37:1233- 1241.
- Marnett L. Chemistry and biology of DNA. Damage by malondialdehyde. *IARC Sci. Publ.* 1999; 150: 17–27.
- Ross S, Findlay V, Malakasi O, Morgan B. Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Mol. Biol. Cell*. 2000; 11: 2631-2642.

Sander C, Hamm F, Elsner P, Thiele J. Cutaneous Biology. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.* 2003; 148: 913–922.

Simmons T, Jamall I. Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes., primacy of glutathione peroxidase. *Biochem. J.* 1988; 251: 913-917.

Song Y, Driessens N, Costa M, De Deken X, Detours V, Corvilain B, Maenhaut C, Miot F, Van Sande J, Many MC, Dumont J. Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92(10):3764-73.

Sun D, Zhang S, Wei Y, Yin L. Antioxidant activity of mangostin in cell-free system and its effect on K562 leukemia cell line in photodynamic therapy. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2009; 41(12):1033-43.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 279(6):L1005-28.

#### **IV. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR LA TERAPIA FOTODINÁMICA**

La TFD puede actuar mediante distintos mecanismos para destruir al tumor. Por un lado puede producir la muerte celular directa principalmente mediante apoptosis y necrosis. Por otra parte puede dañar la vasculatura tumoral y los vasos sanguíneos periféricos, produciendo una muerte tumoral indirecta por hipoxia y falta de nutrientes. También puede inducir una respuesta inmune que contribuye a la destrucción del tumor. La acción de estos mecanismos, y el grado en el que cada uno se manifiesta, determinan el éxito de la TFD (Dolmans et al., 2003; Henderson et al., 2004; Buytaert, 2007).

Los blancos celulares del daño fotodinámico son diversos, dependiendo principalmente de la naturaleza del fotosensibilizante empleado. Estos sitios de acción pueden ser biomoléculas o bien organelas como las mitocondrias, los microsomas, los lisosomas, el núcleo y el retículo endoplasmático (RE) (Morgan y Oseroff, 2001; Castano et al., 2004). Teniendo en cuenta que la mayoría de los FSs no se acumulan en el núcleo, la TFD en comparación con otras terapias antineoplásicas, genera muy poco daño al ADN, mutaciones y carcinogénesis (Oleinick et al., 2002).

Las ROS poseen un tiempo de vida media muy corto, por lo cual el sitio primario de acción del fotodaño coincide con el sitio de acumulación del FS. No obstante, debido a la posible relocalización del FS a otros sitios, el daño fotodinámico puede tener lugar en otras organelas (Buytaert 2007).

El tipo de muerte celular inducido por la TFD depende, entre otras cosas, del sitio de acción del compuesto FS; aquellos que se acumulan preferencialmente en mitocondrias o RE generalmente promueven la apoptosis, mientras que los FSs que afectan la membrana plasmática o los lisosomas predisponen a la muerte por necrosis (Kessel et al., 1997).

Otro mecanismo de muerte inducido por la TFD que se ha descrito recientemente es la autofagia (Buytaert et al., 2006; Kessel et al., 2006).

#### **IV.1. Apoptosis**

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular que resulta de gran importancia en el desarrollo y remodelamiento de los tejidos. Se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, y puede ser inducida por diferentes tipos de estrés celular, incluyendo terapias anticancerígenas como la TFD (Miller et al., 2007).

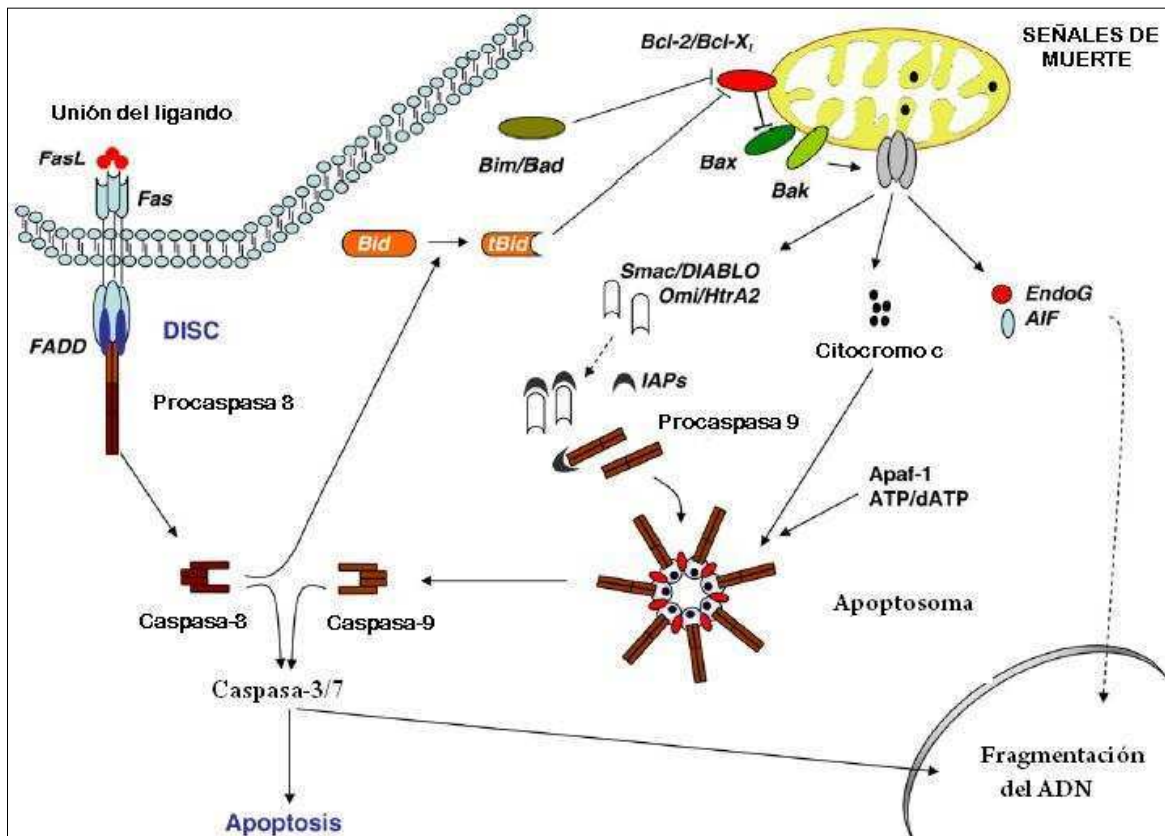
Los cambios morfológicos incluyen: condensación de la cromatina, clivaje del ADN en fragmentos internucleosomales, disminución del tamaño celular, formación de cuerpos apoptóticos sin ruptura de la membrana, exposición de residuos de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana y fagocitosis por parte de células vecinas.

A nivel bioquímico la apoptosis se caracteriza por la activación de las caspasas, un grupo de enzimas proteolíticas altamente conservadas, de las cuales 11 se han identificado en humanos. Las caspasas se sintetizan como pro-enzimas y se activan en respuesta a señales apoptóticas que pueden incluir: dimerización de un complejo multimérico (caspasas iniciadoras), o proteólisis de caspasas ubicadas río arriba (caspasas efectoras).

Una vez activadas, las caspasas efectoras son las responsables de los principales cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis por medio del clivaje de numerosos sustratos. Las caspasas actúan a través de dos mecanismos, la vía intrínseca y la vía extrínseca (Fig. 12). En la primera, las caspasas iniciadoras -8/-10 y -9 activan a las efectoras pro-caspasas -3 y -7. La vía extrínseca se activa por la unión de ligandos específicos a receptores de muerte (RM) ubicados en la superficie de la membrana, como Fas, TNF-RI y TRAIL. Esta unión induce la formación de un complejo oligomérico, DISC, que recluta a las procaspasas iniciadoras -8 y -10 y promueve su dimerización. Éstas a su vez activan a las caspasas efectoras -3 y -7 (Buytaert, 2007; Galuzzi et al., 2007; Jin y El-Deiry, 2005).

Las mitocondrias ejercen un rol central en la vía apoptótica intrínseca, ya que la permeabilización de sus membranas desencadena la liberación de numerosas proteínas apoptogénicas localizadas en el espacio intermembrana, como el citocromo c, Omi/HtrA2, Smac/DIABLO, AIF y endonucleasa G. Una vez liberado al citosol, el citocromo c se une a la proteína Apaf-1, y en presencia de ATP promueve la formación de un complejo heptamérico, el apoptosoma, el cual recluta y activa a la procaspasa -9. Una vez liberados

al citosol, Omi/HtrA2 y Smac/DIABLO antagonizan la actividad de proteínas inhibidoras de caspasas, mientras que AIF y endonucleasa G se translocan al núcleo y promueven la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Lam et al., 2001).



**Fig. 12.** Esquema representativo de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca.

Los mecanismos que llevan a la permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM) aún no se conocen con certeza. Uno de los modelos propuestos involucra un aumento en la permeabilidad de la membrana a solutos con una masa mayor a 1,5 kDa, permitiendo el ingreso de los mismos al interior de la mitocondria. Este proceso se asocia a la apertura de un canal iónico ubicado en la membrana, el poro de transición (PT). Esta apertura estaría estimulada por la presencia de calcio y la exposición de la mitocondria al daño por ROS. En la membrana mitocondrial interna (MMI), se produce una disipación del gradiente H<sup>+</sup> con la consecuente pérdida del potencial transmembrana y cambios osmóticos que finalmente conllevan a la ruptura de la membrana mitocondrial externa



(MME) y a la liberación de factores pro-apoptóticos (Green et al., 2006; Rasola y Bernardi, 2007).

Otro mecanismo propuesto para explicar la PMM consiste en la oligomerización de la familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 o la interacción entre éstas y VDAC.

La familia Bcl-2 comprende al menos 20 miembros que contienen al menos un dominio de homología Bcl-2 (BH1 a BH4). Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (ej: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) contienen los cuatro dominios BH. Las proteínas pro-apoptóticas se subdividen en “BH123 multidominio” (ej.: Bax, Bak) y “BH3” (ej.: Bid, Bad). Las primeras una vez activadas sufren un cambio conformacional y forman poros que mediarían la PMM. Las proteínas “BH3” actúan uniéndose y neutralizando la actividad de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (Antignani y Youle, 2006; Tsujimoto y Shimizu, 2000).

#### **IV.1.1. Participación de los lisosomas en la apoptosis**

Hasta hace poco se consideraba que los lisosomas no estaban involucrados en la muerte por apoptosis, ya que se mantenían estructuralmente intactos en las células apoptóticas (Kagedal, 2001). Sin embargo, en los últimos años, se demostró que la relocalización de proteasas lisosomales como la catepsina D y B desde el lisosoma hacia el citoplasma, participa en la ejecución de la apoptosis (Johnson, 2000; Guicciardi et al., 2004). Este proceso puede producirse como consecuencia de diversos estímulos, como el estrés oxidativo o la activación de p53, entre otros (Yuan et al., 2000; Stoka et al., 2001).

Uno de los mecanismos propuestos para explicar participación de las catepsinas en el proceso apoptótico, sugiere que un aumento de ROS dentro de la célula, llevaría a la desestabilización de la membrana lisosomal, causando la liberación de su contenido al citosol (Kagedal et al., 2001). Una vez liberadas, las catepsinas ejercerían su efecto directamente sobre la función mitocondrial y en estadios tempranos de la apoptosis (Bidere et al., 2003).

## **IV.2. Apoptosis y TFD**

La muerte celular por apoptosis como consecuencia del fotodaño fue descrita por primera vez por Agarwal et al. (1991).

Los tiempos de ejecución de la apoptosis son muy variables. La TFD se caracteriza por inducir una rápida respuesta apoptótica, pudiendo observarse fragmentación del ADN a los 30 min posteriores al fotodaño (Dougherty et al., 1998).

Considerando el rol fundamental que ejerce la mitocondria en la ejecución de la apoptosis, los FSs que se acumulen allí, como la PpIX, son los mejores candidatos para desencadenar este tipo de muerte celular (Krammer et al., 2006).

Los eventos reportados luego de la TFD utilizando FSs con localización mitocondrial, involucran la PMM, permitiendo la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol y la posterior activación de caspasas (Oleinick et al., 2002; Agostinis et al., 2004).

Ciertas características directamente asociadas a la apertura del PT como el aumento de calcio intracelular, el aumento de un estado celular pro-oxidante y la generación de ácidos grasos libres, también han sido observadas como consecuencia de la TFD (Moor, 2000).

La PpIX es un ligando de alta afinidad del receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), que es uno de los componentes del PT. Algunos autores hallaron correlación entre la unión de PpIX al PBR y la muerte celular inducida por la TFD, sugiriendo una posible explicación para la apertura del PT (Kessel et al., 2001; Furre et al., 2005).

La generación de ROS y la subsecuente peroxidación lipídica produce alteraciones en las funciones vitales de la mitocondria, como la mantención del potencial de la membrana mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la capacidad de equilibrar la concentración de calcio; todos ellos factores que favorecen la PMM (Orrenius et al., 2007).

En estudios recientes se ha demostrado que las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 cumplen un rol crítico en la apertura de la MME (Almeida et al., 2004). Como consecuencia de la TFD, en numerosos trabajos, se observó una relocalización de Bax desde el citosol hacia la mitocondria, asociada a la liberación de citocromo c (Granville et al., 1999; Chiu et al., 2003). Los mecanismos moleculares que promueven el cambio

conformacional y la activación de Bax (y Bak) durante la apoptosis inducida por la TFD, aun no se conocen con certeza (Buytaert et al., 2007).

El rol de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en la TFD resulta ambiguo. Mientras que en ciertos casos una sobreexpresión de Bcl-2 se asoció a una disminución en la apoptosis inducida por la TFD, en otros, una elevada expresión de esta proteína aumentó el grado de muerte celular por la TFD (Oleinick et al., 2002; Almeida et al., 2004).

En numerosos trabajos se demostró que Bcl-2 es un target de la TFD utilizando una gran variedad de FSs (Kessel y Castelli, 2001; Kessel et al., 2005; Marchal et al., 2007).

Con respecto a la activación de caspasas, se observó que la vía apoptótica más común luego de someter a las células a la TFD, es la que involucra la liberación de citocromo c, la activación de caspasa-9 y de caspasa-3; sin embargo, otras vías, especialmente aquellas que involucran caspasa-8 pueden contribuir a la muerte en situaciones en las que la vía principal está suprimida (Oleinick et al., 2001).

Si bien las caspasas se consideran las principales determinantes de la morfología apoptótica, un creciente número de trabajos avalan la idea de que la apoptosis inducida por la TFD puede ocurrir en forma independiente de caspasas (Furre et al., 2005; 2006; Vittar et al., 2010).

### **IV.3. Necrosis**

A nivel morfológico la muerte por necrosis se caracteriza por la aparición de vacuolas citoplasmáticas y ruptura de la membrana plasmática, lo que induce una reacción inflamatoria que promueve la liberación del contenido intracelular y moléculas pro-inflamatorias. Recientemente se ha demostrado que la necrosis no sólo ocurre como respuesta a situaciones patológicas, sino también durante algunos procesos fisiológicos como la renovación celular en el intestino delgado (Edinger y Thompson, 2004; Jin y El-Deiry, 2005).

Tradicionalmente se consideraba a la necrosis como una forma de muerte desorganizada y pasiva, pero recientemente se ha demostrado que este proceso está asociado a distintas vías de transducción de señales. Se ha reportado que en ciertas líneas celulares a

las cuales se trató con inhibidores de caspasas, la activación de receptores para TNF y Fas induce necrosis a través de la activación de la quinasa RIP1. Además, se ha demostrado que RIP1 cumple un rol fundamental en la cascada de señalización que induce necrosis activando la vía de JNK.

Estas evidencias sugieren que en ciertas líneas celulares y bajo determinadas condiciones, la necrosis podría constituir un tipo de muerte programada (Buytaert et al., 2007).

#### **IV.4. Necrosis y TFD**

En el caso de los FSs que se localizan preferentemente en la membrana plasmática, la necrosis constituye el principal mecanismo de muerte luego de la TFD (Buytaert, 2007). Esto se debe a la rápida pérdida de la integridad de la membrana como consecuencia del fotodaño, la incapacidad de mantener el flujo de iones a través de la misma, y una rápida depleción del ATP intracelular (Hsie et al., 2003; Fabris et al., 2001).

Los mecanismos que llevan a la célula a una muerte por necrosis en lugar de apoptosis, aún no se conocen. Se observó un importante rol del calcio en la inducción de necrosis (Uzdensky et al., 2007) y también se demostró que en células epiteliales de tumor mamario, el modo de muerte se correlacionó con el sitio de localización del FS (Kriska et al., 2005).

Algunos FSs causan inactivación de procaspasa-9 y procaspasa-3 al relocarse desde la membrana plasmática al citosol, y esa inactivación favorece la muerte por necrosis (Kessel, 2002).

También se ha observado que la producción de oxígeno singulete como consecuencia de la TFD, predispone a una muerte por necrosis, mientras que otras especies reactivas de oxígeno tienden a activar la vía apoptótica intrínseca (Matroule et al., 2006).

#### **IV.5. Autofagia**

Inicialmente la autofagia fue descrita como un mecanismo adaptativo que permitía mantener las funciones vitales en condiciones de privación de nutrientes. En mamíferos actualmente se sabe que la autofagia promueve la supervivencia celular, removiendo las organelas dañadas, metabolitos tóxicos y patógenos intracelulares. Asimismo puede actuar como una forma de muerte celular cuando ocurre una excesiva auto-digestión y degradación de constituyentes celulares esenciales (Kessel et al., 2006; Lefranc et al., 2007).

El primer paso de la autofagia consiste en la formación del autofagosoma, una estructura con doble membrana que contiene organelas y otros elementos citoplasmáticos. Los autofagosomas se fusionan con lisosomas y el contenido interno es degradado por enzimas hidrolíticas. La familia de genes Atg, ampliamente conservada en eucariotas, regula la formación de los autofagosomas (Tsujiyama y Shimizu, 2005; Ricci y Zong, 2006). Las vías de señalización de PI3K clase I y clase III regulan el proceso de autofagia. La formación del autofagosoma se encuentra bajo el control positivo del complejo de clase III, mientras que el complejo de clase I actúa inhibiendo la autofagia a través de la vía de mTOR. El proceso de formación vacuolar y transporte está mediado por Beclina-1, que pertenece al complejo PI3K de clase III y al unirse a éste promueve su activación (Fig. 13). Recientemente se ha demostrado que p53 también promueve la autofagia, y se han descrito otras moléculas asociadas a la activación de autofagia, como DRAM (damage-regulated autophagy modulator gene) y MAP1LC3-II (microtubule-associated protein 1 light chain 3) (Buytaert et al., 2007).

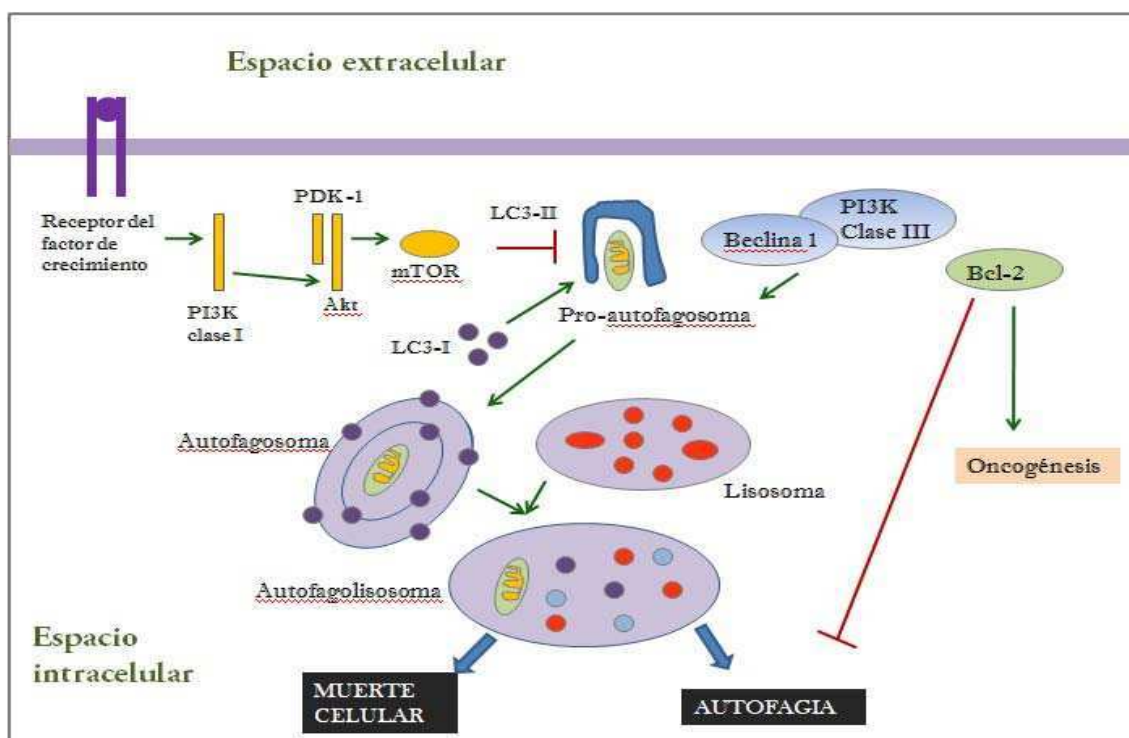
#### **IV.6. Autofagia y TFD**

En estudios recientes se demostró que la TFD puede inducir autofagia en distintos tipos celulares y utilizando una cierta variedad de FSs (Ji et al., 2010; Reiners et al., 2010; Dini et al., 2011).

La evidencia respalda la participación de ROS como iniciadoras de la autofagia (Scherz-Shouval y Elazar, 2007), aunque la relación precisa entre autofagia y TFD aún no se conoce por completo (Reiners et al., 2010). El daño oxidativo a Bcl-2 con la consecuente pérdida de su funcionalidad, se propone como un factor desencadenante de autofagia (Kessel, 2006).

En la línea de leucemia murina L1210 se observó la inducción simultánea de apoptosis y autofagia, luego del tratamiento con TFD (Kessel et al., 2006). En fibroblastos embrionarios murinos, que no expresan Bax y Bak se observaron características morfológicas y bioquímicas típicas de autofagia luego de la TFD, y se vio protección contra la muerte celular cuando las células fueron tratadas con wortmanina, un inhibidor de autofagia (Buytaert et al., 2006).

En la línea MCF-7, de cáncer de mama, que no expresan procaspasa-3, también se evidenció la muerte celular por autofagia luego de la TFD (Xue et al., 2007).



**Fig. 13.** Esquema representativo del proceso de autofagia.

---

## Bibliografía

- Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 1991; 51:5993–6.
- Agostinis P, Buytaert E, Breyskens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3(8):721-9.
- Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy, *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1704:59–86.
- Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane?. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006; 18(6):685-9.
- Bidère N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(33):31401-11.
- Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenheede JR, Heirman I, Grooten J, Agostinis P. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J.* 2006; 20:756–758.
- Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR, Agostinis P. Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 2006; 2(3):238-40.
- Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1776(1):86-107.
- Castano AP, Demidova T, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2004; 1:279-293.
- Chiu SM, Xue LY, Usuda J, Azizuddin K, Oleinick NL. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br. J. Cancer.* 2003; 89: 1590–1597.
- Dini L, Inguscio V, Tenuzzo B, Panzarini E. Rose bengal acetate photodynamic therapy-induced autophagy. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 10(10):1048-55.
- Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 380–387.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90(12):889-905.

Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004; 16(6):663-9.

Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res.* 2001; 61: 7495–7500.

Furre IE, Moller MT, Shahzidi S, Nesland JM, Peng Q. Involvement of both caspase-dependent and-independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis.* 2006; 11: 2031–2042.

Furre IE, Shahzidi S, Luksiene Z, Moller MT, Borgen E, Morgan J, Tkacz-Stachowska K, Nesland JM, Peng Q. Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 11051-11060.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007; 14(7):1237-43. Review.

Granville DJ, Shaw JR, Leong S, Carthy CM, Margaron P, Hunt DW, McManus BM. Release of cytochrome c, Bax migration, Bid cleavage, and activation of caspases 2, 3, 6, 7, 8, and 9 during endothelial cell apoptosis. *Am. J. Pathol.* 1999; 155: 1021-1025.

Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004; 305(5684):626-9.

Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene.* 2004; 23(16):2881-90.

Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, Busch TM, Kousis PC, Cheney RT, Morgan J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res.* 2004; 64:2120–2126.

Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, Yu JS. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J. Cell. Physiol.* 2003; 194: 363–375.

Ji HT, Chien LT, Lin YH, Chien HF, Chen CT. 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase. *Mol. Cancer.* 2010; 9:91.

Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 2005; 4(2): 139-163.

Johnson DE. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia.* 2000; 14(9):1695-703. Review.

Kågedal K, Johansson U, Ollinger K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J.* 2001; 15(9):1592-4.

Kessel D, Vicente MG, Reiners JJ Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 2006; 38: 482–488.



Kessel D, Antolovich M, Smith KM. The role of the peripheral benzodiazepine receptor in the apoptotic response to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 2001; 74: 346–49.

Kessel D, Castelli M, Reiners JJ. Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 502–11.

Kessel D, Castelli M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem. Photobiol.* 2001. 74: 318-322.

Kessel D, Luo Y, Deng Y, Chang CK. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65(3):422-6.

Kessel D, Vicente MG, Reiners JJ Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 2006 ; 38:482–88.

Kessel D. Protection of Bcl-2 by salubrinal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 346:1320-1323.

Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002; 1: 837–840.

Krammer B, Malik Z, Pottier R, Stepp H. Basic Principles. En: Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook. Pottier R, Kramer B, Baumgartner R, Stepp H. Reino Unido. Editor: Royal Society of Chemistry. 2006. P 1-14.

Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinatetreated tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005; 433: 435–46.

Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(50):47379-86.

Lefranc F, Facchini V, Kiss R. Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist.* 2007; 12(12):1395-403.

Marchal S, Francois A, Dumas D, Guillemin F, Bezdetnaya L. Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br. J. Cancer.* 2007; 96: 944-51.

Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, Jolois O, Hunt DW, Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide. A methylester photosensitization, *Oncogene.* 2001; 20:4070–84.

Miller JD, Baron ED, Scull H, Hsia A, Berlin JC, McCormick T, Colussi V, Kenney ME, Cooper KD, Oleinick NL. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007; 224(3):290-9.

Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol.* 2000; 57:1-13.

Morgan J, Oseroff AR. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 49(1-2):71-86.

N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko, The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002; 1–21.

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 47: 143-83.

Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis.* 2007; 12(5):815-33. Review.

Reiners JJ Jr, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy.* 2010; 6(1):7-18.

Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* 2006; 11(4):342-57. Review.

Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(9):422-7.

Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(5):3149-57.

Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2005; 12(2):1528-34.

Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* 2000; 7(12):1174-81. Review.

Uzdensky A, Lobanov A, Bibov M, Petin Y. Involvement of Ca<sup>2+</sup>- and cyclic adenosine monophosphate-mediated signaling pathways in photodynamic injury of isolated crayfish neuron and satellite glial cells. *J. Neurosci. Res.* 2007; 85: 860–70.

Vittar NB, Awruch J, Azizuddin K, Rivarola V. Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010; 42(7):1123-31.

Xue LY, Chiu SM, Azizuddin K, Joseph S, Oleinick NL. The death of human cancer cells following photodynamic therapy: apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochem. Photobiol.* 2007; 83(5):1016-23.

Yuan XM, Li W, Brunk UT, Dalen H, Chang YH, Sevanian A. Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28(2):208-18.

---

# ***Materiales y Métodos***

## I. Reactivos

Se utilizaron ALA, MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolio) hidroetidina (HE), diclorohidrofluoresceín diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA), ioduro de dihexilcarbocianida (DiOC<sub>6</sub>), menadiona, trifluorometoxi carbonil cianida fenil hidrazona (FCCP), glutatión reducido (GSH), triptofano, manitol, naranja de acridina (NA), bromuro de etidio (BE) y pepstatina A (PA), todos ellos de Sigma Chem. Co., USA.

*Trans*-1-(2'-Metoxivinil) pireno (MVP), Lyso Tracker Green, Mito Tracker Green, Hoescht, Annexin V-FITC e ioduro de propidio (IP) se obtuvieron de Invitrogen, Argentina.

La vincristina (VCR) fue gentilmente provista por Filaxis Pharmaceuticals S.A., Argentina y la doxorubicina (DOX) por Gador Pharmaceuticals, Argentina.

Los anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, USA. El kit para medición de proteínas Pierce BCA Protein Assay Kit fue obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc, USA.

El resto de los reactivos empleados fueron de grado analítico, obtenidos de diversas fuentes comerciales.

## Experimentos *in vitro*

### II. Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares leucémicas murinas LBR-, LBR-D160 y LBR-V160 provistas por la Dra. Silvia Hajos (IDEHU, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). LBR-D160 y LBR-V160 son resistentes a VCR y a DOX, respectivamente, y se obtuvieron cultivando a la línea celular leucémica murina LBR- con concentraciones crecientes (5-160 ng/ml) de VCR y DOX. LBR- es sensible a esas drogas, y proviene del control sin el agregado de las mismas (Lopes et al., 2001; 2002). Las células se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY. USA),

suplementado con gentamicina 40 µg/ml, L-glutamina 2 mM y suero fetal bovino 10% , a 37° C en estufa humidificada y gaseada con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **III. Determinación del número de células**

El número de células empleado para cada tratamiento se determinó utilizando una cámara de Neubauer y contando el número de células viables mediante el método de exclusión con Azul Tripán.

### **IV. Extracción y cuantificación de porfirinas**

Las células se incubaron con diferentes concentraciones de ALA y durante distintos tiempos, según se indica en los resultados. Luego se centrifugaron durante 5 min a 2500 RPM, y se separó el pellet del sobrenadante. La extracción de porfirinas se llevó a cabo agregando 2 ml de HCl 5% al pellet (porfirinas retenidas intracelularmente) y 1 ml de HCl 10% al sobrenadante (porfirinas extracelulares). Los tubos se dejaron durante 30 min a temperatura ambiente. La cuantificación de porfirinas se llevó a cabo utilizando un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55, utilizando una longitud de onda de excitación de 406 nm y de emisión de 604 nm, empleando PpIX (Porphyrin Products, Logan, Utah, USA) como estándar de referencia.

### **V. Tratamiento con TFD**

#### **V.1. Incubación con ALA**

Se trabajó con una concentración celular de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las mismas se incubaron en tubos Falcon de 15 ml con ALA, en medio RPMI 1640 completo, utilizando las concentraciones y los tiempos indicados en los resultados. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI libre de ALA.

## **V.2. Irradiación**

Luego de la incubación con ALA, las células se irradiaron durante distintos tiempos. La fuente lumínica utilizada consiste en un banco de dos tubos de luces fluorescentes (Osram L 36 W/10) que producen un espectro de luz entre 400 y 700 nm, con una radiación máxima a 600 nm. Los tubos con las células se ubicaron sobre una lámina de vidrio a 20 cm de la fuente lumínica.

## **VI. Ensayo de viabilidad mediante MTT**

La viabilidad celular se determinó mediante el uso de MTT, a distintos tiempos luego de la irradiación. Este método se basa en la capacidad de las mitocondrias para convertir el MTT en formazán, un producto coloreado cuya intensidad puede medirse espectrofotométricamente. Las células se sembraron en placas de 24 wells, a cada pocillo se agregó una solución de MTT en una concentración de 50 mg/ml (Merlin et al., 1992), y se incubaron a 37°C durante 2 h. Los cristales de formazán resultantes fueron disueltos con el agregado de DMSO y luego se midió la absorbancia a 560 nm utilizando un lector de placas (Spectra Count, Packard USA). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de supervivencia (o viabilidad) en función del control correspondiente.

## **VII. Localización intracelular de PpIX**

Luego de incubar a las células con ALA 1 mM durante distintos tiempos, las mismas fueron resuspendidas en RPMI completo y se incubaron durante 30 min a 37° C con Mito Tracker Green 100 nM y Lyso Tracker Green 100 nM para la identificación de mitocondrias y lisosomas, respectivamente. Previamente a la observación en el microscopio las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio fresco libre de ALA. Para visualizar la localización de la PpIX y su patrón de distribución intracelular se utilizó un microscopio confocal (Nikon D-Eclipse C1, IByME, Fundación Sales.)

## **VIII. Evaluación directa del estrés oxidativo**

Luego de la TFD, las células se centrifugaron, se resuspendieron en PBS y se incubaron en tubos Falcon de 15 ml con los reactivos fluorescentes para la detección de oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y daño mitocondrial (Posner et al., 1984; Paz et al., 2008). La fluorescencia de los reactivos se midió en un citómetro de flujo Partec PAS III.

### **VIII.1. Detección de oxígeno singulete**

La detección de  $^1\text{O}_2$  se realizó inmediatamente luego de someter las células a la TFD. Los tubos se centrifugaron, luego se extrajo el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de PBS 1X y 30  $\mu\text{l}$  de una solución de MVP ( $\lambda$  excitación: 485 nm;  $\lambda$  emisión: 530 nm) 10  $\mu\text{M}$ . Las células se incubaron en oscuridad durante 15 min, a 37° C, luego se agregaron 900  $\mu\text{l}$  de PBS y se analizaron inmediatamente.

### **VIII.2. Detección de anión superóxido**

La producción de  $\text{O}_2^-$  se midió luego de incubar las células con HE ( $\lambda$  excitación: 510 nm;  $\lambda$  emisión: 590 nm) 2  $\mu\text{M}$ , durante 30 min a 37° C, en oscuridad. El control positivo se llevó a cabo incubando una alícuota de suspensión celular con menadiona 25  $\mu\text{M}$  durante 1 h, previamente al agregado del reactivo.

### **VIII.3. Detección de peróxido de hidrógeno**

Las células se incubaron con  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  ( $\lambda$  excitación: 485 nm;  $\lambda$  emisión: 530 nm) 1  $\mu\text{M}$  durante 30 min a 37°C. El control positivo se realizó incubando una alícuota de la suspensión celular con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1 mM, 30 min previos al agregado del reactivo.

#### VIII.4. Despolarización de la membrana mitocondrial

Para evaluar el daño mitocondrial las células se incubaron con DiOC<sub>6</sub> ( $\lambda$  excitación: 484 nm;  $\lambda$  emisión: 511 nm) 30 nM durante 30 min a 37° C. El control positivo se realizó con FCCP 250 nM, durante 10 min previos al agregado del reactivo.

#### IX. Evaluación indirecta del estrés oxidativo utilizando secuestrantes de ROS

Los secuestrantes utilizados fueron ascorbato, manitol, GSH y triptofano en las concentraciones indicadas en los resultados. Las células se preincubaron con los mismos en medio RPMI completo, 1 h previa al agregado de ALA. Luego se llevaron a cabo los tratamientos lumínicos de la TFD y 1 h después se evaluó la viabilidad celular utilizando la técnica de MTT.

#### X. Tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE)

A distintos tiempos luego de la TFD, utilizando distintas dosis lumínicas, se evaluó la inducción de apoptosis mediante el análisis morfológico utilizando la tinción con NA/BE. Para ello se tomó una alícuota de 50  $\mu$ l de suspensión celular y se agregaron 2  $\mu$ l de la solución NA/BE (NA 100  $\mu$ g/ml más BE 100  $\mu$ g/ml en PBS) (Lopes et al., 2001). Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61, equipado con una lámpara de Mercurio HBO 100 W y los correspondientes filtros para microscopía de fluorescencia: azul (450-490 nm, filtro de excitación BP 490) y verde (545 nm, filtro de excitación BP 545).

El porcentaje de células apoptóticas (índice apoptótico) se calculó como:

$$\text{Apoptosis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células con núcleos apoptóticos}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$



De la misma manera se calculó el porcentaje de células necróticas. Al menos se contaron 200 células en cada muestra.

#### **XI. Análisis de la externalización de fosfatidilserina**

Se utilizó la técnica de Annexin-V FITC e IP para evaluar apoptosis incubando a las células con estos reactivos en las concentraciones recomendadas por el fabricante. Una hora después de someter a las células a los tratamientos correspondientes, las mismas se centrifugaron, se realizó un lavado con PBS, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 250  $\mu$ l buffer de binding. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l de suspensión celular a la cual se le agregó 5  $\mu$ l de annexin V-FITC y 3  $\mu$ l de IP. Luego de una incubación de 15 min a temperatura ambiente se agregaron 400  $\mu$ l de buffer de binding y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Partec PAS III dentro de 1 h de teñidas (Separovic et al., 1998).

#### **XII. Determinación de la morfología mitocondrial post-TFD**

Se utilizó el marcador específico de mitocondrias Mito Tracker Green. Las células se incubaron con ALA 1 mM durante 4 h, y 45 min previos a la irradiación se agregó el reactivo en una concentración 100 nM, continuándose la incubación a 37° C. Luego fueron expuestas a distintos tiempos de irradiación, posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en medio de cultivo fresco antes de ser visualizadas mediante microscopía de fluorescencia (Olympus BX61).

#### **XIII. Preparación de extractos celulares para análisis mediante Western Blot**

Para realizar la extracción de proteínas se utilizaron  $1 \times 10^7$  células para cada tratamiento. Las mismas se centrifugaron a 4° C durante 5 min a 2500 rpm, luego fueron resuspendidas en 1 ml de PBS frío, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspendieron en 160  $\mu$ l de buffer de lisis (Tris 20 mM pH: 8.0, NaCl 150 mM, NaF 100

mM, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, PMSF 1 mM y cóctel inhibidor de proteasas). Se homogeneizaron bien y se incubaron en hielo durante 25 min. Por último se realizó una centrifugación a 4° C durante 20 min a 15.000 g para precipitar las mitocondrias y se prepararon alícuotas del sobrenadante que se conservaron a -70° C hasta ser utilizadas.

#### **XIV. Cuantificación de proteínas de lisados celulares**

Para medir la cantidad de proteínas en los lisados se utilizó el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit, USA, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

#### **XV. Ensayos de Western Blot**

En la fracción citosólica de las células sometidas a distintos tratamientos se determinó la expresión de: citocromo c, pro-caspasa -3, caspasa -8, Bcl-2 y actina.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 10-15% (dependiendo de cada proteína) en condiciones desnaturizantes. Las muestras se desnaturizaron durante 5 min a 100° C con el agregado de buffer de siembra (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS 3,2% ; Glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 8% y azul de bromofenol) en una relación 1:1. Se sembraron cantidades iguales de proteínas y se llevó a cabo la electroforesis aplicando un voltaje constante de 180 volts durante 2-4 h, utilizando buffer de corrida Tris 25 mM pH 8,3; glicina 187 mM y SDS 0,6% .

Una vez finalizada la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa en un equipo de electrotransferencia de acuerdo a lo descrito por Towbin et al. (1979). El voltaje utilizado fue constante de 25 volts durante 90 min. Luego de la transferencia la membrana se bloqueó "overnight" con una solución de glicina al 2% y leche en polvo al 3% , a 10° C. Al finalizar el bloqueo la membrana se lavó con PBS-Tween 0,05% y se incubó con el anticuerpo deseado durante tiempos variables. Los anticuerpos primarios se utilizaron en las siguientes diluciones realizadas en PBS-Tween 0,01% :

- Anti-citocromo C: dilución 1:500
- Anti-Bcl-2: dilución 1:200
- Anti-caspasa -3: dilución 1:200
- Anti-caspasa -8: dilución 1:200
- Anti-actina: dilución 1:1000

Luego de la incubación con el anticuerpo primario en la concentración recomendada por el fabricante, la membrana fue lavada con PBS-Tween 0,05/ y posteriormente incubada con el anticuerpo secundario anti-mouse (dilución 1:4000 en PBS-Tween 0,01/ ) durante 1,5 h. Para la detección de las proteínas se utilizó el sistema de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham, GE Healthcare). Una vez agregado el reactivo sobre la membrana se lo dejó reaccionar durante 1 min. Luego la membrana se puso en contacto con la placa radiográfica y se dejó exponiendo durante distintos tiempos, dependiendo de la señal emitida por cada membrana. Posteriormente las placas se colocaron en solución reveladora durante 3 min. Las bandas fueron analizadas utilizando el software Scion Image (Scion Corporation, USA), luego de ser escaneadas.

#### **XVI. Estudios con Pepstatina A (PA)**

Las células se pre-incubaron durante 20 h con PA 100  $\mu$ M a 37° C (Zang et al., 2001). Luego se agregó ALA 1 mM sin cambiar el medio de cultivo y se continuó la incubación durante 4 h. Posteriormente fueron irradiadas durante 20 min y se realizaron las determinaciones de apoptosis de la manera descripta previamente.

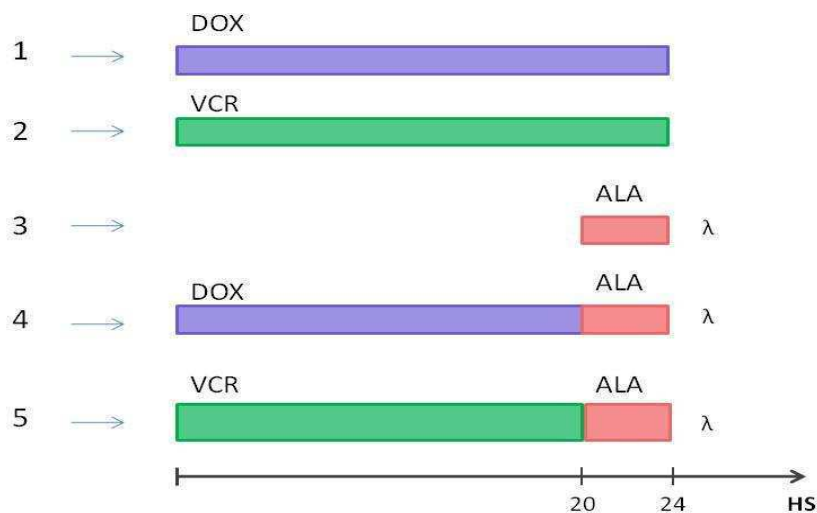
### XVII. Ensayos con DOX y VCR

Las soluciones stock de DOX y VCR se prepararon el mismo día que fueron utilizadas en medio RPMI. Las células, en una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, se incubaron con DOX y VCR en las concentraciones indicadas en los resultados durante 24 h, en medio RPMI completo a  $37^\circ \text{C}$ , en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron, se resuspendieron en medio fresco y se realizó el ensayo de MTT.

### XVIII. Ensayos de terapias combinadas

Se utilizó una concentración celular de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, las cuales se incubaron durante 20 hs en medio RPMI 1640, con DOX  $0,05 \mu\text{g/ml}$  o VCR  $0,01 \mu\text{g/ml}$ . Al cabo de ese tiempo se agregó ALA  $1 \text{ mM}$  y se continuó la incubación durante 4 h. Los tubos fueron irradiados durante 5, 10 y 20 min. Con el fin de poder comparar las terapias entre sí, se realizaron distintos tratamientos según el siguiente esquema:

Tratamientos



Una h luego realizar los tratamientos correspondientes se evaluó la viabilidad de las células mediante MTT, la inducción de apoptosis y necrosis con NA/BE y el estrés oxidativo, siguiendo los procedimientos indicados antes.

### **XIX. Estudios con daunorubicina (DAU).**

Con el fin de evaluar el efecto modulador de la TFD sobre la resistencia a drogas, se evaluó la acumulación intracelular de daunorubicina (DAU), sustrato de Pgp.

Las células se incubaron con DAU 4  $\mu$ M durante 1 h y la fluorescencia roja del compuesto se midió en un citómetro de flujo Partec PAS III (Tang et al., 2009).

## **Experimentos *in vivo***

### **XX. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones hembras pertenecientes a la línea BALB/c, con un peso corporal de 20-22 g y de 2 meses de edad, provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA. Fueron albergados en jaulas estándar con libre acceso a agua y alimento. El número de animales utilizados para cada grupo de tratamiento varió entre 3 (control con RPMI) y 6 animales (para el resto de los tratamientos).

Los animales fueron tratados de acuerdo a las guías vigentes de bienestar animal del Comité Coordinador sobre la Investigación en Cáncer del Reino Unido (UKCCCR) (Workman et al, 1998).

### **XXI. Inoculación de células en ratones**

Las células fueron tratadas con las terapias combinadas siguiendo el protocolo descrito para los estudios *in vitro*. Se obtuvieron así los 5 grupos de tratamientos mostrados en el esquema anterior, más el control de vehículo (RPMI).

Una h post- TFD, el total de las células (aproximadamente  $1 \times 10^6$ ), tanto las viables como las muertas por los tratamientos, se centrifugaron y resuspendieron en 200  $\mu$ l de medio RPMI. La inoculación se realizó por vía intravenosa en la vena de la cola, utilizando jeringas descartables tamaño 27G. En los ratones utilizados como control del vehículo, se inyectó un volumen igual (200  $\mu$ l) de medio RPMI.

## **XXII. Análisis citológico mediante la tinción con Giemsa**

A los ratones inoculados se les extrajo semanalmente una muestra de sangre periférica de la vena de la cola con una aguja descartable tamaño 27G, y se realizaron extendidos que fueron teñidos con la tinción de Giemsa. La presencia de blastos leucémicos en las muestras se determinó utilizando un microscopio óptico.

## **XXIII. Análisis histológico de los órganos**

A los 30 días de la inoculación, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los siguientes órganos para su posterior análisis histológico: timo, corazón, hígado, pulmones, bazo, riñones, ganglios linfáticos, cerebro y fémur. Los mismos fueron lavados con PBS y fijados en Formol 10/ (diluído en PBS), luego se incluyeron en parafina y se cortaron con micrótopo. A los cortes obtenidos se les realizó la tinción con hematoxilina-eosina (H&E) para su posterior análisis al microscopio.

Los análisis histopatológicos fueron realizados por el Dr. Roberto Meiss, en el Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina. Se utilizó un microscopio de campo claro y se fotografiaron los campos representativos de los resultados.

## **XXIV. Métodos estadísticos**

Los valores representados en las figuras de los experimentos *in vitro* representan la media  $\pm$  los desvíos estándar de la media. Se realizaron al menos tres experimentos independientes por duplicado. Se utilizó el t-test de Student desapareado.

Para comparar las diferencias entre los distintos tratamientos *in vivo* se utilizó la prueba Chi Cuadrado de Pearson (con corrección de Yates).

Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

## Bibliografía

Lopes EC, Ernst G, Aulicino P, Vanzulli S, García M, Alvarez E, Hajos SE. Dissimilar invasive and metastatic behavior of vincristine and doxorubicin-resistant cell lines derived from a murine T cell lymphoid leukemia. *Clin. Exp. Metastasis*. 2002; 19(4):283-90.

Lopes EC, García MG, Vellón L, Alvarez E, Hajos SE. Correlation between decreased apoptosis and multidrug resistance (MDR) in murine leukemic T cell lines. *Leuk. Lymphoma*. 2001; 42(4):775-87.

Lopes EC, Scolnik M, Alvarez E, Hajos SE. Modulator activity of PSC 833 and cyclosporin-A in vincristine and doxorubicin-selected multidrug resistant murine leukemic cells. *Leuk Res*. 2001; 25(1):85-93.

Merlin JL, Azzi S, Lignon D, Ramacci C, Zeghari N, Guillemin F. MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur. J. Cancer*. 1992; 28A(8-9):1452-8.

Paz ML, González Maglio DH, Weill FS, Bustamante J, Leoni J. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2008; 24(3):115-22.

Posner GH, Lever JR, Miura K, Lisek C, Seliger HH, Thompson A. A chemiluminescent probe specific for singlet oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1984; 123(2):869-73.

Separovic D, Mann KJ, Oleinick NL. Association of ceramide accumulation with photodynamic treatment-induced cell death. *Photochem. Photobiol*. 1998; 68(1):101-9.

Tang PM, Zhang DM, Xuan NH, Tsui SK, Waye MM, Kong SK, Fong WP, Fung KP. Photodynamic therapy inhibits P-glycoprotein mediated multidrug resistance via JNK activation in human hepatocellular carcinoma using the photosensitizer pheophorbide a. *Mol. Cancer*. 2009; 8:56.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76(9):4350-4.

Workman P, Twentyman P, Balkwill F, Balmain A, Chaplin D, Double J, Embleton J, Newell D, Raymond R, Stables J, Stephens T, Wallace J. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR): Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (Second Edition). *Br. J. Cancer*. 77: 1-10.

Zang Y, Beard RL, Chandraratna RA, Kang JX. Evidence of a lysosomal pathway for apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human leukemia HL-60 cells. *Cell. Death Differ*. 2001; 8(5):477-85.

---

## ***Resultados y Discusión***



## I. DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE PORFIRINAS ENDÓGENAS A PARTIR DE ALA

### I.1. Síntesis y acumulación de porfirinas.

Se determinaron las concentraciones y el tiempo de incubación óptimos con ALA para obtener una síntesis adecuada de porfirinas en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160.

En la Fig. I.1. se observa la cinética de acumulación de porfirinas intracelulares al utilizar concentraciones crecientes de ALA. En las tres líneas empleadas, la producción de PpIX aumentó en función de la concentración de ALA. La línea LBR-V160 produjo niveles de PpIX sensiblemente superiores a las líneas LBR- y LBR-D160, en esta última no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones 1 y 2 mM.

En base a estos resultados, se eligió la concentración de ALA 1 mM para utilizar en los siguientes experimentos, ya que en las tres líneas celulares indujo una síntesis significativa de porfirinas.

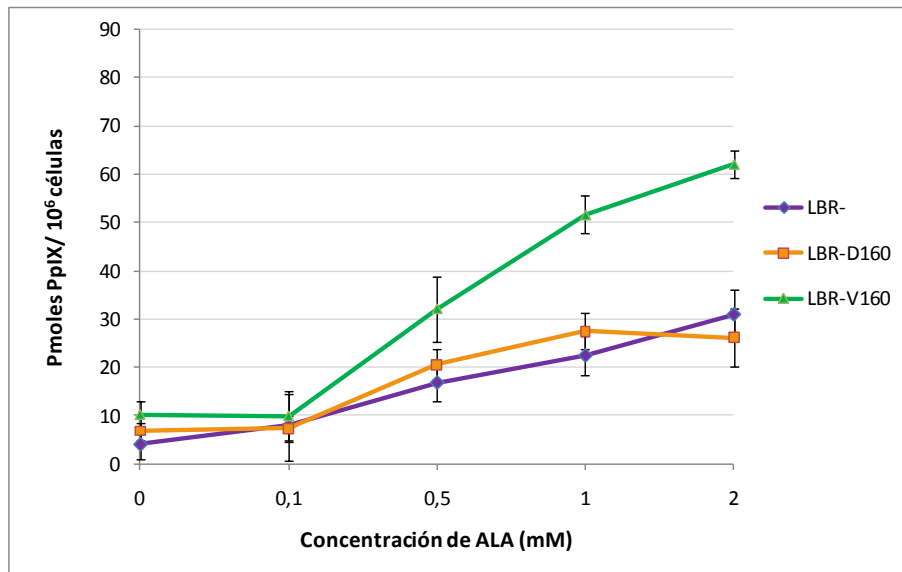
En la Fig. I.2. se observa la cinética de acumulación de porfirinas al utilizar distintos tiempos de incubación con ALA 1 mM. Se observó una dependencia de la síntesis del tetrapirrol con respecto al tiempo de incubación, la línea LBR-V160 fue la que sintetizó la mayor cantidad de PpIX. Las líneas LBR- y LBR-D160 produjeron niveles similares de porfirinas y se obtuvo un plateau a partir de las 5 h de incubación con ALA, debido probablemente a una saturación de las enzimas del camino del hemo.

Previamente fue demostrado que la resistencia a multidrogas (MDR) en las líneas celulares LBR-D160 y LBR-V160 se asociaba a la sobreexpresión del gen *mdr-3* y que los inhibidores de Pgp, PSC 833 y ciclosporina-A (CsA), lograban revertir esta resistencia (Lopes et al., 2003).

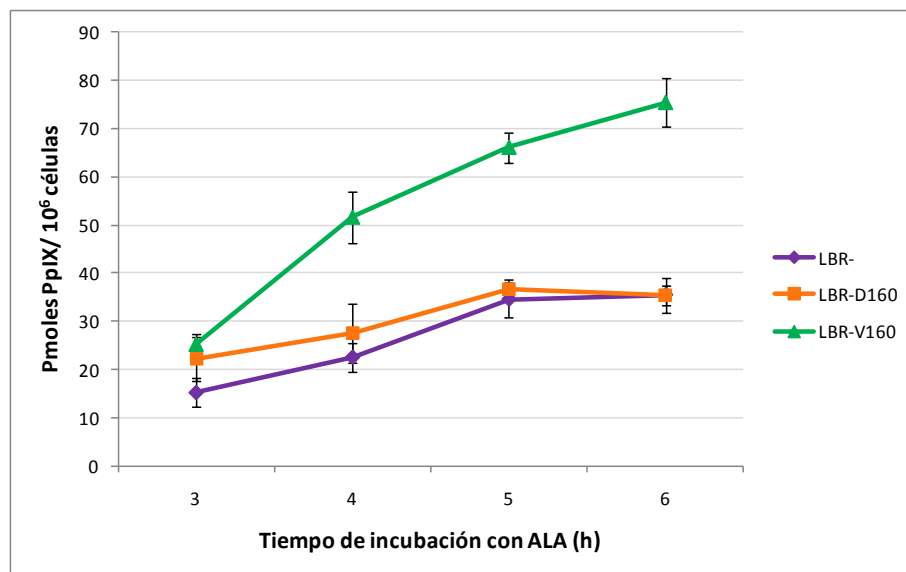
Varios autores postularon que las células que expresan el fenotipo MDR, principalmente las que se desarrollaron mediante repetidas exposiciones a agentes quimioterapéuticos, podrían presentar alteraciones en su actividad enzimática, dando lugar a modificaciones en la síntesis o acumulación de los compuestos FSs utilizados en la TFD, así como en la

respuesta fototóxica, independientemente de que el FS sea sustrato de Pgp (Singh et al., 1991; Kessel et al., 1992; Li et al., 2001). Algunos autores reportaron una disminución en la producción de PpIX en distintas líneas celulares incubadas con ALA; sin embargo, este hecho no siempre se asoció a un descenso en la eficacia de la TFD (Datta et al., 1997; Li et al., 2001, Tsai et al., 2004). Utilizando Photofrin como FS, Singh observó una inhibición en la acumulación del mismo y de su acción fototóxica en células de ovario de hámster resistentes a drogas (Singh et al., 1991). Por otra parte Chu reportó que la línea celular de sarcoma uterino MES-SA-Dx5, que sobreexpresa Pgp1, presentó una reducción en los niveles intracelulares de PpIX al ser tratada con TFD, utilizando Hexil-ALA como FS (Chu et al., 2006). En otro estudio Teiten demostró un aumento en la acumulación del FS meta-tetra (hidroxifenil) clorina (MTHPC) en líneas celulares que expresan Pgp, al compararlas con la línea parental (Teiten et al., 2001).

Resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo en la línea celular resistente a VCR LBR-V160, que produjo niveles superiores de PpIX que su línea parental sensible a drogas, LBR-. Por otra parte, la línea celular resistente a DOX LBR-D160 no mostró diferencias en la síntesis del tetrapirrol al compararla con la línea LBR-.



**Fig. I.1.** Síntesis de PpIX utilizando distintas concentraciones de ALA en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células se incubaron con ALA durante 4 h. La cuantificación de PpIX se realizó según se detalla en M&M. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. I.2.** Síntesis de PpIX a distintos tiempos de incubación con ALA en las líneas celulares LBR- LBR-D160 y LBR-V160. Las células se incubaron con ALA 1 mM durante diferentes tiempos. La cuantificación de PpIX se realizó según se detalla en M&M. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Se evaluó además la cantidad de porfirinas retenidas intracelularmente y las que se externalizaron al medio de incubación. A tiempos relativamente cortos de incubación (3 h), y a tiempos largos (20 h) la proporción de porfirinas que se externalizó fue mayor que la intracelular. Entre las 4 y las 6 h de incubación con ALA ambos valores presentaron una tendencia a equilibrarse (Fig.1.3 a, b y c).

Si bien el bajo nivel de PpIX retenida intracelularmente se corresponde con una alta externalización de la misma, este efecto probablemente no esté mediado por Pgp, ya que se evidencia tanto en las líneas resistentes como en la línea sensible a drogas, LBR-. Estos resultados se corresponden con los descritos en varios trabajos en los que se demostró que Pgp no media la externalización de PpIX sintetizada a partir de su precursor ALA (Rossi et al., 1996; Datta et al., 1997).

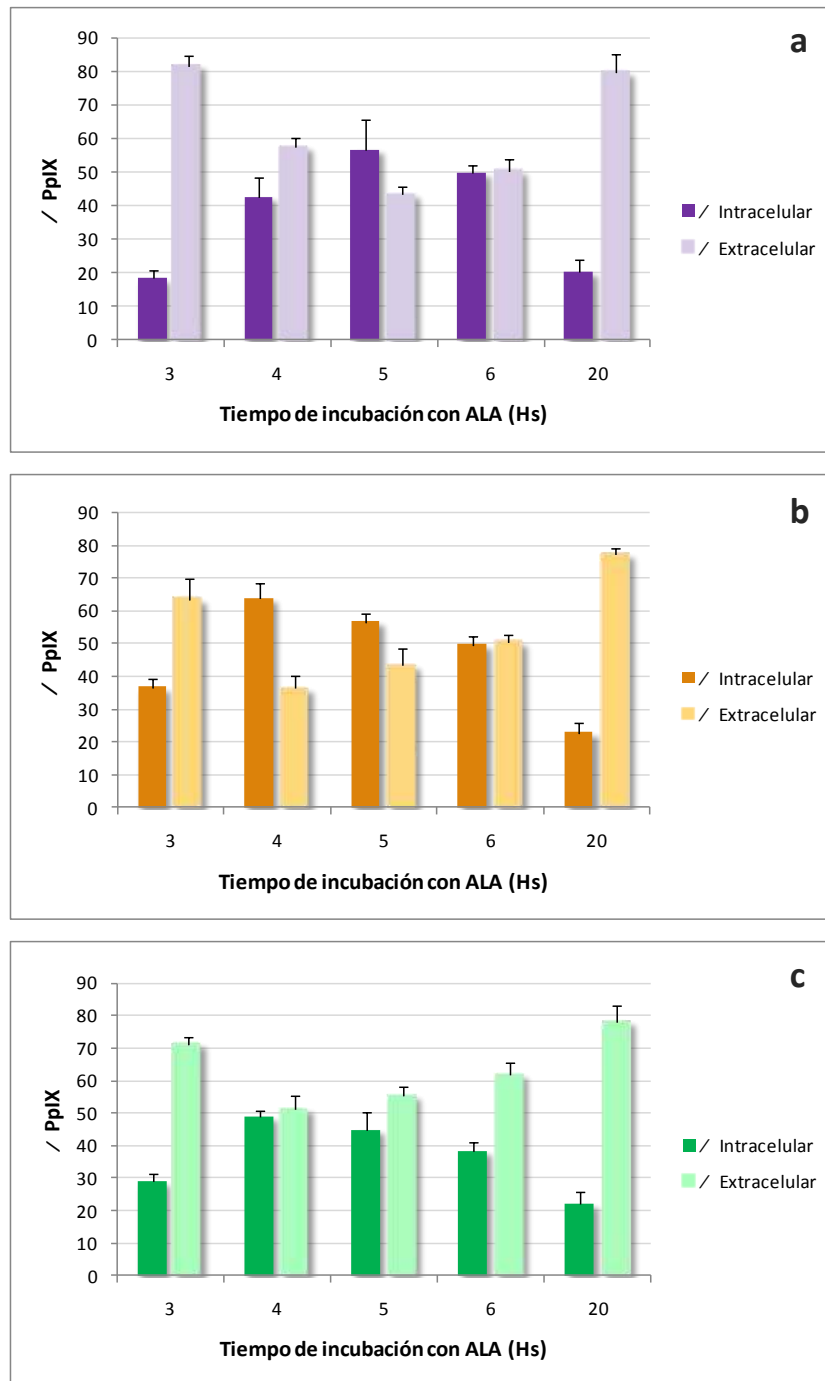
Los siguientes ensayos de TFD-ALA se realizaron con un tiempo de incubación de 4 h, dado que es el tiempo en el que se obtuvo la mejor relación entre porfirinas retenidas intracelularmente y externalizadas.

La presencia de suero fetal bovino en el medio de incubación es considerada por varios autores como un factor contraproducente para la acumulación de algunos FSs (Valduga et al., 1996; Bartosova et al., 2000). Steinbach demostró que la PpIX externalizada al medio de incubación se une a la albúmina fetal del suero, lo cual incrementa el gradiente de PpIX libre entre el espacio intra y extracelular, favoreciendo una mayor externalización de PpIX (Steinbach et al., 1995).

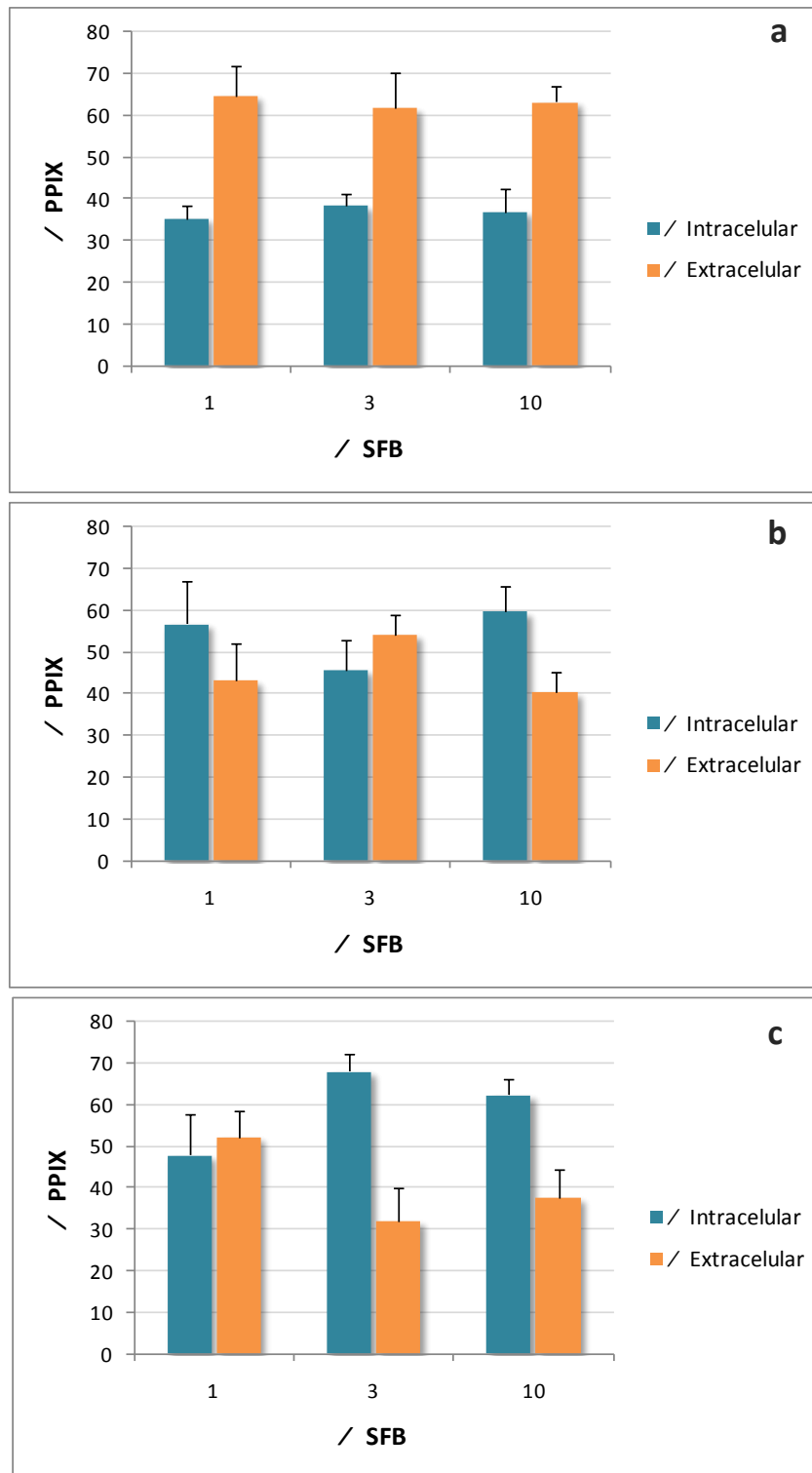
Por otra parte el suero promueve la proliferación celular, aumentando así la actividad metabólica, y por lo tanto la demanda de hierro. Esto genera una disminución en la disponibilidad de hierro intracelular para la ferroquelatasa, disminuyendo su actividad, y favoreciendo la acumulación intracelular de PpIX. De este modo, el suero ejerce efectos que resultan antagónicos, demostrando que su influencia sobre la acumulación de PpIX es compleja.

Para estudiar la interacción de estos factores en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160, se cuantificó el porcentaje de porfirinas retenidas en las células y externalizadas al medio con distintas concentraciones de suero en el medio de incubación. A diferencia de lo hallado por Bartosová en varias líneas leucémicas incubadas con ALA (Bartosová et al.,

2000), en ninguna de las tres líneas estudiadas en este trabajo se observó un aumento en la externalización de PpIX al aumentar la concentración de suero hasta un 10% (Fig. 1.4. a, b y c). La línea LBR- mostró una distribución similar de PpIX en las tres concentraciones de suero utilizadas, mientras que las líneas resistentes presentaron incluso una mayor proporción de PpIX intracelular cuando se utilizó la mayor concentración de suero en el medio.



**Fig. 1.3.** PpIX retenida intracelularmente y externalizada al medio a distintos tiempos de incubación con ALA en las líneas celulares LBR- (a), LBR-D160 (b) y LBR-V160 (c). Las células se incubaron con ALA 1mM durante distintos tiempos. Luego se centrifugaron, y se realizó la extracción de porfirinas tanto en el pellet como en el sobrenadante, según se describe en M&M. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. 1.4.** PpIX retenida intracelularmente y externalizada al medio utilizando distintas concentraciones de suero en las líneas celulares LBR- (a), LBR-D160 (b) y LBR-V160 (c). Las células se incubaron con ALA 1mM durante 4 h. Luego se centrifugaron, y se realizó la extracción de porfirinas tanto en el pellet como en el sobrenadante, según se describe en M&M. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

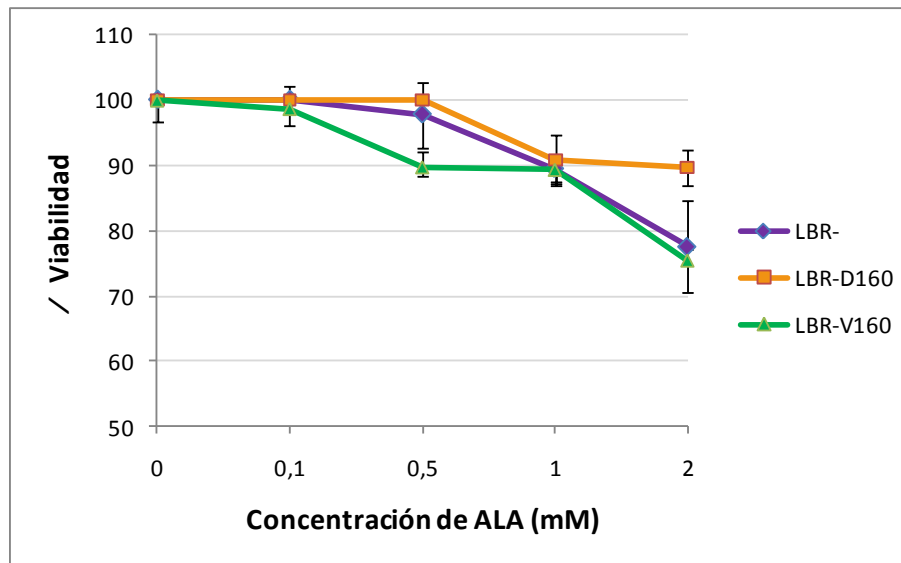
## I.2. Citotoxicidad inducida por la TFD-ALA en condiciones de oscuridad

Con el objetivo de estudiar la toxicidad *per se* del ALA, se evaluó la viabilidad celular luego de incubar a las células con distintas concentraciones del compuesto.

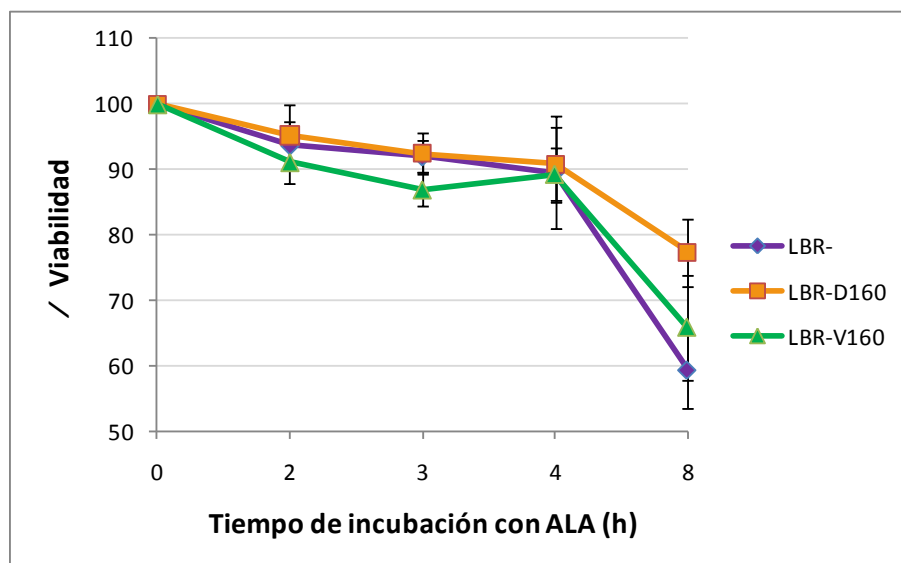
En las líneas LBR- y LBR-D160 se observó una disminución de la viabilidad a partir de la concentración 0,5 mM, en tanto que en las células de la línea resistente a vincristina LBR-V160 la viabilidad disminuyó a una concentración de ALA 0,1 mM (Fig. I.5). Con la mayor concentración de ALA (2 mM), la línea LBR-D160 resultó más resistente, presentando aproximadamente un 15% más de viabilidad que LBR- y LBR-V160. Al incubar con ALA 1 mM se obtuvo una respuesta similar en las tres líneas, con una toxicidad aceptable (aproximadamente un 10%), lo cual apoya la elección de esta concentración como óptima para los siguientes experimentos de respuesta a la TFD.

Teniendo esto en cuenta, se determinó la toxicidad celular, incubando a las células durante distintos tiempos con ALA 1 mM. En la Fig. I.6 se observa que en las tres líneas celulares empleadas a las 4 h se produjo una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente un 10%. A las 8 h la viabilidad disminuyó hasta un 40% en la línea sensible a drogas, LBR-. Las líneas resistentes LBR-D160 y LBR-V160 no demostraron una sensibilidad tan marcada a los efectos tóxicos del ALA.





**Fig. I.5.** Toxicidad celular producida por ALA en condiciones de oscuridad en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células se incubaron durante distintos tiempos con diferentes concentraciones de ALA, luego se determinó la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. I.6.** Toxicidad celular producida por ALA en condiciones de oscuridad en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células se incubaron durante distintos tiempos con ALA 1 mM, luego se determinó la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

### I.3. Citotoxicidad inducida por la TFD-ALA en condiciones de irradiación

Las tres líneas celulares estudiadas se incubaron con ALA 1 mM durante 4 h y luego fueron sometidas a distintas dosis lumínicas. La viabilidad celular se evaluó mediante la técnica de MTT inmediatamente post-TFD y luego de transcurridas 1, 2 y 3 h.

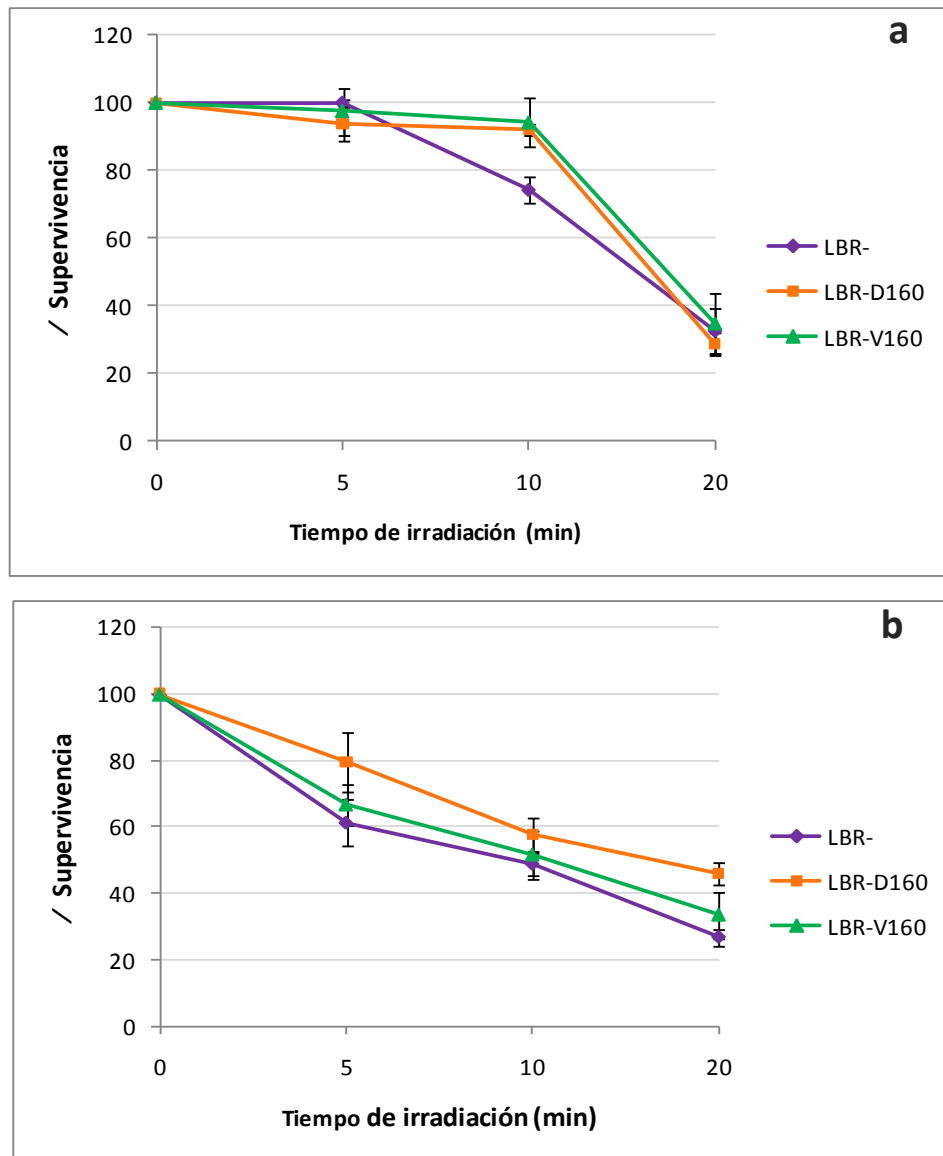
En todos los tiempos post-TFD analizados se observó que la línea celular sensible a drogas, LBR-, fue también la más sensible a la TFD-ALA (Fig. I.7 a, b, c y d). Si se tiene en cuenta que esta línea fue la que sintetizó la menor cantidad de PpIX y retuvo la menor proporción de porfirinas intracelularmente, se puede inferir que la efectividad de la TFD-ALA no se correlaciona estrictamente con la cantidad ni con el patrón de distribución de PpIX intra o extracelular. Esta discrepancia entre la acumulación intracelular de PpIX y la eficacia de la TFD-ALA ha sido descrita en otros trabajos, y podría deberse a una diferencia en la localización intracelular del FS (Li et al., 2001) o bien a diferencias en la cantidad de mitocondrias entre la línea sensible y las resistentes.

Cuando se evaluó la viabilidad inmediatamente post-TFD se observó una disminución en la supervivencia celular del 70% con 20 min de irradiación en las tres líneas celulares, indicando que el efecto de la TFD-ALA es rápido (Fig. I.7 a). La viabilidad decreció en función del tiempo post-TFD, especialmente con dosis lumínicas bajas (5 y 10 min de irradiación). A las 18 horas post tratamiento no se observó viabilidad en las líneas resistentes, mientras que en la línea sensible fueron necesarias 24 horas para la muerte celular total (datos no mostrados).

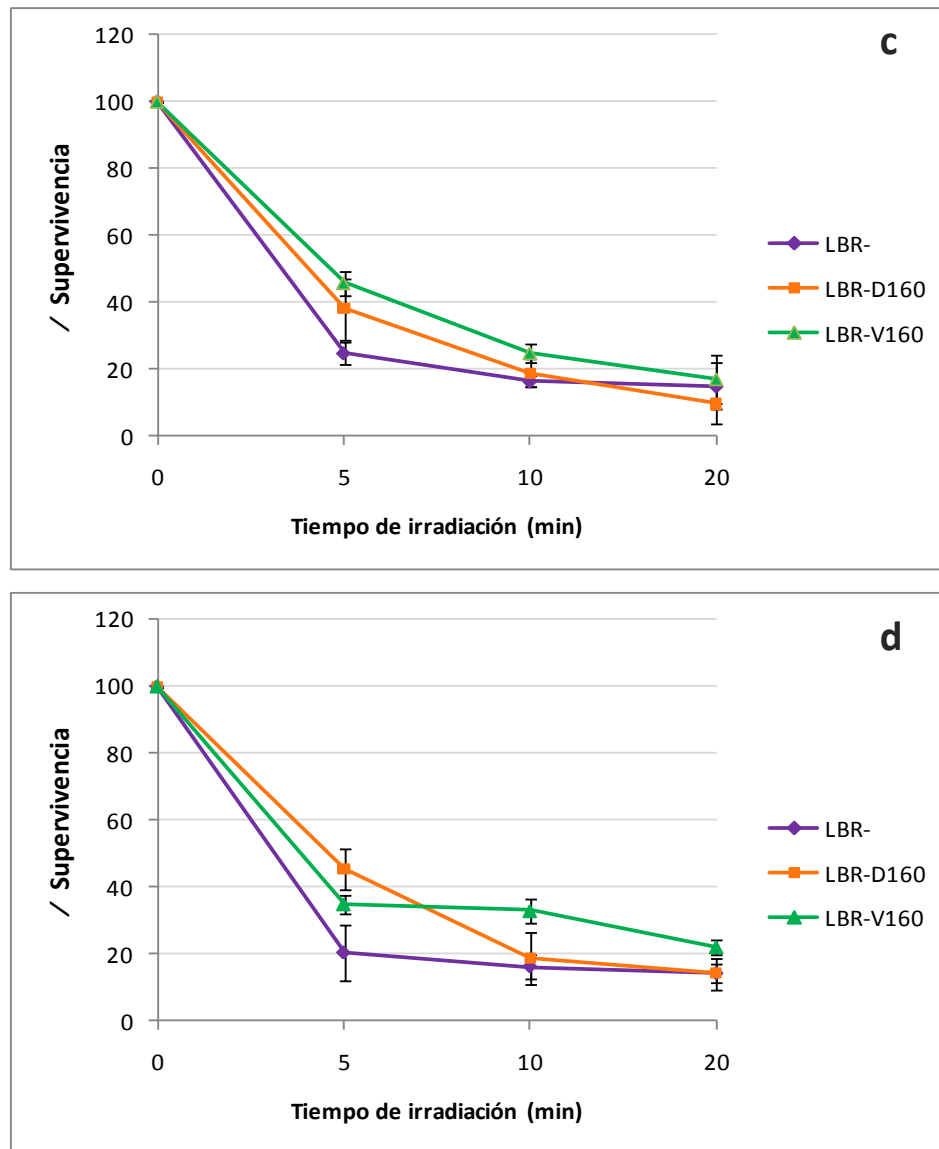
Como se explicó en detalle en la introducción, la respuesta a la TFD es sumamente variable dependiendo del tipo celular, de la naturaleza del FS, o de las dosis de luz empleadas, entre otros factores. En líneas resistentes a drogas varios autores han reportado una disminución en la eficacia de la TFD acompañada por una menor síntesis o retención de compuestos FSs (Capella y Capella, 2003; Busch y Hahn, 2005). Tsai demostró que la línea de cáncer de mama MCF-7/ADR, resistente a adriamicina, resultó también más resistente a la TFD-ALA que su línea parental sensible a drogas, pese a que ambas acumulaban cantidades similares de porfirinas (Tsai et al., 2004). Selbo demostró que la línea celular MES-SA-Dx5 es más resistente a la TFD con TPPS2a que su línea parental, aunque el proceso no fue mediado por Pgp, ya que no hallaron diferencias en la

acumulación intracelular del FS (Selbo et al., 2006). Canti no encontró resistencia cruzada con la TFD-ALA en líneas celulares de melanoma, leucemia y linfoma, resistentes a DOX (Canti et al., 1995).

En el presente trabajo demostramos que la TFD-ALA resulta efectiva en las líneas resistentes a drogas LBR-D160 y LBR-V160, y si bien la respuesta es variable según el tiempo post-TFD considerado, no se hallaron diferencias significativas con respecto a la línea parental, LBR-.



**Fig. 1.7.** Supervivencia celular en las líneas LBR-, LBR-D160 y LBR-V160 determinada mediante el ensayo de MTT inmediatamente (a) y 1 hora (b) post-TFD, luego de iluminar a las células durante distintos tiempos. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. 1.7.** Supervivencia celular en las líneas LBR-, LBR-D160 y LBR-V160 determinada mediante el ensayo de MTT 2 horas (c) y 3 horas (d) post-TFD, luego de iluminar a las células durante distintos tiempos. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

#### **I.4. Localización intracelular de la PpIX**

La localización de los FSs en la TFD resulta de gran importancia ya que el sitio primario de localización de estos compuestos generalmente coincide con el sitio de acción del fotodaño, debido a la breve vida media de las moléculas activadas. Esto no siempre ocurre debido a la posibilidad de relocalización de los compuestos FSs hacia otras organelas (Rodal et al., 1998).

Por otra parte la localización intracelular también puede determinar el tipo de muerte celular desencadenada por la TFD. Aquellos FSs que se acumulan preferencialmente en mitocondrias o retículo endoplasmático generalmente promueven la apoptosis, mientras que los que afectan la membrana plasmática o los lisosomas predisponen a la muerte por necrosis (Kessel et al., 1997).

La distribución intracelular de PpIX se estudió mediante microscopía confocal, considerada como una técnica más confiable y ventajosa con respecto a la microscopía de fluorescencia convencional para estudiar la localización de agentes FSs, ya que permite imágenes de mayor resolución, el análisis en tres dimensiones y la posibilidad de utilizar dos filtros de distintas longitudes de onda al mismo tiempo (Chen et al., 2001).

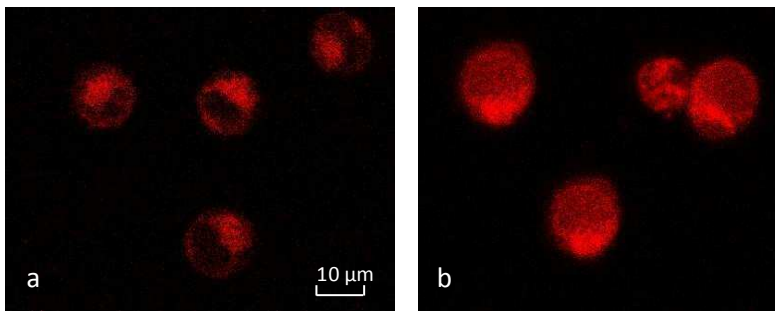
En las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160, se evaluó la localización intracelular de PpIX utilizando la fluorescencia característica de esta molécula y marcadores de mitocondrias y lisosomas, tal como se describe en M&M.

En las condiciones utilizadas el patrón de distribución de PpIX fue similar en las tres líneas celulares. La Fig. I.8 muestra que a tiempos relativamente cortos de incubación con ALA (4 h), la fluorescencia roja se limita a la región citoplasmática y presenta un patrón puntillado, volviéndose más difusa e incluso alcanzando la región nuclear a tiempos mayores de incubación con ALA (20h). Este resultado es consistente con el hecho de que la PpIX se sintetiza inicialmente en la mitocondria y luego puede difundir al citosol (Peng et al., 1997) e incluso al núcleo (Chu et al., 2006). Otros autores han reportado resultados similares en otras líneas celulares leucémicas (Chen et al., 2001), de adenocarcinoma (Gaulhier et al., 1997), y de hepatoma (Ren et al., 2002), entre otras.

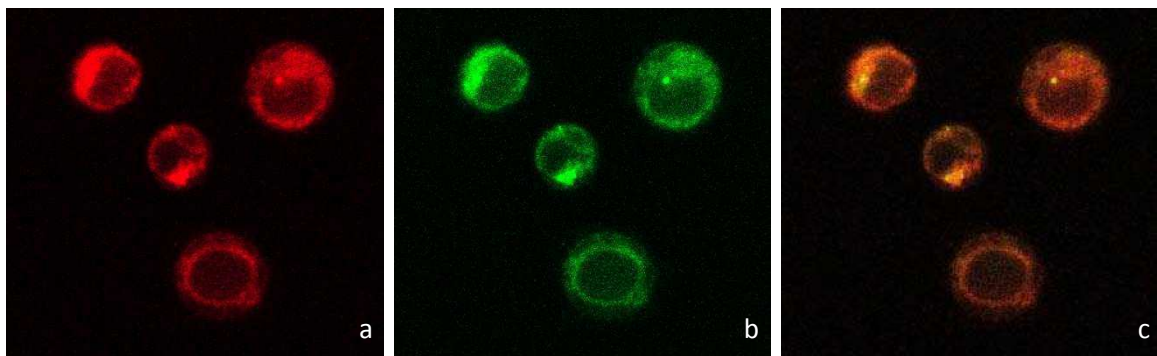
En la Fig. I.9 se muestra la distribución de PpIX, de las mitocondrias y la superposición de ambas imágenes en la línea celular LBR-V160 (a, b y c), donde se evidencia una amplia colocalización de ambas marcas fluorescentes.

En la Fig. I.10 se muestra la misma secuencia de imágenes para la línea celular LBR-D160, pero en este caso la fluorescencia verde corresponde a los lisosomas. La superposición de imágenes demuestra una baja colocalización lisosomal en comparación con las mitocondrias.

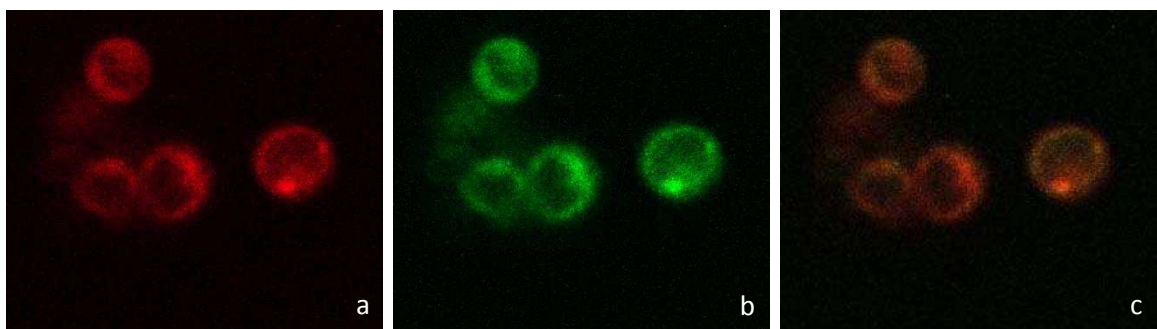
Estos resultados fueron similares en las tres líneas celulares y demuestran que el sitio primario de localización de PpIX son las mitocondrias.



**Fig. I.8.** Distribución intracelular de PpIX en la línea LBR-D160 luego de: a) 4 horas, b) 20 horas de incubación con ALA 1 mM.



**Fig. I.9.** Imágenes de microscopía confocal de la línea LBR-V160. a) Distribución celular de PpIX endógena (rojo) luego de la incubación durante 4 h con ALA 1 mM, b) localización de las mitocondrias (verde) en las mismas células que “a”, c) superposición de imágenes “a” y “b”.



**Fig. I.10.** Imágenes de microscopía confocal de la línea LBR-V160. a) Distribución celular de PpIX endógena (rojo) luego de la incubación durante 4 h con ALA 1 Mm, b) localización de los lisosomas (verde) en las mismas células que “a”, c) superposición de imágenes “a” y “b”.



### **Conclusiones**

- En las tres líneas celulares empleadas, la síntesis de PpIX aumentó en función de la concentración y del tiempo de incubación con ALA, siendo mayor en la línea LBR-V160.
- Los estudios de viabilidad celular realizados mediante la técnica de MTT demostraron la eficacia de la TFD-ALA en las tres líneas celulares.
- La falta de resistencia cruzada con la TFD-ALA en las líneas resistentes a DOX y a VCR resulta favorable, ya que brinda una posible alternativa de tratamiento a los fenotipos resistentes a drogas.
- El efecto de la terapia fue rápido, observándose una significativa disminución en la viabilidad celular inmediatamente después de la irradiación.
- Los estudios realizados mediante microscopía confocal demuestran que las mitocondrias son el principal sitio de localización intracelular de la PpIX.

## Bibliografía

- Bartosová J, Hrkal Z. Accumulation of protoporphyrin-IX (PpIX) in leukemic cell lines following induction by 5-aminolevulinic acid (ALA). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2000; 126(3):245-52.
- Busch TM, Hahn SM. Multidrug resistance in photodynamic therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2005; 4(2):195-6.
- Canti G, Luttada D, Morelli S, Nicolini A, Cubeddu R, Taroni R, Valentini G. Efficacy of photodynamic therapy against doxorubicin-resistant murine tumors. *Cancer Lett.* 1995; 93 (2): 255-9.
- Capella MA, Capella LS. A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10:361-6.
- Chen JY, Mak NQ, Cheung NH, Leung RN, Peng Q. Endogenous production of protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in leukemia cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2001; 22(2):163-8.
- Chu ES, Wu RW, Yow CM, Wong TK, Chen JY. The cytotoxic and genotoxic potential of 5-aminolevulinic acid on lymphocytes: a comet assay study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006; 58(3):408-14.
- Chu ES, Yow CM, Shi M, Ho RJ. Effects of photoactivated 5-aminolevulinic acid hexyl ester on MDR1 over-expressing human uterine sarcoma cells. *Toxicol Lett.* 2008; 181(1):7-12.
- Datta SN, Allman R, Loh CS, Mason M, Matthews PN. Photodynamic therapy of bladder cancer cell lines. *Br.J. Urol.* 1997; 80(3):421-6.
- Gaullier JM, Berg K, Peng Q, Anholt H, Selbo PK, Ma LW, Moan J. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Res.* 1997; 57: 1481-86.
- Kessel D, Erickson C. Porphyrin photosensitization of multi-drug resistant cell types. *Photochem. Photobiol.* 1992; 55:397-9.
- Kessel D, Luo Y, Deng Y, Chang CK. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65(3):422-6.
- Li W, Zhang WJ, Ohnishi K, Yamada I, Ohno R, Hashimoto K. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in multidrug resistant leukemia cells. *J. Photochem. Photobiol.* 2001; 60(2-3):79-86.
- Lopes EC, Garcia M, Benavides F, Shen J, Conti CJ, Alvarez E, Hajos SE. Multidrug resistance modulators PSC 833 and CsA show differential capacity to induce apoptosis in lymphoid leukemia cell lines independently of their MDR phenotype. *Leuk. Res.* 2003; 27(5):413-23.
- Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. *Cancer* 1997; 79:2282-2307.

Ren QG, Wu SM, Peng Q, Chen JY. Comparison of 5-aminolevulinic acid and its hexyl ester mediated photodynamic action on human hepatoma cells, *Acta Biochem. Biophys. Sin.* 2002; 34(5): 650–54.

Rodal GH, Rodal SK, Moan J, Berg K. Liposome-bound Zn (II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1998; 45(2-3):150-9.

Rossi FM, Campbell DL, Pottier RH, Kennedy JC, Dickson EF. In vitro studies on the potential use of 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy for gynaecological tumours. *Br. J. Cancer.* 1996; 74(6):881-7.

Selbo PK, Weyergang A, Bonsted A, Bown SG, Berg K. Photochemical internalization of therapeutic macromolecular agents: a novel strategy to kill multidrug-resistant cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 319(2):604-12.

Singh G, Wilson BC, Sharkey SM, Browman GP, Deschamps P. Resistance to photodynamic therapy in radiation induced fibrosarcoma-1 and Chinese hamster ovary-multi-drug resistant cells in vitro. *Photochem. Photobiol.* 1991; 54:307-12.

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.* 1995; 62:887–895.

Teiten MH, Bezdetsnaya L, Merlin JL, Bour-Dill C, Pauly ME, Dicato M, Guillemin F. Effect of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-mediated photodynamic therapy on sensitive and multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001; 62:146-52.

Tsai T, Hong RL, Tsai JC, Lou PJ, Ling IF, Chen CT. Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. *Lasers Surg. Med.* 2004; 34(1):62-72.

Valduga G, Bianco G, Csik G, Reddi E, Masiero L, Garbisa S, Jori G. Interaction of hydro- or lipophilic phthalocyanines with cells of different metastatic potential. *Biochem. Pharmacol.* 1996; 51(5):585-90.

## II. ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR LA TFD-ALA

### II.1. Evaluación directa del estrés oxidativo

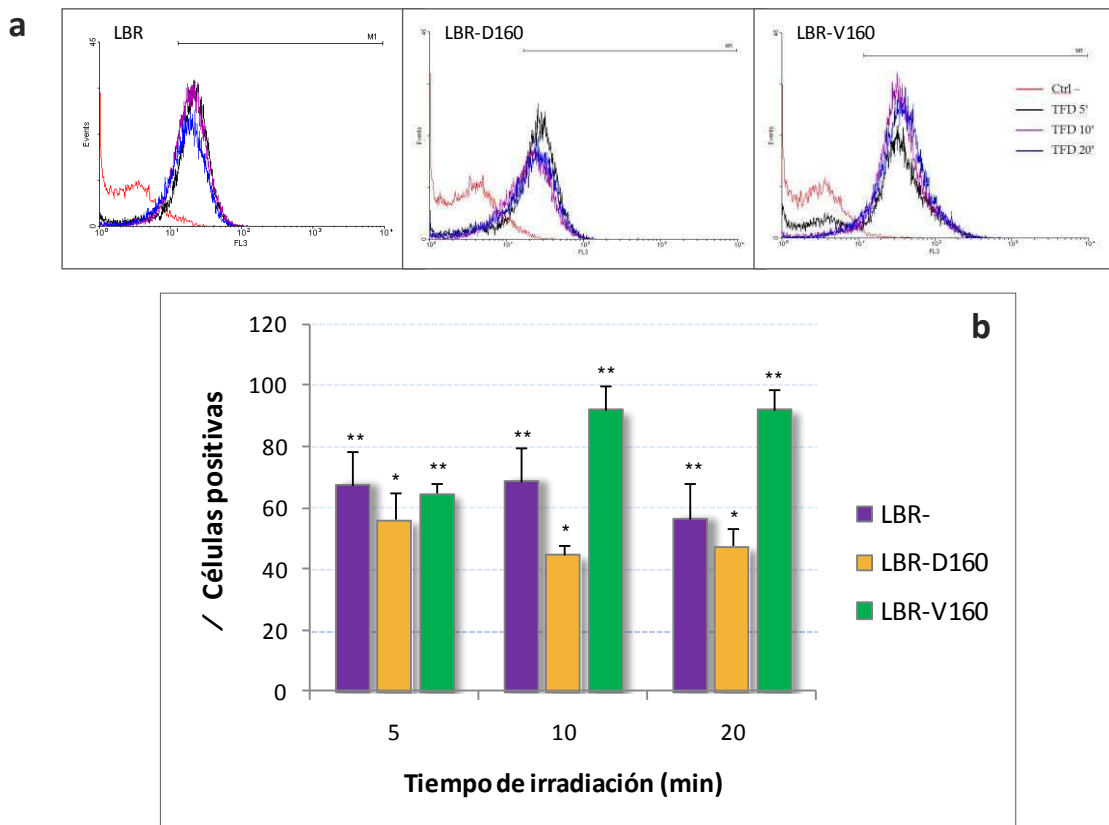
#### II.1.1 Producción de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )

La eficacia de la TFD-ALA depende inicialmente de la formación de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que puede dar origen a otros tipos de ROS, incluyendo anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). La medida en la que cada una de estas moléculas contribuye a producir los cambios bioquímicos y morfológicos observados en la TFD generalmente se infiere de forma indirecta mediante la utilización de agentes secuestrantes específicos para cada ROS (Price et al., 2009). La utilización de reactivos que puedan detectar estas moléculas en forma directa y en tiempo real refleja de manera más certera los procesos que ocurren en la célula. El  $^1\text{O}_2$  presenta una vida media menor a 200 nseg y una tasa de difusión muy baja (aproximadamente 20 nm) (Sun et al., 2009), de allí la importancia de contar con un método para medirlo en forma directa. El reactivo fluorescente *trans*-1-(2'-Metoxivinil) pireno (MVP) brinda la posibilidad de medir la producción de  $^1\text{O}_2$  en las células en tiempo real, luego de ser sometidas a la TFD (Tang et al., 2009). Este compuesto no reacciona con otras ROS, por lo cual es específico para  $^1\text{O}_2$ .

La localización intracelular del FS es un parámetro importante a tener en cuenta en la TFD, ya que puede afectar la eficiencia en la muerte celular inducida por esta terapia. Previamente se demostró que en las líneas celulares en estudio, la PpIX se acumula principalmente en las mitocondrias, indicando que estas organelas serían el sitio primario de acción de la TFD-ALA. Con el fin de dilucidar el rol mitocondrial en el daño ocasionado por la terapia, se midió el nivel intracelular de  $^1\text{O}_2$ , teniendo presente que esta molécula está directamente vinculada al daño mitocondrial.

En la Fig. II.1. se observa un incremento significativo en la producción de  $^1\text{O}_2$  en las tres líneas celulares luego de ser sometidas a la TFD-ALA con respecto al control. Sin embargo

este aumento no fue dependiente del tiempo de irradiación. La línea resistente LBR-V160 produjo mayores niveles de  $^1\text{O}_2$  que las líneas LBR- y LBR-D160 cuando las células se irradiaron durante 10 y 20 min, diferencia que podría atribuirse a la mayor síntesis endógena de PpIX que presentó esta línea, como se describió en el capítulo anterior.



**Fig. II.1.** Producción de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células fueron tratadas con TFD-ALA utilizando los tiempos de irradiación indicados, luego se incubaron con el reactivo fluorescente MVP y se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo. Se observa la intensidad de fluorescencia del MVP para cada tratamiento (a). Las barras indican el porcentaje de células positivas para fluorescencia con respecto al control de células sin tratar (b). Estos valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*  $p < 0,05$  vs células no tratadas, \*\*  $p < 0,01$  vs células no tratadas).

### II.1.2 Producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

Si bien el  $^1O_2$  se considera la especie reactiva del oxígeno predominante en los efectos citotóxicos de la TFD (Sharman et al., 2000), un gran número de observaciones relacionan al anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) con la fototoxicidad inducida por la TFD. El desacople en la cadena de transporte de electrones mitocondrial induce una fuerte producción de  $O_2^{\cdot-}$ , desencadenando múltiples efectos deletéreos como peroxidación lipídica, entrecruzamiento en el ADN y formación de puentes disulfuro en proteínas (Martinez-Cayuela, 1995).

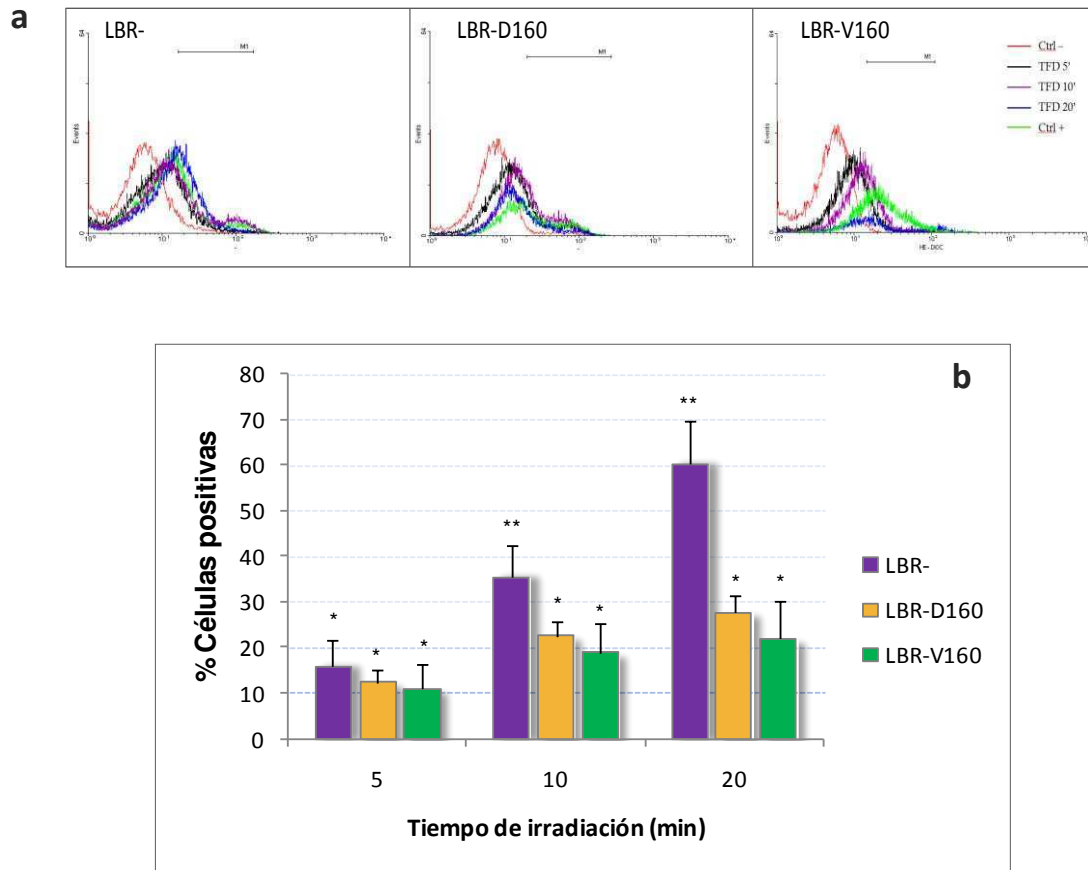
Salet et al. (1997) reportaron un aumento en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en mitocondrias aisladas fotosensibilizadas con Photofrin. También se demostró una fuerte correlación entre la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y la muerte celular ocasionada por la TFD utilizando ALA y ftalocianina de zinc (II) (Gilaberte et al., 1997; Hadjur et al., 1997).

En nuestro trabajo, se midió en las tres líneas celulares: LBR-, LBR-D160 y LBR-V160 la producción de  $O_2^{\cdot-}$  mediante citometría de flujo, utilizando el reactivo fluorescente hidroetidina (HE), tal como se describe en M&M. La HE emite fluorescencia roja al oxidarse, siendo el  $O_2^{\cdot-}$  la principal molécula implicada en este proceso. Una mínima oxidación puede ser producida por peróxido de hidrógeno o por ácido hipocloroso, por lo cual la cuantificación de  $O_2^{\cdot-}$  mediante HE no es del todo específica (Paz et al., 2008). Para el control positivo se utilizó menadiona, la cual promueve el desacople de electrones en la mitocondria, desencadenando una producción masiva de  $O_2^{\cdot-}$ .

En la Fig. II.2 se observa que, en las tres líneas celulares estudiadas, se produjo un incremento significativo en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  a medida que aumentó el tiempo de irradiación. Las líneas resistentes mostraron un comportamiento similar, mientras que en la línea sensible LBR-, la producción de  $O_2^{\cdot-}$  fue significativamente mayor, al igual que el incremento. El máximo nivel de  $O_2^{\cdot-}$  se obtuvo en la línea LBR-, a los 20 min de irradiación, superando en un 60% al control de células sin tratar.

Previamente se demostró que la línea sensible a drogas LBR- resultó más sensible a la TFD-ALA que las líneas resistentes a drogas, y teniendo en cuenta que no produjo

mayores niveles de  $^1\text{O}_2$  que éstas, pero sí de  $\text{O}_2^-$ , se podría inferir que esta molécula sería la principal implicada en el daño oxidativo producido por la terapia.



**Fig. II.2.** Producción de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células fueron tratadas con TFD-ALA durante distintos tiempos de irradiación y 1 h después se analizó la producción de  $\text{O}_2^-$  mediante citometría de flujo. Se observa la intensidad de fluorescencia de la HE para cada tratamiento (a). Las barras indican el porcentaje de células positivas para fluorescencia con respecto al control de células sin tratar (b). Estos valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*  $p < 0,05$  vs células no tratadas, \*\*  $p < 0,01$  vs células no tratadas).

### II.1.3 Despolarización de la membrana mitocondrial

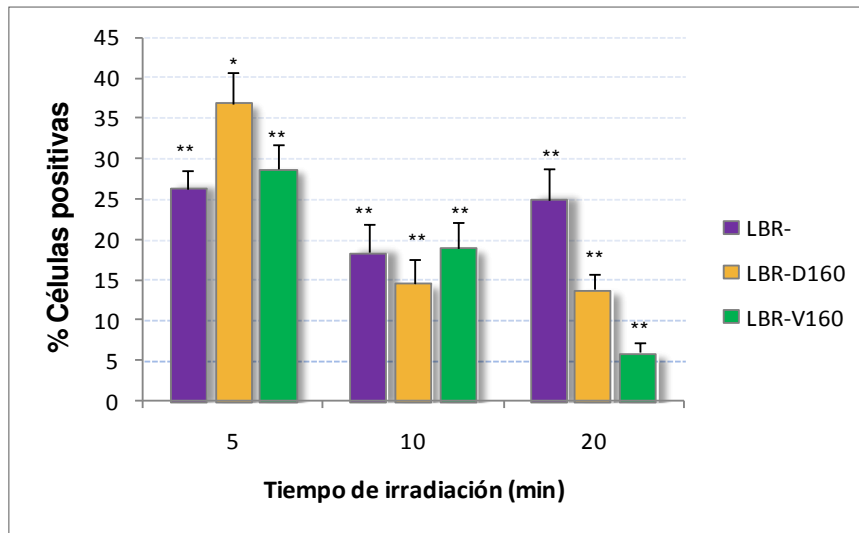
Teniendo en cuenta que la síntesis de PpIX se desarrolla en el espacio intermembrana de la mitocondria, y que previamente se demostró la acumulación mitocondrial de esta molécula, se esperarían cambios en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) al tratar a las células con la TFD-ALA. En el proceso de muerte celular por apoptosis, la pérdida de funcionalidad mitocondrial se relaciona con la permeabilización de la membrana externa a iones y moléculas de gran tamaño necesarios para que ocurra la apoptosis (Antonsson, 2004). La pérdida del PMM se produce como consecuencia del colapso en el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial, proceso que también es responsable de una completa reducción de O<sub>2</sub>, ocasionando un incremento en la producción de ROS (Paz et al., 2008). De esta manera la pérdida del PMM resulta un indicador temprano en la iniciación de la apoptosis celular y del estrés oxidativo asociado a ésta.

El reactivo lipofílico DiOC<sub>6</sub> se utiliza habitualmente para monitorear cambios en el PMM o en el potencial de membrana plasmática. Cuando se usa a bajas concentraciones (orden nM) mide cambios en el PMM y a concentraciones mayores (orden µM) puede ser útil para teñir al retículo endoplasmático (Paz et al., 2008). La despolarización de la membrana mitocondrial se traduce en una disminución en la intensidad de fluorescencia roja, y esta intensidad es detectada mediante un citómetro de flujo.

En las tres líneas celulares estudiadas se detectó un efecto de la TFD-ALA sobre el PMM dependiente del tiempo de irradiación. En la Fig. II.3 se observa que el PMM disminuyó hasta un 26,3% en la línea LBR-, un 28,7% en la línea LBR-V160 y un 36,9% en la línea LBR-D160 cuando se utilizó un tiempo de irradiación de 5 minutos. A diferencia de lo que ocurrió en la línea sensible, en las líneas resistentes se observaron cambios en el nivel de despolarización cuando el tiempo de irradiación se incrementó hasta 20 minutos. La línea LBR-V160 presentó el mayor nivel de despolarización a los 20 minutos de irradiación. En la línea sensible LBR- no se detectaron modificaciones significativas en el PMM en las condiciones estudiadas.



La pérdida de PMM luego de la TFD refleja una consecuencia directa del fotodaño mitocondrial. Estos resultados son consistentes con numerosos trabajos en los que se describen a las mitocondrias como iniciadoras de la respuesta apoptótica inducida tanto por la TFD, como por otros estímulos (Liu, 1996; Kessel, 2006; Dewson & Kluck, 2009).



**Fig. II.3.** Potencial de membrana mitocondrial (PMM) en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células fueron tratadas con TFD-ALA durante distintos tiempos de irradiación y 1 h después se realizaron los estudios de PMM, como se indica en M&M. En los histogramas obtenidos mediante citometría de flujo se observa la intensidad de fluorescencia roja del DiOC<sub>6</sub> para cada tratamiento (a). Las barras indican el porcentaje de células positivas para fluorescencia con respecto al control de células sin tratar, consideradas como valor 100% de fluorescencia (b). Estos valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*  $p < 0,05$  vs células no tratadas, \*\*  $p < 0,01$  vs células no tratadas).

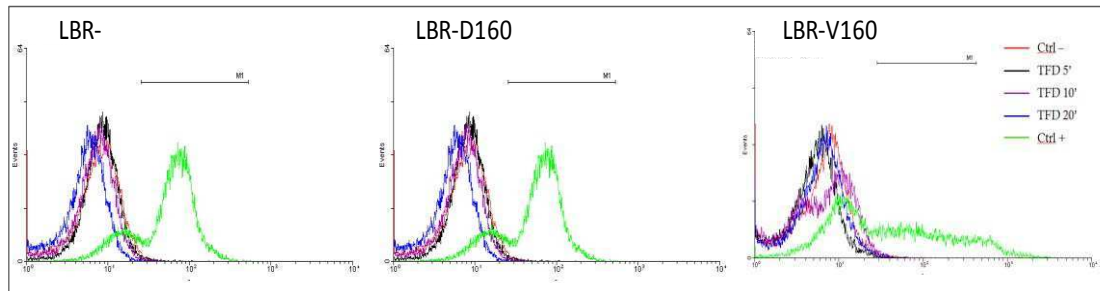
#### II.1.4 Producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se considera una molécula tan reactiva en comparación con otras ROS, sin embargo, tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas, y además promueve la formación de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y •OH, moléculas que sí presentan una alta reactividad (Torres, 2002).

En nuestro trabajo se evaluó la producción de ROS, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando el reactivo H<sub>2</sub>DCF-DA, que al ser oxidado se vuelve fluorescente, y su intensidad puede medirse mediante citometría de flujo. Este reactivo también puede ser oxidado por radicales peroxilo y en parte por •OH, por lo cual no es específico para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y por ese motivo muchas veces se lo considera un marcador general de estrés oxidativo (Setsukinai et al., 2003). El control positivo se realizó utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal como se describe en M&M. La Fig. II.4. muestra que en ninguna de las tres líneas celulares se evidenció un aumento en la intensidad de fluorescencia. Tampoco se hallaron diferencias al realizar las mediciones inmediatamente, a 2 y 3 h post-TFD (datos no mostrados), indicando que bajo las condiciones experimentales estudiadas no se logró detectar la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Estos resultados discrepan con los hallados por otros autores, que reportaron un aumento en la producción de ROS inducido por la TFD, utilizando diversos FS y tipos celulares (Lam et al., 2001; Matroule et al., 2001; Kolarova et al., 2008; Price et al., 2009). El hecho de no detectar la presencia de ROS, especialmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podría atribuirse a que esta molécula se produce principalmente en retículo endoplasmático y peroxisomas (Thanickal et al., 2000), a diferencia del O<sub>2</sub><sup>-</sup> que se produce primordialmente en la mitocondria. Como previamente se demostró, la PpIX se localiza en mitocondrias, por lo cual es de esperar que las moléculas implicadas en el daño oxidativo sean las que allí se producen, como el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

No obstante, debe considerarse que si bien el reactivo H<sub>2</sub>DCF-DA es ampliamente utilizado para medir ROS en distintos tipos celulares, presenta el inconveniente de difundir al medio extracelular rápidamente y de ser extremadamente sensible a la luz (Royal et al., 1993; Haugland, 1996), lo que podría explicar por qué en nuestro caso, en las condiciones experimentales utilizadas, no llegó a detectarse esta especie reactiva.



**Fig. II.4.** Producción de  $H_2O_2$  en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células fueron tratadas con TFD-ALA durante distintos tiempos de irradiación y 1 h después se realizaron los estudios con  $H_2DCFDA$ , como se indica en M&M En los histogramas obtenidos mediante citometría de flujo se observa la intensidad de fluorescencia verde de  $H_2DCF-DA$  para cada tratamiento.

## II.2. Evaluación indirecta del estrés oxidativo utilizando secuestrantes de ROS

El efecto citoprotector de ciertos secuestrantes de radicales libres brinda la posibilidad de proteger a las organelas del daño generado por la TFD (Perotti et al., 2002).

En nuestro caso, investigamos el efecto protector del ascorbato (ASC), manitol (MAN), glutatión reducido (GSH) y triptofano (TRP) en las tres líneas celulares tratadas con TFD-ALA. En primer lugar, se evaluó la toxicidad de cada uno de estos compuestos (Fig. II.5 a, b, c y d). Luego se determinó el posible efecto protector frente a la TFD utilizando las dos concentraciones mayores de cada uno de ellos que no resultaron tóxicas para las células, procediendo tal como se detalla en M&M. Cabe destacar que ninguno de los compuestos mostró una acción fotoactiva en ausencia de ALA.

El ascorbato tuvo un fuerte efecto protector en las tres líneas celulares, en las dos concentraciones utilizadas, 0,5 y 1 mM. La mayor acción se evidenció en las líneas resistentes LBR-V160 y LBR-D160, al ser irradiadas durante 10 minutos (Fig. II.6, a).

A diferencia de lo hallado por Perotti et al. (2002), en estas líneas celulares, no hubo citoprotección por parte del TRP utilizado en las concentraciones 0,5 y 1 mM. Tampoco se observaron diferencias significativas cuando se utilizó manitol 10 y 20 mM (Fig. II.6 b y d).

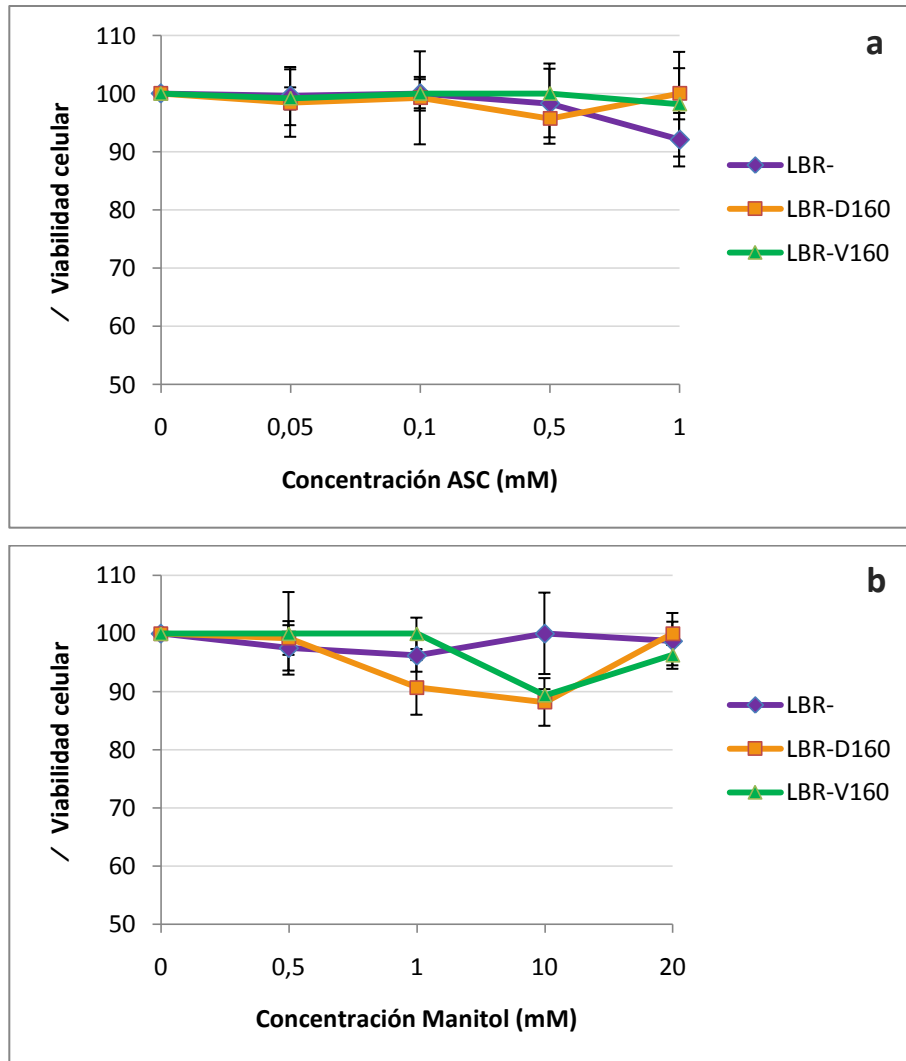
Teniendo en cuenta que manitol es un conocido agente secuestrante del radical hidroxilo y que no ejerció protección en las líneas celulares estudiadas, probablemente esta especie reactiva no se produzca en cantidades significativas como producto de la TFD-ALA, al menos en las condiciones ensayadas. Además, apoyando esta idea, tampoco se evidenció oxidación de H<sub>2</sub>DCF-DA, que en parte es oxidada por radical hidroxilo.

El GSH mostró un efecto citoprotector en las tres líneas, al ser utilizado en concentraciones 10 y 20 mM. En la concentración 10 mM produjo su mayor acción, que fue similar en las tres líneas (Fig. II.6 d). Este resultado concuerda con la producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub><sup>-</sup> descrita previamente, ya que el GSH es un conocido agente secuestrante de estas especies reactivas (Evans et al., 1997).

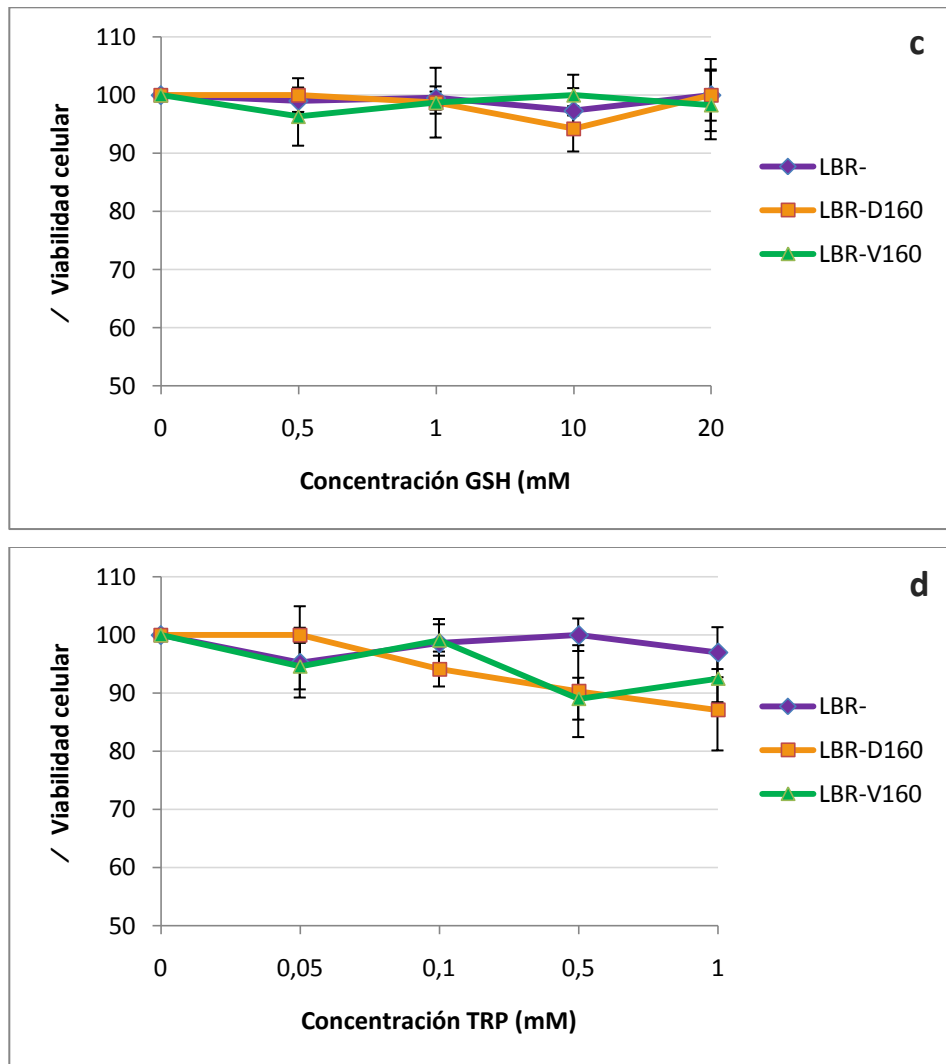
Con el fin de estudiar en forma comparativa el efecto de estos compuestos se determinó el grado de protección (GP) como la relación entre la supervivencia luego de la TFD-ALA

en presencia del compuesto y la supervivencia luego de la TFD-ALA en ausencia del mismo.

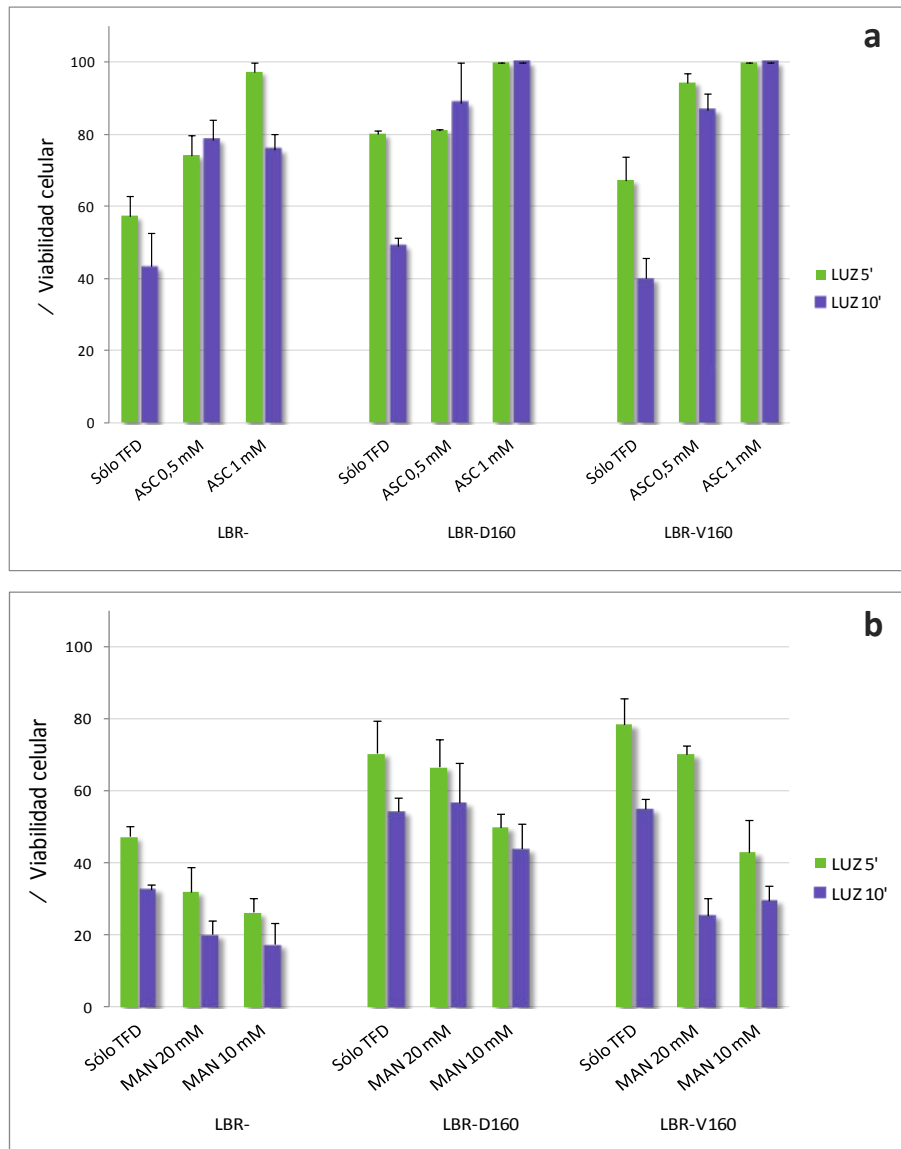
Si bien en líneas generales se observó un mayor GP cuando se utilizó ascorbato, el valor más alto de GP se obtuvo para GSH (GP= 2,7 a 10 mM, irradiación 10 minutos, en la línea LBR-D160) (Tablas II.1 y 2).



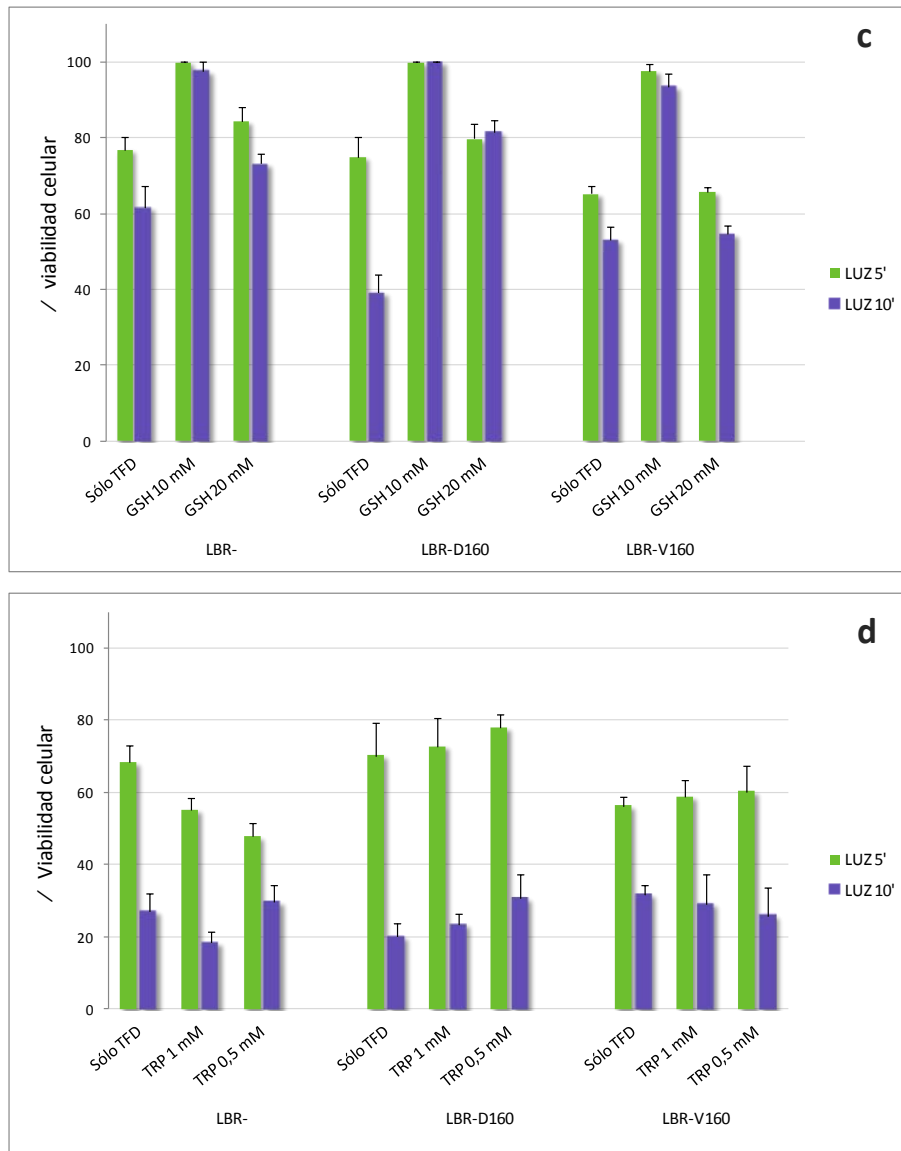
**Fig. II.5.** Evaluación de la toxicidad celular de ASC (a) y MAN (b) en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células se incubaron durante 5 horas con distintas concentraciones de los compuestos y luego se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. II.5.** Evaluación de la toxicidad celular de GSH (c) y TRP (d) en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células se incubaron durante 5hs con distintas concentraciones de los compuestos y luego se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. II.6.** Efecto del ASC (a) y el MAN (b) sobre la viabilidad celular en las líneas LBR-, LBR-D160 y LBR-V160 tratadas con TFD-ALA (irradiación 5 y 10 min). La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. II.6.** Efecto del GSH (c) y el TRP (d) sobre la viabilidad celular en las líneas LBR-, LBR-D160 y LBR-V160 tratadas con TFD-ALA (irradiación 5 y 10 min) y a la TFD. La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Tabla II.1.** Grados de protección (GP) para las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160 utilizando dos concentraciones de ASC (a) y GSH (b) y dos tiempos de irradiación en la TFD: 5 y 10 min. Las células fueron incubadas con los agentes secuestrantes y tratadas con ALA-TFD a las las concentraciones y tiempos indicados, luego se determinó la viabilidad mediante el ensayo de MTT y se calcularon los GP según se indica en M&M.

a)

Línea celular	[ASC]	LUZ 5'	LUZ 10'
LBR-	0,5 mM	1,16	2,32
	1 mM	1,52	2,3
LBR-D160	0,5 mM	1,38	1,89
	1 mM	2,06	2,17
LBR-V160	0,5 mM	1,43	1,69
	1 mM	1,51	2,53

b)

Línea celular	[GSH]	LUZ 5'	LUZ 10'
LBR-	10 mM	1,3	1,62
	20 mM	1,1	1,19
LBR-D160	10 mM	1,35	2,7
	20 mM	1,07	2,2
LBR-V160	10 mM	1,5	1,76
	20 mM	1,01	1,03

### Conclusiones

- Se demostró el daño mitocondrial inducido por la TFD-ALA en las tres líneas celulares mediante el aumento en la producción de  $^1\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ , ambas moléculas producidas fundamentalmente en la mitocondria.
- En comparación con las líneas resistentes a drogas, la línea sensible LBR-, produjo mayores niveles de  $\text{O}_2^-$ , sugiriendo un rol fundamental de esta molécula en la muerte inducida por la TFD-ALA.
- Se demostró la pérdida del PMM en las tres líneas celulares, dependiente del tiempo de irradiación en las líneas resistentes a drogas, apoyando la idea de que las mitocondrias juegan un papel primordial en el daño ocasionado por la TFD.
- No se evidenció producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ninguna de las condiciones ensayadas.
- La utilización de compuestos secuestrantes demostró un efecto protector del ASC y el GSH contra el daño oxidativo ocasionado por la TFD-ALA.

---

## Bibliografía

Antonsson B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 256/257:141–55.

Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J. Cell Sci.* 2009; 122(Pt 16):2801-8.

Evans PJ, Whiteman M, Tredger JM, Halliwell B. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23(7):1002-8.

Gilaberte Y, Pereboom D, Carapeto FJ, Alda JO. Flow cytometry study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1997; 13(1-2):43-9.

Hadjur C, Wagnières G, Ihringer F, Monnier P, van den Bergh H. Production of the free radicals O<sub>2</sub><sup>-</sup> and .OH by irradiation of the photosensitizer zinc(II) phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1997; 38(2-3):196-202.

Haugland RP. En: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6ta ed., Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA. 1996. p. 491–93.

Kessel D. Death pathways associated with photodynamic therapy. *Med. Laser Appl.* 2006; 21(4):219-24.

Kolarova H, Nevrelouva P, Tomankova K, Kolar P, Bajgar R, Mosinger J. Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizers. *Gen. Physiol. Biophys.* 2008; 27(2):101-5.

Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J. Biol. Chem.* 2001; 14;276(50):47379-86.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996; 86(1):147-57.

Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 1995; 77(3):147-61.

Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, Jolois O, Hunt DW, Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene.* 2001; 20(30):4070-84.

Paz ML, González Maglio DH, Weill FS, Bustamante J and Leoni J. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2008; 24(3):115-122.

Perotti C, Casas A, Batlle A. Scavengers protection of cells against ALA-based photodynamic therapy-induced damage. *Lasers Med. Sci.* 2002; 17(4):222-9.

Price M, Reiners JJ, Santiago AM, Kessel D. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 2009; 85(5):1177-81.

Price M, Terlecky SR, Kessel D. A role for hydrogen peroxide in the pro-apoptotic effects of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 2009; 85(6):1491-6.

Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 302(2):348-55.

Salet C, Moreno G, Ricchelli F. Effects of Photofrin photodynamic action on mitochondrial respiration and superoxide radical generation. *Free Radic. Res.* 1997; 26(3):201-8.

Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(5):3170-5.

Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 2000; 319:376-400.

Sun D, Zhang S, Wei Y, Yin L. Antioxidant activity of mangostin in cell-free system and its effect on K562 leukemia cell line in photodynamic therapy. *Acta Biochem. Biophys. Sin (Shanghai).* 2009; 41(12):1033-43.

Tang PM, Zhang DM, Xuan NH, Tsui SK, Waye MM, Kong SK, Fong WP, Fung KP. Photodynamic therapy inhibits P-glycoprotein mediated multidrug resistance via JNK activation in human hepatocellular carcinoma using the photosensitizer pheophorbide a. *Mol. Cancer.* 2009; 8:56.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279(6):L1005-28.

Torres WH. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mens. Bioquim.* 2002; 26: 19-53.

### III. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LA TFD-ALA

#### III.1. Estudios de microscopía de fluorescencia

Dado que los mecanismos de muerte, especialmente la apoptosis, involucran sistemas variados y complejos, el estudio de los mismos fue abordado a través de diferentes técnicas que permiten analizar distintas etapas del proceso.

Con el fin de determinar los cambios morfológicos inducidos por la TFD se utilizó la técnica de tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE) y se evaluó la morfología celular a distintos tiempos post-TFD mediante microscopía de fluorescencia, tal como se detalla en M&M.

En las tres líneas estudiadas se observó el desarrollo de una morfología apoptótica, que se incrementó en función del tiempo de iluminación (Fig. III.1, 2 y 3). Estos cambios morfológicos involucraron la condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos inicialmente sin ruptura de la membrana plasmática y una disminución del tamaño celular. En todos los casos la inducción de necrosis fue muy baja, no sobrepasando el 10%, indicando que el principal mecanismo de muerte asociado a la TFD-ALA en las líneas estudiadas sería la apoptosis.

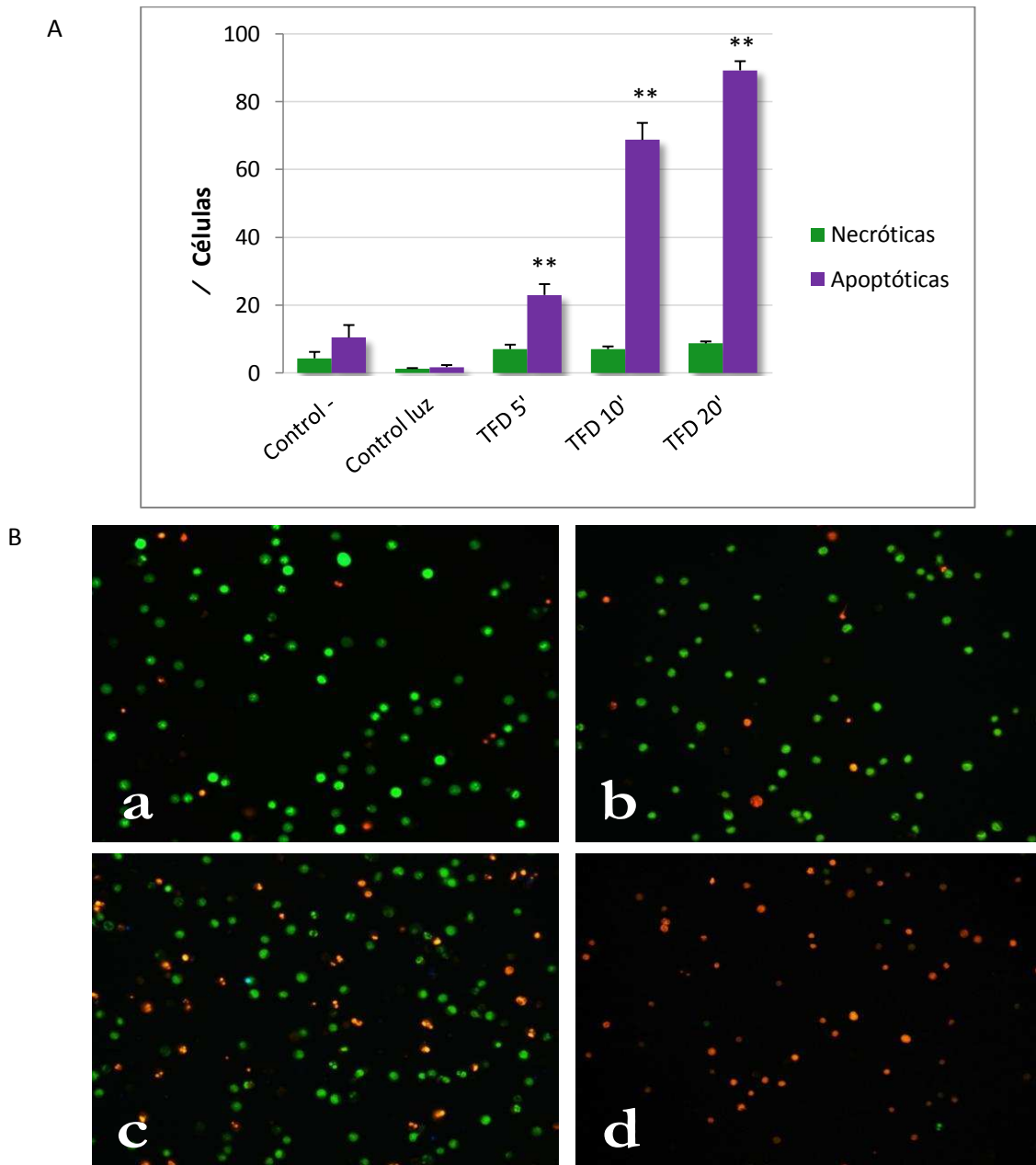
En la línea LBR-D160 la inducción de apoptosis fue más rápida que en las líneas LBR- y LBR-V160, lo cual podría deberse a la mayor acumulación intracelular de PpIX que se evidenció en esta línea a las 4 h de incubación con ALA (capítulo I).

La línea LBR-V160 mostró menores niveles de apoptosis, demostrando una mayor resistencia a la TFD con respecto a las otras líneas. Mientras que a los 20 min de irradiación las células de las líneas LBR- y LBR-D160 presentaron niveles de apoptosis cercanos al 90%, en la línea LBR-V160 estos niveles no superaron el 50%.

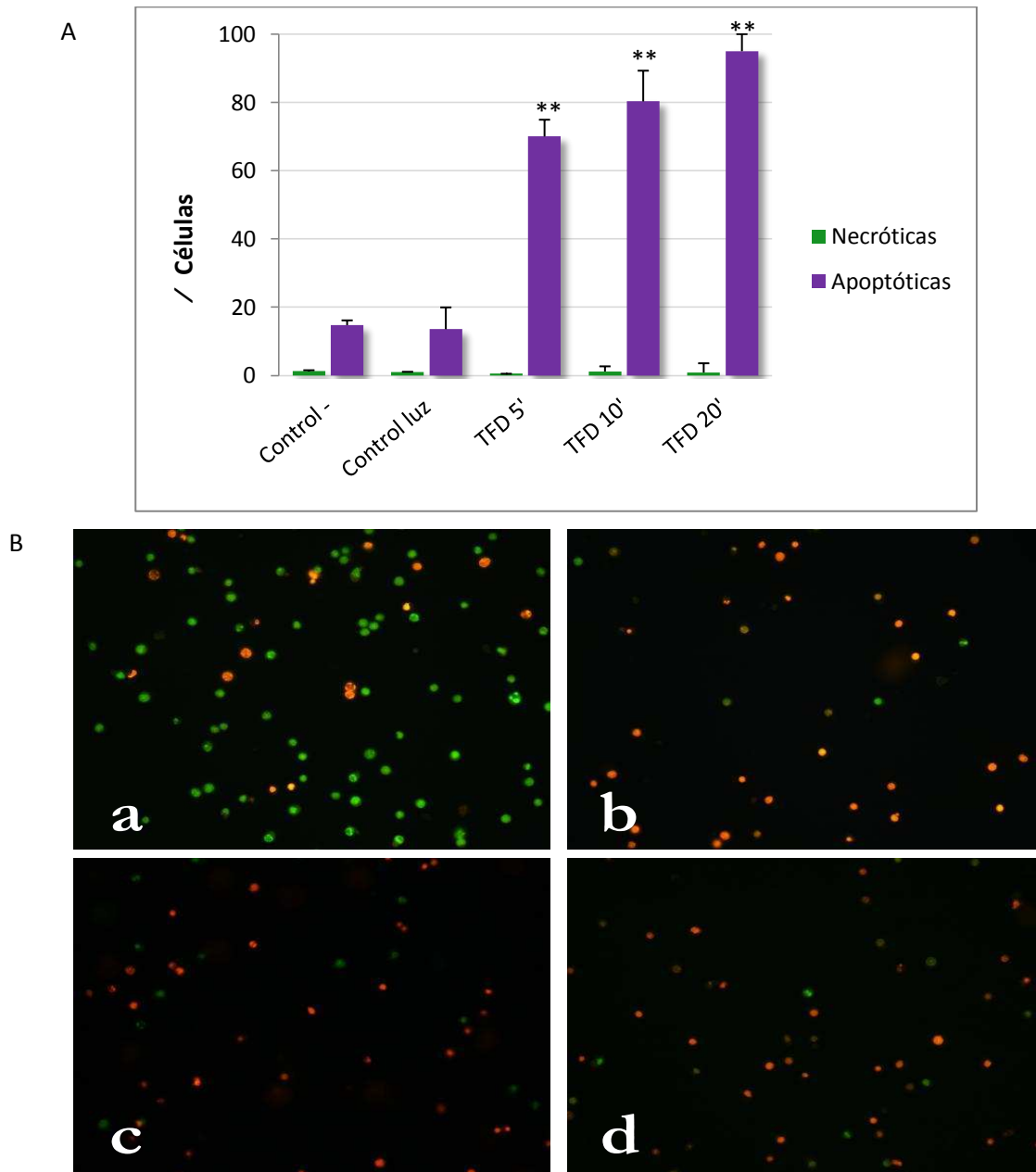
En la Fig. III.4 se puede observar un aumento general en los niveles de apoptosis a medida que aumentan los tiempos post-TFD, especialmente a tiempos cortos de irradiación (5 y 10 min). Este aumento en la apoptosis se produjo de manera más gradual en la línea LBR-

V160, apoyando nuestra hipótesis de que estas células exhiben una mayor resistencia a la TFD. A las 3 h posteriores a la terapia se observó un mayor índice de apoptosis en las células iluminadas durante 10 min.

La respuesta de tipo apoptótica inducida por el tratamiento con la TFD-ALA está de acuerdo con los resultados hallados por otros autores en diversos modelos experimentales (Buytaert et al., 2007) y resulta sumamente favorable, ya que este tipo de muerte, además de destruir a las células malignas, no provoca reacciones inflamatorias.

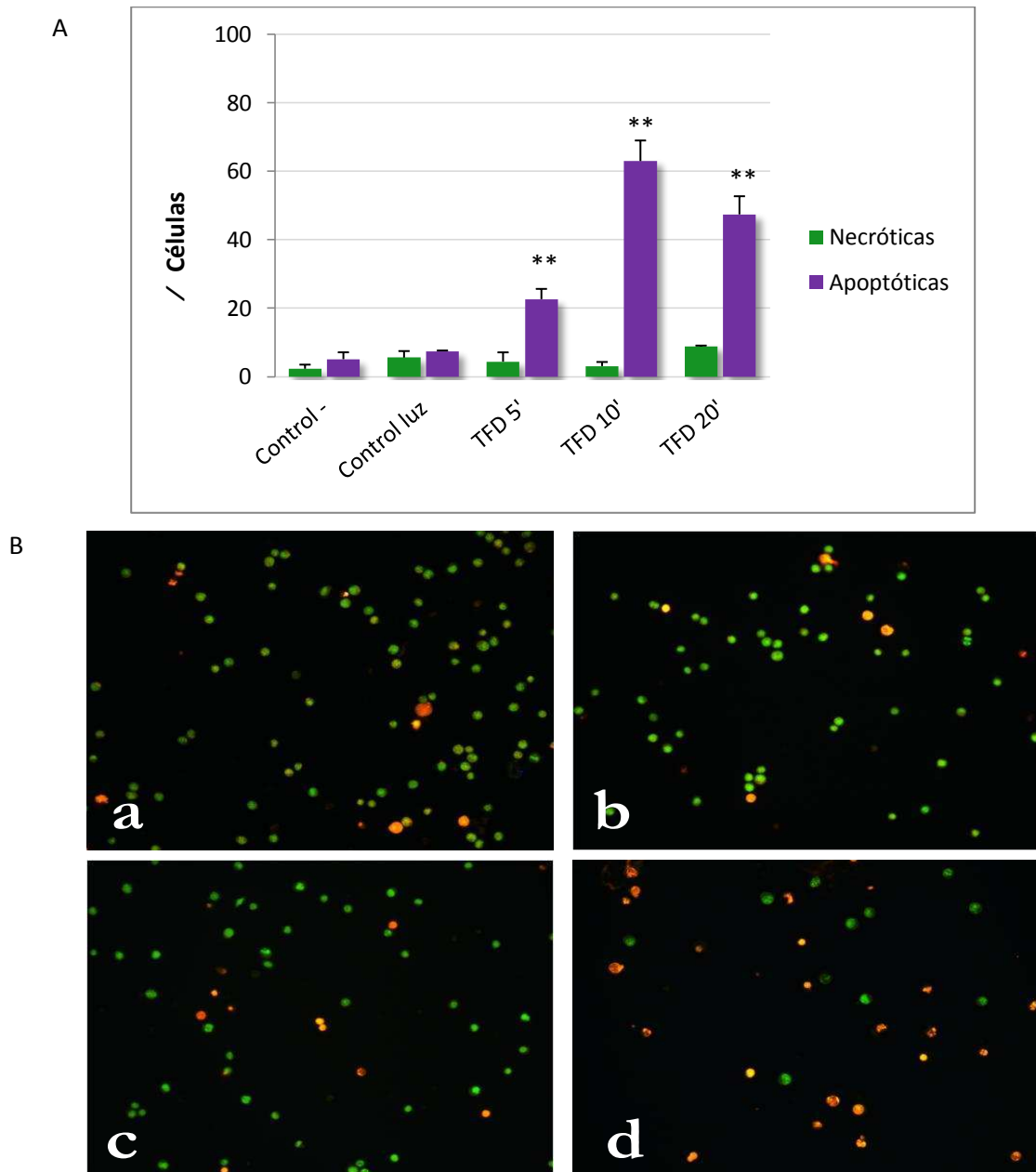


**Fig. III.1.** Inducción de apoptosis y necrosis en la línea LBR-. Las células se trataron con TFD-ALA utilizando distintos tiempos de iluminación. Luego de 1 h se realizaron las tinciones con NA/BE y se observaron bajo microscopía de fluorescencia. El control negativo representa a las células sin tratar con TFD-ALA y el control de luz a las células que sólo recibieron irradiación durante 20 min. El gráfico muestra el porcentaje de células apoptóticas y necróticas con respecto al total de células (A). Las fotografías (B) se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia (objetivo 40X) y muestran la morfología celular para el control negativo (a), TFD utilizando 5 min (b), 10 min (c), y 20 min (d) de iluminación. Los valores del gráfico representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*\*  $p < 0,01$  vs control luz).

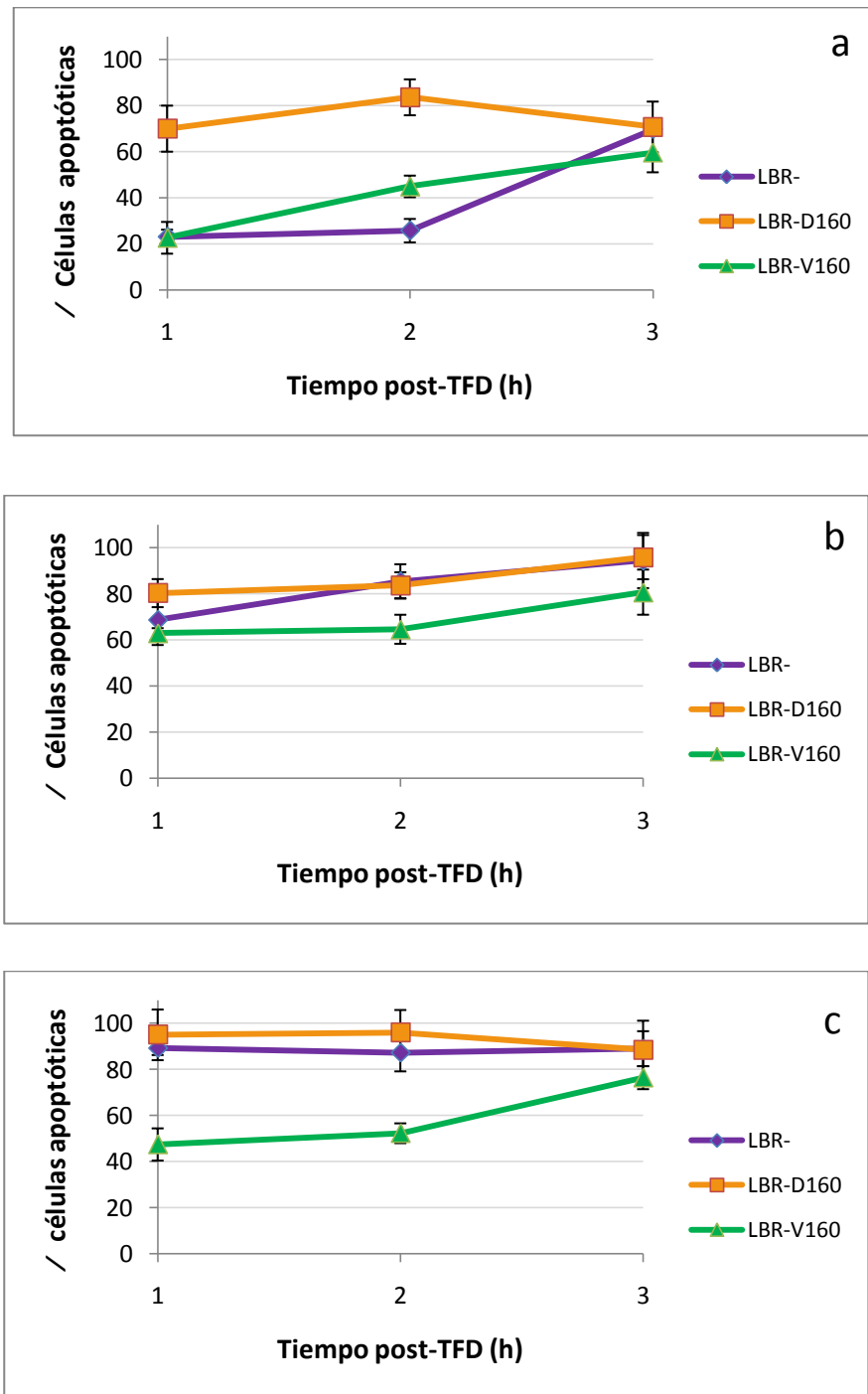


**Fig. III.2.** Inducción de apoptosis y necrosis en la línea LBR-D160. Las células se trataron con TFD-ALA utilizando distintos tiempos de iluminación. Luego de 1 h se realizaron las tinciones con NA/BE y se observaron bajo microscopía de fluorescencia. El control negativo representa a las células sin tratar con TFD-ALA y el control de luz a las células que sólo recibieron irradiación durante 20 min. El gráfico muestra el porcentaje de células apoptóticas y necróticas con respecto al total de células (A). Las fotografías (B) se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia (objetivo 40X) y muestran la morfología celular para el control negativo (a), TFD utilizando 5 min (b), 10 min (c), y 20 min (d) de irradiación. Los valores del gráfico representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*\*  $p < 0,01$  vs control luz).





**Fig. III.3.** Inducción de apoptosis y necrosis en la línea LBR-V160. Las células se trataron con TFD-ALA utilizando distintos tiempos de iluminación. Luego de 1 h se realizaron las tinciones con NA/BE y se observaron bajo microscopía de fluorescencia. El control negativo representa a las células sin tratar con TFD-ALA y el control de luz a las células que sólo recibieron irradiación durante 20 min. El gráfico muestra el porcentaje de células apoptóticas y necróticas con respecto al total de células (A). Las fotografías (B) se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia (objetivo 40X) y muestran la morfología celular para el control negativo (a), TFD utilizando 5 min (b), 10 min (c), y 20 min (d) de irradiación. Los valores del gráfico representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*\*  $p < 0,01$  vs control luz).



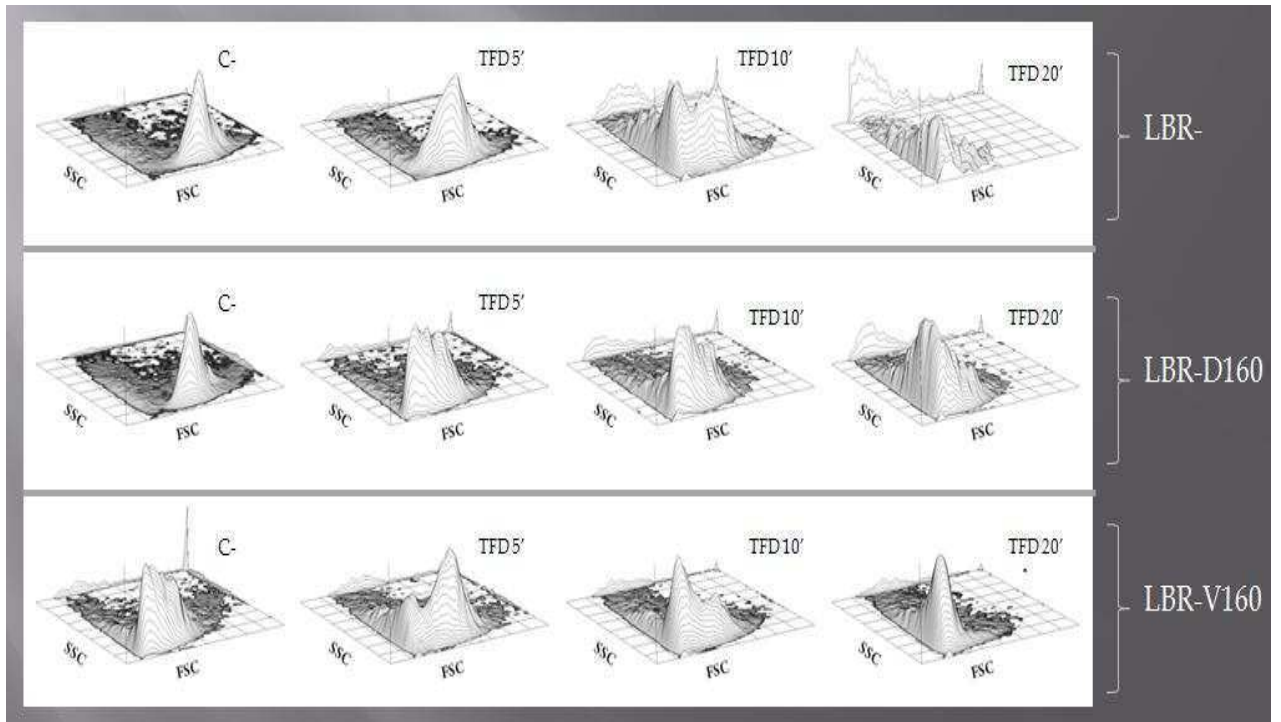
**Fig. III.4.** Inducción de apoptosis y necrosis determinada mediante la tinción con NA/BE y microscopía de fluorescencia, a distintos tiempos post-TFD, utilizando 5 min (a), 10 min (b), y 20 min (c) de irradiación, en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

### **III.2. Estudio de la morfología celular mediante el análisis de la dispersión lumínica, utilizando citometría de flujo**

La disminución del tamaño celular y la formación de cuerpos apoptóticos son dos características fundamentales de la apoptosis, y producen cambios notorios en la dispersión de la luz cuando las células son atravesadas por un haz lumínico. Utilizando citometría de flujo, es posible diferenciar a las células apoptóticas por una disminución en la intensidad del parámetro FSC (forward light scatter) y un aumento en SSC (side light scatter), indicativos de una disminución del tamaño celular y un aumento en la granularidad debida a la formación de cuerpos apoptóticos, respectivamente (Luksiene et al., 2001). Esta propiedad resulta de utilidad para monitorear los cambios morfológicos en las células como consecuencia de la TFD.

En las tres líneas celulares se observó un aumento en la morfología apoptótica a medida que aumentó el tiempo de irradiación, evidenciada por un aumento en SSC y una disminución en FSC. La línea sensible a drogas, LBR-, resultó ser la más afectada por la TFD, especialmente a los 20 min de irradiación (Fig. III.5).

Utilizando la línea celular leucémica K562, se reportó un aumento de la intensidad de FSC como respuesta temprana a la TFD-ALA y en etapas más avanzadas observaron una disminución en la intensidad de este parámetro (Kuzelová et al., 2004). A diferencia de esos resultados, en el presente trabajo la disminución en FSC se observa ya a una hora post-TFD, demostrando el desarrollo de una morfología apoptótica en etapas tempranas luego de la terapia.



**Fig. III.5.** Gráficos en 3D obtenidos mediante el análisis de los resultados de citometría de flujo, una hora post-TFD, en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Se muestran los parámetros SSC y FSC para el control negativo, correspondiente a las células sin tratar y las células tratadas con TFD, utilizando distintos tiempos de iluminación (5, 10 y 20 min).

### III.3. Análisis de la externalización de fosfatidilserina mediante citometría de flujo

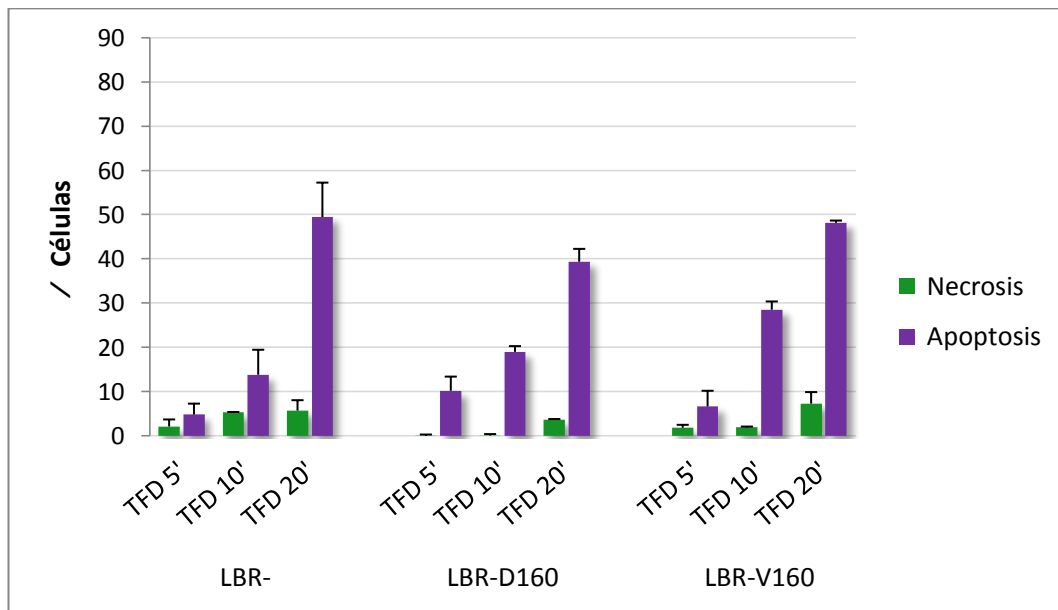
Uno de los parámetros bioquímicos que caracterizan a la apoptosis es la oxidación y externalización de los residuos de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática, pudiendo de esta manera unirse específicamente a células fagocíticas (Fruhirth et al., 2008). Algunos conjugados fluorescentes, como Annexin V-FITC, son proteínas de alta afinidad selectiva por la fosfatidilserina, por lo cual se pueden utilizar para determinar si las células están sufriendo un proceso apoptótico. Debido a que Annexin V-FITC puede unirse también a células necróticas por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, suele utilizarse también IP, un marcador específico de necrosis, para establecer la diferencia entre apoptosis y necrosis, tal como se detalla en M&M.

Con este propósito, las células se sometieron a la TFD-ALA, luego se tiñieron con Annexin V-FITC e IP y se analizaron mediante citometría de flujo.

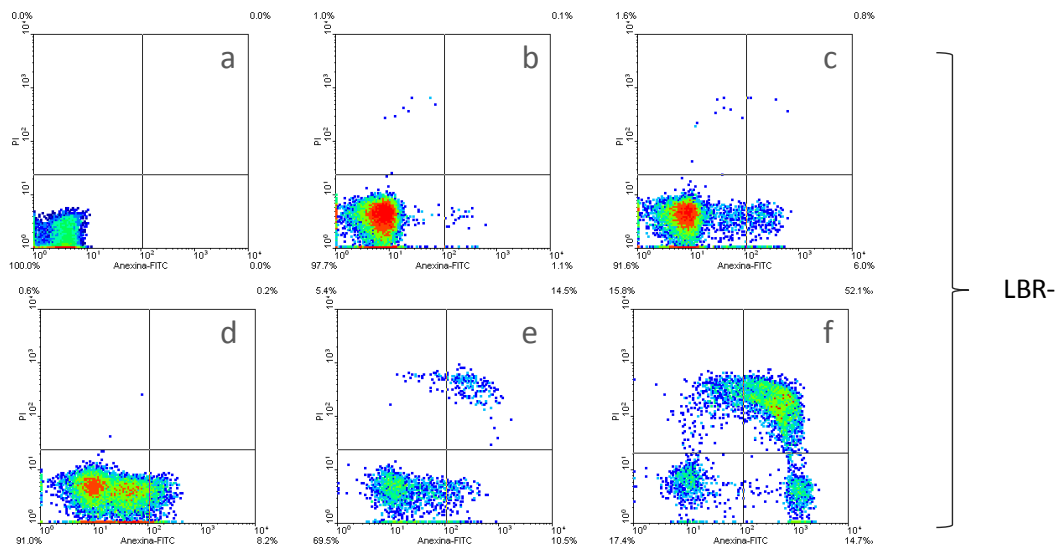
En concordancia con los resultados morfológicos previos, en las tres líneas celulares se observó un incremento en la morfología apoptótica dependiente del tiempo de irradiación (Fig. III.6, 7 y 8). A tiempos cortos de irradiación la proporción de células necróticas es baja, indicando la escasa participación de este mecanismo en la muerte inducida por la TFD; sin embargo, el porcentaje de células positivas sólo para IP aumenta cuando se utilizan 20 min de irradiación. Esta fracción celular corresponde en gran medida a células en apoptosis tardía, ya que la mayoría de ellas también son positivas para Annexin V-FITC.

Se encuentra ampliamente reportado que los FSs que se acumulan preferentemente en mitocondrias predisponen a una muerte celular por apoptosis, mientras que los que se acumulan en la membrana plasmática o en lisosomas pueden bloquear el mecanismo de apoptosis, predisponiendo a las células a una muerte por necrosis (Kessel et al., 1997). Además, apoyando esta evidencia, Kriska demostró que la apoptosis es la forma de muerte celular predominante cuando existe acumulación mitocondrial de PpIX, mientras que la necrosis se convierte en el principal mecanismo de muerte cuando la porfirina se relocaliza en otros targets celulares (Kriska et al., 2005).

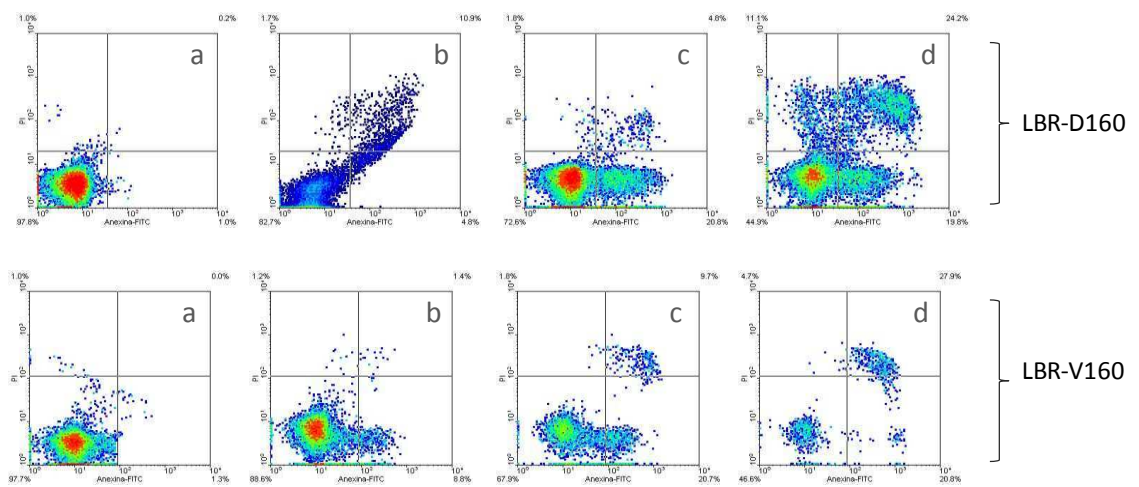
Los resultados tanto morfológicos como bioquímicos obtenidos en el presente trabajo resultan consistentes con esas evidencias, ya que se observó una localización intracelular de PpIX principalmente en mitocondrias, y un fuerte predominio de apoptosis como mecanismo de muerte celular inducido por la TFD-ALA.



**Fig. III.6.** Inducción de apoptosis y necrosis en las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las células fueron tratadas con TFD-ALA aplicando distintos tiempos de irradiación; 1 h después, se realizaron las tinciones con Annexin V-FITC e IP, y se hicieron las mediciones en citometría de flujo. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. III.7.** Análisis de citometría de flujo para la tinción con Annexin V-FITC e IP en la línea LBR-, una hora post-TFD. Los gráficos muestran el control de autofluorescencia (a), control negativo(b), control positivo (c), TFD utilizando 5 min (d), 10 min (e), y 20 min (f) de irradiación.



**Fig. III.8.** Análisis de citometría de flujo para la tinción con Annexin V-FITC e IP en las líneas LBR-D160 y LBR-V160, una hora post-TFD. Los gráficos muestran el control negativo (a), TFD utilizando 5 min (b), 10 min (c), y 20 min (d) de irradiación.

#### **III.4. Rol de las mitocondrias en la muerte celular inducida por la TFD-ALA**

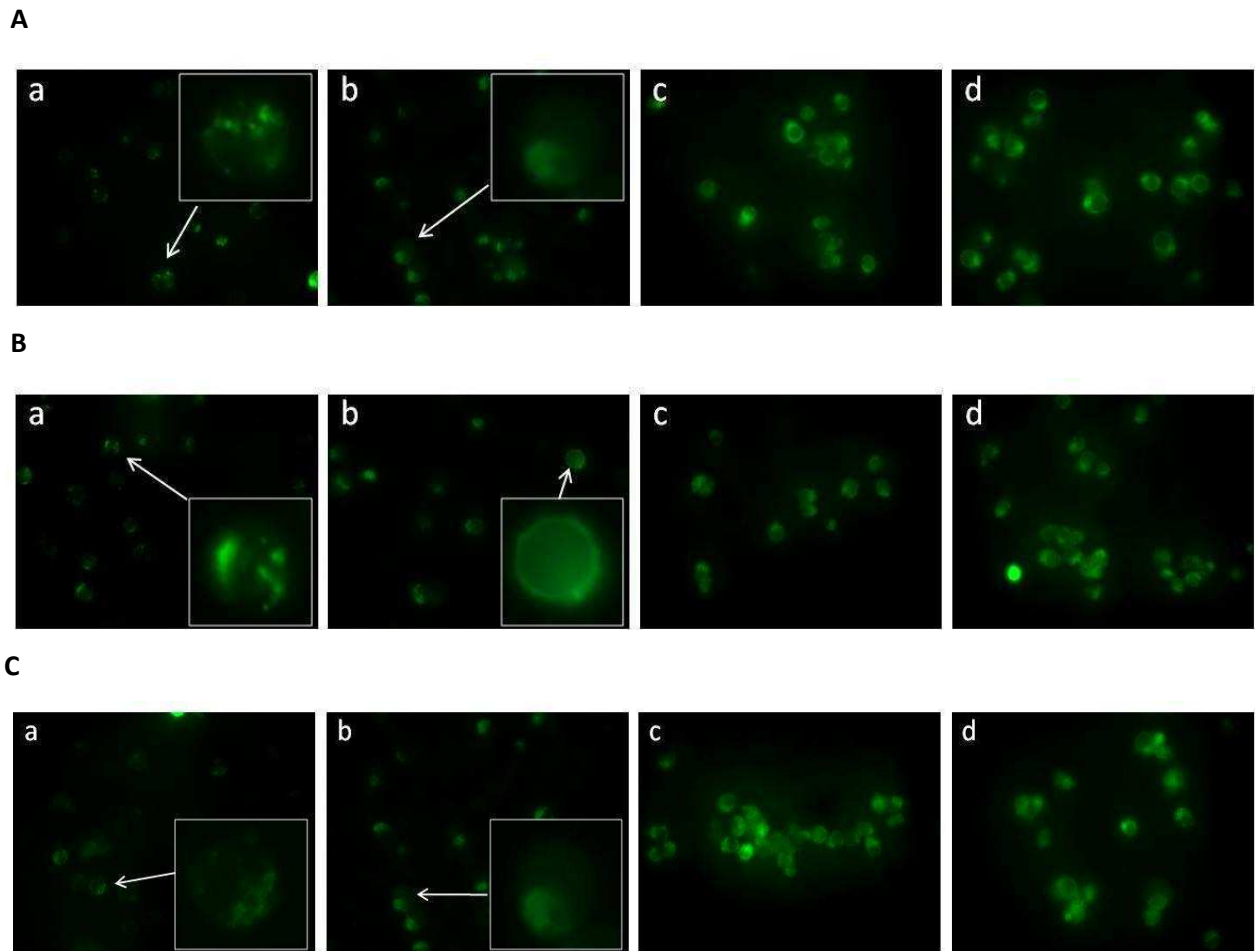
Se considera que las mitocondrias constituyen el sitio de localización del FS más eficiente para la TFD y ejercen un rol importante en la apoptosis, actuando como mediadoras entre la activación y la ejecución de este proceso (Matroule et al., 2001). Una gran variedad de eventos relacionados con la apoptosis involucran a las mitocondrias: la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo c, cambios en el transporte de electrones, pérdida del potencial transmembrana y un estado oxidativo alterado.

En este trabajo hemos demostrado la localización de la PpIX en mitocondrias, la despolarización de la membrana mitocondrial y la predominancia de la apoptosis como mecanismo de muerte celular inducidos por la TFD-ALA en las líneas celulares estudiadas, indicando que las mitocondrias ejercen un rol fundamental en los efectos deletéreos ocasionados por esta terapia.

Con el fin de evaluar en forma cualitativa los cambios mitocondriales asociados a la TFD-ALA, se utilizó la tinción con Mito Tracker Green tal como se detalla en M&M. Este compuesto ingresa a la mitocondria por difusión pasiva, acumulándose allí cuando la organela está activa y difundiendo al citosol cuando se producen cambios en el PMM.

En las tres líneas estudiadas se observó el patrón puntillado característico de las mitocondrias intactas en las células no tratadas, y la pérdida del mismo cuando las células fueron sometidas a la TFD (Fig. III.9). La liberación de la marca al citosol se pudo observar ya a los 5 min de irradiación y no varió notoriamente a medida que aumentó el tiempo de irradiación en la TFD, sugiriendo un fenómeno del tipo “todo o nada”.





**Fig. III.9.** *Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el reactivo fluorescente específico para mitocondrias, Mito-Tracker Green (objetivo 40X). Las muestras se analizaron 1 h post-TFD, utilizando distintos tiempos de irradiación, en las líneas LBR- (A), LBR-D160 (B) y LBR-V160. Se observan: las células sin tratar (a), TFD utilizando 5 min (b), 10 min (c), y 20 min (d) de irradiación. Las ampliaciones en los recuadros corresponden a las células indicadas por la flecha.*

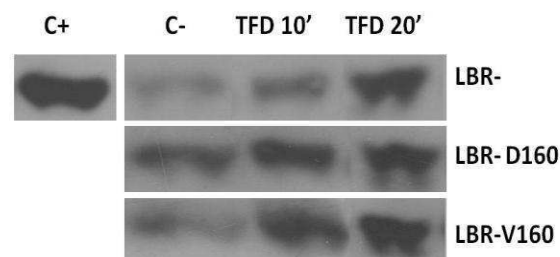
### III.5. Liberación de citocromo c en respuesta a la TFD-ALA

En diversos modelos experimentales se ha observado que la permeabilización de la membrana mitocondrial causada por la TFD permite la liberación de citocromo c desde el interior de la mitocondria hacia el citosol, constituyendo uno de los eventos tempranos más representativos del proceso apoptótico (Oleinick et al., 2002; Agostinis et al., 2004).

En nuestras líneas celulares se midió la liberación de citocromo c a la fracción citosólica mediante la técnica de Western Blot, utilizando citocromo c como control positivo. Se observó un aumento en la liberación del mismo cuando las células fueron sometidas a la TFD-ALA (Fig. III.10). Si bien no se hallaron diferencias significativas entre las tres líneas, en la línea LBR- la expresión de citocromo c aumentó de acuerdo al tiempo de irradiación utilizado en la TFD.

El aumento en la expresión de citocromo c en la fracción citosólica concuerda con el rol activo de la mitocondria descrito previamente.

Cabe destacar que tanto para citocromo c, como para las siguientes proteínas cuya expresión fue evaluada mediante Western Blot, los controles de siembra se realizaron en todos los casos utilizando actina, tal como se detalla en M&M.

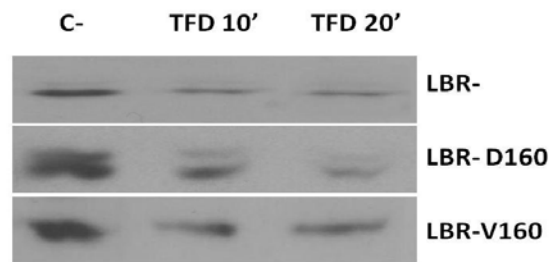


**Fig. III.10.** Expresión de citocromo C evaluada mediante Western Blot, en la fracción citosólica en las líneas celulares LBR, LBR-D160 y LBR-V160. El control positivo se realizó utilizando citocromo C (C+). La extracción de proteínas de las muestras de células se realizó 1 h post-TFD. Se muestran las bandas correspondientes a las células sin tratar (C-) y a las células tratadas con TFD-ALA, utilizando 10 y 20 min de irradiación.

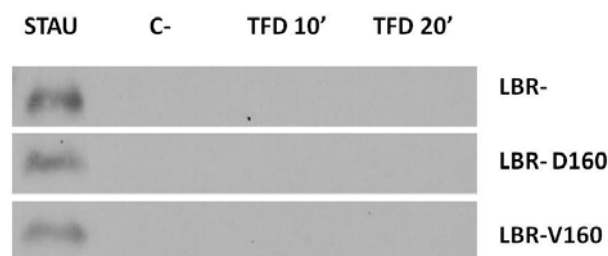
### III.6. Activación de caspasas en respuesta a la TFD-ALA

Las caspasas juegan un rol crucial en la mayoría de las vías apoptóticas. Las caspasas iniciadoras, tales como las caspasas -8 ó -10, clivan y activan a las caspasas efectoras, -3 ó -6, que subsecuentemente clivan numerosos sustratos dando lugar a los principales cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis. (Buytaert et al., 2007). En distintos modelos experimentales se observó que luego de la TFD, la vía apoptótica más común es la que involucra la liberación de citocromo c, la activación de caspasa-9 y de caspasa-3 (vía intrínseca); sin embargo, otras vías, especialmente aquellas que involucran caspasa-8 (vía extrínseca) pueden contribuir a la muerte celular en situaciones en las que la vía principal está suprimida (Oleinick et al., 2002). Si bien las caspasas se consideran las principales determinantes de la morfología apoptótica, un creciente número de trabajos soportan la idea de que la apoptosis inducida por la TFD puede ocurrir en forma independiente de caspasas (Furre et al., 2006; Vittar et al., 2010). Debido a las diversas respuestas a la TFD reportadas resultó de interés determinar la vía apoptótica involucrada en las líneas celulares estudiadas. Para ello se evaluó la expresión de pro-caspasa -3 y caspasa -8, representantes de las vías intrínseca y extrínseca, respectivamente. En la Fig. III.11 se muestra una disminución en la expresión de pro-caspasa -3, cuando las células fueron sometidas a la TFD-ALA, indicando que esta proteína estaría participando en los eventos que conducen a la morfología apoptótica observada luego del tratamiento. La disminución en la expresión de la proteína fue similar en las tres líneas celulares y para los dos tiempos de irradiación utilizados.

No se observó expresión de caspasa -8 bajo ninguna de las condiciones estudiadas.



**Fig. III.11.** Expresión de caspasa -3 evaluada mediante Western Blot, en las líneas celulares LBR, LBR-D160 y LBR-V160. La extracción de proteínas de las muestras de células se realizó 1 h post-TFD. Se muestran las bandas correspondientes a las células sin tratar (C-) y a las células tratadas con TFD-ALA, utilizando 10 y 20 min de irradiación.



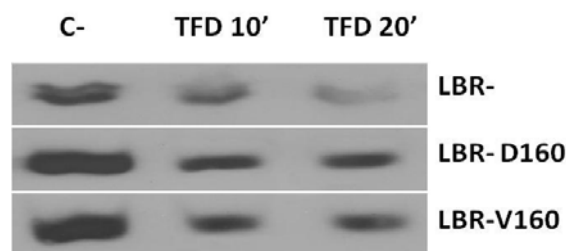
**Fig. III.12.** Expresión de caspasa -8 evaluada mediante Western Blot, en las líneas celulares LBR, LBR-D160 y LBR-V160. La extracción de proteínas de las muestras de células se realizó 1 h post-TFD. Se muestran las bandas correspondientes a las células sin tratar (C-) y a las células tratadas con TFD-ALA, utilizando 10 y 20 min de irradiación.

### III.7. Efecto de la TFD-ALA sobre la expresión de Bcl-2

El rol de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en la TFD resulta ambiguo. Mientras que en ciertos casos una sobreexpresión de Bcl-2 se asoció a una disminución en la apoptosis inducida por la TFD, en otros, una elevada expresión de esta proteína aumentó el grado de muerte celular por la TFD (Oleinick et al., 2002; Almeida et al., 2004).

Además, en numerosos trabajos se demostró que Bcl-2 es un target de la TFD utilizando una gran variedad de FS (Kessel y Castelli, 2001; Kessel et al., 2005, Marchal et al., 2007).

Cuando se evaluó la expresión de Bcl-2 luego de la TFD se observó una disminución de la misma en las tres líneas celulares, demostrando la implicancia de esta molécula en el proceso de muerte celular (Fig. III.12). La expresión fue similar entre las tres líneas celulares y no se observaron diferencias entre los tiempos de irradiación estudiados.



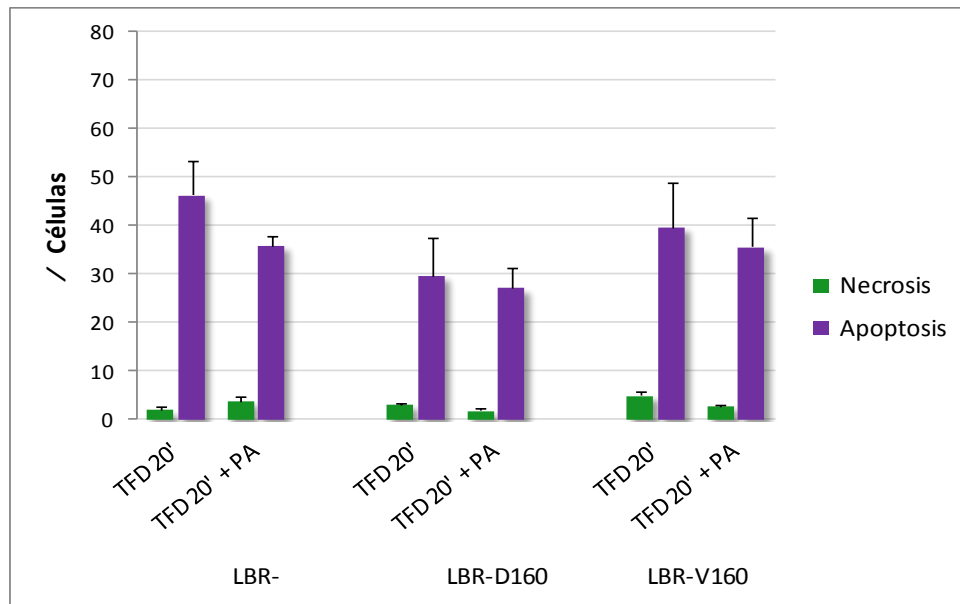
**Fig. III.13.** Expresión de Bcl-2 evaluada mediante Western Blot en las líneas celulares LBR, LBR-D160 y LBR-V160. La extracción de proteínas de las muestras de células se realizó 1 h post-TFD. Se muestran las bandas correspondientes a las células sin tratar (C-) y a las células tratadas con TFD-ALA, utilizando 10 y 20 min de irradiación.

### III.8. Participación de los lisosomas en la muerte celular inducida por la TFD

Tradicionalmente la ruptura de los lisosomas se asociaba al proceso de muerte por necrosis, ya que durante la apoptosis éstos se mantenían estructuralmente intactos. Sin embargo en trabajos de los últimos años se demostró que la relocalización de proteasas lisosomales como la catepsina D y B desde el lisosoma hacia el citoplasma, puede participar en la ejecución de la apoptosis (Johnson et al., 2000; Guicciardi et al., 2004). Este proceso se atribuye a diversos estímulos como el estrés oxidativo, principalmente la producción de peróxido de hidrógeno o la activación de p53, entre otros (Yuan et al., 2000; Stoka et al., 2001).

Si bien en las líneas celulares estudiadas previamente demostramos que el principal sitio de localización de la PpIX es la mitocondria, también observamos una mínima localización en lisosomas (Capítulo I). Por este motivo resultó interesante esclarecer la participación lisosomal en el proceso de muerte celular inducido por la TFD-ALA. Para ello las células se preincubaron con el inhibidor de catepsina D, pepstatina A (PA) y luego fueron sometidas a la TFD-ALA.

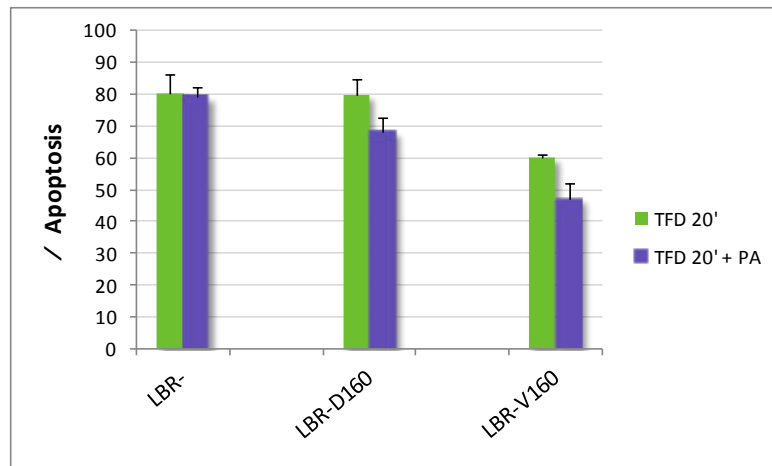
Debido a que la disrupción lisosomal se considera un evento temprano en el proceso de apoptosis, las células fueron analizadas inmediatamente post-TFD. Se midió el nivel de apoptosis utilizando Annexin-V FITC e IP. En la Fig. III.14 se observa una inhibición de la apoptosis en las líneas resistentes a drogas, LBR-D160 y LBR-V160, cuando se trataron con PA. Sin embargo estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Cuando se analizó este mismo parámetro a distintos tiempos post-TFD (1 y 2 h), tampoco se hallaron diferencias significativas (datos no mostrados).



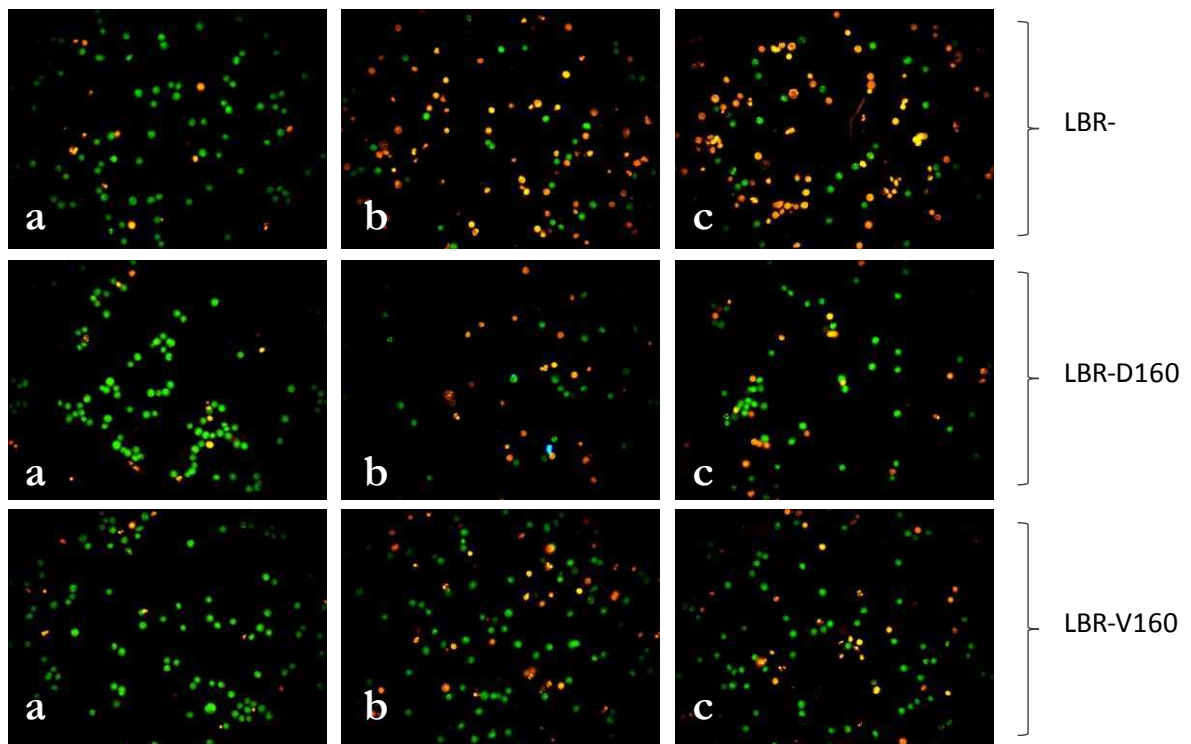
**Fig. III.14.** Inducción de apoptosis y necrosis determinada mediante citometría de flujo, utilizando la tinción con Annexin V-FITC e IP, 1 h post-TFD, utilizando un mismo tiempo de irradiación en la TFD, para las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. El gráfico muestra el porcentaje de células apoptóticas y necróticas para las células tratadas sólo con TFD, y para las células tratadas con TFD+ PA. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

También se evaluó la morfología celular mediante la tinción con NA/BE hallando resultados similares. En las Fig. III.15 y III.16 se muestra una leve disminución en el nivel de apoptosis cuando las células fueron tratadas con PA en comparación con las no tratadas, pero estas diferencias tampoco resultaron significativas.

Estos resultados indican que si bien en estas líneas celulares puede existir una participación lisosomal en el proceso de muerte, ésta es mínima en comparación con la participación de las mitocondrias.



**Fig. III.15.** Inducción de apoptosis determinada mediante la tinción con NA/BE y microscopía de fluorescencia, 1 h post-TFD, utilizando un mismo tiempo de irradiación en la TFD, para las líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. El gráfico muestra el porcentaje de apoptosis para las células tratadas sólo con TFD, y para las células tratadas con TFD+ PA. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Fig. III.16.** Inducción de apoptosis y necrosis determinada mediante la tinción con NA/BE, 1 h post-TFD en las líneas LBR-, LBR-D160 y LBR-V160. Las fotografías se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia (objetivo 40X) y muestran la morfología celular para el control negativo (a), TFD utilizando 20 min de irradiación (b) y TFD + PA (c).



## Conclusiones

- Se demostró que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte involucrado en la TFD-ALA tanto en la línea sensible LBR- como en las líneas resistentes a drogas LBR-D160 y LBR-V160.
- Las características apoptóticas, tanto morfológicas como bioquímicas, se evidenciaron en forma temprana luego de la TFD-ALA, demostrando el rápido efecto de esta terapia. Estos resultados concuerdan con la inmediata producción de oxígeno singulete y anión superóxido descrita en el capítulo II de este trabajo.
- Al estudiar la muerte celular mediante la tinción con NA/BE se observó una menor y más lenta inducción de apoptosis en la línea LBR-V160; sin embargo los estudios realizados con Annexin-V FITC e IP no revelaron diferencias significativas entre las tres líneas en las respuestas a la TFD-ALA.
- La pérdida de la integridad mitocondrial observada a nivel morfológico, la liberación de citocromo c hacia el citosol, junto con la despolarización de la membrana mitocondrial descrita en el capítulo II de esta tesis, demuestran el importante rol que ejercen las mitocondrias en la muerte celular inducida por TFD-ALA.
- En contraposición, los estudios realizados con PA indican que en este modelo experimental, los lisosomas no jugarían un papel central en el proceso de apoptosis.
- La disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y del precursor de caspasa -3 activa indican la participación de la vía apoptótica intrínseca en el proceso de muerte celular. Además, la falta de expresión de caspasa -8 luego de la TFD es consistente con estos resultados.

## Bibliografía

- Agostinis P, Buytaert E, Breyskens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3(8):721-9.
- Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1776(1):86-107.
- Fruhwrth GO, Hermetter A. Mediation of apoptosis by oxidized phospholipids. *Subcell. Biochem.* 2008; 49:351-67.
- Furre IE, Moller MT, Shahzidi S, Nesland JM, Peng Q. Involvement of both caspase-dependent and-independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis.* 2006; 11:2031-42.
- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene.* 2004; 23(16):2881-90.
- Johnson DE. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia.* 2000; 14(9):1695-703.
- Kessel D, Castelli M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem. Photobiol.* 2001; 74:318-22.
- Kessel D, Castelli M, Reiners JJ. Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 502–11.
- Kessel D, Luo Y, Deng Y, Chang CK. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65(3):422-6.
- Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinate-treated tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005; 433(2):435-46.
- Kuzelová K, Grebenová D, Pluskalová M, Marinov I, Hrkal Z. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2004; 73(1-2):67-78.
- Luksiene Z, Eggen I, Moan J, Nesland JM, Peng Q. Evaluation of protoporphyrin IX production, phototoxicity and cell death pathway induced by hexylester of 5-aminolevulinic acid in Reh and HPB-ALL cells. *Cancer Lett.* 2001; 169(1):33-9.

Marchal S, Francois A, Dumas D, Guillemin F, Bezdetnaya L. Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br. J. Cancer.* 2007; 96:944-51.

Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, Jolois O, Hunt DW, Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene.* 2001; 20(30):4070-84.

Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002; 1(1):1-21.

Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(5):3149-57.

Vittar NB, Awruch J, Azizuddin K, Rivarola V. Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010; 42(7):1123-31.

Yuan XM, Li W, Brunk UT, Dalen H, Chang YH, Sevanian A. Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28(2):208-18.

## **IV- EFECTOS *IN VITRO*-*IN VIVO* DE LAS TERAPIAS COMBINADAS: QUIMIOTERAPIA + TFD-ALA**

### ***Experimentos in vitro***

#### **IV.1. Determinación de la LD<sub>50</sub> para los agentes quimioterápicos doxorubicina y vincristina en la línea sensible a drogas LBR-**

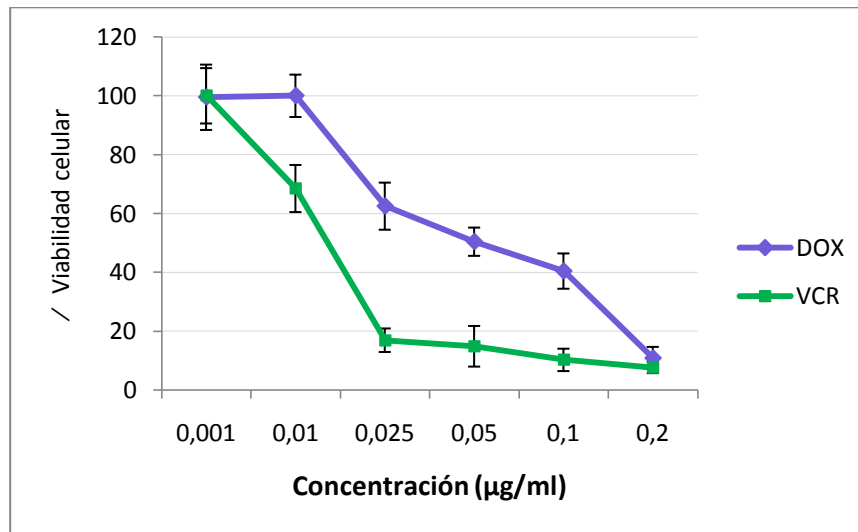
La doxorubicina (DOX) y la vincristina (VCR) son agentes antineoplásicos utilizados habitualmente para el tratamiento de enfermedades malignas hematológicas (Kostrzewa-Nowak et al., 2005; Eden et al., 2010).

Aunque el mecanismo de acción de la DOX aún no se conoce completamente, su actividad anticancerígena se relaciona con la formación de aductos en el ADN, la inhibición de la enzima nuclear topoisomerasa II, la formación de radicales libres y la interacción con componentes de la membrana celular (Cutts, 2005). Por otra parte la VCR se une a monómeros de tubulina impidiendo la formación de microtúbulos, y por lo tanto inhibiendo la división celular (Meininger V, 1990).

Con el fin de hallar la dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>) para cada una de estas drogas, se evaluó la viabilidad celular luego de tratar a las células de la línea LBR- con distintas dosis de las mismas.

En la Fig. IV.1. se observa una disminución de la viabilidad celular cuando se utilizaron dosis crecientes de ambas drogas. En las células tratadas con DOX se evidenció un efecto tóxico menor y más gradual que cuando se utilizó VCR.

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó para los experimentos siguientes una dosis de 0,05 µg/ml para DOX y de 0,01 µg/ml para VCR, correspondientes a aproximadamente una LD<sub>50</sub>.



**Fig. IV.I.** Evaluación de la toxicidad celular producida por DOX y VCR en condiciones de oscuridad en la línea celular LBR-. Las células se incubaron durante 24 hs con distintas concentraciones de DOX y VCR, luego se determinó la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT. El control de células incubadas en ausencia de DOX ó VCR se consideró como 100%. Los valores se expresan como % de viabilidad celular con respecto al control de células sin tratar (100%), y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

#### **IV.2. Viabilidad celular utilizando TFD-ALA, quimioterapia y la combinación de ambas en la línea celular LBR-**

Una de las principales limitaciones que existen en el tratamiento de las leucemias es la presencia de células malignas remanentes luego del purgado de la médula ósea, las que durante el trasplante autólogo de la misma son reinsertadas en el paciente, produciendo la recaída de la enfermedad (Devetten y Armitage, 2007). Por otra parte, los agentes quimioterapéuticos habitualmente utilizados en el tratamiento de esta patología, no poseen actividad selectiva sobre las células malignas, afectando también en gran medida a los tejidos normales, y además, su utilización favorece el desarrollo de fenotipos celulares resistentes a drogas (Peters et al., 2000).

Se ha propuesto el uso de la TFD en el proceso de purgado de la médula ósea con el fin de reducir la contaminación de células tumorales, produciendo una mínima toxicidad a las células progenitoras (Li et al., 2001). Debido al efecto selectivo de la TFD, la combinación con otros métodos como la radioterapia y la quimioterapia ha sido estudiada por varios autores (Zimmerman et al., 2003; Xie, et al. 2009).

En este trabajo se propone la utilización de DOX y VCR en combinación con TFD-ALA como una alternativa posible para optimizar el proceso de purgado de médula ósea y disminuir las dosis de drogas, minimizando así las limitaciones de la quimioterapia.

Para evaluar la eficacia de esta combinación, en primer lugar se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en la línea sensible a drogas LBR-.

Se observó un efecto sinérgico al utilizar las terapias combinadas, dado por una disminución significativa de la supervivencia celular con respecto a cada terapia en forma independiente (Fig. IV.2). Este efecto fue mayor para el tratamiento con VCR en comparación con DOX.

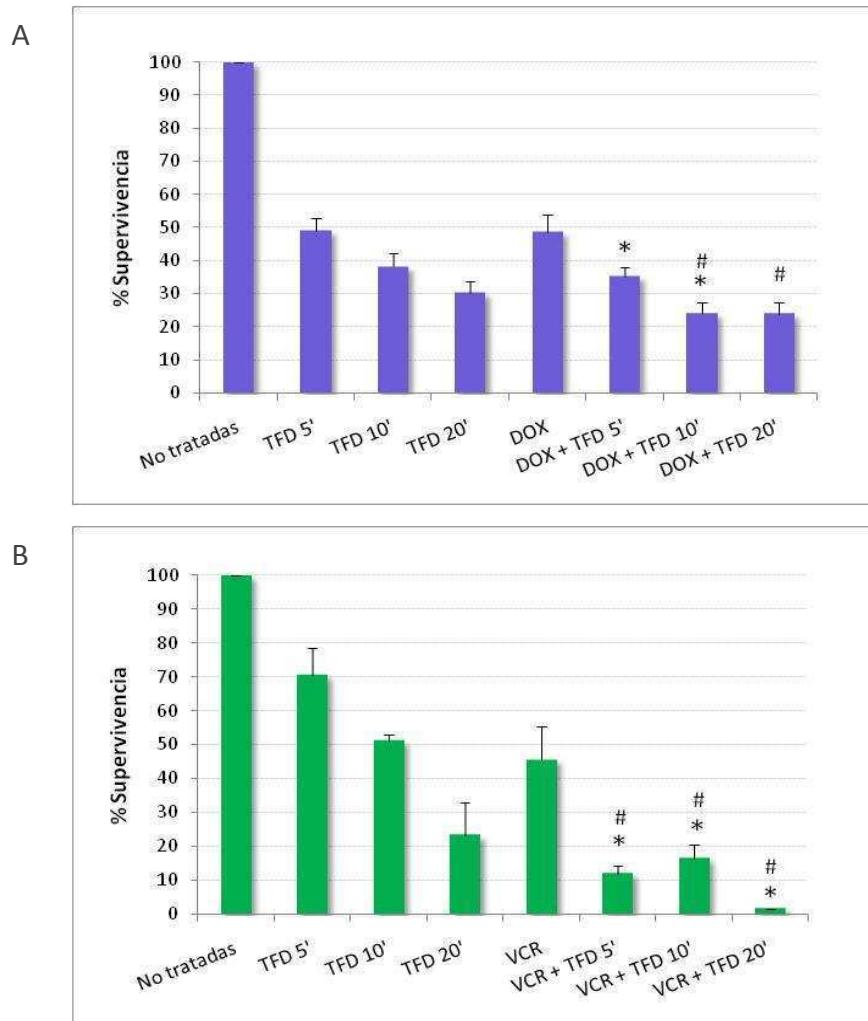
Con la combinación de TFD (irradiación 20 min) y quimioterapia, se obtuvo una disminución de la supervivencia equivalente a una dosis de DOX y VCR  $> 0,1 \mu\text{g/ml}$ , dosis que duplica la utilizada en el tratamiento de las células.

La posibilidad de lograr una determinada eficacia disminuyendo las dosis de DOX y VCR en un 50% , contribuiría a minimizar los efectos secundarios indeseados de la quimioterapia y el desarrollo de fenotipos celulares resistentes a drogas.

Varios autores han descrito ya un significativo beneficio al combinar el uso de agentes antineoplásicos con la TFD. Peterson, Snyder y Kirveliene demostraron que la TFD (utilizando diversos FSs) en combinación con DOX resultó más efectiva que las terapias en forma independiente (Peterson et al., 2003; Snyder et al., 2003; Kirveliene et al., 2006). Xie observó un efecto sinérgico al utilizar TFD en combinación con gemcitabina, en un modelo *in vivo* de ratones *nude* inoculados con células de cáncer pancreático (SW1990) (Xie et al., 2009).

Hasta el momento existen pocos trabajos en los que se haya estudiado la combinación de drogas de quimioterapia con TFD utilizando ALA como agente pro-fotosensibilizante, y ninguno que se haya llevado a cabo en células leucémicas. Utilizando un modelo *in vitro-in vivo* de adenocarcinoma murino, Casas et al. demostraron que la reducción tumoral se vio altamente potenciada al utilizar la combinación de DOX con TFD-ALA y al exponer explantes tumorales a adriamicina y al agente alquilante ciclofosfamida junto con la TFD-ALA, observaron un 30% de incremento en la eficacia, con respecto a la aplicación de sólo TFD (Casas et al., 1997, Casas et al., 1998). Sinha et al. también demostraron una mayor efectividad terapéutica al utilizar TFD-ALA en combinación con metotrexato en células LNcaP (Sinha et al., 2001).

Los resultados descritos en el presente trabajo demuestran el beneficio de utilizar las terapias combinadas.



**Fig. IV.2.** Supervivencia celular determinada mediante el ensayo de MTT para los tratamientos con TFD-ALA (tiempos de irradiación: 5, 10 y 20 min), DOX (A), VCR (B), y la combinación de las terapias. Los resultados representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*  $P < 0,05$  vs. TFD, #  $P < 0,05$  vs. droga correspondiente).



### **IV.3. Efecto de las terapias combinadas en las líneas celulares resistentes: LBR-D160 y LBR-V160**

El desarrollo de resistencia a drogas constituye la principal limitación de los tratamientos para el cáncer. La TFD se ha propuesto como una alternativa para superar esta resistencia (Capella y Capella, 2003). En la línea celular humana MCF-7 de cáncer de mama, y en otras resistentes a DOX derivadas de éstas, algunos autores reportaron que la TFD con meta-tetra (hidrofenil)clorina (mTHPC), ALA y AlaAcBu, era capaz de eliminar células que expresaban el fenotipo MDR (Teiten et al., 2001; Tsai et al., 2004; Feuerstein et al., 2011). La TFD-ALA también resultó efectiva en las líneas resistentes a multidrogas NB4/MDR y NOMO-1/ADR, pero no así en las líneas K562 y K562/ADR, que acumularon menores cantidades de PpIX (Li et al., 2001).

En las dos líneas celulares que se utilizaron en la presente tesis, LBR-D160 y LBR-V160 resistentes a DOX y a VCR respectivamente, Lopes et al. reportaron previamente la sobreexpresión del gen *Mdr-3* y de *Pgp*, confiriéndoles a estas células resistencia cruzada entre distintas drogas (Lopes et al., 2001). Dado que algunos autores recientemente han reportado que la TFD puede revertir la resistencia a drogas en distintos tipos celulares (Chu et al., 2008, Tang et al., 2009), resultó de interés evaluar la respuesta de las líneas LBR-D160 y LBR-V160 cuando se utilizan las drogas de quimioterapia DOX y VCR en combinación con TFD-ALA.

En la Tabla I (A y B) se observa que si bien ambas líneas respondieron a TFD-ALA, no se evidenciaron diferencias significativas en la supervivencia al utilizar las terapias combinadas con respecto a cada una de ellas en forma independiente.

La respuesta de las dos líneas celulares al tratamiento con DOX y con VCR fue diferente. Mientras que la línea LBR-V160 no presentó sensibilidad a ninguna de las drogas, en la línea LBR-D160 la supervivencia celular disminuyó un 40% cuando fue tratada con VCR.

Con el fin de determinar el posible efecto modulador de la TFD sobre la resistencia a drogas, se evaluó la acumulación intracelular de daunorubicina (DAU), sustrato de *Pgp*, luego de someter a las células a la TFD-ALA. Al analizar el patrón de fluorescencia roja de DAU mediante citometría de flujo, en ninguna de las dos líneas celulares se observaron

diferencias entre las células tratadas sólo con DAU y las tratadas previamente con TFD-ALA, indicando que esta terapia no ejercería modificaciones sobre la actividad de Pgp (Fig. IV.3 a y b).

Esto difiere con lo reportado por Tang et al., quienes demostraron una inhibición de la actividad de Pgp mediada por TFD utilizando feoforbido A (PA) como FS, en células de hepatocarcinoma resistentes a drogas: R-HepG2 (Tang et al., 2009). También Chu et al. reportaron una disminución en la actividad de Pgp inducida por la TFD con el derivado hexil-ALA en la línea celular MES-SA-Dx5 de sarcoma uterino (Chu et al., 2008). Sin embargo, en otras investigaciones se han encontrado una amplia variedad de respuestas cuando se analiza la relación entre la TFD y la resistencia a drogas, dependiendo del tipo celular o el FS empleado (Busch y Hahn, 2005). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la TFD-ALA fue efectiva en las líneas resistentes a drogas LBR-D160 y LBR-V160, aunque en las condiciones empleadas no resultó capaz de revertir ni modificar significativamente esta resistencia.

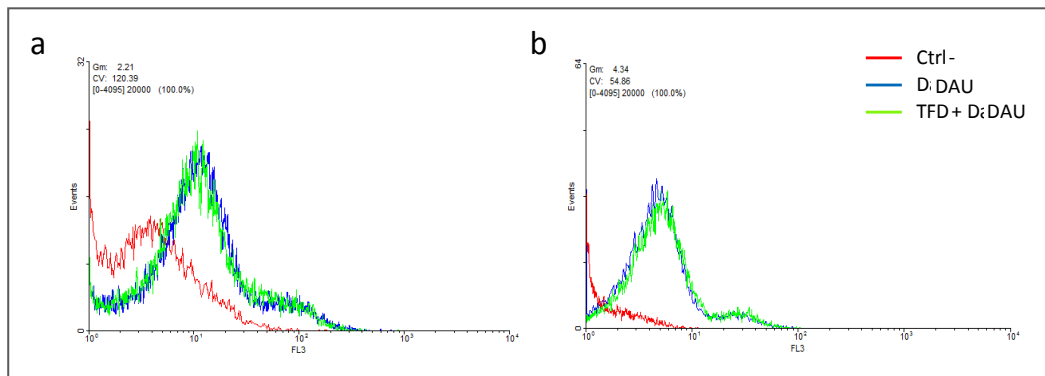
**Tabla IV.I.** Supervivencia celular determinada mediante el ensayo de MTT para los tratamientos con TFD-ALA (tiempos de irradiación: 5, 10 y 20 min), DOX, VCR, y la combinación de las terapias en las líneas LBR-D160 (A) y LBR-V160 (B), con respecto al control de células tratadas sólo con ALA (100%).

A

/ de supervivencia celular				
LBR-D160	Tiempo de irradiación			
Tratamientos	0 min	5 min	10 min	20 min
Sólo TFD	100	74,5 ± 8	64,5 ± 3,1	38 ± 5
Sólo DOX	100	98,7 ± 6,1	93,1 ± 3,7	94,1 ± 7,1
TFD y DOX		91,1 ± 3,4	78,3 ± 11	47,5 ± 7,4
Sólo VCR	60,1 ± 6,9	51,7 ± 10	57,8 ± 7,3	64,8 ± 9,1
TFD y VCR		61 ± 4,5	51,5 ± 2,9	22,6 ± 7,4

B

/ de supervivencia celular				
LBR-V160	Tiempo de irradiación			
Tratamientos	0 min	5 min	10 min	20 min
Sólo TFD		77,3 ± 6	48,3 ± 4,3	23,6 ± 0,8
Sólo DOX	100	100	100	100
TFD y DOX		69 ± 8,2	56,4 ± 1,5	25,4 ± 2,3
Sólo VCR	100	97,1 ± 9,8	86,9 ± 2,8	91,5 ± 6
TFD y VCR		84,07 ± 5,4	60,4 ± 4,9	40,7 ± 2,3



**Fig. IV.3.** Fluorescencia de daunorubicina (DAU) en las líneas celulares LBR-D160 (a) y LBR-V160 (b). Se observan la fluorescencia roja del control negativo correspondiente a la fluorescencia basal de las células sin tratar, las células tratadas sólo con DAU y las células sometidas previamente a la TFD-ALA, utilizando ALA 1 mM, irradiando durante 10 min y tratadas posteriormente con DAU.

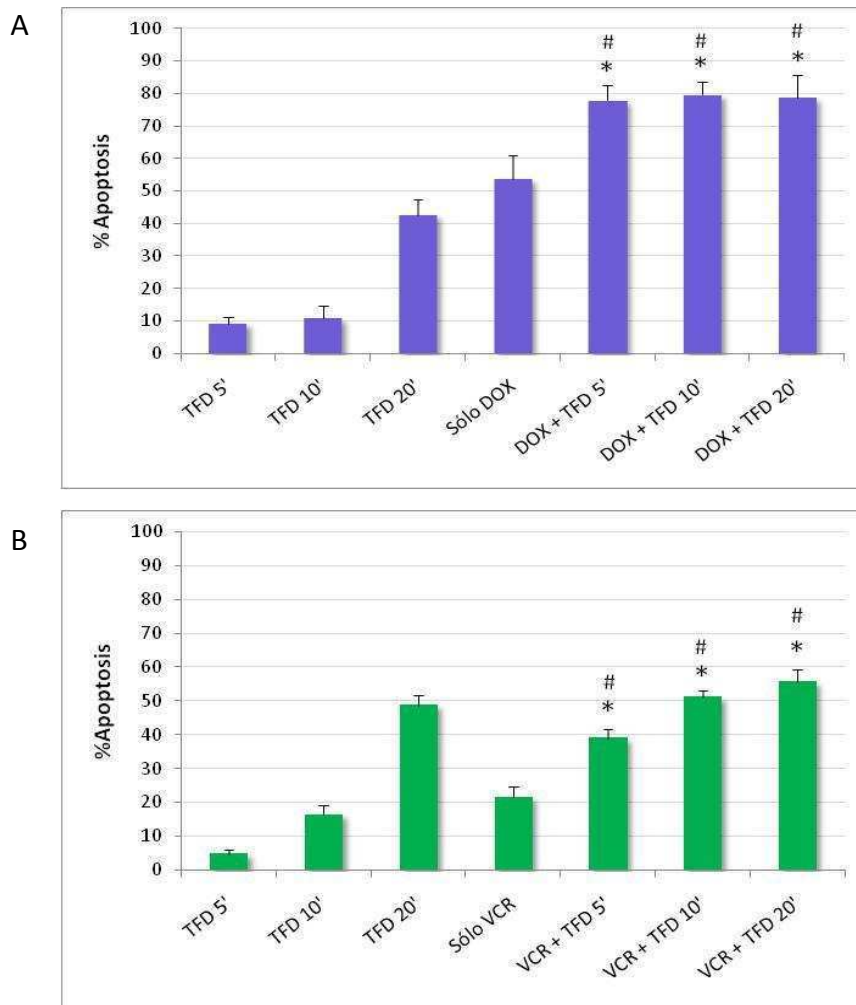
#### **IV.4. Inducción de apoptosis y necrosis utilizando TFD-ALA, quimioterapia y la combinación de ambas en la línea celular LBR-**

Hemos demostrado que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte inducido por la TFD-ALA (Capítulo III). Con el fin de evaluar los cambios morfológicos producidos por la combinación de esta terapia con DOX y VCR en la línea celular LBR-, se realizó la tinción con NA/BE, y posteriormente las células fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia.

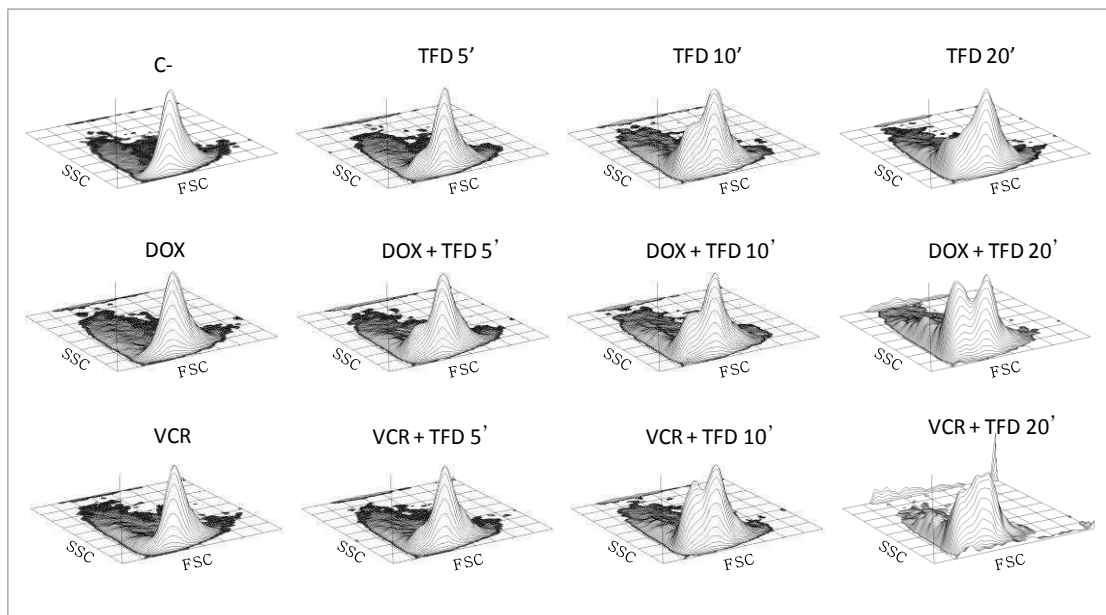
En la Fig. IV.4 A y B se observa que utilizando tanto VCR como DOX, la inducción de apoptosis aumentó significativamente cuando se utilizó la combinación de terapias con respecto a cada una de ellas en forma independiente.

Cuando las células fueron tratadas con DOX + TFD-ALA, no se observaron diferencias al utilizar distintas dosis de luz, mientras que al utilizar la combinación VCR + TFD-ALA, se observó un aumento de apoptosis a medida que se incrementó el tiempo de irradiación.

También demostramos el desarrollo de una morfología apoptótica inducida por la TFD, evidenciada en el patrón de dispersión lumínica detectado mediante citometría de flujo: una disminución en la intensidad del parámetro FSC (forward light scatter) y un aumento en SSC (side light scatter). Cuando se analizó el efecto de las terapias combinadas utilizando la misma técnica, también se observó un incremento en la morfología apoptótica en comparación con cada terapia en forma independiente, en particular cuando se aplicó la TFD con un tiempo de irradiación de 20 min (Fig. IV.5).



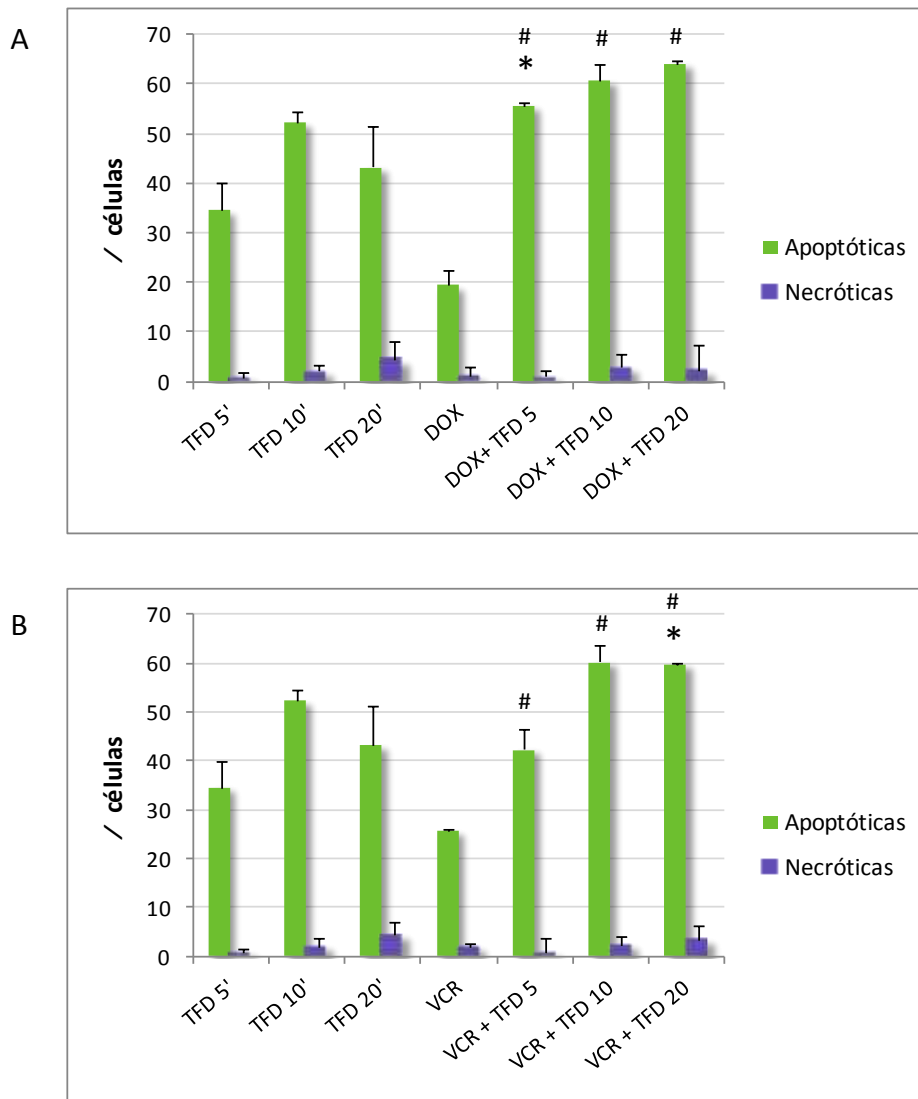
**Fig. IV.4.** Inducción de apoptosis determinada mediante tinción con NA/BE y microscopía de fluorescencia, para los tratamientos con TFD-ALA (tiempos de irradiación: 5, 10 y 20 min), DOX (A), VCR (B), y la combinación de las terapias, en la línea LBR-. En el gráfico se indica el porcentaje de células apoptóticas con respecto al total de células. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*  $P < 0,05$  vs. TFD, #  $P < 0,05$  vs. droga correspondiente).



**Fig. IV.5.** Gráficos en 3D obtenidos mediante el análisis por citometría de flujo para los tratamientos con TFD-ALA (tiempos de irradiación: 5, 10 y 20 min), DOX, VCR, y la combinación de las terapias, en la línea LBR-.

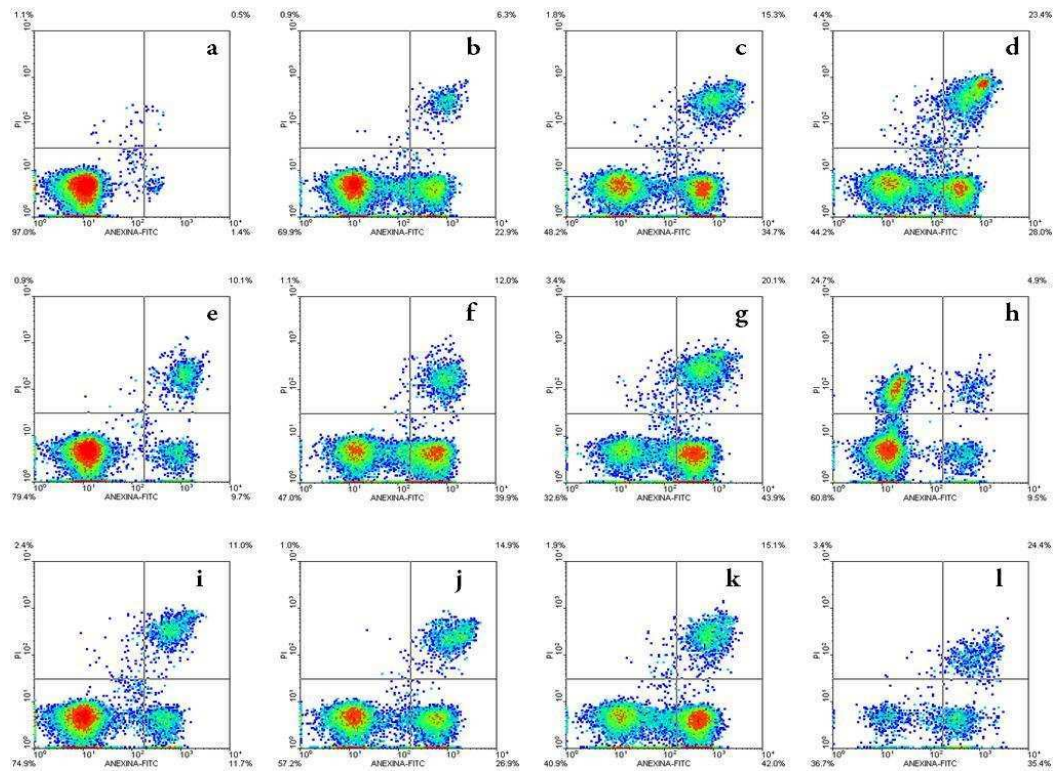
Se evaluó también la externalización de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana celular, utilizando la tinción con Annexin V-FITC/IP. Los resultados obtenidos demuestran un aumento en la externalización del fosfolípido cuando se utilizaron las terapias combinadas, aunque este aumento sólo fue significativo comparado con las drogas de quimioterapia (DOX y VCR), pero no con la TFD (Fig. IV.6 A, B y Fig IV.7).

El bajo nivel de células positivas para IP indica una baja inducción de necrosis en todas las condiciones observadas, en concordancia con los resultados morfológicos previos.



**Fig. IV.6.** Inducción de apoptosis y necrosis determinada mediante citometría de flujo, utilizando la tinción con Annexin V-FITC/IP, para los tratamientos con TFD-ALA (tiempos de irradiación: 5, 10 y 20 min), DOX (A), VCR (B), y la combinación de las terapias, en la línea LBR-. En el gráfico se indica el porcentaje de células apoptóticas y necróticas con respecto al total de células. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*  $P < 0,05$  vs. TFD, #  $P < 0,05$  vs. droga correspondiente).





**Fig. IV.6.** Análisis de citometría de flujo para la tinción con Annexin V-FITC/PI en la línea LBR-. Los gráficos muestran la autofluorescencia del control (a), los tratamientos con TFD 5 min (b), TFD 10 min (c), TFD 20 min (d), DOX (e), DOX + TFD 5 min (f), DOX + TFD 10 min (g), DOX + TFD 20 min (h), VCR (i), VCR + TFD 5 min (j), VCR + TFD 10 min (k) y VCR + TFD 20 min (l).

#### **IV.5. Estrés oxidativo inducido por TFD-ALA, quimioterapia y la combinación de ambas en la línea celular LBR-**

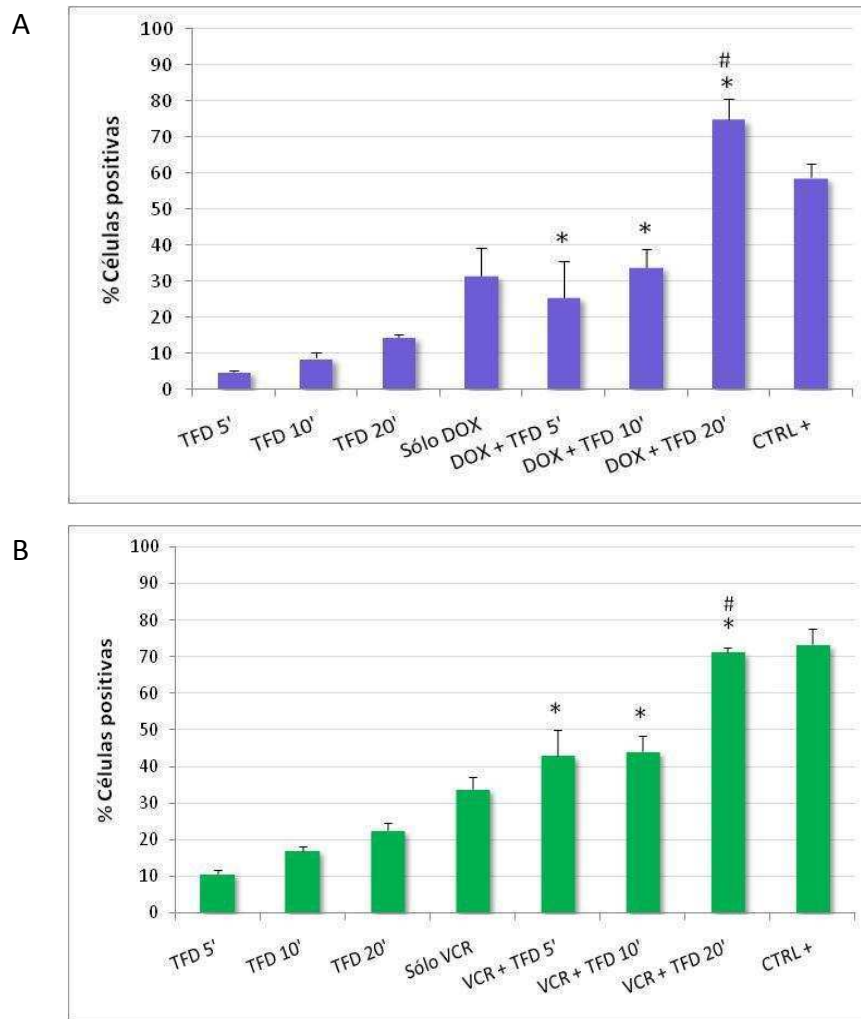
Con el fin de evaluar el rol del estrés oxidativo cuando la TFD-ALA se combina con drogas de quimioterapia, se midió la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y la despolarización de la membrana mitocondrial mediante citometría de flujo en la línea LBR-.

Previamente habíamos demostrado que en las tres líneas celulares LBR-, LBR-D160 y LBR-V160, la TFD-ALA inducía la producción de  $O_2^{\cdot -}$  y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en forma dependiente del tiempo de irradiación utilizado (Diez et al., 2009). La producción de  $O_2^{\cdot -}$  se midió utilizando el reactivo fluorescente hidroetidina (HE), cuya fluorescencia roja aumenta una vez que se oxida.

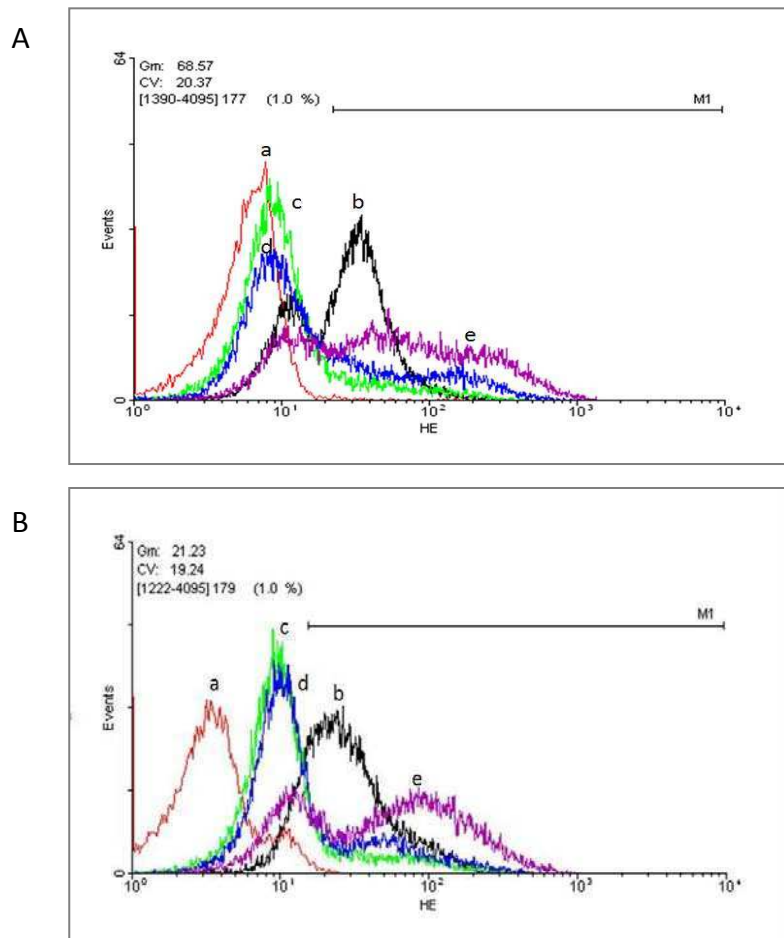
En la Fig. IV.8. A y B se observa que la producción de  $O_2^{\cdot -}$  aumentó con el tiempo de irradiación, siendo mayor cuando se combinaron las dos terapias con respecto a cada una de ellas en forma independiente. La mayor diferencia se produjo cuando se aplicó la combinación DOX + TFD-ALA, irradiando durante 20 minutos.

En la Fig. IV. 9 A y B se muestran los histogramas típicos obtenidos por citometría de flujo en donde se evidencia la fluorescencia roja de la HE para cada tratamiento.

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial se monitorearon utilizando el reactivo DiOC<sub>6</sub> según se detalla en M&M. Los resultados se representan en la Fig. IV.10 A y B, en donde se observa una disminución en la intensidad de fluorescencia a medida que aumentó el tiempo de irradiación en la TFD-ALA. Esta disminución fue significativamente mayor cuando la TFD se combinó con DOX ó con VCR.



**Fig. IV.8.** Producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) en la línea celular LBR-, evaluada mediante citometría de flujo, utilizando HE, para los tratamientos con TFD-ALA (tiempos de irradiación: 5, 10 y 20 min), DOX (A), VCR (B), y la combinación de las terapias. Las barras indican el porcentaje de células positivas para fluorescencia roja con respecto al control de células sin tratar. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*  $P < 0,05$  vs. TFD, #  $P < 0,05$  vs. droga correspondiente).



**Fig. IV.9.** Producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) en la línea celular LBR-, evaluado mediante citometría de flujo, utilizando HE, 1 hora después de los tratamientos correspondientes utilizando DOX (A) y VCR (B). En los histogramas obtenidos mediante citometría de flujo se observa la intensidad de fluorescencia roja de la HE para cada tratamiento. Se muestran las células no tratadas (**a**), el control positivo (**b**), tratamiento con TFD-ALA, irradiación 20 min (**c**), sólo con las drogas de quimioterapia (**d**) y la combinación de ambas terapias (**e**).

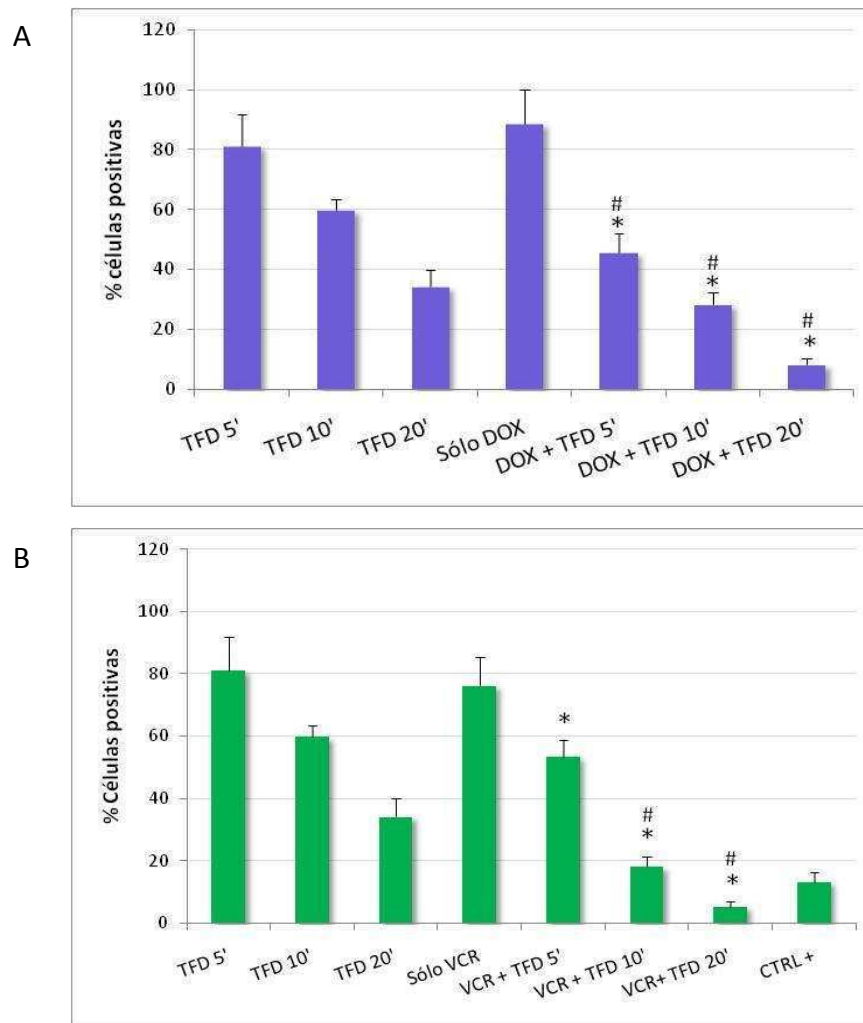


Fig. IV.10. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en la línea celular LBR-, utilizando DiOC6 y analizando las muestras mediante citometría de flujo. Se muestran los / de células positivas para los tratamientos con TFD-ALA (tiempos de irradiación: 5, 10 y 20 min), DOX (A), VCR (B), y la combinación de las terapias, con respecto a las células no tratadas (100/ ). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\*  $P < 0,05$  vs. TFD, #  $P < 0,05$  vs. droga correspondiente).

## Experimentos *in vivo*

### IV.7. Efectos de la TFD-ALA, quimioterapia y la combinación de ambas sobre la infiltración leucémica en distintos órganos

En base al efecto sinérgico obtenido al utilizar las terapias combinadas en un modelo *in vitro*, resultó interesante evaluar la respuesta de esta combinación en un modelo *in vivo*. Además, hasta el presente, en la bibliografía no se reportaron trabajos en los que se haya estudiado el efecto combinado de la TFD-ALA y drogas de quimioterapia en modelos *in vivo* de leucemia, aunque algunos autores estudiaron esta combinación empleando otros FSs y otros agentes antineoplásicos en distintos modelos de cáncer *in vivo* (Canti et al., 1998; Snyder et al., 2003; Kirveliene et al., 2006; Anand et al., 2009; Xie et al., 2009).

Con el fin de evaluar los efectos de las terapias combinadas, se utilizaron ratones BALB-c, a los que se inoculó por vía intravenosa con  $1 \cdot 10^6$  células de la línea LBR-, como se detalla en M&M. Las mismas fueron sometidas previamente a los distintos tratamientos, en las condiciones utilizadas para las experiencias *in vitro*, dando lugar a los siguientes grupos de tratamientos: células LBR- no tratadas (grupo control), tratadas sólo con TFD, DOX, VCR, y las combinaciones TFD + DOX, TFD + VCR.

Esta parte del trabajo tuvo como finalidad evaluar la presencia y el grado de infiltración leucémica (IL) en distintos órganos, por lo que fue necesario, en primer lugar, determinar el momento óptimo de sacrificio para la extracción de los órganos en los animales tratados.

Para ello se realizó una extracción de sangre semanal a los ratones, inoculados previamente con las células sometidas a los distintos tratamientos, con el fin de evaluar la carga de blastos o células indiferenciadas. A los extendidos obtenidos se les realizó la tinción de Giemsa, y luego fueron analizados al microscopio.

Algunos autores sostienen que el grado de IL en los distintos órganos se correlaciona con la cantidad de blastos en sangre, reflejando la masa total de células leucémicas en el organismo (Reiter et al., 1994). Por ello, evaluar la carga de blastos semanalmente en los animales nos permitió, por un lado tener una noción aproximada del grado de avance de

la enfermedad y por otra parte nos permitió determinar el momento óptimo de sacrificio de los mismos.

Los extendidos correspondientes a los ratones del grupo control presentaron una mayor carga de células indiferenciadas en la sangre, con respecto a los que recibieron las células tratadas. A los 30 días, la carga de blastos resultó muy alta en estos animales y además, en esta etapa, los ratones presentaron aletargamiento y deterioro en el pelaje, indicando un mal estado general (datos no mostrados). De acuerdo a lo observado en este grupo, que fue el que presentó peores condiciones generales, se consideró como tiempo óptimo de sacrificio para los siguientes experimentos el día 30 desde la inoculación de las células. Alcanzado ese tiempo, se procedió al sacrificio de los animales y se realizó la extracción de los siguientes órganos: timo, riñón, hígado, bazo, corazón, pulmón, ganglios linfáticos y cerebro. Los mismos fueron conservados en formol 10% (diluído en PBS) hasta su procesamiento para realizar los cortes histológicos. Luego se tiñeron con la técnica hematoxilina-eosina (H&E) y se analizaron al microscopio.

En el grupo control, se observó IL en todos los animales en el 87,5% de los órganos analizados (Tablas IV.2 y 3). En los grupos inoculados con células tratadas sólo con TFD, si bien todos los animales presentaron IL, se observó un 50% de los órganos afectados (principalmente ganglios linfáticos), pero con menor intensidad que el grupo control. En los animales inoculados con células tratadas sólo con DOX ó VCR se observaron células tumorales en el 25% y el 75% de los órganos, respectivamente. Cuando se utilizó la combinación de las terapias (DOX+TFD ó VCR+TFD) no se observó IL en ningún órgano de los animales analizados.

Al comparar tanto el porcentaje de animales que presentaron IL, como el porcentaje de órganos con IL para cada tratamiento, las diferencias fueron estadísticamente significativas al utilizar las terapias combinadas frente a las terapias en forma independiente.

Todos los órganos analizados (excepto el corazón) se vieron afectados por IL en los ratones inoculados con las células sin tratar (Tablas IV.4 y 5). En los grupos tratados sólo con TFD, VCR ó DOX, el grado de IL y la variedad de órganos comprometidos fue menor que en el grupo control, hallándose afectados principalmente timo, pulmón y bazo.

Las imágenes histológicas muestran cortes de distintos órganos correspondientes al grupo control y a los tratados con la combinación DOX + TFD (Fig. IV.11). En el grupo control se pueden apreciar focos de blastos en todos los órganos. En el riñón la IL se dispuso en focos intersticiales rodeando glomérulos (Fig. IV.11, A1, círculos). El cerebro muestra una amplia IL peri-ventricular (Fig. IV.11, B1, flechas). En el hígado las células leucémicas se observaron rodeando estructuras vasculares como la arteria hepática (AH) y la vena centro-lobulillar (VCL) (Fig. IV.11, C1, flechas). En los pulmones se vio afectado el parénquima alveolar a partir de una disposición peri-vascular (Fig. IV.11, D1, círculos). El bazo perdió su estructura normal debido a una intensa IL principalmente de la pulpa blanca, con desaparición de la pulpa roja. (Fig. IV.11, E1).

Cabe destacar que cuando se utilizó la combinación DOX + TFD, no se observó presencia de células leucémicas en ninguno de los órganos estudiados.

El beneficio al utilizar TFD en combinación con DOX ó con VCR en este modelo *in vivo*, concuerda con los resultados obtenidos previamente *in vitro*, y también coincide con lo reportado por Canti et al. que utilizaron combinaciones similares en modelos *in vivo* de leucemia, hallando resultados sinérgicos, e incluso aditivos. En ratones inoculados con las líneas celulares de leucemia L1210, y de linfoma P388, Canti demostró un efecto antitumoral aditivo aplicando TFD con ftalocianina de aluminio como FS en combinación con ADR y con cisplatina (Canti et al., 1998). Recientemente el mismo grupo de investigación también llevó a cabo la combinación de tres terapias en forma simultánea en un modelo de leucemia murina: TFD basada en m-THPC, junto con linfocitos inmunes (inmunoterapia) y las drogas de quimioterapia vinorelbina ó cisplatina. La combinación produjo un efecto sinérgico con ambos agentes (Canti et al., 2010).

Cabe destacar que la inoculación intravenosa de células tratadas externamente en ratones sanos no es estrictamente comparable con el trasplante de médula ósea que reciben los pacientes con leucemia, en donde la administración de agentes antineoplásicos se realiza en forma sistémica. Sin embargo, el hecho de haber hallado infiltración leucémica en el SNC (cerebro) y en riñón en el grupo control, sugiere que este modelo murino podría ser potencialmente extrapolable al humano, ya que esos órganos



frecuentemente presentan IL en pacientes con leucemia (Barcos et al., 1987; Crazzolaria et al., 2001).

Teniendo en cuenta los resultados previamente descritos, tanto a nivel *in vitro*, como *in vivo*, queda en evidencia el beneficio de la utilización de TFD-ALA en combinación con DOX ó VCR, como un método eficaz para erradicar las células malignas durante el purgado de médula ósea en pacientes con leucemia, permitiendo la posibilidad de disminuir las dosis de quimioterapia, minimizando así sus limitaciones y efectos adversos.

**Tabla IV.2.** Porcentaje de animales que presentaron infiltración leucémica (IL) en al menos uno de sus órganos, en los distintos grupos de tratamientos. Se reporta el valor de P al comparar a los grupos entre sí, utilizando el test Chi Cuadrado de Pearson con la corrección de Yates. Se observan diferencias no significativas (NS), significativas (\*) y altamente significativas (\*\*), mientras que algunas comparaciones resultan no relevantes (NR).

	/ animales con IL	P				
		VS CONTROL	VS TFD	VS DOX	VS DOX+TFD	VS VCR
<b>CONTROL</b>	100					
<b>TFD</b>	100	NR				
<b>DOX</b>	50	0,1473 (NS)	0,3017 (NS)			
<b>DOX+TFD</b>	0	0,0047 (**)	0,0016 (**)	0,0528 (NS)		
<b>VCR</b>	50	0,1473 (NS)	0,3017 (NS)	NR	0,0730 (NS)	
<b>VCR+TFD</b>	0	0,0027 (**)	0,0009 (**)	0,0730 (NS)	NR	0,0528 (NS)

**Tabla IV.3.** Porcentaje de órganos que presentaron infiltración leucémica (IL) en los distintos grupos de tratamiento. Se reporta el valor de P al comparar los grupos entre sí, utilizando el test Chi Cuadrado de Pearson con la corrección de Yates. Se observan diferencias no significativas (NS), significativas (\*) y altamente significativas (\*\*), mientras que algunas comparaciones resultan no relevantes (NR).

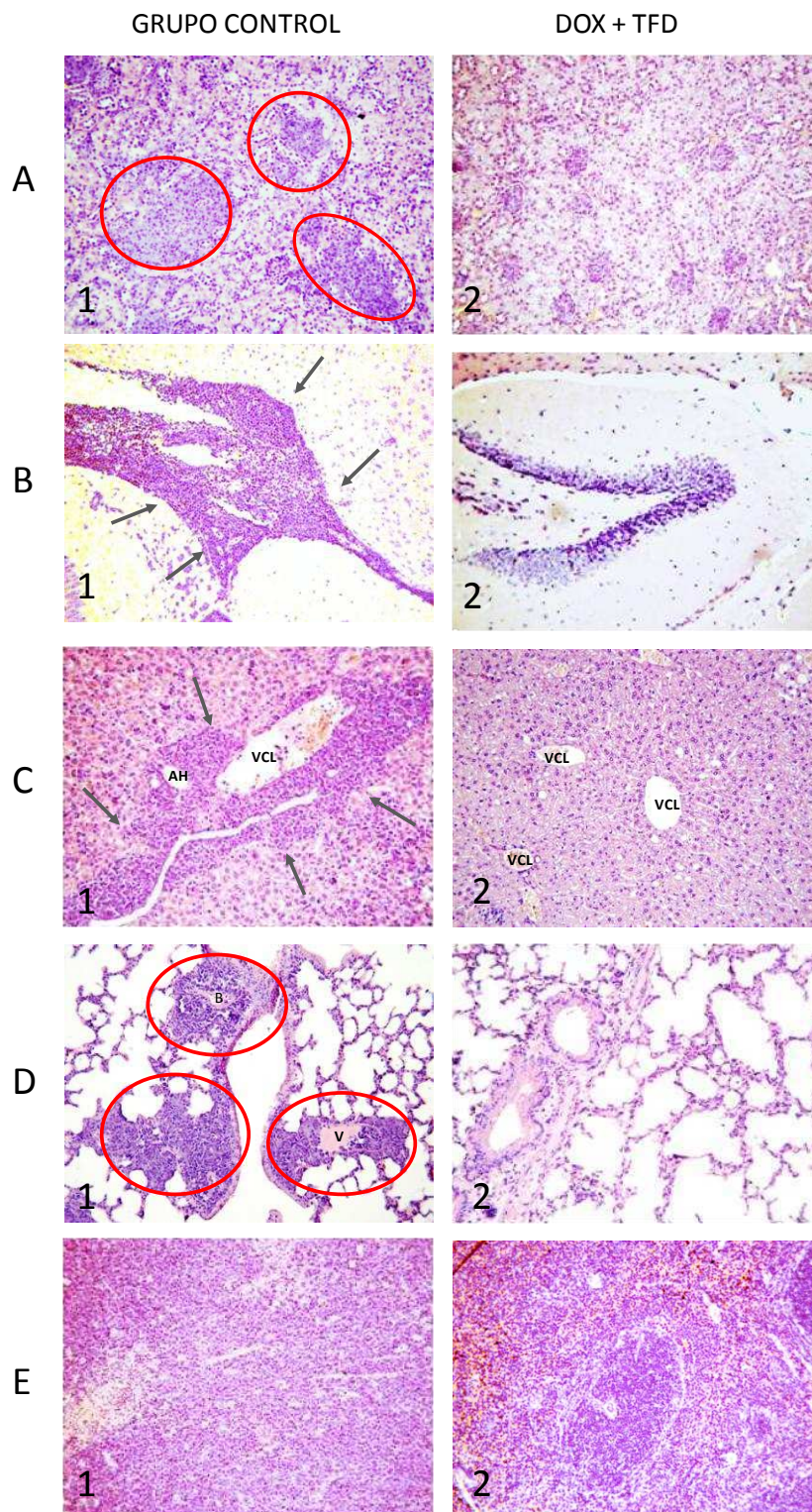
	/ órganos con IL	P				
		VS CONTROL	VS TFD	VS DOX	VS DOX+TFD	VS VCR
<b>CONTROL</b>	87,5					
<b>TFD</b>	50	0,105 (NS)				
<b>DOX</b>	25	0,0209 (*)	0,1056 (NS)			
<b>DOX+TFD</b>	0	0,0004 (**)	0,0209 (*)	0,0209 (*)		
<b>VCR</b>	75	0,5218 (NS)	0,3017 (NS)	0,3029 (NS)	0,0019 (**)	
<b>VCR+TFD</b>	0	0,0004 (**)	0,0209 (*)	0,1056 (NS)	NR	0,0019 (**)

**Tabla IV.4.** Porcentaje de órganos afectados con infiltración leucémica (IL) para los distintos grupos de tratamiento.

	/ de órganos afectados con IL							
LBR-	Timo	Pulmón	Corazón	Hígado	Bazo	Riñón	Ganglio	Cerebro
CONTROL	100	100	0	100	100	33,3	33,3	33,3
TFD	40	60	0	0	60	0	100	0
DOX	0	0	0	0	50	0	25	0
DOX+TFD	0	0	0	0	0	0	0	0
VCR	50	25	0	25	50	0	33,3	25
VCR +TFD	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla IV.5.** Evaluación semi-cuantitativa de la IL en cada órgano analizado para los distintos grupos de tratamiento, determinada mediante la tinción con H&E y análisis microscópico. Los resultados representan un promedio de los casos estudiados en cada grupo. Se determinaron los siguientes grados de IL: negativo (-), IL leve (+), moderada (++) ó intensa (+++).

	Timo	Pulmón	Corazón	Hígado	Bazo	Riñón	Ganglio	SNC
CONTROL	+++	++	-	+	++	+++	+++	+++
TFD	+	+	-	-	+	-	+	-
DOX	-	-	-	-	+++	-	++	-
DOX + TFD	-	-	-	-	-	-	-	-
VCR	+++	+	-	+	++	-	++	+
VCR + TFD	-	-	-	-	-	-	-	-



**Fig. IV.11.** Imágenes histológicas de riñón (A), cerebro (B), hígado (C), pulmón (D) y bazo (E), para los grupos control y DOX + TFD. Los preparados se tiñeron con H&E, como se detalla en M&M. Los círculos y las flechas indican los focos de infiltración leucémica (IL). En las imágenes de hígado se observan las venas centro-lobulillares (VCL) y la arteria hepática (AH).

## Conclusiones

### *Experimentos in vitro*

- En la línea celular sensible a drogas LBR-, se observó un efecto sinérgico sobre la muerte celular al utilizar la TFD-ALA en combinación con las drogas de quimioterapia DOX y VCR.
- Si bien las líneas celulares resistentes LBR-D160 y LBR-V160 respondieron a la TFD-ALA, no se observó un beneficio significativo al ser tratadas con las terapias combinadas.
- Los estudios morfológicos y bioquímicos sobre la muerte celular indican que el principal mecanismo de muerte al utilizar las terapias combinadas es la apoptosis, y ésta se vio significativamente incrementada con respecto a las terapias en forma independiente (TFD, DOX ó VCR).
- Se observó un incremento en el daño oxidativo al utilizar la combinación de terapias, tanto en la producción de  $O_2^-$  como en la despolarización de la membrana mitocondrial.

### *Experimentos in vivo*

- En los grupos de animales tratados con las terapias en forma independiente (TFD, DOX ó VCR), se observó un menor grado de IL que en el grupo control, demostrando la validez de estos experimentos.
- No se encontró IL en ningún otro órgano de los animales tratados con las terapias combinadas, demostrando el beneficio de estas últimas.

---

## Bibliografía

- Anand S, Honari G, Hassan T, Elson P, Maytin EV. Low-dose methotrexate enhances aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(10):3333-43.
- Barcos M, Lane W, Gomez GA, Han T, Freeman A, Preisler H, Henderson E. An autopsy study of 1206 acute and chronic leukemias (1958 to 1982). *Cancer.* 1987; 60: 827–837.
- Busch TM, Hahn SM. Multidrug resistance in photodynamic therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2005;4(2):195-6.
- Capella MA, Capella LS. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(4):361-6.
- Carter, WO, Narayanan, PK., and Robinson, JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukocyte Bio.* 1994; 55: 253-8.
- Canti G, Calastretti A, Bevilacqua A, Reddi E, Palumbo G, Nicolin A. Combination of photodynamic therapy + immunotherapy + chemotherapy in murine leukemia. *Neoplasma.* 2010; 57(2):184-8.
- Canti, B., Nicolin, A., Cubeddu, R., Taroni, P., Bandieramonte, G., and Valentini, G. Antitumor efficacy of the combination of photodynamic therapy and chemotherapy in murine tumors. *Cancer Lett.* 1998; 125: 39–44.
- Casas A, Fukuda H, Batlle AM del C. Potentiation of the 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy with cyclophosphamide. *Cancer Biochem. Biophys.* 1998; 16: 183-96.
- Casas A, Fukuda H, Riley PA, Batlle AM del C. Enhancement of aminolevulinic acid based photodynamic therapy by adriamycin. *Cancer Letters* 1997; 121: 105-3.
- Chu ES, Yow CM, Shi M, Ho RJ. Effects of photoactivated 5-aminolevulinic acid hexyl ester on MDR1 over-expressing human uterine sarcoma cells. *Toxicol. Lett.* 2008; 181(1):7-12.
- Crazzolara R, Kreczy A, Mann G, Heitger A, Eibl G, Fink FM, Möhle R, Meister B. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2001; 115(3):545-53.
- Cutts SM, Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR. Recent advances in understanding and exploiting the activation of anthracyclines by formaldehyde. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* 2005; 5: 431–47
- Devetten M, Armitage JO. Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. *Ann. Oncol.* 2007; 18(9):1450-6.

Diez B, Cordo Russo R, Teijo MJ, Hajos S, Batlle A, Fukuda H. Ros production by endogenously generated Protoporphyrin IX in murine leukemia cells. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2009; 55(2):15-9.

Eden TO, Pieters R, Richards S. Systematic review of the addition of vincristine plus steroid pulses in maintenance treatment for childhood acute lymphoblastic leukaemia - an individual patient data meta-analysis involving 5,659 children. *Br. J. Haematol.* 2010; 149(5):722-33.

Feuerstein T, Berkovitch-Luria G, Nudelman A, Rephaeli A, Malik Z. Modulating ALA-PDT efficacy of mutlidrug resistant MCF-7 breast cancer cells using ALA prodrug. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011; 10(12):1926-33.

Kirveliėne V, Grazeleėne G, Dabkeviėiene D, Micke I, Kirvelis D, Juodka B, idziapetriėne J. Schedule-dependent interaction between Doxorubicin and mTHPC-mediated photodynamic therapy in murine hepatoma in vitro and in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006; 57(1):65-72.

Kostrzewa-Nowak D, Paine MJ, Wolf CR, Tarasiuk J. The role of bioreductive activation of doxorubicin in cytotoxic activity against leukaemia HL60-sensitive cell line and its multidrug-resistant sublines. *Br. J. Cancer.* 2005; 93:89-97.

Li W, Zhang WJ, Ohnishi K, Yamada I, Ohno R, Hashimoto K. 5-Aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in multidrug resistant leukemia cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001; 60(2-3):79-86.

Lopes EL, Scolnik M, Alvarez E, Hajos E. Modulatory activity of PSC 833 and cyclosporin-A in vincristine and doxorubicin-selected multidrug resistant murine leukemic cells. *Leukemia Research* 2001; 25:85-93.

Meininger V, Binet S, Chaineau E, Fellous A. In situ response to vinka alkaloids by microtubules in cultured post-implanted mouse embryos. *Biol. Cell* 1990; 68(1):21-9.

Peters W, Hamm C, Baynes R. Principles of bone marrow transplantation. En: Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, editors. *Cancer Medicine 5<sup>th</sup> edition, 2000. Hamilton (ON) BC Decker:* 18 (67):890-910.

Peterson CM, Shiah JG, Sun Y, Kopecková P, Minko T, Straight RC, Kopecek J. HPMA copolymer delivery of chemotherapy and photodynamic therapy in ovarian cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 519:101-23.

Reiter A. Leukemia in children. *Kinderkrankenschwester.* 1994; 13(8):254-8.

Sinha AK, Anand S, Ortel BJ, Chang Y, Mai Z, Hassan T, Maytin EV. Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. *Br. J. Cancer* 2006; 95(4):485-95.

Snyder JW, Greco WR, Bellnier DA, Vaughan L, Henderson BW. Photodynamic therapy: a means to enhanced drug delivery to tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(23):8126-31.

Tang PM, Zhang DM, Xuan NH, Tsui SK, Waye MM, Kong SK, Fong WP, Fung KP. Photodynamic therapy inhibits P-glycoprotein mediated multidrug resistance via JNK activation in human hepatocellular carcinoma using the photosensitizer pheophorbide a. *Mol. Cancer*. 2009; 8:56.

Teiten MH, Bezdetnaya L, Merlin JL, Bour-Dill C, Pauly ME, Dicato M, Guillemin F. Effect of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-mediated photodynamic therapy on sensitive and multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2001; 62(3):146-52.

Tsai T, Hong RL, Tsai JC, Lou PJ, Ling IF, Chen CT. Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. *Lasers Surg. Med*. 2004; 34(1):62-72.

Xie Q, Jia L, Liu YH, Wei CG. Synergetic anticancer effect of combined gemcitabine and photodynamic therapy on pancreatic cancer in vivo. *World J. Gastroenterol*. 2009; 15(6):737-41.

Zimmermann A, Walt H, Haller U, Baas P, Klein SD. Effects of chlorin-mediated photodynamic therapy combined with fluoropyrimidines in vitro and in a patient. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2003; 51(2):147-54.



## CONCLUSIONES GENERALES

- Los estudios de síntesis y distribución de porfirinas endógenas a partir de ALA demostraron que en las tres líneas celulares empleadas, LBR-, LBR-D160 y LBR-V160, la síntesis de PpIX aumentó en función de la concentración y del tiempo de incubación con ALA, siendo mayor en la línea LBR-V160. La localización intracelular de PpIX se observó principalmente en mitocondrias.
- Se demostró la eficacia de la TFD-ALA, tanto en la línea sensible, como en las líneas resistentes a drogas. Esto último indica que TFD-ALA constituye una posible alternativa de tratamiento para los fenotipos resistentes a drogas.
- En las tres líneas celulares empleadas se observó que la TFD-ALA induce estrés oxidativo asociado principalmente al daño mitocondrial, evidenciado mediante la despolarización de la membrana mitocondrial y el aumento en la producción de  $^1\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ , ambas moléculas producidas fundamentalmente en la mitocondria.
- Los estudios morfológicos y bioquímicos sobre la muerte celular demostraron que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte involucrado en la TFD-ALA tanto en la línea sensible LBR- como en las líneas resistentes a drogas LBR-D160 y LBR-V160. La inducción de apoptosis se manifestó en forma temprana luego del tratamiento, indicando el rápido efecto de la TFD.
- Se observó la pérdida de la integridad mitocondrial a nivel morfológico, la liberación de citocromo c hacia el citosol, la disminución en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y del precursor de caspasa -3 y la ausencia en la expresión de caspasa -8, indicando un rol fundamental de la vía apoptótica intrínseca en el proceso de muerte celular.

- El estudio de las terapias combinadas: DOX + TFD-ALA ó VCR + TFD-ALA, demostró un significativo beneficio de estas combinaciones con respecto a cada terapia en forma independiente, tanto en un modelo *in vitro*, como en un modelo *in vivo*. Los animales inoculados con células que fueron tratadas previamente con las terapias combinadas no presentaron infiltración leucémica en ninguno de los órganos analizados.

## CONCLUSIÓN FINAL

Teniendo en cuenta la necesidad de contar con nuevos métodos para el purgado de la médula ósea durante el trasplante autólogo de la misma en pacientes con leucemia, en esta tesis se estudiaron los efectos de la TFD-ALA en un modelo *in vitro in vivo* de leucemia murina.

Los resultados hallados indican que la terapia es efectiva tanto en células sensibles como resistentes a drogas de quimioterapia, indicando el potencial beneficio de utilizar la TFD-ALA durante el proceso de purgado, especialmente para eliminar fenotipos resistentes a drogas.

Por otra parte se encontró que la utilización de TFD-ALA en combinación con DOX ó VCR, es sumamente importante, pues permite reducir las dosis de drogas utilizadas en la quimioterapia, eliminando así sus limitaciones y efectos adversos.