

## Tesis Doctoral

# Terapia fotodinámica a partir de ALA: acerca de estrategias para aumentar su eficacia y selectividad

Perotti, Christian Pablo

2004

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](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 Master's and 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:**

Perotti, Christian Pablo. (2004). Terapia fotodinámica a partir de ALA: acerca de estrategias para aumentar su eficacia y selectividad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3694\\_Perotti](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3694_Perotti)

**Cita tipo Chicago:**

Perotti, Christian Pablo. "Terapia fotodinámica a partir de ALA: acerca de estrategias para aumentar su eficacia y selectividad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3694\\_Perotti](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3694_Perotti)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y**  
**NATURALES**

**“Terapia Fotodinámica a partir de ALA: acerca  
de estrategias para aumentar su eficacia y  
selectividad”**

**CHRISTIAN PABLO PEROTTI**

**№3694**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE PORFIRINAS Y  
PORFIRIAS**  
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y  
TECNICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES –  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Directora: Prof. Dra. Alcira M. Del C. Batlle de Albertoni.  
Co-Directora: Dra. Adriana Gabriela Casas.

Tesis Doctoral

**“Terapia Fotodinámica a partir de ALA: acerca  
de estrategias para aumentar su eficacia y  
selectividad”**

**CHRISTIAN PABLO PEROTTI**

Bueno Aires, 2004

AGRADECIMIENTOS.....	I
ABREVIATURAS.....	II
OBJETIVOS.....	III

## **INTRODUCCIÓN**

<b>I. Las porfirinas y el camino metabólico del hemo.</b>	
I.1. Las porfirinas. Generalidades.....	1-2
I.2. Biosíntesis del hemo.....	2-4
<b>II. Terapia fotodinámica del cáncer.</b>	
II.1. Introducción.....	5-6
II.2. Su historia.....	7
II.3. Fotoquímica.....	7-9
II.4. Las porfirinas en la fotodetección de tumores y como fotosensibilizantes.....	10-11
II.5. Mecanismos de acumulación de las porfirinas en los tumores.....	11-12
II.6. Sitios celulares y subcelulares blancos de la TFD.....	12-14
II.7. Otras Aplicaciones de la TFD.....	14-15
<b>III. Terapia fotodinámica a partir de ALA.</b>	
III.1. Introducción.....	16-17
III.2. Selectividad de tejidos por la PPIX inducida a partir de ALA .....	17
III.3. Vías de administración.....	17-18
III.3.1. Penetración del ALA a través de la piel.....	18-20
III.4. Usos del ALA en la TFD y en la fotodetección .....	21-22
<b>IV. Derivados del ALA.</b>	
IV.1. Introducción.....	23
IV.2. La membrana celular como factor limitante en la penetración de los derivados de ALA.....	24-25
IV.3. La piel como barrera para la absorción de ALA y sus derivados.....	25-29
IV.4. Usos de derivados de ALA en la fotodetección y la TFD en cáncer de vejiga.....	29
IV.5. Actividad específica de esterasas.....	30-32
IV.6. Actividad de amino peptidasas en el clivaje de derivados.....	32-34

<b>V. Liposomas.</b>	
V.1. Introducción.....	35-38
V.2. Liposomas y cáncer.....	38-39
V.3. Liposomas en la TFD.....	39-40
V.4. ALA y liposomas.....	40
<b>VI. Scavengers de radicales libres.</b>	
VI.1. Introducción.....	41-43
VI.2. Defensas antioxidantes.....	43-45
VI.3. ROS en la TFD.....	45-46
<b>VII. Referencias.....</b>	<b>47-66</b>

## **MATERIALES Y METODOS**

<b>I.</b>	<b>Drogas.....</b>	<b>67</b>
<b>II.</b>	<b>Síntesis de derivados.....</b>	<b>68-69</b>
<b>III.</b>	<b>Cultivo de líneas celulares.....</b>	<b>70</b>
	III.1.Extracción de porfirinas en células. ....	70
	III.2.Ensayo de viabilidad por MTT.....	70
	III.3.Determinación del número de células. ....	71
	III.4.Tratamiento fotodinámico de líneas celulares.....	71
	III.5. Análisis de fragmentación de ADN en células tratadas con ALA y He-ALA TFD.....	71
	III.6. Determinación de ALA o derivados de ALA y PBG en células.....	72
	III.7. Separación de ALA, THP-ALA y He-ALA acumulado en células mediante cromatografía en columna de intercambio iónico.....	72-73
<b>IV.</b>	<b>Animales.....</b>	<b>74</b>
	IV.1. Inoculación subcutánea de tumor M2.....	74
	IV.2. Inducción química de papilomas en ratones SENCAR.....	74
	IV.3. Administración de ALA y derivados.....	75
	IV.3.1.Preparación y aplicación tópica de las formulaciones de ALA y He-ALA en ratones portadores de tumor.....	75-76
	IV.3.2. Preparación y administración de ALA y derivados en ratones BALB/C portadores de adenocarcinoma M2.....	76
	IV.4. Extracción de Porfirinas de los tejidos.....	76
	IV.5. Determinación de Ala , He-ALA y PBG en los tejidos. ....	76-77
<b>V.</b>	<b>Cultivo de explantes de tejidos.....</b>	<b>78</b>
	V.1. Tratamiento fotodinámico de explantes.....	78
	V.2. Preparación de liposomas.....	78-79
	V.3. Microscopia óptica y electrónica.....	79
<b>VI.</b>	<b>Cultivo de esplenocitos.....</b>	<b>80</b>

VI.1. Aislamiento de esplenocitos.....	80
VI.2. Activación de linfocitos.....	80
VI.3. Tratamiento fotodinámico de linfocitos.....	80
VI.4. Determinación de actividades enzimáticas.....	81
VI.5. Contenido de Proteínas .....	81
VI.6. Contenido de glutatión en linfocitos.....	81
<b>VII. Preparación y utilización de scavengers.....</b>	<b>82</b>
<b>VIII. Fuentes de luz.</b>	
VIII.1. Láser .....	83
VIII.2. Lámparas.....	83
<b>IX. Análisis estadístico.....</b>	<b>84</b>
<b>X. Referencias.....</b>	<b>85-86</b>

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

- I. Eficiencia en la síntesis de porfirinas *in vitro*, utilizando ALA y HE-ALA.**
  - I.1. Dependencia de la síntesis de porfirinas con el número de células, tiempo de incubación y concentración de ALA o He-ALA.....87-89
  - I.2. Citotoxicidad inducida por la TFD a partir de ALA o He-ALA.....90-91
  - I.3. Evidencia de apoptosis en células LM2 tratadas con TFD a partir de ALA o He-ALA.....91-93
  - I.4. Discusión.....93-95
- II. Síntesis de porfirinas en explantes de tumor M2 expuestos a ALA o He-ALA, libre y liposomal.**
  - II.1. Síntesis de porfirinas en función de la dosis de ALA o He-ALA.....96-99
  - II.2. Daño fotodinámico a partir de ALA y He-ALA, libre y liposomal en explantes de tumor M2. Estudios histológicos.....100-104
  - II.3. Discusión.....105-106
- III. Experiencias *in vitro* con citoprotectores contra el daño fotodinámico a partir de ALA en la línea celular LM2.....107-115**
  - III.1. Discusión.....116-118
- IV. TFD en Linfocitos Activados y en Reposo.**
  - IV.1. Síntesis de porfirinas en linfocitos activados y en reposo.....119-122
  - IV.2. Respuesta de los linfocitos activados y en reposo al ALA-TFD.....123-126
  - IV.3. Respuesta antioxidante de células sobrevivientes al ALA-TFD.....126-129
  - IV.4. Discusión.....130-132
- V. Aplicación de ALA y He-ALA en forma tópica en tumor M2 implantado en ratones en forma subcutánea.**
  - V.1. Síntesis de porfirinas en función de la dosis de ALA o He-ALA.....133-138
  - V.2. Síntesis de porfirinas en función del tiempo.....138-140
  - V.3. Discusión.....141-142
- VI. Topicación de ALA o He-ALA en papilomas generados químicamente.....143-150**
  - VI.1. Discusión.....151-153



<b>VII. Experiencias <i>in vivo</i> con ALA y He-ALA aplicados en distintas vías y distintos vehículos.</b>	
VII.1. Acumulación de porfirinas en diferentes tejidos luego de la administración i.p. de ALA o He-ALA en ratones portadores de tumor M2.....	154-160
VII.2. Síntesis de porfirinas a partir de ALA y He-ALA, en cultivos de explantes de órganos como medida de la actividad esterasa.....	161
VII.3. Comparación en la síntesis de porfirinas luego de la administración de ALA o He-ALA en ratones portadores de tumor M2.....	162
VII.4. Acumulación de ALA y He-ALA en cerebro luego de la administración i.p. de ambas drogas.....	162-163
VII.5. Discusión.....	163-164
<b>VIII. Síntesis de porfirinas y TFD a partir de ALA y sus ésteres derivados de cadena larga.</b>	
VIII.1. Síntesis de porfirinas en función de la dosis de ALA o sus derivados.....	165-166
VIII.2. Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación con ALA y sus derivados.....	167
VIII.3. Citotoxicidad celular inducida por la TFD a partir de ALA y sus derivados.....	168-170
VIII.4. Acumulación de ALA y PBG intracelular a partir de los distintos compuestos.....	171-172
VIII.5. Comparación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA y sus derivados en explantes de tumor LM3.....	172-173
VIII.6. Síntesis de porfirinas <i>in vivo</i> , luego de la aplicación sistémica de ALA o sus derivados en ratones portadores de tumor LM3.....	173-174
VIII.7. Discusión.....	174-177
VIII.8. Referencias.....	178-183

CONCLUSIONES GENERALES.....	184-186
CONCLUSION FINAL.....	187

## *Agradecimientos*

Principalmente a la Dra. Alcira Batlle, por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de un grupo de trabajo muy humano y procurar que siempre pudiera realizar todos nuestros proyectos.

A la Dra. Adriana Casas, por brindarme todo su apoyo, confianza y amistad. Por su notable desempeño en la coordinación del trabajo y por enseñarme a transitar esta carrera compartiendo toda su experiencia. A la Dra. Haydée Fukuda por haberme ayudado en todo lo que necesitara.

A Gabriela Di Venosa por su valiosa colaboración en este último año de trabajo. A mis compañeros y amigos de trabajo, Fabiana Caballero, Laura Varela, Marcelo Guolo por brindarme su ayuda en todo lo que les fuera posible y hacer del ámbito laboral un lugar mucho más agradable.

A todo el grupo que conforma el CIPYP por estar conmigo y acompañarme en los momentos difíciles que me tocaron vivir estos últimos meses.

A mis familiares y amigos que estuvieron siempre conmigo y me apoyaron durante todo este tiempo.

## *Abreviaturas*

$\cdot\text{OH}$  = Radical hidroxilo

ALA = Ácido 5-Aminolevúlico

CAT = Catalasa

Con A = Concanavalina A

DMSO = Dimetil Sulfóxido

EDTA = Etilen diamino tetracético

GPx = Glutación Peroxidasa

GSH = Glutación reducido,

GSSG = Glutación oxidado.

He-ALA = Hexil ALA

HpD = Derivado de Hemato porfirina

MEM = Medio mínimo esencial

NAC = N-acetil-L-cisteína

PBS= Buffer fosfato salino

PPIX = Protoporfirina IX

ROS = Especies Reactivas de Oxígeno

SAM = S-adenosil-L-metionina

SDS = Dodecil sulfato de sodio

SOD =Superóxido Dismutasa

TFD = Terapia Fotodinámica

THP-ALA = Tetrahidro piranil ALA

UND-ALA = Undecanoil ALA

$^1\text{O}_2$  = Oxígeno singulete

## Objetivos

- ❖ Estudiar la síntesis de porfirinas *in vitro* a partir del ácido aminolevúlico (ALA) o su derivado ALA hexil éster (He-ALA) y otros ésteres derivados en forma libre y encapsulados en liposomas, y evaluar su eficacia como profotosensibilizantes.
- ❖ Estudiar mediante microscopía la posible existencia de blancos subcelulares diferenciales debido al uso de liposomas.
- ❖ Estudiar la importancia de la vehiculización del ALA y He-ALA *in vivo*, así como la importancia de las distintas vías de administración. Evaluar la eficacia para alcanzar el tejido blanco tanto del ALA como del He-ALA. Con el fin de aumentar la eficacia de la terapia fotodinámica, evaluar y comparar el patrón de distribución y producción de tetrapirroles a partir de ALA o su derivado en ratones portadores de tumor, tanto en el tumor como en los órganos más relevantes que pudieran verse afectados luego del tratamiento con terapia fotodinámica (TFD).
- ❖ Empleando diferentes ésteres derivados de ALA con el objetivo de incrementar la penetración en las células tumorales, evaluar su eficacia como profotosensibilizantes *in vitro* e *in vivo* y estudiar la disponibilidad de ALA intracelular, proveniente de ALA o sus derivados y la actividad de las esterasas en tumor frente a las distintas pro-drogas.
- ❖ Elucidar los mecanismos de muerte celular mediada por el tratamiento fotodinámico, para poder modularlos y así mejorar el tratamiento fotodinámico y evitar los efectos secundarios producidos por esta proteger las células no tumorales. Evaluar la capacidad de protección de algunos scavengers de radicales libres, antioxidantes, y compuestos sulfurados, así como también establecer el rol de las modificaciones en el contenido de tioles intracelulares en cultivos de células tratadas con ALA-TFD.

Los resultados de las experiencias realizadas en esta tesis han sido publicados o enviados para su publicación según se detalla:

- ◆ **“Porphyrin synthesis from ALA derivatives for Photodynamic therapy. *In vitro* and *in vivo* studies.”** Perotti C., Fukuda H., DiVenosa G., MacRobert A., Batlle A. & Casas A. *Br. J. Cancer*, (2004) en prensa.
- ◆ **“Topical application of ALA and ALA hexyl ester on a subcutaneous mammary adenocarcinoma: tissue distribution.”** Perotti C., Casas, A., Fukuda H., Sacca P. & Batlle A.. *Br. J. Cancer*, **88**: (2003) 432-437.
- ◆ **“ALA and ALA hexyl ester-induction of porphyrins after their systemic administration to tumour bearing mice.”** Perotti C., Casas, A., Fukuda H., Sacca P., Batlle A.. *Br. J. Cancer*, **87**: (2002) 790-795.
- ◆ **“Photodynamic Therapy of activated and resting lymphocytes and its antioxidant adaptive response”.** Casas A., Perotti C., Fukuda H. & Batlle A.. *Lasers Med. Sci.*, **17**: (2002) 42-50.
- ◆ **“ALA and ALA hexyl ester in free and liposomal formulations for the photosensitisation of tumour organ cultures.”** Casas A., Perotti C., M. Saccoliti, Sacca P., Fukuda H. & Batlle A. *Br. J. Cancer*, **86**: (2002) 837-842.
- ◆ **“Scavengers Protection of Cells Against ALA-based Photodynamic Therapy-induced Damage.”** Perotti C., Fukuda H., Casas A. & Batlle A. *Lasers Med. Sci.*, **17**: (2002) 222–229
- ◆ **“ALA and ALA hexyl ester-induced porphyrin synthesis in chemically induced skin tumours: the role of different vehicles on improving photosensitization.”** Casas A, Perotti C, Fukuda H, Rogers L, Butler AR, Batlle A. *Br. J. Cancer.*, **85**: (2001) 1794-800.

# **INTRODUCCIÓN**

# **I. LAS PORFIRINAS Y EL CAMINO METABÓLICO DEL HEMO.**

## **I.1. Las porfirinas. Generalidades.**

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

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

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

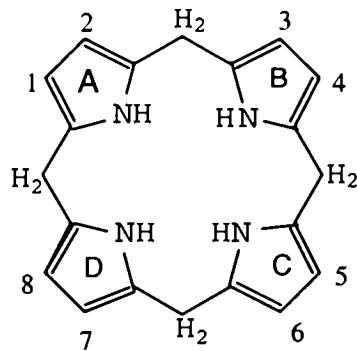
Las porfirinas pueden combinarse fácilmente con metales, dando lugar a quelatos con gran importancia biológica, como la hemoglobina y mioglobina (con hierro ferroso), las clorofilas (con magnesio), los citocromos (contienen hierro capaz de oxidarse y reducirse) y las corrinas (con cobalto).

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

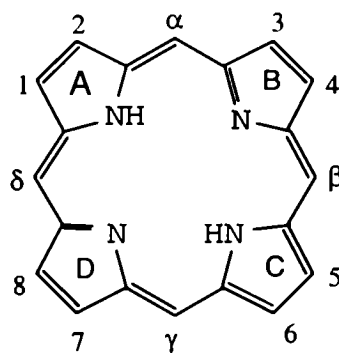
Cuando cambia la valencia de los metales de transición a los que se encuentran unidas, las porfirinas pueden controlar el desplazamiento de electrones y así aumentar la eficiencia de las reacciones de oxido-reducción. Es por eso que las porfirinas han tenido un rol fundamental en la ontogénesis de la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

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





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



***Figura I.1b: Núcleo de porfirinógeno.***

## I.2. Biosíntesis del hemo.

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

El primer paso es la condensación de la glicina con el succinil CoA, ambas moléculas derivadas del ciclo de Krebs, para formar ácido 5-aminolevúlico (ALA), catalizado por la enzima ALA sintetasa (ALA-S), usando fosfato de piridoxal como cofactor.

Esta es la reacción limitante en la biosíntesis del hemo, y es regulada por el pool de hemo libre intracelular. La formación del ALA ocurre en la mitocondria y luego, por

transporte activo, es trasladado al citoplasma (Batlle, 1997), donde la enzima ALA dehidrasa (ALA-D) condensa y cicla dos moléculas del sustrato para dar lugar a la formación del primer intermediario aromático, el monopirrol porfobilinógeno (PBG).

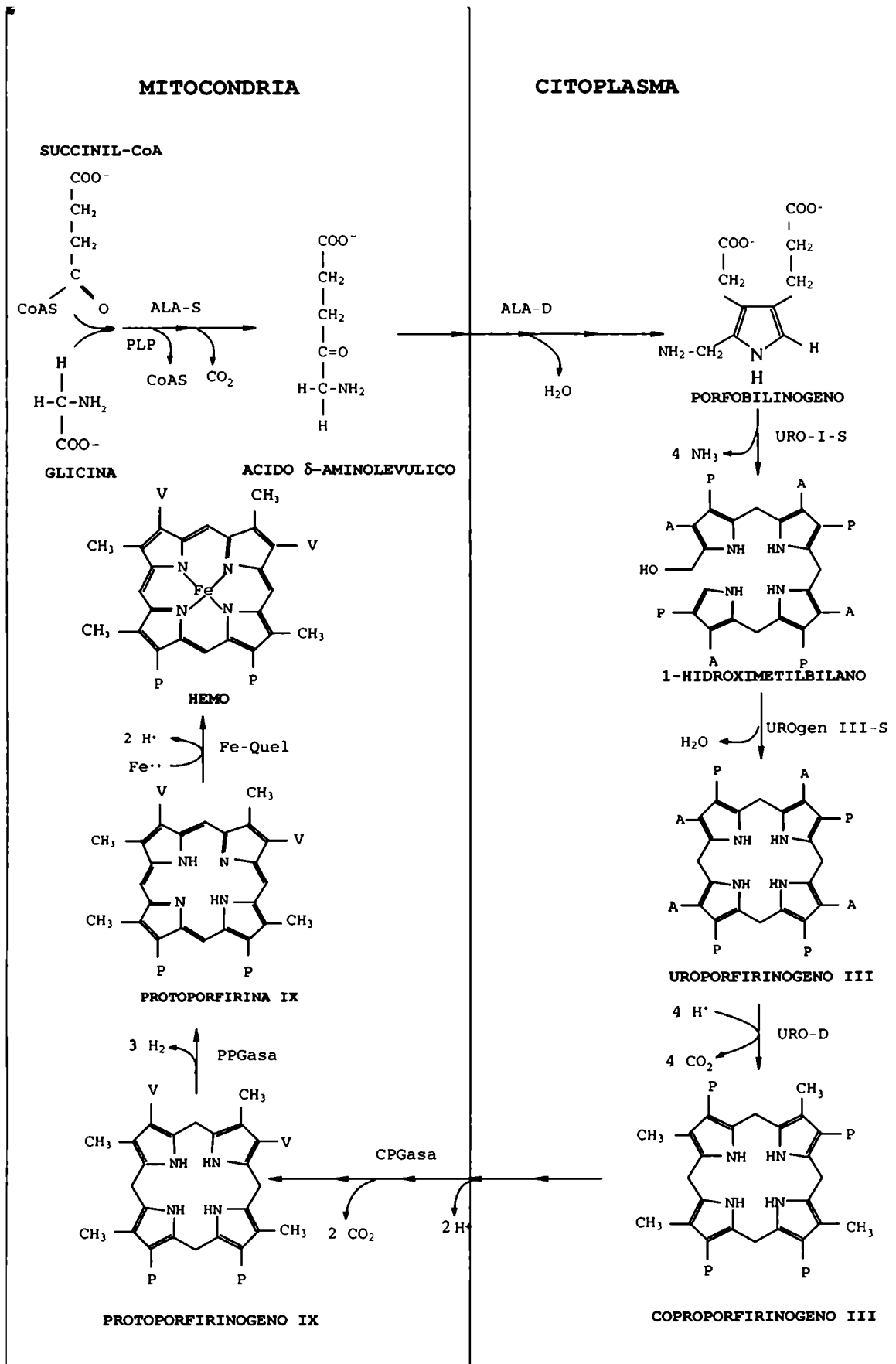
En el paso siguiente se condensan cuatro moléculas de PBG, reacción catalizada por la PBG deaminasa (URO-I-S), formando el tetrapirrol lineal hidroximetilbilano, que luego es isomerizado y ciclado por la isomerasa (UROgen III-S) para formar uroporfirinógeno III (Urogen III).

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

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

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

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



**Figura 1.2: Camino Biosintético del Hemo**

## **II. TERAPIA FOTODINÁMICA DEL CÁNCER**

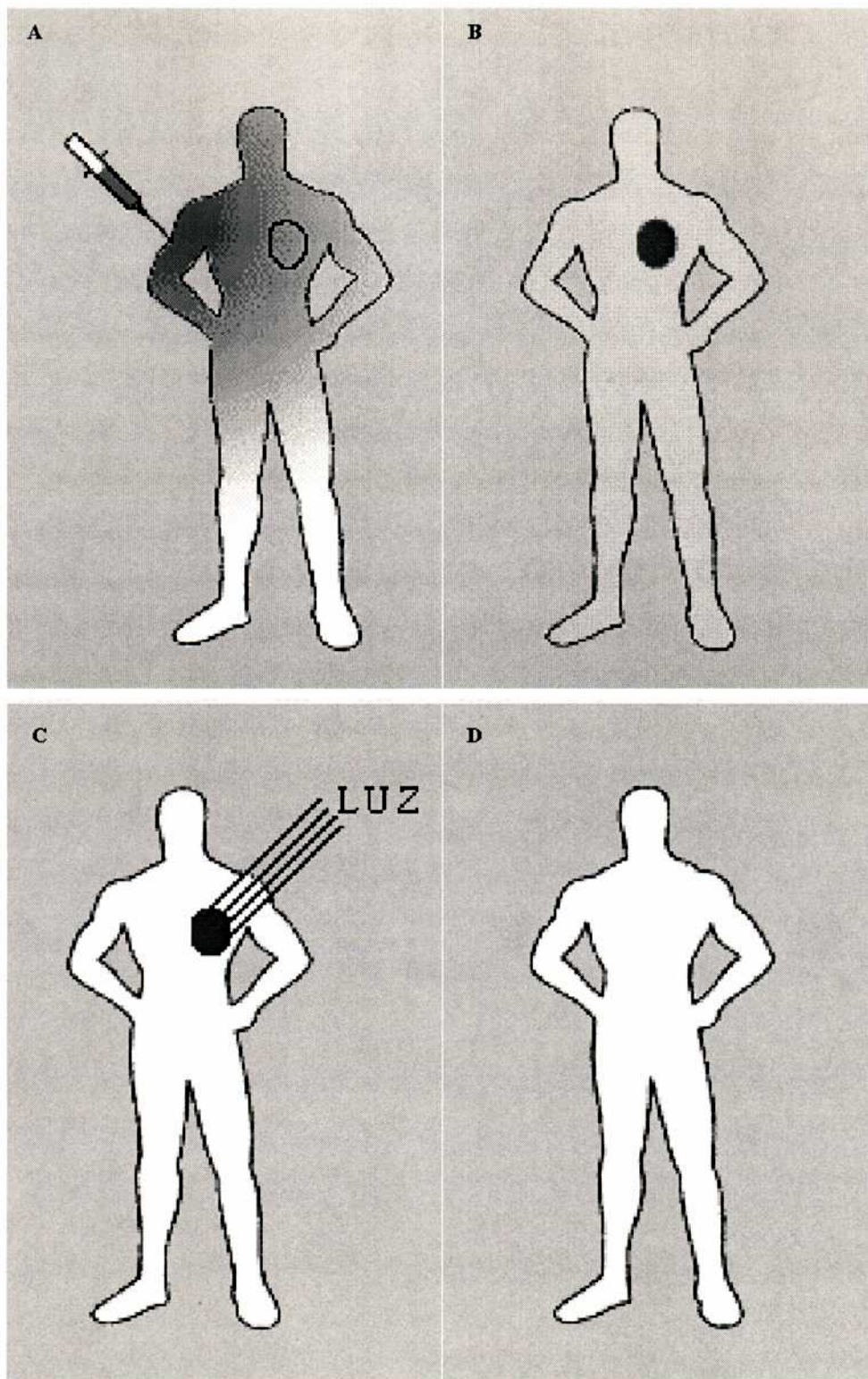
### **II.1. Introducción.**

La Terapia Fotodinámica (TFD), es un tratamiento para el cáncer, originado en el descubrimiento de que ciertos tipos de compuestos, llamados agentes fotosensibilizantes, podían matar a un organismo unicelular cuando éstos eran expuestos a la luz.

A través de la combinación de la luz con el fotosensibilizante esta terapia destruye las células tumorales, lo que da lugar a una reacción fotoquímica, mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS), que resultan citotóxicas para el tejido tumoral (figura II.1).

Como tratamiento antineoplásico es sumamente prometedor para tumores superficiales localizados o sólidos, y se basa en la acumulación preferencial del fotosensibilizante en el tejido maligno luego de su administración, generalmente sistémica.

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



***Figura II.1: Principios básicos de la Terapia Fotodinámica.***

*(a) administración del fotosensibilizante, (b) acumulación del fotosensibilizante en el tejido tumoral, (c) irradiación con luz y (d) remisión del tejido tumoral.*

## **II.2. Su historia.**

La primera observación de fotosensibilización química de un tejido fue descrita por Raab (1900). Poco tiempo después Tappeiner y Jesionek (1903) usaron eosina aplicada tópicamente y luz solar para tratar pacientes con cáncer de piel, creando así el concepto básico de la TFD. Diez años más tarde, Meyer-Betz (1913) se autoadministró Hematoporfirina con el objeto de determinar sus efectos biológicos.

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

Lipson y col. en 1961 mejoraron la localización tumoral del fotosensibilizante mediante acetilación y posterior reducción de la preparación cruda, obteniendo el Derivado de Hematoporfirina (HpD). El hallazgo del HpD como un efectivo fotosensibilizante tumoral y el posterior desarrollo de equipos láser adecuados y sistemas ópticos de transmisión de la luz, llevaron al desarrollo de la TFD durante la década del '70. Inicialmente, el principal interés en el uso del HpD se concentró en la detección y localización de tumores durante la exposición de los tejidos a una luz de longitud de onda corta en el visible, o ultravioleta. Diamond y col. (1972) evaluaron los efectos terapéuticos en gliomas murinos irradiando a longitudes de onda más largas, en tanto que Dougherty y col. (1975) realizaron los primeros estudios de TFD en tumores animales. El primer caso clínico de TFD fue en un paciente con cáncer de vejiga, a quien se le administró HpD y se lo sometió a una irradiación transuretral (Kelly & Snell, 1976). Desde entonces, ha habido un creciente interés en esta nueva terapia, con una gran cantidad de estudios experimentales y clínicos en distintos tipos de tumores con localizaciones diversas.

## **II.3. Fotoquímica.**

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.

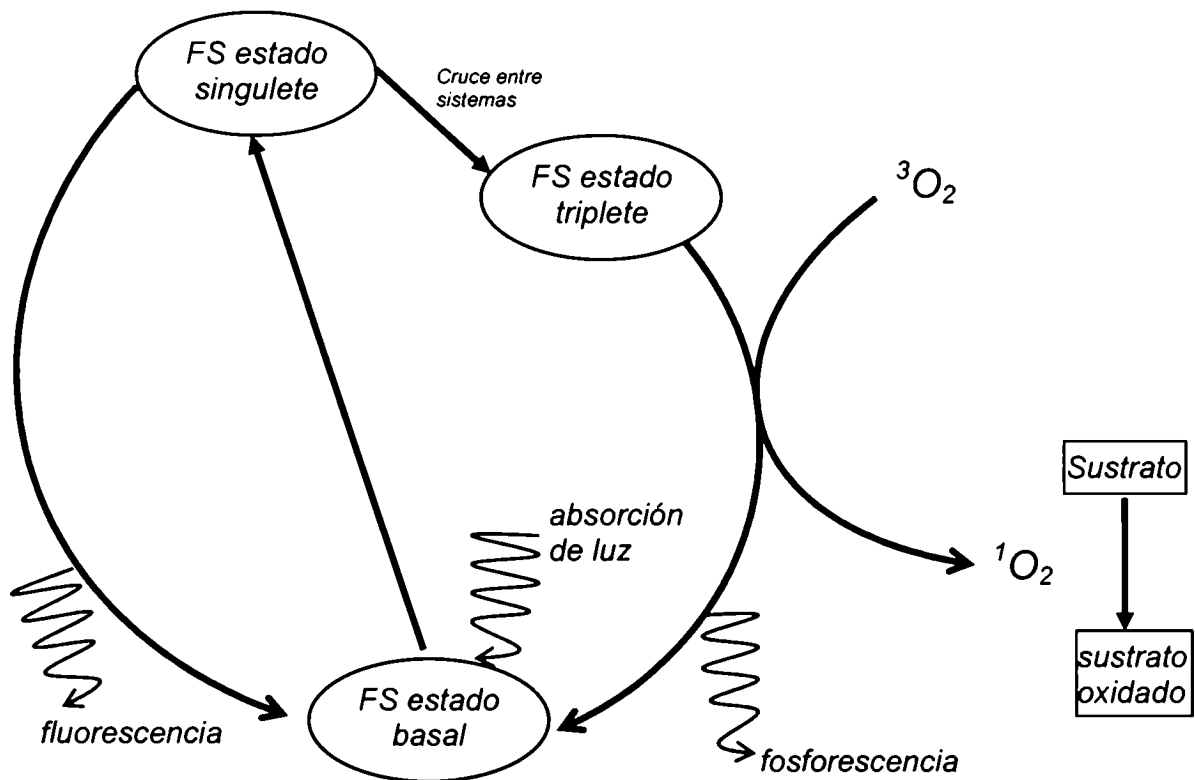
La llamada “ventana fototerapéutica” de los fotosensibilizantes, va desde los 600 a los 1000 nm, en ese rango la luz tiene muy baja dispersión en los tejidos, y además la absorción por parte de otras biomoléculas es escasa. Como la penetración de la luz en los

tejidos aumenta con longitudes de onda mayores (Van Gemert y col., 1985; Wilson, 1989) generalmente se usa la banda de absorción más débil que es la de 630 nm para irradiar, lo que permite una mayor penetración de la luz.

El efecto inicial de la TFD es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) catalizadas por la luz, principalmente el radical oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) a partir del oxígeno disponible en los tejidos (Weishaupt y col., 1976), esto sería lo que lleva al daño tisular inducido por la TFD. También se observó que la presencia de secuestrantes de oxígeno singulete suprimían los efectos fototóxicos (Valenzeno, 1987).

La activación del oxígeno puede ocurrir por dos mecanismos diferentes: la absorción de energía suficiente como para revertir el spin de un electrón desapareado, o por reducción monovalente. Si una molécula de porfirina absorbe un fotón, ésta pasa a un estado de excitación singulete de vida media extremadamente corta. Luego el fotosensibilizante puede volver al estado basal y emitir luz en forma de fluorescencia roja a longitudes de onda de alrededor de los 620 nm. Sin embargo para ejercer su acción fotodinámica, el fotosensibilizante debe pasar a un estado de excitación triplete, el cual es más estable que el estado singulete y por lo tanto tiene mayor posibilidad de interactuar con el oxígeno en estado basal (Gomer, 1989). Esta interacción permite la transferencia de energía del fotosensibilizante en estado triplete al oxígeno molecular generando el oxígeno singulete, el cual es altamente reactivo (figura II.2).

Un camino alternativo es que la interacción se de entre el fotosensibilizante y una biomolécula, con transferencia de electrones o de hidrógenos, produciendo formas radicales de ambos compuestos. Estos radicales pueden reaccionar directamente con el oxígeno molecular para formar especies activas como el radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y anión superóxido (Buettner & Need, 1985; Van Steveninck y col., 1986; Atar y col., 1989).



**Figura II.2:** Interacción entre el fotosensibilizante y el oxígeno.

*Al absorber la luz el fotosensibilizante (FS) pasa a un estado activado singulete. De allí puede pasar nuevamente a estado basal emitiendo fluorescencia, o bien puede pasar a un estado triplete lo cual permite que reaccione con el oxígeno también en estado triplete, activándolo a estado singulete, el cual puede oxidar otras moléculas.*

#### **II.4. Las porfirinas en la fotodetección de tumores y su uso como fotosensibilizantes.**

La excitación con luz de 405 nm de un tejido fotosensibilizado con porfirinas, induce la emisión de fluorescencia roja que puede ser detectada mediante el uso de sistemas ópticos electrónicos. La concentración selectiva de las porfirinas en los tumores ha sido utilizada como método de diagnóstico a través de la detección de fluorescencia.

Si la luz utilizada en TFD proviene de un láser, se puede transmitir a través de una fibra óptica, la cual se coloca cerca del área cancerígena para entregar la cantidad de luz adecuada. Además la fibra óptica puede ser dirigida a través de un broncoscopio a los pulmones para el tratamiento de cáncer de pulmón o a través de un endoscopio al esófago para el tratamiento de cáncer de esófago.



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

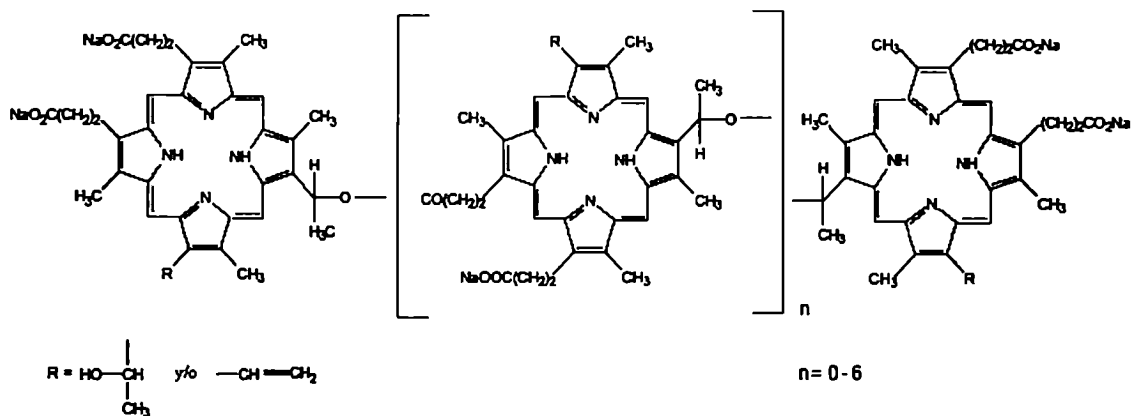
La fuente de luz –un láser de kriptón o una lámpara de mercurio con filtro- es acoplada a una fibra óptica ubicada en el canal de un endoscopio. La luz emitida por la fibra induce la fluorescencia del fotosensibilizante. La imagen es filtrada de manera de eliminar la luz excitante, y luego es amplificada por un intensificador de imagen para ser visualizada en un monitor. También se puede analizar el espectro de fluorescencia, que puede ser representado en una pantalla o en un graficador. El espectro obtenido para el tumor es distinto en amplitud y forma al de la mucosa normal permitiendo la detección endoscópica de lesiones superficiales.

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

Mediante el uso de tamices moleculares se logró aislar una fracción enriquecida en las especies responsables de las propiedades fotosensibilizantes del HpD (Dougherty y col., 1984). Esta fracción activa se denominó porfímero de sodio (Photofrin II, QLT Inc., Vancouver, Canadá y Laboratorios Lederle, Pearl River, NY, USA) y está constituida por una mezcla agregada de trímeros/oligómeros de porfirinas unidas por puentes éter y/o éster (Dougherty, 1987; Kessel y col., 1987; Dougherty & Marcus, 1992) (figura II.4). Este producto fue el primero en ser aprobado por la FDA de Estados Unidos, y es corrientemente utilizado en la TFD clínica, ya que en diciembre de 1995 se autorizó su uso para el cáncer de esófago y en enero de 1998 para estadios tempranos de cáncer de pulmón de células no pequeñas y para los casos avanzados en que el tratamiento convencional no se pudiera aplicar.

Una ventaja de la TFD es que causa un daño mínimo al tejido sano. Sin embargo, debido a que la luz láser utilizada no puede atravesar más de 3 cm de espesor de tejido, la TFD se utiliza principalmente para tratar tumores situados sobre la piel o justo debajo de ella o bien en la superficie de órganos internos.

En 1998 Momma y col., reportaron por primera vez el uso combinado de la TFD con la cirugía (esterilización del lecho quirúrgico) obteniendo como resultado un mejor control local del tumor primario y una reducción significativa en el número de metástasis, trabajando con un modelo de tumor de próstata.



**Figura II.4: Estructura del Photofrin.**

*Composición química de un trímero de porfirina, una de las principales componentes del Photofrin.*

## II.5. Mecanismos de acumulación de las porfirinas en los tumores.

No está dilucidado aún la razón por la cual las porfirinas se concentran preferencialmente en el tejido maligno, pero se proponen varias hipótesis:

a) la afinidad porfirina/lipoproteína, b) la debilidad de la vasculatura tumoral, c) el drenaje linfático disminuido, d) los receptores de LDL con mucha actividad o e) a una escasa conversión a hemo debida a una baja actividad de la ferroquelatasa (Wilson y col., 1991)

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

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

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

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

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

Dailey y Smith (1984) estudiaron la interacción de algunas porfirinas presentes en el HpD con la ferroquelatasa, siendo que éstas eran o bien sustrato o bien inhibidores competitivos de la enzima. La baja actividad de Fe-Quel en el tejido tumoral podría contribuir a la acumulación de porfirinas en el tumor.

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

## **II.6. Sitios celulares y subcelulares blancos de la TFD.**

Existen diversos blancos celulares de daño fotodinámico y estos dependen principalmente de la naturaleza química 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 (Moan y col., 1989; Jori, 1990b).

Hay amplio consenso en señalar las membranas celulares como uno de los sitios principales de daño (Girotti, 1990; Chapman y col., 1991) La reacción de los radicales libres del oxígeno con los lípidos poliinsaturados es una de las reacciones más frecuentemente citadas, así como la formación de agregados entrecruzados de proteínas, la modificación específica de aminoácidos, la fragmentación de la cadena peptídica y la alteración de la carga luego de la TFD, han sido algunas de las evidencias encontradas a favor de estas hipótesis. Las proteínas así modificadas serían más susceptibles a la proteólisis. (Prinsze y col., 1990, Farr & Kogama, 1991)

En algunas líneas celulares murinas se observó una disminución en la actividad de algunas enzimas de membrana luego de la fotosensibilización, mientras que las enzimas

citosólicas lactato y malato deshidrogenasa no sufrieron cambios (Gaffney & Sieber, 1990).

Por otro lado, dado que las porfirinas se acumulan principalmente en las mitocondrias, se piensa en estas organelas como otro posible blanco (Salet & Moreno, 1990).

Woodburn y col. (1991), observaron que las porfirinas con cadenas catiónicas se localizan en las mitocondrias, mientras que las aniónicas se localizan en los lisosomas, siendo estas últimas de menor citotoxicidad.

El oxígeno activado y los agentes que producen radicales libres, así como las radiaciones ionizantes, inducen numerosas lesiones en el ADN, causando deleciones, mutaciones y otros efectos genéticos (Imlay & Linn, 1986). La principal causa de ruptura del ADN simple cadena es la oxidación del azúcar por el radical hidroxilo, así como también el entrecruzamiento del ADN con las proteínas (Oleinick y col., 1986).

La fotosensibilización mediada por porfirinas en algunos casos también es capaz de inducir daño en el DNA ya sea en forma directa (actuando sobre DNA de cadena simple) o indirecta, activando endonucleasas, lo cual lleva al típico patrón apoptótico de fragmentación en escalera (Agarwall y col., 1991).

En cuanto al blanco subcelular del daño producido por el tratamiento fotodinámico, es sabido que el oxígeno singulete y otras ROS conducen a la peroxidación lipídica y daños en la membrana, ADN, citoesqueleto, etc. (Moan y col., 1992). Pero el mecanismo final de la muerte celular puede deberse tanto a la necrosis como a la apoptosis, dependiendo del fotosensibilizante utilizado, la concentración, el tiempo de exposición, la dosis de luz, la fuente de luz y el tipo celular (He y col., 1994; Dellinger y col., 1996; Noodt y col., 1996; Miyamoto y col., 1999). Se observó que la activación de fosfolipasas (Agarwall y col., 1993) y caspasas (He y col., 1998) están involucradas en el proceso apoptótico inducido por la TFD.

Webber y col. (1996) reportaron una respuesta apoptótica a la TFD *in vivo* en ratones con adenocarcinoma de colon, tratados con ALA para inducir la formación endógena de PPIX. Noodt y col. (1996) observaron que algunas líneas celulares expuestas a ALA-TFD morían principalmente por necrosis, mientras que otras morían por apoptosis. Se ha descrito que la TFD inducía la expresión de citoquinas en células tumorales, Usuda y col. (2001) encontraron que en las células de carcinoma de pulmón de Lewis tratadas con L-aspartil clorina TFD, empleando un láser de diodos, se inducía la expresión de interleuquina 6 (IL-6), IL-2 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), pero sólo en las

células que tenían aumentada la IL-6 se encontró una mayor sensibilidad a los efectos citotóxicos así como un aumento en la apoptosis.

Sin embargo, no parece que el daño y reparación nuclear fueran importantes en la fotodestrucción celular ya que la TFD indujo niveles de citotoxicidad similares en fibroblastos normales y deficientes en las enzimas reparadoras de ADN (Gomer y col., 1988).

La fotosensibilización mediada por porfirinas puede aumentar la transcripción y traducción de varios genes de estrés oxidativo como el de la hemoxygenasa (Gomer y col., 1991). Si bien aún no está claro el significado de esta inducción, una posible función sería la de actuar como mecanismo de defensa antioxidante.

## **II.7. Otras Aplicaciones de la TFD empleando diversos fotosensibilizantes.**

La terapia fotodinámica de componentes celulares de la sangre está siendo ampliamente estudiada para su uso como técnica de esterilización para reducir el riesgo de transmisión de enfermedades por transfusión (Ben-Hur y col., 1996; Lin y col., 1997).

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

A pesar de la efectividad demostrada por el Photofrin como fotosensibilizante y como localizador de tumores, sus efectos adversos han llevado al desarrollo de productos alternativos, llamados fotosensibilizantes de segunda generación, tales como las ftalocianinas, clorinas, purpurinas y bacterioclorinas entre otros.

Las ftalocianinas (FC) son compuestos estructuralmente similares a las porfirinas y entre ellas existen derivados metálicos y no metálicos. Así, por ejemplo, la cloro-aluminio FC demostró ser un buen fotosensibilizante tanto *in vitro* (Ben-Hur & Rosenthal, 1985) como *in vivo*. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales Vrouenraets y col. (2001) lograron producir una acumulación tumoral selectiva del fotosensibilizante aluminio ftalocianina tretsulfonato en ratones “nude” portadores de carcinoma de células escamosas.

Los ésteres aspárticos de Clorina e6 (NPe6) poseen una importante acción fototóxica (Nelson y col., 1987b). Más recientemente se encontró que derivados etéreos de cadena larga son mejores fotosensibilizantes que sus ésteres análogos (Pandey y col., 1991). Estudios *in*

*vitro* (Beems y col., 1987), utilizando células leucémicas murinas demostraron que la bacterioclorina A produce una efectiva destrucción celular.

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

Agentes fotosensibilizadores tales como benzoporfirina derivado (Lemoli y col., 1993; Jamieson y col., 1990; Obochi y col., 1995), ftalocianinas (Singer y col., 1987; Singer y col., 1988) y merocianina 540 (Sieber y col., 1984; Smith y col., 1992; Lydaki y col., 1997) se han estudiado en la depuración de células madres hematopoyéticas.

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

También se ha comprobado la efectividad de la TFD para destruir bacterias Gram positivas y disminuir el riesgo de resistencia a antibióticos, utilizando como fotosensibilizantes hematoporfirina, hematoporfirina derivado, deuterio porfirina o ftalocianinas con aluminio (Bertolini y col., 1984; Nitzan y col., 1987; Wilson y col., 1994).

Hamblin y col. (2003) reportaron el uso de técnicas ópticas para monitorear y tratar infecciones con *Pseudomonas aeruginosa* en ratones. Para lograr esto utilizaron un fotosensibilizante policatiónico conjugado, el cual está diseñado para penetrar en las bacterias gram negativas. De este modo al aplicar el compuesto en forma tópica en la lesión, se observó la desaparición de fluorescencia, y se obtuvo un 90 % de supervivencia en los ratones tratados.

Estudios preclínicos demostraron que la TFD de tumores aumenta la respuesta inmune del huésped. Sin embargo el rol del efecto de la TFD en células tumorales no se ha determinado. Gollinck y col. (2002) estudiaron la efectividad de la inmunogenicidad de un lisado de células tumorales generado por TFD. Encontraron que el lisado funcionaba como una vacuna potente y aún más efectivos fueron los lisados generados mediante TFD. Las vacunas generadas mediante TFD eran tumor específicas e inducían una mejor respuesta de las células T citotóxicas.

### **III. TERAPIA FOTODINÁMICA A PARTIR DE ALA.**

#### **III.1. Introducción.**

Hacia fines de los años 80 y principios de la década del 90, se comenzó a usar el ácido aminolevúlico (ALA), para inducir la acumulación selectiva de los tetrapirroles endógenos sintetizados en el tejido tumoral (Navone y col., 1988; Kennedy y col., 1990; Fukuda y col., 1992) y se ha convertido en uno de los campos más promisorios en la investigación de la TFD.

Siguiendo los descubrimientos científicos de pioneros como Finsen, Raab y Von Tappeiner, con el aislamiento de las porfirinas y el descubrimiento subsecuente de las propiedades de localización tumoral y los efectos fototóxicos en este tejido, se desarrolló la TFD basada en ALA (Ackroyd y col., 2001).

En 1987, Malik fue el primero en reportar la fotosensibilización de células en cultivo expuestas a ALA, si bien ya en 1975 Batlle y col. habían observado también que el agregado de ALA en cultivos de callos de soja, estimulaba la síntesis y acumulación de porfirinas y su destrucción por exposición a la luz.

El ALA es la pro-droga que induce la síntesis del fotosensibilizador Protoporfirina IX (PPIX). Luego de la administración de ALA, las células tumorales generan PPIX a través del camino biosintético del hemo. Este método se basa en dos importantes hechos. El primero es que todas las células poseen la capacidad de formar porfirinas a partir de precursores del hemo. El otro es que en varios tejidos malignos y en tejidos en regeneración, se ha encontrado disminuida la actividad de la ferroquelatasa mientras que en estas mismas células se ha hallado que la actividad de la PBG-asa estaba aumentada (Leivovici y col., 1988; Schoenfeld y col., 1988; Navone y col., 1990; El-Sharabasy y col., 1992; Rubino & Rasetti, 1996).

La idea consiste en “by-pasear” la enzima limitante del camino del hemo, el ALA-S, mediante la administración de un exceso de su producto, el ALA, lo cual conduce a la acumulación de porfirinas, en particular PPIX (Navone y col., 1988; Malik & Lugaci, 1989; Fukuda y col., 1989; Kennedy y col., 1990) en las células malignas.

Además de la selectividad, la ventaja que presenta la fotosensibilización endógena con ALA es que el producto principal, la PPIX, tiene una estructura molecular definida, con un máximo de absorción en la zona roja del espectro en los 630 nm (Pottier y col., 1986). Otra ventaja del uso terapéutico del ALA es la corta vida media de los efectos

fotosensibilizantes de la PPIX comparado con otros compuestos, los cuales no duran más de 48 horas (Kennedy et al, 1990; Fukuda et al 1993).

### **III.2. Selectividad de tejidos por la PPIX inducida a partir de ALA.**

La administración de una dosis adecuada de ALA en animales de experimentación induce la típica fluorescencia de la PPIX en algunos tejidos, pero no en todos.

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

En tumores humanos se observó que aquellos que tenían origen epidérmico (carcinoma de células basales, escamoso, adenocarcinoma de glándulas sebáceas) y de tejido mamario (adenocarcinoma de mama) exhibían una fuerte fluorescencia luego de la aplicación tópica de ALA (Kennedy y col., 1990).

Se induce una mayor cantidad de porfirinas a partir de ALA en las células con alta proliferación. La mayoría de los tejidos epiteliales tales como la epidermis y la mucosa epitelial de algunos órganos internos huecos (tracto gastrointestinal, vejiga urinaria, etc) así como en glándulas con ductos que se vacían en dichas superficies como las glándulas sebáceas, mamarias o salivales, generan mayores niveles de PPIX y muy baja cantidad de porfirinas en las capas lindante de la dermis (piel), submucosa y músculo. Por lo tanto las células malignas derivadas de estos tejidos deberían ser blanco de las pro-drogas para la síntesis de PPIX sin producir daños en los tejidos normales circundantes.

Steinbach y col. (1995) estudiaron la capacidad de acumular PPIX a partir de ALA en diversas líneas celulares, y encontraron que las células que derivan de tumores de vejiga mostraban una intensidad de fluorescencia mucho mayor que la exhibida por las células normales.

### **III.3. Vías de administración.**

Una de las ventajas del uso de ALA en la TFD es que, a diferencia de otros agentes fotosensibilizantes, puede ser administrado por diversas vías en forma inocua, tales como: vía sistémica, intravesical, topicación, inhalación y por vía oral. En animales de experimentación también se ha utilizado la vía intra-tumoral para administrar el ALA en

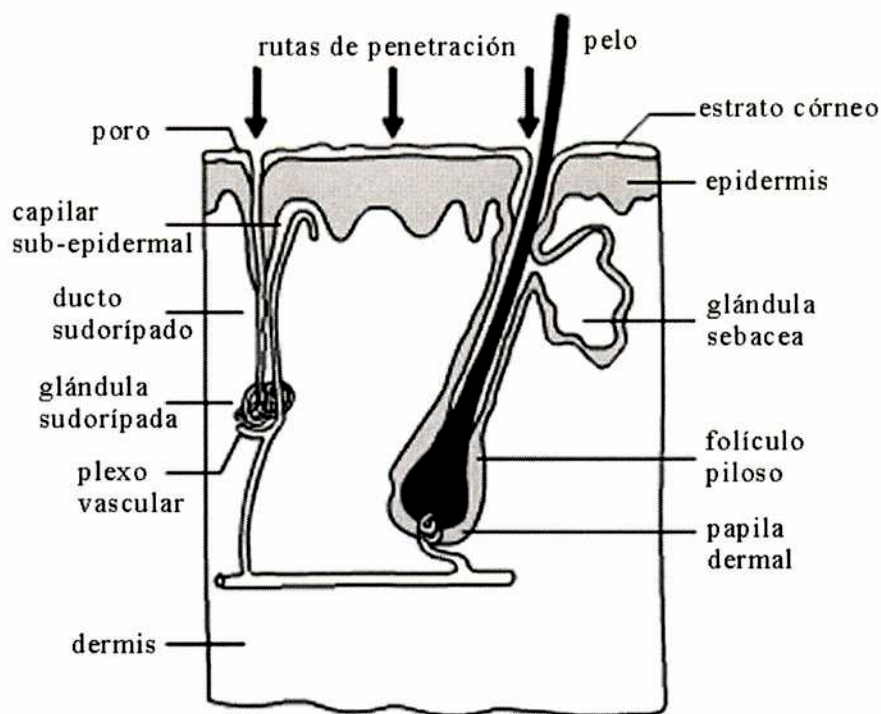


tumores accesibles, y si bien los niveles de porfirinas acumuladas fueron adecuados (Fukuda et al, 1992a; 1992b), no se observó un aumento en la eficiencia del tratamiento con respecto a las vías clásicas (Cairnduff y col., 1995), debido a la heterogeneidad de la distribución del fotosensibilizante.

### **III.3.1. Penetración del ALA a través de la piel.**

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

Existen dos rutas para que una molécula pueda difundir a través de la piel normal sana: la vía transepidérmica, que incluye la vía transcelular y la intercelular, o la vía transapéndice (folículo piloso y glándulas sudoríparas). Estos apéndices pueden bypassar la baja difusibilidad del estrato córneo. Sin embargo los apéndices representan solo una pequeña fracción de la piel (Scheuplein, 1967) y no tendrían demasiada importancia en la penetración de las drogas. La mayoría de los agentes penetrarían a través de la epidermis, en cuyo caso la molécula debería primero pasar a través del estrato córneo antes de difundir por la epidermis. (figura III.1)



**Figura III.1: Estructura de la piel normal y vías de difusión.**

Esquema de las distintas capas de la piel normal y sus componentes.

Varios tipos de anomalías benignas de la piel tales como heridas, quemaduras, psoriasis, queratosis actínica, etc., favorecen la permeabilidad del ALA. En cambio la hiperqueratosis asociada a *verruca vulgaris*, inhibe en gran medida la penetración de ALA.

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

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

La naturaleza hidrofóbica de la molécula de ALA y el hecho de que el ALA es un zwitterion a pH fisiológico y que por lo tanto tiene baja solubilidad lipídica, limita de alguna forma el pasaje a través de barreras biológicas como el estrato córneo de la piel y

las membranas celulares. De aquí que la formación de PPIX a partir del ALA está frecuentemente restringida a las capas superficiales del tejido, siguiendo una distribución inhomogénea y parcial en las capas más profundas o lesiones nodulares. Para alcanzar niveles de PPIX en las capas más profundas de los tumores que sean clínicamente relevantes es necesario administrar dosis mayores de ALA (Kloek y col., 1996).

Actualmente hay varias líneas de investigación dedicadas a mejorar la penetración del ALA, ya sea utilizando distintos vehículos en la aplicación de ALA o bien desarrollando nuevas moléculas sintéticas derivadas del ALA.

Con el uso de derivados de ALA más lipofílicos se espera tener una mejor difusión a través de las membranas celulares de manera tal que, tras alcanzar el sitio de acción, ocurriría la conversión en ALA por hidrólisis enzimática, obteniendo de esta forma una mayor tasa de formación de PPIX.

#### **III.4. Usos del ALA en la TFD y en la fotodetección.**

La TFD mediada por ALA (ALA-TFD) brinda una esperanza al tratamiento de estadios precancerosos de lesiones de piel como la queratosis solar, la enfermedad de Bowen, y tumores incluyendo el carcinoma de células basales, la enfermedad de Paget y el carcinoma de células escamosas (Kurwa & Barlow, 1999). Patologías no malignas de piel como la psoriasis (Boehncke y col., 1994) y la queratosis actínica, entre otras, han sido también tratadas con esta técnica (Fritsch y col., 1998).

En Inglaterra, existen actualmente 35 centros que están llevando a cabo ALA-TFD tópica. En noviembre de 1999, la FDA aprobó el ALA bajo el nombre comercial Levulan para el tratamiento de la queratosis actínica utilizando una fuente de luz policromática llamada Blu-U (Ormrod y col., 2000; Szeimies & Landthaler, 2002).

Varios estudios abiertos reportaron la eficacia de la TFD tópica en el tratamiento de cáncer de piel no melanótico y lesiones precancerosas. El uso de ALA-TFD tópico y luz azul para el tratamiento de queratosis actínica no hiperqueratótica es actualmente una de las pocas aplicaciones dermatológicas aprobadas en Estados Unidos (Bissonnette y col., 2002). Szeimies y col. (1996) llevaron a cabo un estudio de fase II para estudiar la eficacia y la tolerabilidad del ALA-TFD en esta enfermedad. Encontraron que luego de aplicar la emulsión e irradiar con luz no coherente, en el 71% de las queratosis actínicas ubicada en cabeza se producía la remisión completa, mientras que en las lesiones de brazos y manos sólo había una remisión parcial.

Salim y col. (2000) compararon la efectividad del ALA-TFD con el 5-fluorouracilo, y observaron que inicialmente el 88% de los pacientes tratados con ALA-TFD mostraban una remisión completa comparado con el 67% para el 5-fluorouracilo. Mientras que los pacientes que recibieron este último compuesto mostraban escaras y ulceraciones, los que recibieron ALA mostraron muy escasos efectos adversos. En forma similar la TFD es tan efectiva como la crioterapia para el tratamiento de carcinoma de células basales, pero con mayor poder curativo y cosmético. La TFD puede ser particularmente ventajosa para el tratamiento de lesiones grandes y/o múltiples y para aquellas lesiones que debido a su ubicación, las terapias convencionales puedan provocar riesgo de desfiguramiento o de una pobre curación. Aunque todavía no hay datos suficientes para comparar en lo que concierne a la cirugía de rutina, la técnica de curettage y radioterapia, la TFD parece ser igualmente efectiva y en algunos casos superior a las terapias estándar en el tratamiento de cáncer de piel no melanótico (Morton, 2002).

Se ha sugerido también que el ALA-TFD actuaría como un inmunomodulador o un agente fotocitotóxico teniendo como blanco sólo a los linfocitos activados o leucémicos (Hryhorenko y col., 1998). También se ha descrito al ALA-TFD como una alternativa promisoriosa para el tratamiento de estadios tempranos de linfomas cutáneos de células T, caracterizados por la acumulación de células T malignas en la piel y sangre periférica (Malik y col., 1987; Grebenova y col., 1998).

También se ha sugerido el uso *ex vivo* para la depuración de células en trasplante autólogo de médula ósea (Sieber y col., 1984).

Además de su utilidad en la terapia oncológica, el ALA tiene también una característica única que puede ser explotada con el propósito de diagnóstico: luego de la administración tópica o sistémica se induce la acumulación de PPIX en forma casi selectiva en el epitelio tumoral, con una alta relación tejido tumoral / tejido circundante, la cual puede ser visualizada luego de la excitación con luz. Mediante el uso acoplado de sistemas de cámaras CCD junto con un digitalizador de imágenes, el contraste de la imagen de fluorescencia adquirida puede ser mejorada considerablemente y permite la determinación de un umbral, el cual puede ser utilizado ya sea para hacer una biopsia directa o para el planeamiento pre-operativo en los casos en que la cirugía ya está estipulada. Actualmente se está evaluando el empleo de rutina de estos sistemas (Szeimies & Landthaler, 2002).

Se investigó la efectividad de la administración oral de ALA para el diagnóstico fotodinámico de tumores de mama primarios en humanos. El estudio incluyó varios

pacientes con tumor de mama palpable que durante la operación se irradiaron en el sitio afectado y además se extrajeron diversas muestras. Mediante el diagnóstico fotodinámico con ALA lograron distinguir confiablemente entre el tumor primario de mama y el tejido mamario normal debido a que el tumor tenía una fluorescencia significativamente mayor, tanto macroscópica, como microscópica en todos los casos. Esto podría ser una simple herramienta para reconocer los márgenes del tumor durante la cirugía (Lander y col., 2001).

Estudios preliminares sugieren que el fotodiagnóstico a través de la detección de fluorescencia de la PPIX, es superior a la citoscopia de tumor de vejiga tradicional. Luego de la administración intravesical de ALA a 52 pacientes se detectó por fluorescencia un 25% de casos con tumores de vejiga que habían sido omitidos por la citoscopia convencional. La fotodetección con ALA tuvo una 94% de sensibilidad comparada contra un 70% de la citoscopia y un 43% de especificidad. Por lo tanto el diagnóstico con ALA podría llegar a ser un procedimiento estándar para la detección y resección de tumores de vejiga, tales como carcinoma *in situ*, tumores multifocales y en especial para los casos en que sólo se llega endoscópicamente (Riedl y col., 1999).

En un estudio abierto se investigaron los efectos colaterales y la farmacocinética del ALA así como también la fluorescencia de la PPIX luego de la administración intravesical de ALA para la fotodetección endoscópica de carcinoma superficial de vejiga. El ALA aumentaba rápidamente en plasma y a las 9 horas ya estaba por debajo de los niveles normales. Si bien la absorción en vejiga era baja, no se observaron efectos secundarios por ALA en ningún caso (Popken y col., 2000).

Con los métodos actuales de tratamiento el pronóstico de los pacientes con tumores de cerebro agresivos es muy desalentador y la falla de los tratamientos se debe generalmente a la recurrencia local del tumor. La detección fotodinámica intra-operativa del tejido tumoral y la TFD post-quirúrgica de la cavidad reseçada podría ser de gran beneficio en la resección de tumores de cerebro (Freisen y col., 2002).

## **IV. Derivados del ALA**

### **IV.1. Introducción.**

Se han sintetizado un gran número de derivados de ALA con el fin de desarrollar un compuesto que penetre mejor la membrana plasmática de las células blanco y difunda a través de las capas de la epidermis más eficientemente que el ALA. Se han preparado derivados tanto a partir del extremo carboxilo como del amino y en muchos casos los ésteres resultaron ser más efectivos que el ALA, induciendo una acumulación selectiva en el tejido tumoral.

Es sabido que el aumento del número de carbonos en una cadena carbonada unida a una droga existente, da como resultado un aumento en la lipofilidad (Svensson, 1987), y por lo tanto en la permeabilidad a través de la membrana. Sin embargo, cuando la droga es demasiado lipofílica, puede quedar retenida en la membrana o en el estrato córneo sin ser liberada para poder ejercer su acción biológica. Se ha señalado por lo tanto que una pro-droga ideal debería tener tanto propiedades lipofílicas como hidrofílicas (Sloan, 1992; Guy & Hadgraf, 1992).

Midiendo el coeficiente de partición aparente de los ésteres de ALA en octanol y en PBS (P), se demostró que es posible variar la lipofilidad del ALA en más de tres órdenes de magnitud cuando se esterifica el ALA (Uehlinger y col., 2000). De acuerdo a este criterio, tanto el ALA como el metil-ALA son hidrofílicos mientras que el etil, butil, hexil, octil y ciclohexil éster son más lipofílicos.

Sin embargo la efectividad potencial de los derivados de ALA no es trivial ya que existen varios factores involucrados en la captación de las pro-drogas y la liberación de ALA

- a) la tasa de difusión a través de los tejidos
- b) la captación celular de la pro-droga
- c) la liberación de ALA a partir de la pro-droga.

## IV.2. La membrana celular como factor limitante en la penetración de los derivados de ALA.

Kloek y col. (1996) sintetizaron por primera vez una serie de ésteres derivados de ALA utilizando alcoholes de cadena de carbonos de longitud creciente, así como también amidas y derivados dobles de ALA (figura IV.1) Empleando células de linfoma de Jurkat, distinguieron entre un período de incubación I (0 a 30 min.), en el cual se permite la entrada a los derivados de ALA, y un período II (3 a 9 hs.), durante el cual las células metabolizan la cantidad de pro-droga que penetró a través de la membrana durante el período de incubación I. Los autores encontraron que cuando se mantenía el período I en un mínimo, la diferencia entre los derivados y el ALA como pro-fotosensibilizantes era más pronunciada, reforzando la hipótesis de que la penetración de ALA a través de la membrana es un paso limitante en la síntesis de PPIX.

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Nombre	Producción de PpIX
-H	-H	ALA	
-H	-CH <sub>3</sub>	ALA-metil ester	igual al ALA
-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ALA-etil ester	mejor que el ALA
-H	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	ALA-n-butil ester	mejor que el ALA
-H		R,S-ALA-2-(hidroximetil) tetrahidrofuranyl ester	mejor que el ALA
-H		R,S-ALA-2-(hidroximetil) tetrahidropiranyl ester	mejor que el ALA
	-H	N-acetil-ALA	mejor que el ALA
	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N-acetil-ALA-etil ester	igual al ALA
	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	N-acetil-ALA-butyl ester	igual al ALA

**Figura IV.1:** Estructura del ALA y los derivados sintetizados por Kloek y col. (1998)

Utilizando células de linfoma, Kloek y col. (1998) analizaron diversos ésteres de ALA (etil, propil, butil, pentil, hexil y octil éster), y encontraron que las pro-drogas con cadenas alquilo más largas inducían un aumento en el contenido intracelular de PPIX, llegando al máximo contenido de PPIX con ALA pentil éster, mientras que aquellos formados a partir de alcoholes de cadenas más largas que el pentanol inducían menores concentraciones de porfirinas. En este trabajo se demostró que cuando la lipofilicidad de la droga aumenta más allá de un determinado valor, la droga tiende a quedar retenida en la membrana celular. Cuanto más aumenta la lipofilicidad de la droga, menor es la fracción que difunde de la membrana al citoplasma, como se demuestra por el menor contenido de PPIX obtenido a partir de octil éster comparado con el hexil éster.

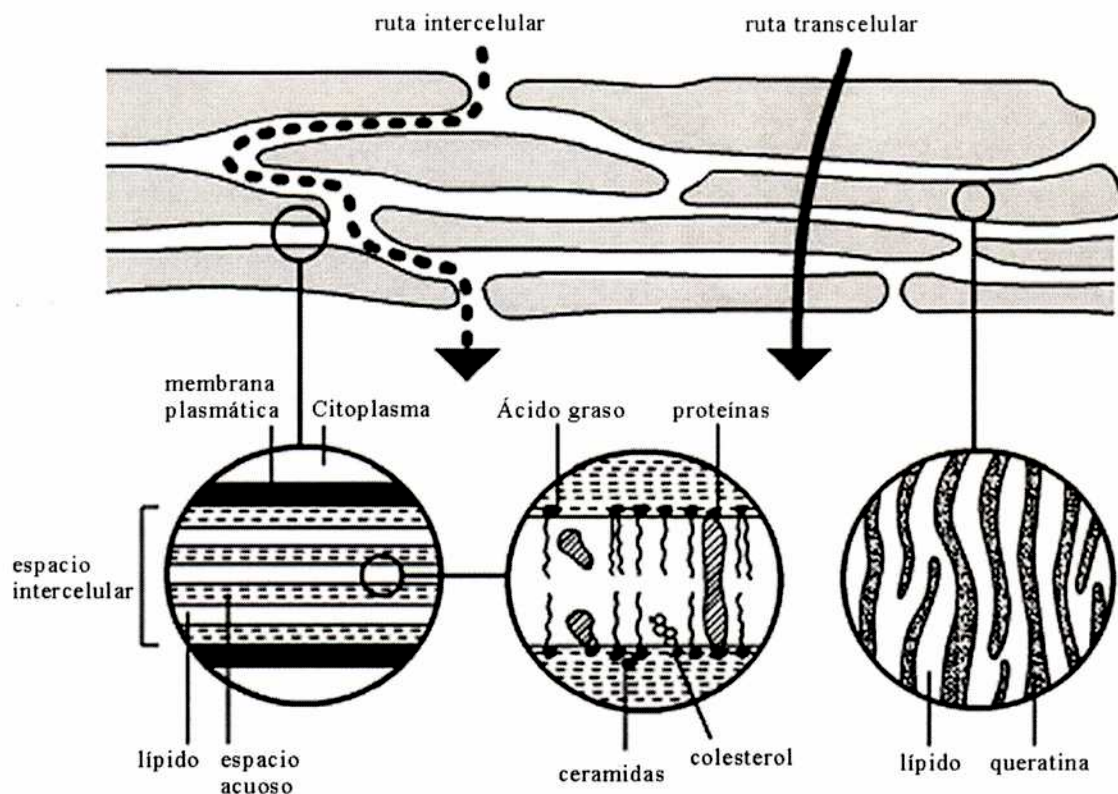
También se estudió la formación de PPIX en líneas celulares humanas de pulmón y vejiga, inducida a partir de ALA o sus ésteres derivados (Kloek y col., 1998), y bajo condiciones óptimas, se observó que la tasa de formación de porfirinas era más elevada a partir de los ésteres de cadenas largas con respecto a los ésteres de cadenas más cortas.

Utilizando líneas celulares provenientes de diferentes tejidos, Gaullier y col. (1997) encontraron que la proporción de aumento en la síntesis de PPIX inducida por la esterificación del ALA era dependiente de la línea celular utilizada. Esto no es raro ya que hay factores que están involucrados en la síntesis de PPIX como la captación, la conversión a ALA, y la conversión a porfirinas.

### **IV.3. La piel como barrera para la absorción de ALA y sus derivados.**

La capa más externa de la piel, el estrato córneo, ha sido identificada como la principal barrera para la penetración de la mayoría de las drogas. La matriz lipídica juega el rol de mayor importancia en el funcionamiento de la barrera. Existen tres potenciales vías de permeabilización de compuestos a través del estrato córneo: la vía transapéndice, la vía transepidérmica, a través del espacio intercelular y la vía transcelular a través de las células mismas (Barry, 1987). Las moléculas hidrofílicas preferirían la vía intracelular, mientras que las lipofílicas podrían atravesar el estrato córneo por la ruta intercelular. (figura IV.2)





**Figura IV.2:** Microcaminos de penetración de sustancias a través de la piel normal.

*Esquema de las vías de penetración de compuestos a través de la piel normal y composición de las distintas capas de la piel.*

El obstáculo principal para la permeabilización de los compuestos polares es su baja partición dentro del estrato córneo y su dificultad para penetrar en la capa lipídica durante la permeación. Como ya se expuso, aumentando el número de átomos de carbono de una cadena carbonada unida a una droga, da como resultado un aumento de la lipofilidad (Svensson, 1987), y consecuentemente la permeabilidad. Esto podría llevar a una acumulación membrana o en el estrato córneo sin la posibilidad de ser liberada para ejercer su acción biológica. Se ha señalado que una droga idealmente debe tener tanto propiedades lipofílicas como hidrofílicas (Sloan, 1992; Guy, 1992).

Por otra parte, una mayor solubilidad de los compuestos con alta lipofilidad en cremas y ungüentos puede aumentar la penetración del ALA a través de la piel. Usando un cálculo aproximado para estimar el coeficiente de permeabilidad en estado estacionario de los derivados de ALA, se puede predecir que el ALA butil éster va a ser transportado a través de la piel 50 veces más eficientemente que el ALA. Mientras que con ALA metil

éster, el transporte sería el doble. Sin embargo, estos datos sólo son importantes en cuanto a la biodisponibilidad, ya que las sustancias que son muy lipofílicas, como ya se dijo pueden acumularse en el estrato córneo. Entonces para obtener un flujo máximo a través de la piel, se debe obtener un coeficiente de partición balanceado, buena solubilidad en agua y lípidos (Uehlinger y col., 2000).

Algunos ésteres de ALA han sido usados en piel normal de ratón (Peng y col., 1996) y en carcinomas de células basales (Peng y col., 1995), observándose una distribución tisular más alta y homogénea comparada con las porfirinas inducidas a partir de ALA.

Pero a pesar del éxito que demostraron tener los derivados de ALA para permear la membrana plasmática, el uso de estos compuestos para el tratamiento de cáncer de piel está aún en discusión debido al hecho de que parecen difundir más lentamente a través del estrato córneo que el ALA.

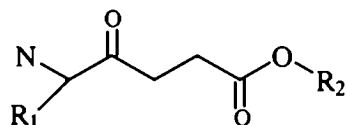
En junio de 2001, el ALA metil éster fue aprobado en Suecia bajo el nombre de Metvix, para el uso en queratosis actínica no hiperqueratótica de cara y cuero cabelludo, y para el carcinoma de células basales que no puede ser tratado con terapias convencionales .

En nuestro laboratorio (Casas y col., 1999) se examinaron una serie de derivados de ALA hidrofóbicos (figuras IV.3) empleando cultivos de explantes de piel normal humana y de rata flotando en el medio de incubación. Utilizando estos cultivos, se observó que las drogas son absorbidas a través de la dermis como ocurriría cuando se aplica la droga por la vía sistémica. Los resultados mostraron que en estos tejidos normales los derivados de ALA eran captados, deesterificados y convertidos en PPIX con menor eficiencia que el ALA. La excepción fue el derivado doble carbobenzoiloxi-D-fenil-alanil-5-ALA-etil éster, que era tan activo como el ALA para inducir la formación de PPIX. El agregado de un quelante de hierro, CP94, aumentó mucho la acumulación de PPIX en la piel humana expuesta a ALA, ALA-metil éster y ALA-hexil éster.

Van den Akker y col. (2000a) usando ratones sin pelo demostraron que el ALA pentil éster producía un ligero aumento en la producción de PPIX comparado con el ALA libre en lesiones de piel precancerosas inducidas por UVB, mientras que la piel normal mostraba iguales cantidades de porfirinas ya sea a partir de ALA o del éster.

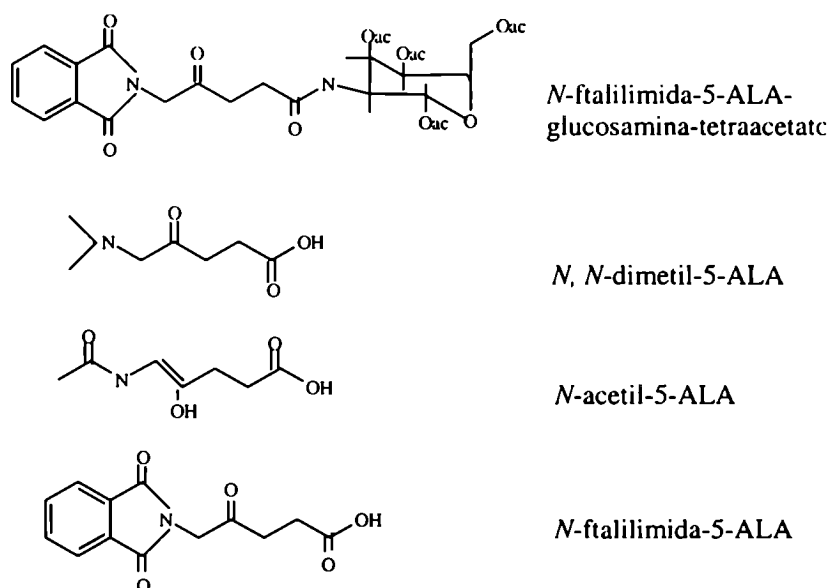
Los mismos autores (Van den Akker y col., 2000b) encontraron niveles de PPIX más altos en el estrato córneo de lesiones de piel, pero no en las capas de la epidermis displásica tratadas con pentil-ALA, mostrando que éste éster también difunde pobremente en comparación con el ALA. Estas lesiones consistían en queratosis actínica y seborreica y en carcinomas de células escamosas.

Moan y col. 2001, encontraron que la aplicación de ALA metil éster y ALA hexil éster (He-ALA) a la piel normal o a la piel que rodeaba un adenocarcinoma de colon, mediante la medición de la señal de fluorescencia de la piel, el He-ALA inducía los mismos niveles de PPIX que el ALA en la piel que rodeaba al tumor, mientras que en otros sitios distantes de la piel no se observaba fluorescencia.



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Nombre
H—	-H	ALA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO—	-H	butil ALA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO—	-H	pentil ALA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO—	-H	hexil ALA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO—	-H	heptil ALA
	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	Carbobenzoiloxi-glicinil-5-ALA-hexil éster
	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Carbobenzoiloxi-D-fenilalanil-5-ALA-etil éster
	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Carbobenzoiloxi-glicinil-5-ALA-etil éster

**Figura IV.3:** Estructura de ALA y derivados sintetizados por Casas y col. (1999)



**Figura IV.3:** Estructura de ALA y derivados sintetizados por Casas y col. (1999).

#### IV.4. Usos de derivados de ALA en la fotodetección y la TFD en cáncer de vejiga.

Marti y col. (1999) lograron mejorar la detección fotodinámica y la TFD de carcinoma de vejiga mediante el uso de ésteres derivados de ALA. Para ello estudiaron la acumulación y distribución de las porfirinas formadas en la mucosa de vejiga humana y de porcino perfundidos a partir de estos compuestos. Estos autores observaron que los ésteres, en especial el He-ALA aceleraba y regularizaba la acumulación de PPIX. Más aún, en un estudio clínico piloto, el He-ALA fue aplicado a los pacientes en forma intravesical (Lange y col., 1999) y se observó que, en comparación con el ALA se necesitaba una concentración 20 veces menor, originando una fluorescencia del doble en el tejido neoplásico. La fluorescencia de la PPIX en ambos estudios se distribuía homogéneamente en todo el urotelio maligno, y no se restringía sólo a las capas superficiales. La selectividad por el tejido maligno para el ALA y para el éster fue similar.

Los estudios sistemáticos de Bridges y col. (1979) con series de homólogos del carbamato mostraron una tasa de absorción relativamente constante para compuestos con valores de log P entre 0,8 y 2,8. Sin embargo, los carbamatos con valores de log P menores que 0,8 mostraron una baja absorción a través de la pared de la vejiga. Esto sugiere que en el caso de los ésteres de ALA que contengan 2 o más átomos de carbono en su función éster habría una mayor incorporación.

#### IV.5. Actividad específica de esterasas.

Hay evidencias de que en algunos tejidos la actividad de esterasas es mayor en células tumorales que en su contraparte normal (Davey y col., 1988; Sawaki y col., 1990), mientras que lo opuesto se verifica en otros casos (Dube y col., 1984; Markey y col., 1993). En general la hidrólisis del éster varía considerablemente en función del tipo de célula y de la estructura de la pro-droga (Dolan y col., 1998). Por lo tanto, para un tipo de tumor en particular estas características pueden ser explotadas para mejorar la selectividad del ALA-TFD.

En la piel se ha identificado la presencia de esterasas así como la actividad de otras enzimas cutáneas. Por lo tanto es importante entender cómo este sistema de enzimas puede modular la actividad de las drogas aplicadas en forma tópica y entonces en base a esto optimizar el diseño de las pro-drogas (Chan & Po, 1989).

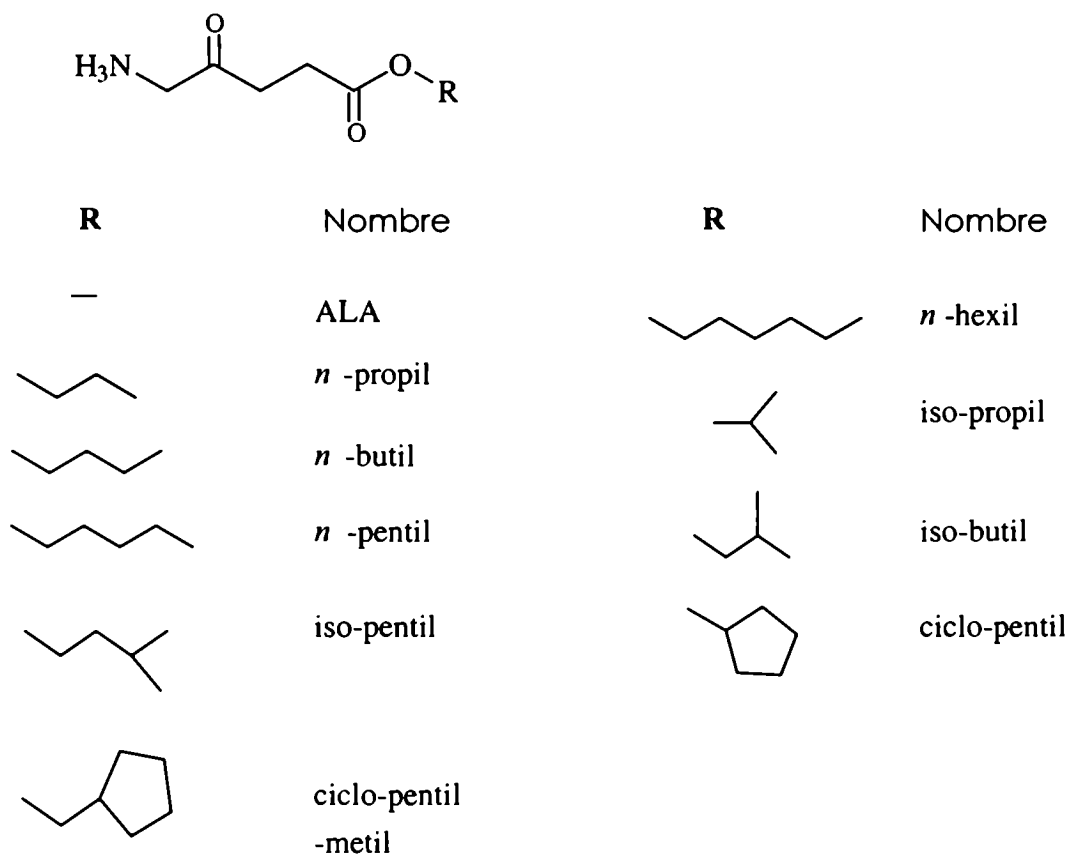
Cuando Kloek y col. (1996) aplicaron en forma tópica *N*-acetil-ALA, un compuesto que había resultado ser muy eficiente *in vitro* en una línea celular de linfoma, sorprendentemente, no indujo síntesis de porfirinas. Se hipotetizó entonces que la causa de estas diferencias se debía a la falta de la enzima responsable de convertir este derivado en ALA libre. En base a esto, cobró gran importancia la actividad y accesibilidad al sustrato de la enzima responsable de liberar el ALA.

En un intento por distinguir entre la tasa de difusión de la droga a través de barreras biológicas y su tasa de conversión enzimática a la molécula parental ALA, Kloek y col. (1998) compararon los datos de experimentos con células intactas, con los de experimentos en que las células habían sido lisadas previo a la incubación con ALA o sus derivados. Encontraron que en las células lisadas, empleando ésteres de ALA con cadenas alquilo de 1 a 8 carbonos, la tasa de formación de porfirinas disminuía a medida que aumentaba el largo de la cadena hasta el butil éster. Cuando la cadena tenía más de 4 carbonos, el contenido celular de PPIX se incrementaba, hasta llegar al He-ALA. Pero aumentando el largo de la cadena de 6 a 8 carbonos, no se lograba un mayor aumento en la síntesis de porfirinas.

Aparentemente, con excepción del He-ALA, las pro-drogas de cadenas alquilo más largas parecen ser hidrolizadas más lentamente que las pro-drogas de cadenas más cortas. Con anterioridad a estos estudios, se había propuesto (Bungaard y col., 1988) que las cadenas alifáticas más largas impedían la hidrólisis enzimática, posiblemente debido a un aumento en la unión a proteínas de los compuestos más lipofílicos (Jarvinen y col., 1995).

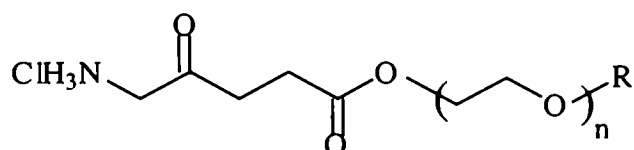
En contraste, algunos compuestos (ALA propil éster y ALA octil éster) inducían mayor concentración en células intactas que en células lisadas, pero la razón por la cual sucedía esto aún no está clara. Una hipótesis es que algunas pro-drogas podrían gatillar mecanismos de transporte activo, resultando en un mayor contenido intracelular de la pro-droga.

Teniendo en cuenta la especificidad de las esterasas, Whitaker y col. (2000) ensayaron una serie de compuestos (figura IV.4) y encontraron que hay un punto de ramificación próximo al sitio de clivaje del éster que impediría el contacto entre el éster y el sitio activo de la esterasa. Dado que se necesita una estrecha interacción molecular para clivar esta unión éster (Sato & Hosokawa, 1998), esto llevaría a una disminución en la tasa de clivaje (Dixon & Webb, 1979) resultando en una menor producción de PPIX en el caso del iso-propil y del ciclopentil ALA éster.



**Figura IV.4:** Estructuras empleadas por Whitaker et al (2000) para examinar la relación estructura / actividad, en la síntesis de PPIX.

Berger y col. (2000) sintetizaron ésteres de la familia del polietilenglicol. Para evaluar la selectividad de las esterasas celulares, compararon la producción de PPIX obtenida en células endoteliales y de carcinoma humanas expuestas a ésteres de ALA de la familia del etilen glicol (figura IV.5). En las células endoteliales no se observaron diferencias entre mono, di y trietilenglicol etil ésteres, mientras que en células tumorales al aumentar el largo de la cadena de etilenglicol aumentaba ligeramente la producción de PPIX, sugiriendo cierta selectividad de las células tumorales sobre las endoteliales.



- n=1, R=CH<sub>3</sub>      ALA-O-etilenglicol monometil éter (sal HCl)  
n=1, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>    ALA-O-etilenglicol monoetil éter (sal HCl)  
n=2, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>    ALA-O-dietilenglicol monoetil éter (sal HCl)  
n=3, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>    ALA-O-trietilenglicol monoetil éter (sal HCl)

***Figura IV.5: Estructuras de los derivados de etilen glicol de ALA sintetizados por Berger y col. (2000)***

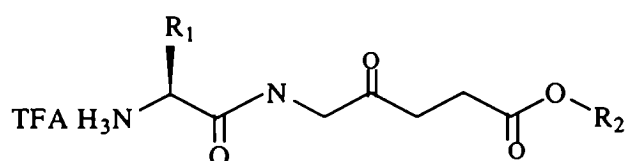
#### **IV.6. Actividad de amino peptidasas en el clivaje de derivados.**

Se han detectado niveles elevados de actividad de aminopeptidasas asociados a la membrana plasmática de varias líneas celulares tumorales humanas y varias líneas celulares tumorales metastásicas de mamíferos (Ashum & Look, 1990; Saiki y col., 1993; Smal y col., 1995).

Se observó además que en la vasculatura del tumor, la actividad amino peptidasa se expresa en forma diferencial en comparación con la vasculatura normal de un mismo órgano, según se trate de moléculas ácidas, básicas o neutras (Juillerat-Jeanneret y col., 2000).

Berger y col. (2000) sintetizaron algunos derivados aminoácidos de ALA básicos, ácidos o neutros (figura IV.6) los cuales representan sustratos potenciales de la amino peptidasa A (APA), APB o APN/M respectivamente. Los autores evaluaron la selectividad de las enzimas para atacar el ALA disponible en las células endoteliales asociadas al tumor

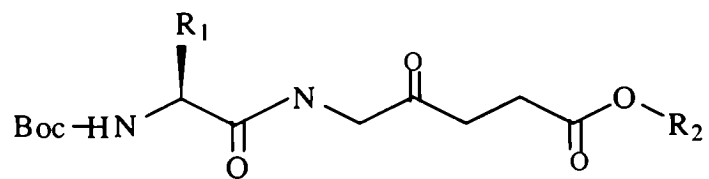
o bien en las células tumorales de pulmón. La actividad de dichas enzimas había sido estudiada previamente en estos dos tipos celulares empleados. En todas las líneas utilizadas se observó que los mejores precursores eran los aminoácidos neutros, cualquiera fuera la actividad de la APN/M. Por otro lado los derivados básicos no estimularon la biosíntesis de PPIX, aún en las células que expresaban una alta actividad de APB. Y los derivados ácidos fueron pobres precursores del ALA. En el mismo trabajo se demostró que para liberar el ALA de los derivados, es necesaria una aminopeptidasa activa. Mediante el uso de derivados bloqueados, que no podían ser sustrato de las aminopeptidasas similares a la APN/M (figura IV.7)



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Nombre	
-CH <sub>3</sub>	€ H <sub>3</sub>	Ala-ALA-O-metil	(Trifluoracetato)
-CH <sub>3</sub>	€ <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	Ala-ALA-O-hexil	(Trifluoracetato)
-CH <sub>3</sub>	€ <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Phe-ALA-O-metil	(Trifluoracetato)
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub> TFA	-C H <sub>3</sub>	Lis-ALA-O-metil	(Trifluoracetato)
-CH <sub>2</sub> -COOH	-CH <sub>3</sub>	Asp-ALA-O-metil	(Trifluoracetato)
-CH <sub>3</sub>	-H	Ala-ALA	(Trifluoracetato)

***Figura IV.6: Estructura de derivados pseudoaminoácidos de ALA sintetizados por Berger y col. (2000).***





R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Nombre
-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	Boc-Ala-ALA-O-metil
-CH <sub>3</sub>	-H	Boc-Ala-ALA

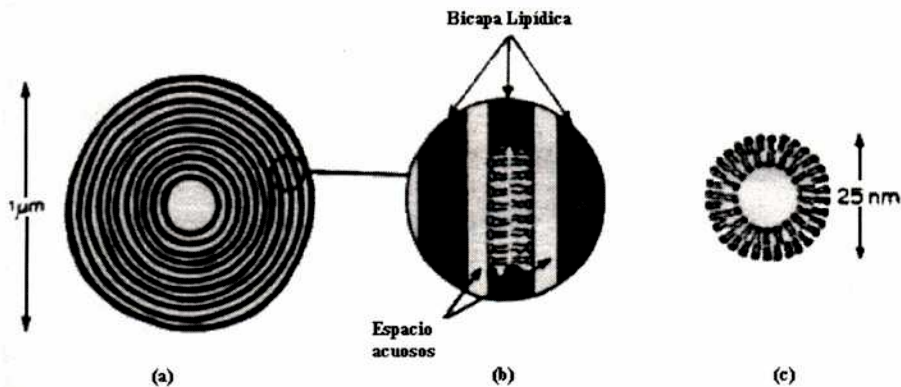
***Figura IV.7: Estructura de derivados pseudoaminoácidos N-protegidos de ALA sintetizados por Berger y col.***

## V. Liposomas.

### V.1. Introducción.

Los liposomas se utilizaron como transportadores de drogas para aumentar la eficacia de una gran variedad de agentes terapéuticos, incluyendo antineoplásicos, antibióticos e inmunomoduladores (Lasic, 1993).

La palabra liposoma designa una estructura vesicular hueca, rodeada por una o más bicapas lipídicas similares a las biológicas. Estas membranas artificiales, biodegradables y atóxicas, tienen un potencial enorme de aplicación en medicina y dermatología entre otras áreas. Debido a las propiedades físicas de los lípidos, éstos se ordenan en forma de micelas, esféricas, con sus grupos hidrofóbicos hacia el interior y los hidrofílicos hacia el exterior (Scarpa & de Gier, 1971), cuando los fosfolípidos son resuspendidos en una solución acuosa, formando espontáneamente vesículas concéntricas, con la capa lipídica separada por una capa de medio acuoso (figura V.1).



**Fig V.1:** Representación esquemática de liposomas.

(a) liposoma multilamelar, (b) vista ampliada de (a), (c) liposoma unilamelar pequeño.

Según su tamaño y el número de bicapas, los liposomas se clasifican en multilamelares (LMB), unilamelares de pequeño tamaño (SUV) y unilamelares de gran tamaño (LUV).

Los liposomas han sido estudiados extensamente como modelos de membranas biológicas. Un aspecto de esos estudios involucra el encapsulamiento dentro del liposoma de pequeñas moléculas de soluto con el fin de medir la permeabilidad de las membranas biológicas a estas moléculas (Scarpa & de Gier, 1971). Esto llevó a pensar en los liposomas como transportadores de diversas sustancias, con la ventaja de poder ser metabolizados en el cuerpo.

Se pueden formar liposomas a partir de muchos fosfolípidos diferentes, pero la composición más usada ha sido fosfatidilcolina, con o sin colesterol. Los fosfolípidos sólo forman liposomas a la temperatura en la que la cadena lipídica es fluida.

Los métodos para la preparación de liposomas actualmente son muchos y muy variables, según la molécula que se quiera encapsular. El método original y más comúnmente usado para hacer liposomas es aquél en el cual luego de mezclar los lípidos con un solvente adecuado, se secan al vacío de modo de obtener una delgada capa de lípidos. Luego éstos son resuspendidos mediante el agregado de una solución acuosa y agitados energicamente para que los lípidos se organicen espontáneamente en vesículas de diferentes tamaños. Los lípidos forman de manera espontánea y gradual liposomas multilamelares grandes, de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Bangham y col. 1974).

Batzri y Korn (1975), describieron un método en el cual una solución de lípidos en etanol era inyectada en una solución acuosa a través de una fina aguja hipodérmica. Esto producía una suspensión de liposomas pequeños con un diámetro aproximado de 25 nm. La heterogeneidad de los liposomas con respecto al tamaño es de gran importancia ya que puede ser una limitación para su uso en ciertas investigaciones. Juliano y Stamp (1975), demostraron que la tasa y el lugar de incorporación *in vivo* de liposomas grandes y pequeños podía ser muy diferente.

El volumen de solución incorporado al liposoma puede ser estimado midiendo el grado de incorporación de un soluto no iónico y no permeable como la glucosa. El volumen incorporado es entonces la fracción de soluto incorporado por el volumen total de la preparación.

Algunos de los obstáculos principales en el desarrollo de liposomas para uso terapéutico son: (a) la baja capacidad de encapsulamiento, especialmente en las vesículas de pequeño tamaño, y (b) la estabilidad de la droga encapsulada (Lasic 1993; Barenholz & Crommelin 1994).

Los liposomas pueden transportar tanto medicamentos hidrofóbicos como hidrofílicos, los primeros disueltos en la membrana lipídica que los rodea, y los segundos

en solución en el interior de las vesículas. En general las drogas hidrofílicas se transportan en vesículas unilamelares de mayor tamaño, mientras que las hidrofóbicas en liposomas multilamelares. Los liposomas pueden transportar una amplia gama de drogas, sin importar su tamaño, solubilidad u otras características, y en mayor cantidad en comparación con la droga libre. Además liberan su contenido tanto fuera como dentro de las células. Independientemente de la forma en que reconocen su objetivo, los liposomas siempre ingresan a la célula por endocitosis. Una vez en el citoplasma se fusionan con los lisosomas para formar fagosomas, donde se destruye la bicapa lipídica y se libera su contenido. Las drogas pueden actuar en la misma organela o difundir hacia otros compartimentos celulares. En menor medida, el liposoma también puede fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido directamente en el citoplasma (Gregoriadis 1995).

Los liposomas de tamaño igual o menor a los 100 nm tienen una vida media más larga a 37°C y por ende tienen mayores probabilidades de llegar al sitio blanco, con cantidades suficientes de droga, como para ejercer su acción farmacológica.

La tasa a la cual el soluto escapa del liposoma depende tanto de la naturaleza del soluto como de la composición del liposoma. Mediante la modificación de la composición de la capa lipídica es posible reducir la pérdida de una molécula en particular (Sessa & Weissmann 1970). En el caso de trabajar con compuestos iónicos, es posible disminuir la pérdida usando lípidos que tengan la misma carga que el ion que se quiere encapsular, ya que la repulsión electrostática disminuye la tasa de difusión del compuesto a través de la bicapa lipídica.

En cuanto al mecanismo de acción de los liposomas, hasta ahora no existe un acuerdo general y se ha analizado con mucha reserva, cuando se refiere a la vehiculización de drogas por liposomas hasta las capas profundas de la piel. Esto no descarta su uso para obtener efectos sobre el estrato córneo, ya que en contacto con el corneocito, el liposoma puede liberar su carga por difusión o por fusión de la bicapa con los lípidos y proteínas del estrato córneo, incorporándose a los componentes celulares y logrando de esta manera la reposición de lípidos, humedad, mejor tolerancia, etc. (Castro & Alió 2001).

Los liposomas inyectados *in vivo* se eliminan a través de las células fagocíticas en el sistema de retículo endotelial del hígado, mayoritariamente por las células de Kupffer, y en el bazo (Senior y col., 1988; Juliano, 1988). El tamaño, las características de la superficie y la fluidez de membrana juegan un rol fundamental en la tasa de depuración de los liposomas. Se sabe que el tamaño y la composición lipídica específica son importantes para

la eliminación de los liposomas del cuerpo. Los liposomas grandes se eliminan más rápidamente que los pequeños. Los liposomas cargados negativamente se eliminan más fácilmente que los que tiene carga neutra o positiva. El hecho de agregar fosfolípidos como la fosfatidilserina o el dicetilfosfato a un liposoma compuesto por fosfatidilcolina y colesterol, hace que éste sea captado por el sistema retículo endotelial más fácilmente y se elimine más rápidamente (Liu y col., 1995).

## **V.2. Liposomas y cáncer.**

En general los compuestos quimioterapéuticos poseen numerosos efectos adversos que podrían minimizarse si se transportaran encapsulados en liposomas, a la vez de mejorar su acción terapéutica. Un ejemplo importante lo constituye la doxorubicina, eficaz para el tratamiento de ciertos cánceres. Al ser administrada encapsulada en liposomas se logra evitar la cardiotoxicidad irreversible que produce (Lasic y col., 1992).

Hay muchas evidencias que señalan la utilidad y efectividad de los liposomas para el diagnóstico y seguimiento de tumores como el sarcoma de Kaposi y algunos linfomas malignos. Además el uso de isótopos como el  $^{111}\text{In}$ , da buen resultado en la detección de tejidos sarcomatosos cuando se lo aplica en formulaciones liposomales por vía i.v, ya que estos tejidos retienen por más tiempo al radioisótopo y permite su visualización mediante la centellografía (Chelvi y col.1995).

Las drogas encapsuladas en liposomas pueden administrarse también por vía i.p.. Estudios *in vivo* utilizando actinomicina D liposomal mostraron una reducida toxicidad y además incrementó el tiempo de sobrevivencia de ratones portadores de tumor ascítico (Rahman y col., 1974).

Por otro lado existen liposomas que pueden permanecer en circulación por un tiempo más largo y dadas sus características de extravasarse y acumularse preferencialmente en el tejido tumoral, son un punto de estudio importante para la terapia contra el cáncer como transportadores de drogas (Gabison & Papahadjipoulos 1988; Papahadjipoulos y col. 1991; Liu y col., 1992; Huang, 1992). Se vió en algunos casos que estos liposomas eran más eficientes para entregar la droga y para reducir el crecimiento del tumor (Allen, 1994).

Mediante el uso de polietilen glicol (PEG) en la superficie de los liposomas, se puede prolongar al doble el tiempo de estos en circulación. Como es sabido, el suero ejerce una acción opsonizante mediante la activación del complemento, lo que favorece la depuración de los liposomas. En este caso el PEG inhibiría la unión de los anticuerpos presentes por la

activación del complemento del suero, o bien inhibiría la unión del complemento activado a los liposomas (Liu y col., 1995).

### **V.3.Liposomas en la TFD.**

En lo que respecta al mejoramiento del comportamiento tumorotrópico de los fotosensibilizantes, una alternativa reciente consiste en el uso de los liposomas como transportadores de moléculas de uso en la TFD.

Hasta el momento, en general, con los liposomas tradicionales no se logró elevar la relación tumor / tejido normal del fotosensibilizante, impidiendo su uso generalizado como transportador tumorotrópico. Sin embargo, los liposomas específicamente modificados tales como los liposomas de larga circulación, ofrecen una mejor opción para establecer este tipo de transporte (Derycke y col., 2004)

Con el objetivo de estudiar si el encapsulamiento de los fotosensibilizantes aumentaba o no la eficacia de la TFD, Igarashi y col. (2003) encapsularon el Photofrin en liposomas multilamelares y se comparó su uso con la acumulación del compuesto libre luego de 8 horas de administrada la droga. Se encontró que los valores de Photofrin eran mucho más altos en el tejido tumoral cuando se usaba la droga liposomal. También se observó que el índice apoptótico en el tumor era mayor cuando se utilizaban los liposomas como vehículo, lo que evidencia una mayor acumulación de la droga en el tejido tumoral y por lo tanto una mayor efectividad para la TFD.

Se ha demostrado que el fotosensibilizante verteporfín, un derivado de benzoporfirina encapsulado en liposomas, tiene una acción efectiva tanto *in vivo* como *in vitro* (Allison y col., 1994; Young y col., 1996). Reinke y col. (1999) evaluaron el efecto de aplicaciones repetidas de la TFD en retina de primates, utilizando verteporfín administrada vía intravenosa y observaron una mejor respuesta al tratamiento, evitando los daños permanentes en la retina. Ensayos clínicos en fase 3, utilizando verteporfín mostraron que el tratamiento con este fotosensibilizante reducía significativamente el riesgo de pérdida de la visión comparado con los pacientes tratados con placebo, por lo menos durante un año, en pacientes con degeneración macular que también tenían neovascularización coroidal. El mismo trabajo sugiere que la verteporfín reduce el crecimiento de la lesión y disminuye la progresión clásica de la neovascularización coroidal (Neil, 1999).

Takeuchi y col. (2003) encontraron que utilizando la TFD antiangiogénica con bajas dosis de verteporfin, encapsulado en liposomas policatiónicos y administrado vía i.v., inducía una eficiente destrucción de las vesículas angiogénicas y subsecuentemente la destrucción de las células del tumor por apoptosis.

#### **V.4. ALA y liposomas.**

La TFD a partir de ALA como terapia para el tratamiento de cáncer de piel aún tiene limitaciones para lograr que la droga penetre eficientemente a través de la misma.

Con el objetivo de incrementar la afinidad del ALA por las células tumorales, en nuestro laboratorio se logró encapsular ALA en liposomas de fosfatidilcolina. El uso de ALA encapsulado en liposomas presenta la ventaja adicional de alcanzar una distribución más uniforme en el tumor, además de disminuir los posibles efectos neurológicos colaterales, impidiendo el paso de este precursor por la barrera hematoencefálica. Estudios *in vitro* en cultivos de explantes tisulares en medio conteniendo ALA libre o encapsulado en liposomas, mostraron que la formación de porfirinas fue mayor cuando se utilizó el precursor encapsulado (Fukuda y col., 1989).

Se ha demostrado también que la inyección intratumoral e i.p. de ALA liposomal en ratones portadores de tumor, resultó en el incremento de la síntesis de porfirinas y en una mayor relación tejido tumoral / tejido normal (Fukuda 1992a). Se encontró además que la administración previa de liposomas vacíos *in vivo*, con el objetivo de bloquear la captación hepática del ALA encapsulado inyectado vía i.t., incrementaba un 30 % el nivel de porfirinas acumuladas en el tumor, como consecuencia de una menor captación por el tejido hepático (Fukuda y col., 1992 b).

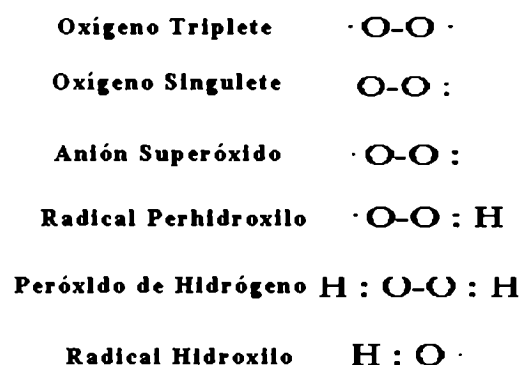
Pierre y col. (2001) con el objetivo de optimizar la administración de la droga en la TFD de cáncer de piel, utilizando liposomas con una composición lipídica semejante a la del estrato córneo de mamíferos, encontraron que había una mayor retención del ALA liposomal en la piel, llegando a la dermis y epidermis más eficientemente que la formulación acuosa.

## VI. Secuestrantes de radicales libres.

### VI.1. Introducción.

El estrés oxidativo es un término generalmente usado para describir el nivel de daño oxidativo de la célula, el tejido, u órgano, causado por las especies reactivas de oxígeno tales como el agua oxigenada y el anión superóxido (Storey, 1996). Este daño puede afectar tanto a una sola molécula como al organismo entero. Las ROS, que incluyen los radicales libres y los peróxidos, representan moléculas derivadas del metabolismo del oxígeno y se encuentran en concentraciones basales en todos los organismos aeróbicos. Existen muchas fuentes de las cuales pueden provenir las ROS, la mayoría son endógenas y producto del metabolismo normal y esencial de la célula. Por ejemplo pueden provenir del metabolismo energético de la mitocondria, o de las reacciones de detoxificación que ocurren en el hígado por el sistema de enzimas del citocromo P-450 (Turrens y col., 1982; Konstantinov y col., 1987; Halliwell B & Gutteridge 1989; Kleinveld y col., 1989). Las fuentes exógenas incluyen el humo del cigarrillo, la contaminación ambiental, el consumo de alcohol, los asbestos y las infecciones bacterianas o virales. La tasa de generación de ROS está relacionada con el consumo de oxígeno del tejido y es proporcional a la cantidad de mitocondrias presentes en éste.

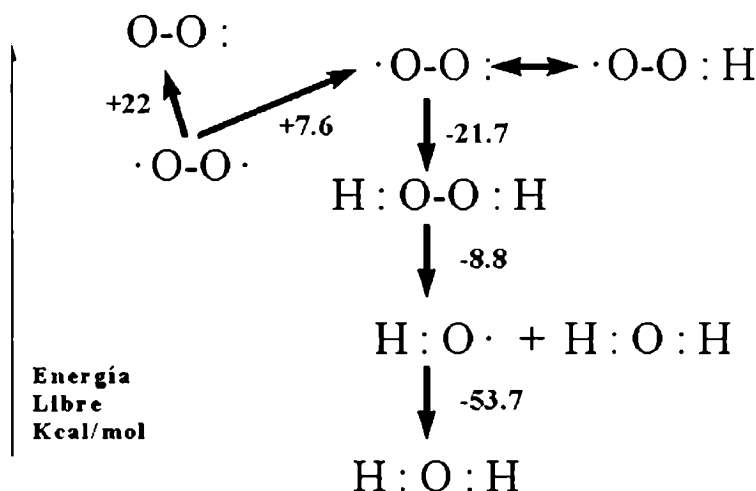
A continuación se detallan la estructura de la molécula de oxígeno en estado basal y la de algunas de las especies reactivas del mismo.



El oxígeno en estado basal se encuentra en el estado triplete y al absorber una cantidad de energía suficiente puede pasar a formar el oxígeno singulete. De esta forma

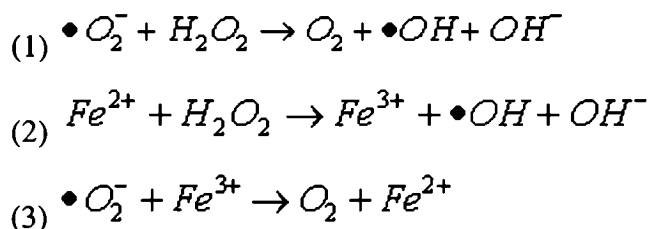


puede participar en reacciones de transferencia de electrones preferentemente con moléculas de origen orgánico. El oxígeno también puede activarse mediante reducción monovalente para formar el anión superóxido ( ${}^{\cdot}\text{O}_2^-$ ), agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) y finalmente agua (figura VI.1).



**Figura VI.1:** Estados de activación del oxígeno. El oxígeno no activado es un biradical. A partir del estado triplete se puede activar mediante la reversión del spin para formar el estado singulete o por reducción. La primera reducción forma el anión superóxido. Las siguientes forman el agua oxigenada, el radical hidroxilo y agua.

En el siglo pasado Fenton había descrito el potencial de oxidación del agua oxigenada en presencia de sales ferrosas (Fenton, 1899). En los sistemas biológicos en presencia de trazas de hierro, la reacción de agua oxigenada y anión superóxido prosigue a la formación del radical hidroxilo, el cual es altamente destructivo y es capaz de iniciar la oxidación de sustratos orgánicos:



La retención selectiva de la droga en el tejido enfermo es sin duda uno de los puntos más importantes para el éxito de cualquier agente de TFD. Dado que esta terapia actúa a

través de la formación de ROS, principalmente el  $^1\text{O}_2$  y teniendo en cuenta que la distancia de difusión del oxígeno singlete es relativamente corta (0,1 micron aproximadamente), el fotosensibilizante debería estar íntimamente asociado al sustrato para obtener una mayor eficiencia de fotosensibilización. En base a esto y a algunas de las características únicas que presenta el tejido tumoral, actualmente hay varias líneas de investigación trabajando en el uso de agentes de protección natural de las células, conocido como medio de rescate de las células normales.

## **VI.2. Defensas antioxidantes.**

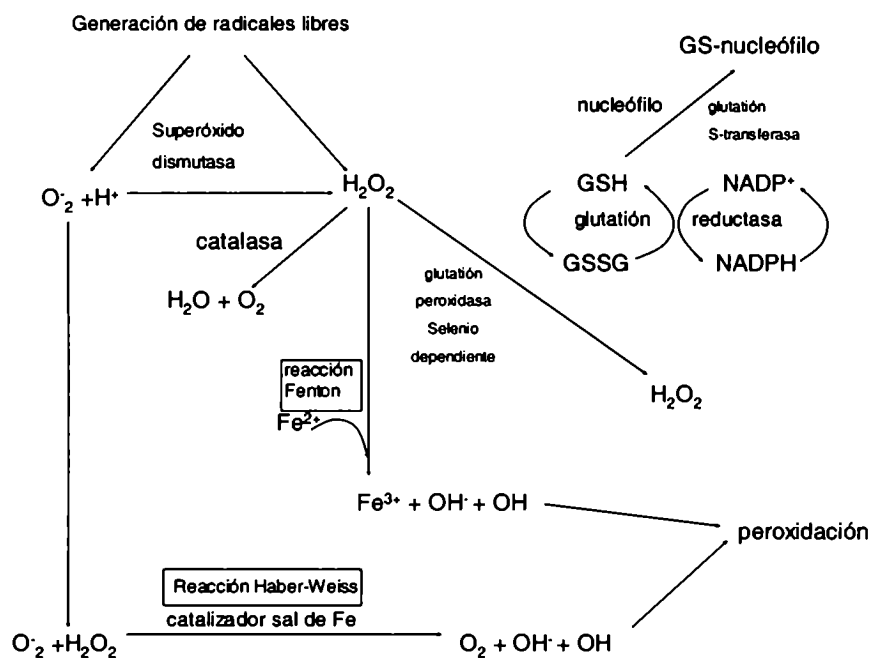
Todos los componentes celulares son susceptibles de ser atacados por ROS, particularmente por el  $\bullet\text{OH}$ . La acción sobre las proteínas, puede conducir a la modificación de aminoácidos, la oxidación de grupos sulfhidrilos, produciendo cambios conformacionales, también puede producir el clivaje de uniones peptídicas así como la modificación en glicoproteínas (Stadtman, 1992; Sies, 1993). Las ROS también pueden actuar sobre el ADN causando rupturas y modificación de las bases, conduciendo a mutaciones puntuales (Sies, 1993) Pueden asimismo actuar sobre los ácidos grasos poliinsaturados, lo cual lleva a la formación de hidroperóxidos lipídicos. La presencia de éstos en membrana produce una disfunción celular ya que modifican la fluidez permitiendo el pasaje de iones como el  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la membrana y la activación de fosfolipasas, conduciendo eventualmente a la ruptura de la membrana celular (Halliwell, 1992).

Debido a esto las células mantienen sus defensas antioxidantes. Se habla de tres niveles de protección:

- (1) prevención de la formación de ROS
- (2) eliminación de ROS mediante la acción de sequestrantes o enzimas antioxidantes
- (3) reparación de los componentes celulares dañados.

Un aspecto importante es la prevención de la formación del radical hidroxilo (Balla y col., 1992). El glutatión (GSH) es un tripéptido extremadamente importante en la defensa antioxidante para la célula y posee varias acciones: (a) Como sustrato de enzimas antioxidantes, (b) como sequestrante del radical hidroxilo y del oxígeno singlete, (c) como reactivador de algunas enzimas inhibidas bajo condiciones oxidantes, y en la generación de la vitamina E (Redy y col., 1982; Halliwell B & Gutteridge 1989). En general, la relación GSH/GSSG es un buen indicador del nivel de estrés oxidativo en la célula.

Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen a la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZnSOD), la SOD con manganeso (MnSOD) y la catalasa (figura VI.2). La SOD convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, mientras que la catalasa degrada el peróxido de hidrógeno a agua. (Sanders y col., 2003). Se demostró que estas enzimas, las cuales mantienen el balance redox dentro de la célula, pueden ser moduladas por radiación UVB y UVA *in vitro* (Sasaki y col., 1997; Leccia y col., 1998; Poswig y col., 1999; Leccia y col., 2001) e *in vivo* (Shindo y col., 1993; Okada y col., 1994). Por otro lado la glutatión peroxidasa (GPx) que tiene dos isoformas, la Selenio dependiente y la Selenio independiente, la primera encargada de la detoxificación de los peróxidos (Raes y col., 1987; Simmons & Jamall, 1988) y la segunda que degrada los hidroperóxidos (Ahmad y col., 1989).



**Figura VI.2:** Formación de especies reactivas de oxígeno.

*Vías de formación de ROS y acción de alguna de las enzimas involucradas en el sistema de defensa celular.*

Las enzimas involucradas en la defensa secundaria 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 (Darr & Fridovich, 1994; Thiele y col., 2000; Sander y col., 2002). La peroxidación lipídica conduce a la formación de malondialdehído básicamente, 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 puede ser usado como índice de estrés oxidativo (Moore y col., 1998; Hartley y col., 1999).

Varios estudios han investigado el sistema de enzimas antioxidantes en diversas líneas celulares de cáncer de piel, demostrando que existe un desbalance en el estado redox de la célula (Rabilloud y col., 1990; Lehtola y col., 1995; Picaro y col., 1996; Meyskens y col., 1997)

### **VI.3. ROS y las defensas antioxidantes en la TFD.**

La aparición de células apoptóticas y efectos citotóxicos es prevenida en células de leucemia murina tratadas con fotosensibilizadores con blanco lisosomal, cuando el secuestrante trolox o alfa-tocoferol succinato están presentes durante la irradiación (Kessel y col., 1996). El manitol y la melatonina son conocidos secuestrantes del radical hidroxilo, mientras que la histidina, el triptofano y el glutatión reducido entre otros son antioxidantes protectores contra el oxígeno singulete.

Como ya se ha dicho anteriormente, el GSH es considerado uno de los componentes más importantes del mecanismo de defensa celular. Dada la alta concentración en que se encuentra presente en las células, es probable que las ROS generadas sean secuestradas mediante reacciones que involucren al GSH antes de que comience el daño celular (Jones y col., 1981). El glutatión reducido actúa como un donador de hidrógeno y como tal es un sustrato clave de las enzimas antioxidantes como la GPx dependiente de Selenio (Tan y col., 1986).

Es por eso que los tioles intracelulares pueden jugar un papel importante en el mecanismo de diferentes modalidades del tratamiento del cáncer tales como radiaciones ionizantes, quimioterapia e hipertermia (Arriek & Nathan, 1984) así como también en la TFD. En varios estudios se ha visto que la resistencia a los quimioterápicos podría deberse a un alto contenido de GSH, el cual actuaría protegiendo a la célula de las especies citotóxicas vía detoxificación, o bien actuando como secuestrante de radicales libres y reparando el daño oxidativo celular por donación de hidrógenos (Siemann y col., 1993; Richarson y col., 1995). También puede proteger a la célula del daño producido por el  $^1\text{O}_2$  generado durante las terapias, ayudando a la reparación del ADN y manteniendo la integridad de membrana a través de la formación de disulfuros mixtos (Isaacs & Binkley 1979; Revesz & Larsson 1981). Se ha visto que la depleción de GSH intracelular, sensibiliza más a las células al daño fotodinámico (Millar y col., 1986).

La S-adenosil-L-metionina (SAM) es un precursor del GSH que a diferencia de éste puede atravesar la membrana fácilmente. Se ha demostrado que suplementando la solución de preservación de órganos con SAM en lugar de GSH mejoraba la captura del radical hidroxilo, así como la quelación de iones hierro (Evans y col., 1997). Otro compuesto sulfuroso como la N-acetil-L-cisteína (NAC), incrementa los niveles de glutatión y previene la patología producida por radicales libres y ROS (Patterson y col., 1986). Tao y col. (1996) encontraron que el NAC era capaz de contrarrestar el efecto de la TFD mediante la activación de proteinquinasas, y también se encontró que el NAC protegía de la apoptosis generada por fotosensibilización con pirofeoforbido-metilester en células de cáncer de colon (Matroule y col., 2001). Sin embargo el NAC no pudo prevenir la fotosensibilización inducida por la PPIX en la protoporfiria eritropoyetica (Bijlmer-lest y col., 1992) y en pacientes tratados con Photofrin (Baas at al., 1995).

## **Referencias**

- Ackroyd R., Kelty C., Brown N. & Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.*, **74**: (2001) 656-69.
- Agarwall M., Clay M., Harvey H., Evans H., Antunez A. & Oleinick N. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.*, **51**: (1991) 5993-5996.
- Agarwall M., Larkin H., Zaidi S., Mukhtar H. & Oleinick N. Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. *Cancer Res.*, **53**: (1993) 5897-5902.
- Ahmad S., Beilstein M.A. & Pardini R.S. Glutathione peroxidase activity in insects: a reassessment. *Archives of insect biochemistry and physiology.*, **12**: (1989)
- Allen T. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol Sci.*, **15**: (1994) 215-20.
- Allison B., Pritchard P. & Levy J. Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer.*, **69**: (1994) 833-9.
- Arrick B. & Nathan C. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res.*, **44**: (1984) 4224-4232.
- Ashmun R. & Look A. Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood.*, **75**: (1990) 462-9.
- Athar M., Elmets D., Bickers D. & Mukhtar H. A novel mechanism for generation of superoxide anions in hematoporphyrin derivative mediated cutaneous photosensitization: activation of xantine oxidase pathways. *J. Clin. Invest.*, **83**: (1989) 1137-43.
- Auler H. & Banzer G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwülstkranken Menschen und Tieren. *Z. Krebsforsch.*, **53**: (1942) 65-68.
- Baas P., van Mamsom I., van Tinteven H., Stewart F., van Zandwijk N. Effect of N-acetylcysteine on Photofrin induced skin photosensitivity in patients. *Lasers Surg Med.*, **16**: (1995) 359-67
- Bangham A., Hill M. & Millar N. *In Method in Membrane Biology (Korn ED ed.)*, **1**: Plenum Press, New York (1974) 1-68.
- Barenholz Y. & Crommelin D. *Liposomes as pharmaceutical dosage forms In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (Swarbrick J & Boyalton JC eds.)* Dekker inc, New York (1994) 1-39.

- Barry B. & Bennett S. Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol., hydrocortisone and progesterone through human skin. *J Pharm Pharmacol.* **39:** (1987) 535-46
- Batlle A. The importance of prebiotic porphyrins in biopoiesis. *Int. J. Unit. Sci.*, **2:** (1989) 299-312.
- Batlle A., Llambías E., Wider E. & Tigier H. Porphyrin biosíntesis in the soybean callus tissue system XV. The effect of growth conditions. *Int. J. Biochem.*, **6:** (1975) 591-606.
- Batlle, A. Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, suplemento 3 (1997).
- Batzri S & Korn E. Interaction of phospholipid vesicles with cells. Endocytosis and fusion as alternate mechanisms for the uptake of lipid-soluble and water-soluble molecules. *J Cell Biol.*, **66:** (1975) 621-34.
- Beems E., Dubbelman T., Lugtenburg J., Van Best J., Smeets M. & Boegheim J. Photosensitizing properties of bacteriochlorophyllin a and bacteriochlorin a, two derivatives of bacteriochlorophyll a. *Photochem. Photobiol.*, **46:** (1987) 639-43.
- Ben-Hur E. & Rosenthal I. Factors affecting the photokilling of cultured Chinese hamster cells by phthalocyanines. *Radiat. Res.*, **103:** (1985) 403-9.
- Ben-Hur E., Moor A. & Margolis-Nunno H., et al. The photodecontamination of cellular blood components: mechanisms and use of photosensitization in transfusion medicine. *Transfus. Med. Rev.*, **10:** (1996) 15-22.
- Benson R., Farrow G., Kinsey J., Cortese D., Zincke H. & Utz D. Detection and localization of *in situ* carcinoma of the bladder with Hematoporphyrin derivative. *Mayo Clin. Proc.*, **57:** (1982) 548-555.
- Berger Y., Greppi A., Siri O., Neier R., Juillerat-Jeanneret L. Ethylene glycol and amino acid derivatives of 5-aminolevulinic acid as new photosensitizing precursors of protoporphyrin IX in cells. *J. Med.Chem.* **43:** (2000) 4738-4746.
- Berns M., Rettenmaier M. & McCullough J. Response of psoriasis to red laser light (630 nm) following systemic injection of hematoporphyrin derivative. *Lasers Surg. Med.*, **4:** (1984) 73-77.
- Bertolini G., Salvato B., Dall'Acqua M., Vazzoler M. & Jori G. Hematoporphyrin sensitized photoactivation of .. *Photochem. Photobiol.*, **38:** (1984) 811-16.

- Bijlmer-Iest J., Baarte de la Faille H., van Asbeck B., van Hattum J., van Weelden H., Marx J. & Koningsberger J. Protoporphyrin photosensitivity cannot be attenuated by oral N-acetylcysteine. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **9**: (1992) 245-249.
- Bissonnette R., Tremblay J., Juzenas P., Boushira M. & Lui H. Systemic photodynamic therapy with aminolevulinic acid induces apoptosis in lesional T lymphocytes of psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol.*, **119**: (2002) 77-83.
- Blumer M. Evidence for isomerism in fossil porphyrins of 420- 504 molecular weight. *Ann. Acad. Brasil. Cienc.*, **46**: (1974) 77-81.
- Boehncke W., Sterry W. & Kaufmann R. Treatment of psoriasis by topical photodynamic therapy with polychromatic light. *Lancet.*, **343**: (1994) 801.
- Bridges J., Sargent N. & Upshall D. Rapid absorption from the urinary bladder of a series of n-alkyl carbamates: a route for the recirculation of drugs. *Br J Pharmacol.*, **66**: (1979) 283-9.
- Buettner G. & Need M. Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by hematoporphyrin derivative, ascorbate and light. *Cancer Lett*, **25**: (1985) 297-304.
- Bugleski P., Porter C. & Dougherty T. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in malignant and normal tissue of the mouse. *Cancer Res.*, **41**: (1981) 4606-4612.
- Bundgaard H., Buur S., Chang C. & Lee H. Timolol prodrugs: synthesis, stability and lipophilicity of various alkyl, cycloalkyl and aromatic esters of timolol *Int. J. Pharm.*, **46**: (1988) 77.
- Cairnduff F., Roberts D., Dixon B. & Brown S. Response of a rodent fibrosarcoma to photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid or polyhaematoporphyrin. *Int. J. Radiat. Biol.*, **67**: (1995) 93-9.
- Casas A., Batlle A., Butler A.R., Robertson D., Brown E., MacRobert A., & Riley P. Comparative effect of ALA derivatives on protoporphyrin IX production in human and rat skin organ cultures. *British J. Cancer*. **80**: (1999) 1525-1532.
- Castro A. & Alió A. Importancia del vehículo en la terapia tópica. *Act. Terap. Dermatol.*, **24**: (2001) 142-148.
- Chan S. & Po A. Prodrugs for dermal delivery, *Int. J. Pharmac.*, **55**: (1989) 1-16.
- Chapman J., Stobbe C. & Arnfield M. Oxygen dependency of cell killing *in vitro* by light-activated Photofrin II. *Radiat. Res.*, **126**: (1991) 73-79.



- Chelvi T., Jain S. & Ralhan R. Hyperthermia-mediated targeted delivery of thermosensitive liposome-encapsulated melphalan in murine tumors. *Oncol. Res.*, **7**: (1995) 393-8.
- Cookson G. & Rimington C. Porphobilinogen. Chemical constitution. *Nature.*, **171**: (1953) 875-876.
- Dailey H. & Smith A. Differential interactions of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem. J.*, **223**: (1984) 441-445.
- Darr D. & Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.*, **102**: (1994) 671-5.
- Davey F., Mick R., Nelson D., MacCallum J., Sobol R., Royston I., Cuttner J., Ellison R. & Bloomfield C. Morphologic and cytochemical characterization of adult lymphoid leukemias which express myeloid antigen. *Leukemia.*, **2**: (1988) 420-6.
- Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem. Photobiol.*, **64**: (1996) 182-187.
- Derycke A. & de Witte P. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev.*, **56**: (2004)17-30
- Di Ilio C., Sacchetta P., del Boccio., LaRovere G. & Federici G. Glutathione peroxidase., glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Lett.*, **29**: (1985) 37-42.
- Diamond I., Granelli S., McDonagh A., Nielsen S., Wilson C. & Jaenicke R. Photodynamic Therapy of malignant tumors. *Lancet.*, **2**: (1972) 1175-1177.
- Dixon M., Webb E. *Enzymes.*, Longman Group: London., (1979).
- Doiron D., Profio A., Vincent R. & Dougherty T. Fluorescence bronchoscopy for detection of lung cancer. *Chest.*, **76**: (1979) 27-32.
- Dolan M., Roy S., Garbiras B., Helft P., Paras P., Chae M., Moschel R. & Pegg A. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase inactivation by ester prodrugs of O6-benzylguanine derivatives and their rate of hydrolysis by cellular esterases. *Biochem. Pharmacol.*, **55**: (1998) 1701-9.
- Dougherty T. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2**: (1984) 83-116.
- Dougherty T. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.*, **45**: (1987) 879-889.
- Dougherty T. & Marcus S. Photodynamic therapy. *Eur. J. Cancer.*, **28**: (1992) 1734-1742.

- Dougherty T., Grindey G., Fiel R., Weishaupt K. & Boyle D. Photoradiation therapy II: cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**: (1975) 115-121.
- Dougherty T., Potter W. & Weishaupt K. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **170**: (1984) 301-314.
- Dube J., Frenette G., Tremblay Y., Belanger A. & Tremblay R. Single case report of prostate adenocarcinoma in a dog castrated three months previously. Morphological., biochemical., and endocrine determinations. *Prostate.*, **5**: (1984) 495-501.
- Edelson R., Berger C. & Gasparro F. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, **316**: (1987) 297-303.
- El-Sharabasy M., El-Waseef A., Hafez M. & Salim S. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br. J. Cancer.*, **65**: (1992) 409-412.
- Evans P., Whiteman M., Tredger M. & Halliwell B. "Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids". *Free Rad. Biol. Med.*, **23**: (1997) 1002-1008.
- Farr S. & Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, **55**: (1991) 561-85.
- Fenton H. Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. *Proc. Chem Soc.*, **25**: (1899) 224.
- Figge F., Weiland G. & Manganiello L. Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Roy. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68**: (1948) 640-641.
- Freitas I. Lipid accumulation., the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissues. *J. Photochem. Photobiol.*, (1990) 359-361.
- Friesen S., Hjortland G., Madsen S., Hirschberg H., Engebraten O., Nesland J. & Peng Q. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (review). *Int J Oncol.*, **21**: (2002) 577-582
- Fritsch C., Goerz G. & Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch. Dermatol.*, **134**: (1998) 207-214.
- 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.* **25**: (1993) 1395-1398.

- Fukuda H., Paredes S. & Batlle A. Tumor-localizing properties of porphyrins. *In vitro* studies using the porphyrin precursor aminolevulinic acid in free and liposome encapsulated forms. *Drug Des. Deliv.*, **5**: (1989) 133-139.
- Fukuda H., Paredes S. & Batlle A. Tumor-localizing properties of porphyrins. *In vivo* studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **102**: (1992a) 433-436.
- Fukuda H., Paredes S., Casas A., Chueke F. & Batlle A. Potential of liposome-entrapped aminolevulinic acid in cancer therapy. Effect of prior injection of empty liposomes and different routes of administration. *Cancer J.*, **5**: (1992b) 295-299.
- Gabizon A. & Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: (1988) 6949-6953.
- Gaffney D. & Sieber F. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of soluble and membrane-bound enzymes in L1210 leukemia cells. *Cancer Res.*, **50**: (1990) 7765-7769.
- Gaullier J., Berg K., Peng Q., Anholt H., Selbo P., Ma L. & Moan J. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cell in culture. *Cancer Res.* **57**: (1997) 1481-1486.
- Girotti A. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.*, **51**: (1990) 497-509.
- Gollnick S., Vaughan L. & Henderson B. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **62**: (2002) 1604-1608.
- Gomer C. Photodynamic therapy in the treatment of malignancies. *Semin. Hematol.*, **26**: (1989) 27-34.
- Gomer C., Luna M., Ferrario A. & Rucker N. Increase transcription and translation of heme oxygenase in Chinese Hamster fibroblasts following photodynamic stress or Photofrin II incubation. *Photochem. Photobiol.*, **53**: (1991) 275-279.
- Gomer C., Rucker N. & Murphee A. Differential cell photosensitivity following photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **48**: (1988) 4539-4542.
- Granick S. & Bogorad L. Porphobilinogen a monopyrrole. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**: (1953) 3610.
- Grebenova D., Cajthamlova H., Bartosova J., Marinov J., Klamova H., Fuchs O. & Rca Z. Selective destruction of leukaemic cells by photo-activation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin-IX., *J. Photochem. Photobiol.*, **47**: (1998) 74-81.

- Greenwald R. Drug delivery systems: anticancer pro-drugs and their polymeric conjugates. *Expert. Opin. Ther. Pat.*, **7**: (1997) 601-609.
- Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.*, **13**: (1995) 527-37.
- Guy R. & Hadgraft J. *In Prodrugs-Topical and Ocular Drug Delivery.*, (Sloan ,Dekker eds.) Dekker inc, New York (1992)., pp. 1-16.
- Halliwell B & Gutteridge J. *Free Radicals in Biology & Medicine.* Oxford, Clarendon Press., UK. (1989)
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, **59**: (1992) 1609-1623.
- Hamblin M. & Newman E. On the mechanism of the tumour- localising effect in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.*, **23**: (1994) 3-8.
- Hamblin M., Zahra T., Contag C., McManus A. & Hasan T. Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J. Infect. Dis.*, **187**: (2003) 1717-1725.
- 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.*, **161**: (1999) 23–33.
- Hayashi T., Saito T., Sato H., Kuroiwa Y. & Aizawa K. Direct visualization of atherosclerosis in small coronary arteries using the epifluorescence stereoscope. *Cardiovasc. Res.*, **30**: (1995) 775-780.
- He J., Whitacre C., Xue L., Berger N. & Oleinick N. Protease activation and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment. *Cancer Res.*, **58**: (1998) 940-946.
- He X., Sikes R., Thomsen S., Chung L. & Jacques S. Photodynamic therapy with Photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem. Photobiol.*, **59**: (1994) 468-473.
- Hryhorenko E., Rittenhouse-Diakun K., Harvey N., Morgan J., Stewart C. & Oseroff A. Characterization of endogenous protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in resting and activated peripheral blood lymphocytes by four-color flow cytometry., *Photochem. Photobiol.*, **67**: (1998) 565-572.
- Huang L. Stealth liposomes™, Ninja liposomes or cryptosomes: are they really sterically stabilized liposomes? *J. Liposome Res.* **2**: (1992) 451-454.

- Igarashi A., Konno H., Tanaka T., Nakamura S., Sadzuka Y., Hirano T. & Fujise Y. Liposomal Photofrin enhances therapeutic efficacy of photodynamic therapy against the human gastric cancer. *Toxicol Lett.*, **145**: (2003)133-141.
- Imlay J. & Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.*, **240**: (1986) 1302-1309.
- Isaacs J. & Binkley F. Glutathione dependent control of protein disulfide-sulfhydryl content by subcellular fractions of hepatic tissue. *Biochim. Biophys. Acta.*, **497**: (1979) 192-204.
- Jamieson C., McDonald W. & Levy J. Preferential uptake of benzoporphyrin derivative by leukemic versus normal cells. *Leuk. Res.*, **14**: (1990) 209-219.
- Jarvinen T., Poikolainen M., Suhonen P., Vepsalainen J., Alaranta S. & Urtti A. Comparison of enzymatic hydrolysis of pilocarpine prodrugs in human plasma, rabbit cornea, and butyrylcholinesterase solutions. *J Pharm Sci.*, **84**: (1995) 656-60.
- Jones D., Eklow L., Thor H. & Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contribution of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenous generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, **210**: (1981) 505-516.
- Jori G. *In vivo* transport and pharmacokinetic behavior of tumours photosensitizers. *Ciba Found Symp.*, **146**: (1989) 78-94.
- Jori G. Photosensitized processes *in vivo*: proposed phototherapeutic applications. *Photochem. Photobiol.*, **52**: (1990) 439-443.
- Juillerat-Jeanneret L., Lohm S., Hamou M. & Pinet F. Regulation of aminopeptidase A in human brain tumor vasculature: evidence for a role of transforming growth factor-beta. *Lab Invest.*, **80**: (2000) 973-80.
- Juliano R. & Stamp D. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**: (1975) 651-658.
- Juliano R. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2**: (1988) 31-54.
- Kelly J. & Snell M. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, **155**: (1976) 150-151.
- Kennedy J. & Pottier R. Endogenous protoporphyrin IX., a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **14**: (1992) 275-292.

- Kennedy J., Pottier R & Pross G. Photodynamic Therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **6**: (1990) 143-148.
- Kessel D. & Luo Y. Delayed oxidative photodamage induced by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **64**: (1996) 601-604.
- Kessel D. & Spikes E. Porphyrin accumulation by atheromatous plaques of the aorta. *Photochem. Photobiol.*, **40**: (1984) 59-63.
- Kessel D. & Woodburn K. Biodistribution of photosensitizing agents. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.*, **25**: (1993) 1377-1383.
- Kessel D., Thompson P., Musselman B. & Chang C. Probing the structure and stability of the tumor localizing derivative of hematoporphyrin by reduction with LiAlH<sub>4</sub>. *Cancer Res.*, **47**: (1987) 4642-4645.
- Kleinveld H., Swaak A., Hack C & Koster J. Interactions between oxygen free radicals and proteins. *Scand. J. Rheumatol.*, **18**: (1989) 341-352.
- Kloek J. & Beijersbergen van Henegouwen G. Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **64** : (1996) 994-1000.
- Kloek J., Akkermans W. & Beijersbergen van Henegouwen G. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, **67**: (1998) 150-154.
- Kolesnikov., M. & Egorov., I. Porphyrins and phycobilins in precambian rocks. *Orig. Life.*, **8**: (1977) 383-390.
- Konstantinov A., Peskin A., Popova E., Khomutov G & Ruuge E. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.*, **894**: (1987) 1-10.
- Kurwa H. & Barlow R. The role of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Exp Dermatol.*; **24**: (1999) 143-148.
- Ladner D., Steiner R., Allemann J., Haller U. & Walt H. Photodynamic diagnosis of breast tumours after oral application of aminolevulinic acid. *Photodynamic Diagnosis Information*, **84**: (2001) 33-37.
- Lange N., Jichlinski P., Zellweger M., Forrer M., Marti A., Guillou L., Kucera P., Wagnieres G. & van den Bergh H. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *Br J Cancer.*, **80**: (1999) 185-193.

- Lasic D. *Liposomes: From physics to applications. (Lasic D ed.) Elsevier., Amsterdam* (1993) pp 580 .
- Lasic D., Ceh B., Stuart M., Guo L., Frederick P. & Barenholz Y. Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1239**: (1995) 145-156.
- Lasic D., Frederik P., Stuart M., Barenholz Y. & McIntosh T. Gelation of liposome interior. A novel method for drug encapsulation. *FEBS Lett.*, **312**: (1992) 255-258.
- Leccia M. Richard M. & Joanny-Crisci F. UV-A1 cytotoxicity and antioxidant defence in keratinocytes and fibroblasts. *Eur. J. Dermatol.*, **8**: (1998) 478–482.
- Leccia M., Yaar M., Allen N. & Beani J. Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.*, **10**: (2001) 272–279.
- Lehtola K., Laurikainen L. & Leino L. Antioxidant enzymes are elevated in dimethylbenz (a) anthracene-induced neoplastic murine keratinocytes containing an active ras-Ha oncogene. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, **121**: (1995) 402–406.
- Leivovici L., Schoenfeld N., Yehoshua H., Mamet R., Rakowsky E., Schindel A. & Atsom A. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer.*, **62**: (1988) 2297-2300.
- Lemoli R., Igarashi T., Knizevski M., Acaba L., Richter A., Jain A., Mitchell D., Levy J. & Gulati S. Dye-mediated photolysis is capable of eliminating drug-resistant (MDR<sup>+</sup>) tumor cells. *Blood.*, **81**: (1993) 790-800.
- Lin L., Cook D. & Wieseahn G. Photochemical inactivation of viruses and bacterias in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long wavelength ultraviolet light. *Transfusion.*, **37**: (1997) 423-435.
- Lipson R., Baldes E. & Olsen A. The use of hematoporphyrin in tumour destruction. *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**: (1961) 1-11.
- Liu D., Hu Q. & Song Y. Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanisms. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1240**: (1995) 277-284.
- Liu D., Mori A. & Huang L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta*, **1104**: (1992) 95-101.
- Lydaki E., Dimitriou H., Papazoglou T., Liu W.Q. & Kalmanti M. Merocyanine 540 mediated photolysis of normal bone marrow., committed hemopoietic progenitors and neoplastic cells., implications for bone marrow purging. *Leuk. Res.*, **21**: (1997) 641-650.

- Malik Z. & Lugaci H. Destruction of erythroleukemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins., *Br. J. Cancer.*, **56**: (1987) 589-595.
- Malik Z., Hanania J. & Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins. An alternative approach to antimicrobial drugs. *J. Photochem. Photobiol.*, **5**: (1990) 281-293.
- Malik, Z. & Lugaci, H. Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *British Journal of Cancer*, **56**: (1987)589-595.
- Markey G., Curry R., Swain D., Morris T., McCormick J., Alexander H. & Edgar S. Monocyte esterase deficiency in gastrointestinal cancer. *J Clin Pathol.*, **46**: (1993) 529-532.
- Marnett L. Chemistry and biology of DNA. damage by malondialdehyde. *IARC Sci. Publ.*, **150**: (1999) 17–27.
- Marti A., Lange N., van den Bergh H., Sedmera D., Jichlinski P. & Kucera P. Optimisation of the formation and distribution of protoporphyrin IX in the urothelium: an in vitro approach. *J Urol.*, **162**: (1999) 546-552.
- Matroule J., Carthy C., Granville D., Jolois O., Hunt D. & Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene.*, **20**: (2001) 4070-4084.
- Mercer Smith J. & Mauzerall D. Molecular hydrogen production by uroporphyrin and coproporphyrin. A model for the origin of photosynthetic function. *Photochem. Photobiol.*, **34**: (1981) 407-410.
- Merchat M., Bertolini G., Giacomini P., Villanueva A. & Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **32**: (1996) 153-157.
- Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische). Wirkung des hematoporphyrins und andere Derivative des Bluts and Gallenfarbstoffs. *Arch. Dtsch. Klin. Med.*, **112**: (1913) 476-503.
- Meyskens F. Jr, Chau H., Tohidian N. & Buckmeier J. Luminolenhanced chemiluminescent response of human melanocytes and melanoma cells to hydrogen peroxide stress. *Pigment. Cell. Res.*, **10**: (1997) 184–189.
- Miller A. & Henderson B. The influence of cellular glutathione content on cell survival following photodynamic treatment *in vitro*. *Radiat. Res.*, **107**: (1986) 83-94.
- Minnock A., Vernon D., Schofield J., Griffiths J., Parish J. & Brown S. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phtalocyanine to photoinactivate both



- Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **32**: (1996) 159-164.
- Miyamoto Y., Umabayashi Y. & Nishisaka T. Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B*, **53**: (1999) 53-59.
- Moan J. & Berg K. Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem. Photobiol.*, **55**: (1992) 931-948.
- Moan J., Berg. K., Kvam E., Western A., Malik Z., Ruck A. & Schneckenburger H. Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Found Symp.*, **146**: (1989) 95-111.
- Moan J., Liu M., Iani V. On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *Int. J. Cancer.*, **92**: (2001) 139-143.
- Momma T., Hamblin M., Wu H. & Hasan T. Photodynamic therapy of orthotopic prostate cancer with benzoporphyrin derivative: local control and distant metastasis. *Cancer Res.*, **58**: (1998) 5425-5431.
- Moore K. & Roberts L. 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.*, **28**: (1998) 659-671.
- Morgan A., Garbo G., Kreimer-Birnbaum M., Keck R., Chaudhuri K. & Selman S. Morphological study of the combined effect of purpurin derivatives and light on transplantable rat bladder tumors. *Cancer Res.*, **47**: (1987) 496-498.
- Morton C. The emerging role of 5-ALA-PDT in dermatology: is PDT superior to standard treatments? *J Dermatolog Treat.*, **13**: (2002) 25-29
- Navone N., Polo C., Frisardi A., Andrade N. & Batlle A. Heme biosynthesis in human breast adenocarcinoma. Mimetic *in vitro* studies and some heme enzymic activity levels. *Int. J. Biochem.*, **22**: (1990) 1407-1411.
- Nelson J., Roberts W. & Berns M. In vivo studies on the utilization of mono-L-aspartyl chlorin (NPe6) for photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **47**: (1987) 4681-4685.
- Neuberger A. & Scott J. Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis. *Nature.*, **172**: (1953) 1093-1094.
- Nitzan Y., Shainberg B. & Malik Z. Effect of photoactivated hematoporphyrin on Gram-positive bacteria. *Curr. Microbiol.*, **15**: (1987) 251-258.
- Nitzan Y., Shainberg B. & Malik Z. The mechanism of photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* by deuteroporphyrin. *Curr Microbiol.*, **19**: (1989) 265-269.

- Noodt B., Berg K., Stoke T., Peng Q. & Nesland J. Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br. J. Cancer.* **74:** (1996) 22-29.
- Obochi M., Canaan A., Jain A., Richter A. & Levy J. Targeting activated lymphocytes with photodynamic therapy: susceptibility of mitogen-stimulated splenic lymphocytes to benzoporphyrin derivative (BPD) photosensitization. *Photochem. Photobiol.*, **62:** (1995) 169-175.
- Okada K., Takahashi Y. & Ohnishi K. Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. *J. Dermatol. Sci.* **8:** (1994) 183–186.
- Oleinick N., Chiu S., Ramakrishnan N & Xue L. The formation., identification and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Brit. J. Cancer.*, **55:** (1986) 135-140.
- Ormrod D. & Jarvis B. Topical aminolevulinic acid HCl photodynamic therapy. *Am J Clin Dermatol.*, **1:** (2000) 133–139.
- Pandey R., Bellnier D., Smith K. & Dougherty T. Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **53:** (1991) 65-72.
- Papahadjopoulos D., Allen T., Gabizon A., Mayhew E., Matthay K., Huang S., Lee K., Woodle M., Lasic D., Redemann C. & Martin F. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88:** (1991) 11460-11464.
- Patterson C., Butler J., Byrne D. & Rhodes M. Oxydant lung injury intervention with sulphhydryl reagents. *Lung.*, **165:** (1986) 23-32.
- Peng Q., Warloe T., Moan J., Heyerdahl H., Steen H., Nesland J. & Giercksky K. Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol.*, **62:** (1995) 906-913.
- Picardo M., Grammatico P. & Roccella F. Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, **107:** (1996) 322–326.
- Pierre M., Tedesco A., Marchetti J. & Bentley M. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and in vitro permeation study. *BMC Dermatol.*, **1:** (2001) 5.

- Popken G., Schultze-Seemann W., Seiler K., Birkel M. & Wetterauer U. Intravesical administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA). Safety and pharmacokinetics of 5-ALA and its metabolite protoporphyrin IX. *Eur J Clin Pharmacol.*, **56**: (2000) 241-246.
- Poswig A., Wenk J. & Brenneisen P. Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. *J. Invest. Dermatol.*, **112**: (1999) 13–18.
- Pottier J. & Kennedy J. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J. Photochem. Photobiol.*, **8**: (1990) 1-16.
- Pottier R., Chow Y., LaPlante J., Truscott T., Kennedy J. & Beiner L. Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra *in vivo*. *Photochem. Photobiol.*, **44**: (1986) 679-687.
- Prinsze C., Dubbelman T. & Van Steveninck J. Protein damage induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1038**: (1990) 152-157.
- Raab O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. *Z. Biol.*, **39**: (1900) 524-526.
- Rabilloud T., Asselineau D. & Miquel C. Deficiency in catalase activity correlates with the appearance of tumor phenotype in human keratinocytes. *Int. J. Cancer*, **45**: (1990) 952–956.
- Raes M., Michels C. & Remacle J. Comparative study of the enzymatic defense system against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase. *Free Rad. Biol. and Med.*, **3**: (1987) 3-7.
- Rahman Y., Cerney E., Tollaksen S., Wright B., Nance S. & Thompson J. *Proc. Soc Exp. Biol. Med.*, **146**: (1974) 1173-1176.
- Reddy R., Scholz R., Thomas C. & Massaro E. Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Science.*, **31**: (1982) 571-579.
- Reinke M., Canakis C., Husain D., Michaud N., Flotte T., Gragoudas E. & Miller J. Verteporfin photodynamic therapy retreatment of normal retina and choroid in the cynomolgus monkey. *Ophthalmology*, **106**: (1999)1915-1923
- Revesz M. & Larsson A. Induction and repair of single-strand DNA breaks after X-ray irradiation of human fibroblasts deficient in glutathione. *Int. J. Radiat. Biol.*, **40**: (1981) 355-363.

- Richardson M. & Siemann D. DNA damage in cyclophosphamide-resistant tumor cells: the role of glutathione. *Cancer Res.*, **55**: (1995) 1691-1695.
- Riedl C., Plas E. & Pfluger H. Fluorescence detection of bladder tumors with 5-amino-levulinic acid. *J Endourol.*, **13**: (1999) 755-759.
- Rimington, C. & Krol, C. Decarboxylation of porphobilinogen- and iso-porphobilinogen- $\alpha$ -carboxylic acids. *Nature.*, **175**: (1955) 630-631.
- Rubino C. & Rasetti L. Porphyrin metabolism in human neoplastic tissues. *Panminerva Med.*, **8**: (1996) 290-292.
- Saiki I., Fujii H., Yoneda J., Abe F., Nakajima M., Tsuruo T. & Azuma I. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer.*, **54**: (1993) 137-43.
- Salet., C. & Moreno., G. Photosensitization of mitochondria: molecular and cellular aspects. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **5**: (1990) 133-150.
- Salim, Whitehurst, Morton. Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *Br. J. Derm.*, **114**: (2000) 114.
- Sander C., Chang H. & Salzman S. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, **118**: (2002) 618-25.
- Sander C., Hamm F., Elsner P. & Thiele J. Cutaneous Biology. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.*; **148**: (2003) 913-922.
- Sasaki H., Akamatsu H. & Horio T. Effects of a single exposure to UVB radiation on the activities and protein levels of copper-zinc and manganese superoxide dismutase in cultured human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.*, **65**: (1997) 707-713.
- Sato T. & Hosokawa M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **38**: (1998) 257-288.
- Sawaki M., Enomoto K., Takahashi H., Nakajima Y. & Mori M. Phenotype of preneoplastic and neoplastic liver lesions during spontaneous liver carcinogenesis of LEC rats. *Carcinogenesis.*, **11**: (1990) 1857-1861.
- Scarpa A. & de Gier J. Cation permeability of liposomes as a function of the chemical composition of the lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, **241**: (1971) 789-797.
- Scheuplein R. Mechanisms of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J. Invest. Dermatol.*, **48**: (1967) 79.

- Schoenfeld N., Epstein O., Lahav M., Mamet R., Shaklai M. & Atsom A. The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett.*, **43**: (1988) 43-48.
- Senior J. Drug Carrier System. *Crit. Rev. Ther.*, **3**: (1988) 123-193.
- Sessa G. & Weissmann G. Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure-linked latency. *J Biol Chem.*, **245**: (1970) 3295-3301.
- Shemin., D. & Russel., C.  $\delta$ -aminolevulinic acid., its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**: (1953) 4873-4874.
- Shindo Y., Witt E. & Packer L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J. Invest. Dermatol.*, **100**: (1993) 260-265.
- Sieber F., Spivak J. & Sutcliffe A. Selective killing of leukaemia cells by merocyanine 540-mediated photosensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**: (1984) 7584-7587.
- Sieber., F. & Krueger., G. Photodynamic therapy and bone marrow transplantation. *Seminars in Hematology.*, **26**: (1989) 35-39.
- Sieber., F., Krueger., J., O'Brien., S., Schober., S., Sensenbrenner., L. & Sharkis., S. Inactivation of Friend erythroleukemia virus and Friend virus transformed cells by merocyanine 540-mediated photosensitization. *Blood.*, **73**: (1989) 345-350.
- Siemann., D. & Beyers., K. *In vivo* therapeutic potential of combination thiol depletion and alkylating chemotherapy. *Br. J. Cancer.*, **68**: (1993) 1071-1079.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, **215**: (1993) 213-219.
- Sima A., Kennedy J., Blakeslee D. & Robertson D. Experimental porphyric neuropathy: a preliminary report. *Can. J. Neurol. Sci.*, **8**: (1981) 105-114.
- Simmons T. & Jamall I. Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes., primacy of glutathione peroxidase. *Biochem. Journal.*, **251**: (1988) 913-917.
- Singer C., Bown S., Linch D., Huehns E. & Goldstone A. Phtalocyanine photosensitization for in vitro elimination of residual acute non-lymphoblastic leukaemia: preliminary evaluation. *Photochem. Photobiol.*, **46**: (1987) 745-749.
- Singer C., Linch D., Bown S., Huehns E. & Goldstone A. Differential Phtalocyanine photosensitization of acute myeloblastic leukaemia progenitor cells a potential purging technique for autologous bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.*, **68**: (1988) 417-422
- Sloan., K. *In Prodrugs-Topical and Ocular Drug Delivery.* (Sloan ,Dekker eds.) Dekker inc, New York (1992).

- Smal M., Dong Z., Cheung H., Asano Y., Escoffier L., Costello M. & Tattersall M. Activation and cytotoxicity of 2- $\alpha$ -aminoacyl prodrugs of methotrexate. *Biochem. Pharmacol.*, **49**: (1995) 567-574.
- Smith O., Traul D. & Sieber F. Photodamaging effects of merocyanine 540 on neutrophils and HL-60 cells. *Exp. Hematol.*, **20**: (1992) 1278-1284.
- Smith., A., Nuiry., I. & Awasthi., Y. Interactions with glutathione S-transferases of porphyrins used in photodynamic therapy and naturally occurring porphyrins. *Biochem. J.*, **229**: (1985) 823-831.
- Spikes., J. & Jori., G. Photodynamic therapy of tumours and other diseases. *Lasers Med. Sci.*, **2**: (1987) 3-15.
- Stadtman E. Protein oxidation and aging. *Science.*, **257**: (1992) 1220-1224.
- Steinbach P., Weingandt H., Baumgartner R., Kriegmair M., Hofstädter F. & Knüchel R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer Protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.*, **62**: (1995) 887-895.
- Storey K. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **29**: (1996) 1715-1733.
- Svensson L. Prodrugs metabolisms-based drug desing. *Pharm. Weekbl.*, **122**: (1987) 245.
- Szeimies R. & Landthaler M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis of skin cancers. *Recent Results Cancer Res.*, **160**: (2002) 240-245
- Szeimies, Karrer, Sauerwald & Landthaler. PDT with topical application of 5-ala in the treatment of actinic keratoses. An initial clinical study. Pharmacology and treatment *J.Photochem.Photobiol.B.Biol.*, **192**: (1996) 246-251.
- Takeuchi Y., Kurohane K., Ichikawa K., Yonezawa S., Nango M. & Oku N. Induction of intensive tumor suppression by antiangiogenic photodynamic therapy using polycation-modified liposomal photosensitizer. *Cancer.*, **97**: (2003)2027-2034.
- Takeya H. Preparation of 5-aminolevulinic acid alkyl esters as herbicides. *Chem. Abstr.*, **116**: (1992) 189633m.
- Tan K., Meyer D., Coles B & Ketterer B. Thymine hydroperoxide., a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. *FEBS Letters.*, **207**: (1986) 231-233.
- Tao J., Jasbinder S., Pelech S., Wong G. & Levy J. Stimulation of stress-activated protein kinase and p38 HOG1 kinase in murine keratinocytes following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative. *J. Biol. Chem.*, **271**: (1996) 27107-27115.

- Tappeiner., H. & Jesionek., A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffe. *Muench Med. Wochenschr.*, **47**: (1903) 2042-2044.
- Thiele J., Dreher F. & Packer L. Antioxidant defense systems in skin. In: *Cosmeceuticals, Drugs Vs Cosmetics (Elsner P. & Maibach H. Eds.)*. New York: Marcel Dekker, (2000) 145–187.
- Turrens J., Freeman B., Levitt J & Crapo J. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**: (1982) 401-410.
- Uehlinger P., Zellweger M., Wagnieres G., Juillerat-Jeanneret L., van den Bergh H. & Lange N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J. Photochem. Photobiol. B*, **54**: (2000) 72-80.
- Usuda J., Okunaka T., Furukawa K., Tsuchida T., Kuroiwa Y., Ohe Y., Saijo N., Nishio K., Konaka C. & Kato H. Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int. J. Cancer*, **93**: (2001) 475-480.
- Valenzo D. Photomodification of biological membranes with emphasis in singlet oxygen mechanisms. *Photochem. Photobiol.*, **46**: (1987) 147-160.
- Van den Akker., J., Iani., V., Star., W., Sterenborg., H. & Moan., J. Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetic and the role of the stratum corneum. *Photochem. Photobiol.*, **72**: (2000b) 681-689.
- Van der Akker., J., Bruijn. H., Beijersbergen van Henegouwen G., StarW. & Sterenborg., H. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics and localization after topical application of ALA pentyl ester and ALA on hairless mouse skin with UVB-induced early skin cancer. *Photochem. Photobiol.*, **72**: (2000a) 399-406.
- Van Gemet M., Berebaum M. & Gijsberts G. Wavelength and light dose dependence in tumour phototherapy with hematoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer.*, **52**: (1985) 43-49.
- Van Steveninck J., Tijssen K. Boegheim J. Van der Zee J. & Dubbelman T. Photodynamic generation of hydroxyl radicals by hematoporphyrin derivative and light. *Photochem. Photobiol.*, **44**: (1986) 711-716.
- Vrouenraets M., Visser G., Stigter M., Oppelaar H., Snow G. & van Dongen G. Targeting of aluminum (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies: improved efficacy in photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **61**: (2001) 1970-1975.

- Webber J., Luo Y., Crilly R., Fromm D. & Kessel D. An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin *in vivo*. *J. Photochem. Photobiol. B*: **35**: (1996) 209-211.
- Weishaupt., K., Gomer., C. & Dougherty., T. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoactivation of a murine tumour. *Cancer Res.*, **36**: (1976) 2326-2329.
- Whitaker C., Battah S., Forsyth M., Edwards C., Boyle R. & Matthews K. Photosensitization of pancreatic tumor cells by aminolevulinic acid esters. *Anti-Cancer Drugs Design.*, **15**: (2000) 161.
- Wilson B. Photodynamic therapy: light delivery and dosage for second generation photosensitizers. *Ciba Found. Symp.*, **146**: (1989) 60-77.
- Wilson J., Van Hillesberg R., Van der Berg J., Kort W. & Terpstra., O. Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors. *Scand. J. Gastroenterol.*, **188**: (1991) 20-25.
- Wilson M. & Pratten J. Sensitization of Staphylococcus aureus to killing by low power laser light. *J. Anti-microb. Chemother.*, **33**: (1994) 619-624.
- Wolf P., Fink-Puches R., Cerroni L. & Kerl H. Photodynamic therapy for mycosis fungoides after topical photosensitization with 5-aminolevulinic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **31**: (1994) 678-680.
- Woodburn K., Vardaxis J., Hill A., Kaye A. & Phillips D. Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem. Photobiol.*, **54**: (1991) 725-732.
- Yang J., Van Dijk-Smith J., Van Vugt D., Kennedy J. & Reid R. Fluorescence and photosensitization of experimental endometriosis in the rat after systemic 5-aminolevulinic acid administration: A potential new approach to the diagnosis and treatment of endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **174**: (1996) 154-160.
- Young L., Howard M., Hu L., Kim R. & Gragoudas E. Photodynamic therapy of pigmented choroidal melanomas using a liposomal preparation of benzoporphyrin derivative. *Arch. Ophthalmol.*, **114**: (1996) 186-192.



**MATERIALES  
Y  
MÉTODOS**

## **I. Drogas.**

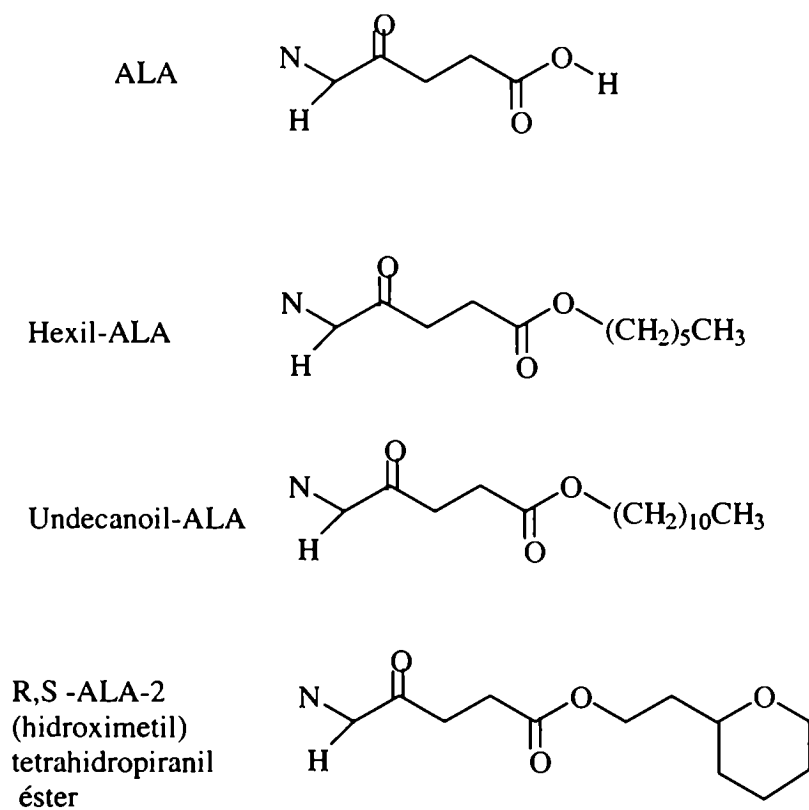
Ácido aminolevúlico (ALA), 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA), 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA),

L-cisteína, L-triptofano, L-metionina, glicina, manitol, melatonina, S-adenosilmetionina (SAM), N-acetil-L-cisteína (NAC), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), Concanavalina A (Con A), NADH, NADPH, MTT y citocromo c oxidado fueron obtenidos de Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA. El Standard de PPIX fue de Frontier Scientific inc. Logan, UT, USA.

Todos los otros reactivos usados fueron de grado analítico.

## II. Síntesis de derivados.

Los derivados de ALA, He-ALA y Undecanoil (UND-ALA) (Figura I.1) fueron sintetizados según el método de Takeya (1992) haciendo reaccionar el ALA con el hexanol o el undecanol en presencia de cloruro de tionilo. La mezcla se agitó a 70°C hasta que la sal de ALA se disolvió completamente y la reacción se confirmó por TLC (Cl<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>:MeOH 9:1). El exceso de alcohol se evaporó mediante vacío. Luego del agregado del dietiléter, se dejó que la sal de hidrocloreuro de los derivados cristalizara a 4°C, obteniendo un rendimiento entre 40 y 60%. R, S-ALA-2-(hidroximetil) tetrahidropiranyl (THP-ALA) (Figura I.1) éster se obtuvo de forma similar. El producto crudo fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel, y se eluyó con una mezcla de Cl<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>/MeOH. EL rendimiento fue de 20%. La pureza de los compuestos sintetizados fue siempre mayor al 95%, según se estableció por técnicas de TLC y RMN.



***Figura I.1: Estructura del ALA y los ésteres derivados.***

### **III. Cultivo de líneas celulares.**

La línea celular LM2 (Galli y col., 2000) derivada del adenocarcinoma mamario murino M2 y la línea LM3 (Werbajh et al, 1998) derivada del adenocarcinoma murino M3 (Instituto Roffo, Buenos Aires) fueron cultivadas en medio Eagle mínimo esencial (MEM), suplementado con L-glutamina 2 mM, 40 µg gentamicina/ml y 5% de FBS, e incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% CO<sub>2</sub>.

#### **III.1. Extracción de porfirinas en células.**

Las células de las líneas LM2 y LM3 se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron con ALA o sus derivados durante tres horas en medio MEM sin suero. Las porfirinas acumuladas dentro de las células se extrajeron dos veces con HCl 5%, dejándolas en presencia del ácido por media hora a 37 °C. Para las determinaciones de porfirinas en el medio de incubación el HCl se agregó directamente al medio. Se utilizaron las longitudes de onda que producían la máxima excitación y emisión (406 nm y 604 nm respectivamente). Las concentraciones se determinaron utilizando un patrón de PPIX como Standard de referencia.

#### **III.2. Ensayo de viabilidad por MTT.**

La fototoxicidad o toxicidad se registró mediante el uso de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) (Denizot y col., 1986). Diecinueve horas luego de los tratamientos, se agregó a cada pocillo una solución de MTT en una concentración de 0,5 mg/ml, y las placas se incubaron a 37 °C por 1 h. Los cristales de formazán resultantes fueron disueltos con el agregado de DMSO y luego se midió la absorbancia a 560 nm. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje en función del control correspondiente.

### **III.3. Determinación del número de células.**

El número de células sembradas por pocillo y el número de células empleado para el cálculo de porfirinas por células se determinó contando el número de células viables mediante el método de exclusión de Azul Tripán.

### **III.4. Tratamiento fotodinámico de líneas celulares.**

Las células de las distintas líneas, LM2 y LM3, sembradas en placas de 24 wells, se incubaron con medio mínimo libre de suero conteniendo ALA o los derivados ALA en las concentraciones indicadas. Luego de 3 horas se realizó la irradiación. Finalizada la irradiación el medio fue reemplazado por medio con 10% de suero fetal bovino, y se continuó la incubación por 19 horas más para estudiar la viabilidad. La dosis lumínica utilizada fue de 4,6 J/cm<sup>2</sup>.

### **III.5. Análisis de fragmentación de ADN en células tratadas con ALA y He-ALA TFD.**

Las células tratadas con TFD, adheridas y no adheridas al frasco, se cosecharon a las 19 horas post tratamiento mediante centrifugación y los pellets se lavaron con PBS, se resuspendieron en TNE (Tris -HCl 10 mM, pH 7,6; 1 mM EDTA; y 140 mM NaCl) y luego se lisaron a 37°C en 1 ml de buffer de extracción de ADN (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; 100 mM EDTA, pH 8,0; 20 µg/ml RNAsa pancreática y 0.5 % SDS). Luego de 2 horas, se agregó proteinasa K en una concentración final de 100 µg/ml y la mezcla se incubó otras 3 horas a 50°C. El ADN se extrajo dos veces con igual volumen de fenol y una vez con cloroformo. Luego se precipitó con 0,1 vol de acetato de sodio (pH 4,8) y 2,5 vol de etanol a -20°C durante toda la noche, y se lo centrifugó a 14.000 g por 30 minutos. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% durante 2 horas y media a 100 V y el ADN se visualizó por tinción con bromuro de etidio.

### **III.6. Determinación de ALA o derivados de ALA y PBG en células.**

Previamente encontramos que el THP-ALA, UND-ALA y He-ALA se podían cuantificar indistinguiblemente del ALA según el método de Di Venosa y col. (2003). Las células se sembraron en placas de 100 mm y luego de 48 horas se cambió el medio a medio sin suero y se expusieron a ALA 0,6 mM o derivados durante 3 horas. Pasado ese tiempo, las células se lavaron 4 veces con PBS y luego se agregó TCA 5 %. Luego de raspar la placa para levantar las células, se centrifugaron y el sobrenadante se empleó para la determinación de ALA y PBG siguiendo una modificación del método de Mauzerall & Granick (1956). La condensación se desarrolló en presencia de acetil acetona a 100 °C durante 10 minutos y los pirroles resultantes se determinaron a 555 nm luego del agregado del reactivo de Ehrlich y los nanomoles totales se calcularon en base a una curva de calibración de ALA o sus derivados, a los cuales se le sustrajo los valores de PBG correspondiente. Para la determinación de PBG, se agregó directamente el reactivo de Ehrlich al sobrenadante desproteinizado de TCA.

### **III.7. Separación de ALA, THP-ALA y He-ALA acumulado en células mediante cromatografía en columna de intercambio iónico.**

Las células se sembraron en placas de 100 mm. Luego de 72 horas, se cambió el medio y las células se incubaron con 0,6 mM de ALA o derivados en medio sin suero. Luego se lavaron con PBS 4 veces y se les agregó TCA 5 %. Luego de raspar la placa las células se centrifugaron y se recolectó el contenido de dos placas. Una alícuota de cada sobrenadante se utilizó para determinar ALA y PBG como se describió previamente. El resto del sobrenadante se pasó por una columna de resina Dowex 50 X 8 empaquetadas en columnas plásticas (Bio Rad) según se detalla a continuación:

Se colocó en la columna una alícuota de 3 ml de una solución de ALA o de los derivados preparados en TCA 5 % y se dejó escurrir. Se eluyó con acetato de sodio 1 M y se recolectaron fracciones de 1 ml. Una alícuota de cada fracción se mezcló con igual volumen de buffer acético acetato 1 M pH 4,8 y acetil acetona. La condensación se realizó como se explicó previamente.

Bajo estas condiciones los derivados de ALA quedan retenidos en la columna, y luego pueden ser eluidos con HCl 10 M. Luego 100  $\mu$ l del eluido se mezclaron con 100  $\mu$ l de NaOH 10 M y se procedió a medir el contenido de ALA como se explica anteriormente en IV.5.

Mediante este método se logró separar el ALA de los derivados de ALA y el porcentaje del total se calculó a partir del ALA total, luego de haber sustraído el PBG.



## **IV. Animales**

En todos los casos los animales se trataron siguiendo las normas establecidas por el Comité de la Asociación Argentina de Especialistas en el cuidado y uso de Animales de Laboratorio (AADEALC)

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 12 semanas, con un peso aproximado entre 20 y 25g. Los animales fueron criados y mantenidos en el lugar apropiado manteniendo las condiciones óptimas de temperatura y sometidos a ciclos de 12 h luz/ 12 h oscuridad. Se los alimentó con agua y comida (Purina 3, Molinos Río de la Plata) *ad libitum*.

### **IV.1. Inoculación subcutánea de tumor M2**

Los ratones se inocularon por vía subcutánea con una suspensión celular de  $1,65 \times 10^5$  células de la línea LM2. Los experimentos se realizaron aproximadamente 20 días después de implantado el inóculo y sólo se utilizaron los tumores que tenían un tamaño similar (aproximadamente 1 cm de diámetro).

### **IV.2. Inducción química de papilomas en ratones SENCAR**

Para la inducción de papilomas se emplearon ratones hembras SENCAR de 6 a 8 semanas provistos por La Comisión Nacional de Energía Atómica Argentina (CNEA).

Sólo se utilizaron los animales que tuvieran el pelo en la fase de descanso del ciclo. La formación de papilomas escamosos benignos se indujo mediante el uso de carcinógenos químico según el siguiente protocolo. Los animales se rasuraron en la zona dorsal y luego se topicaron con una dosis de DMBA (20  $\mu\text{g}$  en 0.2 ml acetona/ratón) en la zona rasurada. Una semana después, se comenzó el tratamiento con TPA (2  $\mu\text{g}$  en 0.2 ml acetona/ratón) una vez por semana durante 4 meses. Luego de 16 semanas, el 50% de los ratones tratados presentaron un promedio de 3 a 4 tumores por ratón. Algunos tumores seleccionados al azar fueron resecados para verificar que fueran papilomas escamosos mediante técnicas de histopatología. Sólo se utilizaron los animales que tenían tumores de tamaño semejantes.

### **IV.3. Administración de ALA y derivados.**

#### **IV.3.1. Preparación y aplicación tópica de las formulaciones de ALA y He-ALA en ratones portadores de tumor.**

Para las aplicaciones tópicas, las formulaciones de ALA y He-ALA se prepararon previo a cada experiencia. Se aplicaron 15 mg ALA y 22.5 mg He-ALA por ratón de modo de obtener una concentración equimolar de ALA libre para todas las formulaciones.

##### **Formulaciones:**

- **Formulación crema:** el ALA y el He-ALA se disolvieron en 50 mg de una emulsión en agua (Genargen, Argentina)
- **Formulación loción:** el ALA y el He-ALA se disolvieron en solución fisiológica en un volumen final de 0.2 ml.
- **Formulación Etanol:** se preparó agregando a la loción 40% de etanol en solución fisiológica.
- **Formulación DMSO:** se preparó agregando a la loción DMSO 10% en solución fisiológica.
- **Formulación Etanol/DMSO:** en este caso se utilizó 10% de DMSO y 40 % de etanol.

En los experimentos con ratones portadores de tumor subcutáneo M2 las distintas formulaciones de ALA y He-ALA se aplicaron en forma tópica sobre la zona tumoral previamente rasurada. Se frotó la superficie por un período de 5 minutos con un pincel suave, asegurando que no quedaran vestigios de la crema o la loción.

En los experimentos con ratones portadores de papilomas, el ALA y el He-ALA en sus diferentes formulaciones se aplicaron tópicamente sobre la superficie de un único papiloma, de un peso aproximado de 100 mg, más 3 mm del área peritumoral, utilizando el mismo método. En ratones libres de tumor el ALA o el He-ALA se aplicaron sobre una superficie rasurada de 1,76 cm<sup>2</sup> de piel normal .

Para el estudio de distribución de porfirinas en función de la distancia de aplicación de ALA, se utilizaron ratones con 7 u 8 papilomas, de los cuales sólo uno fue topicado como

se explicó previamente y el resto de los papilomas fueron procesados en forma separada para la determinación de porfirinas.

#### **IV.3.2. Preparación y administración de ALA y derivados en ratones BALB/C portadores de adenocarcinoma M2**

El ALA o los derivados, se prepararon en solución salina en un volumen final de 0.15 ml en el caso de la administración intra peritoneal (ip) ó 0.05 ml en el caso de la administración intravenosa (iv) inmediatamente antes de ser usados.

#### **IV.4. Extracción de Porphirinas de los tejidos**

Luego de la administración de ALA o derivados, los animales se sacrificaron, previa inyección de heparina (0.15 ml, 1000 UI) y luego se los perfundió con 200 ml de solución fisiológica estéril.

Las muestras de tejidos se homogeneizaron con una solución de acetato de etilo:ácido acético glacial (4:1). Las muestras de sangre se heparinizaron y se agitaron vigorosamente con la misma mezcla de solventes de extracción. Luego los homogenatos se centrifugaron 30 minutos a 3000 g, se descartó el pellet, se midió el volumen del sobrenadante y se agregó un volumen igual de HCl al 5% (Falk, 1964). La extracción con HCl se repitió hasta obtener fluorescencia negativa en la fase orgánica. La fracción acuosa se utilizó para determinar el contenido de porfirinas. Se empleó un espectrofluorómetro Shimadzu RF-510 para la determinación fluorométrica, con una longitud de onda de excitación de 406 nm y una longitud de onda de emisión de 604. Para la calibración se utilizó un standard de PPIX en HCl al 5% (Porphyrin Products, Palo Alto, USA) como referencia.

#### **IV.5. Determinación de ALA , He-ALA y PBG en los tejidos.**

Luego de 5 minutos de administrado el ALA o el derivado vía ip, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los tejidos, los cuales se homogenizaron en buffer Tris HCl 50 mM pH 7.4 y se centrifugaron 30 minutos a 3000 g. En el sobrenadante se determinó el

contenido de ALA o He-ALA en cerebro y tumor se determinó mediante una modificación del método de Mauzerall y Granick (1956). Mediante la condensación con acetyl acetona como se explicó previamente (VI.6). Los nmoles totales de ALA / g tejido se calcularon en base a una curva de calibración de ALA y He-ALA, y luego se extrajeron los valores de PBG correspondientes.

## **V. Cultivo de explantes de tejidos.**

El sistema de cultivo de explantes de tejidos fue desarrollado por Polo et al (1988). Explantes de tejido tumoral de 200 mg proveniente de un tumor no necrosado ni hemorrágico se colocaron en placas de Petri conteniendo medio mínimo esencial (MEM) libre de suero, adicionado con L-glutamina 2 mM y gentamicina 40 ug ml<sup>-1</sup> y se incubaron a 37 °C en presencia de ALA o derivados durante 3 horas. Al cabo de este tiempo se procedió a la extracción y determinación de porfirinas como se explicó para tejidos en V.4.

### **V.1. Tratamiento fotodinámico de explantes.**

Se incubaron explantes de 4-5 mg en presencia de ALA durante 3 horas. Luego del período de incubación los explantes se irradiaron durante 5 minutos con luz láser con una potencia de 190 J cm<sup>2</sup>. Luego se reemplazó el medio por medio MEM fresco con 10% suero y libre de ALA. La extracción de porfirinas se realizó luego de 19 horas de incubación a 37 °C. Los explantes tumorales que se utilizaron para microscopía, se fijaron luego de 4 ó 24 horas del tratamiento con ALA-TFD.

### **V.2. Preparación de liposomas.**

Se prepararon liposomas multilamelares grandes (1µ de diámetro) conteniendo ALA o He-ALA según el método descrito por Fukuda y col. (1989) utilizando el fosfolípido neutro fosfatidilcolina en cloroformo. Se formó la capa lipídica bajo atmósfera de nitrógeno y luego se resuspendió mediante agitación con perlas de vidrio en presencia de soluciones de ALA o He-ALA. La solución obtenida se pasó por una jeringa para uniformar el tamaño de las vesículas y luego se centrifugó. El pellet liposomal resultante se resuspendió en solución fisiológica. La eficiencia de encapsulamiento obtenida fue del 12%, determinada por la medición de la concentración de ALA en el pellet lisado con Tritón X-100 y en el sobrenadante, según el método de Mauzerall & Granick (1956). Las soluciones liposomales

se prepararon previo a cada experiencia y se emplearon inmediatamente luego de su preparación.

### **V.3. Microscopia óptica y electrónica.**

Los explantes fueron fijados a 4°C durante 6 h en glutaraldehído 3% en buffer Millioing, post-fijados en tetróxido de osmio 2% en 0.1 mM de buffer cacodilato, deshidratados en etanol y embebidos en Epon 812 (resina epoxi). Se cortaron secciones muy finas (750-900 Å) utilizando un ultramicrotomo (Sorvall Portem-Blum MT2B), y luego se tiñeron con acetato uranilo 2%-Reynolds y se observaron en microscopio electrónico de transmisión. Las muestras teñidas con azul de toluidina se observaron en el microscopio óptico.

## **VI. Cultivo de linfocitos.**

### **VI.1. Aislamiento de linfocitos.**

Se obtuvieron células mononucleares de bazo a partir de ratones BALB/c. Los animales se sacrificaron por asfixia. El bazo se extrajo bajo condiciones de esterilidad y se cortó en pequeños trozos, que luego se presionaron sobre una malla metálica y se lavaron con medio MEM conteniendo 10% de suero fresco. La suspensión obtenida se centrifugó a 2500 rpm, el sobrenadante se descartó y el pellet se trató con un buffer de lisis ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15 M;  $\text{KHCO}_3$  1 mM;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM; pH 7,4) para eliminar los glóbulos rojos, luego se lavó con buffer fosfato y se determinó la viabilidad y el número de células.

### **VI.2. Activación de linfocitos.**

Las células mononucleares se resuspendieron en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM y 40  $\mu\text{g}$  de gentamicina/ml. La activación se llevó a cabo mediante la incubación de la suspensión celular ( $5 \times 10^6$  células/ml) con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Con A a 37° C en una atmósfera húmeda con 5%  $\text{CO}_2$  por 72 horas. En las experiencias en que las células fueron incubadas con ALA, la inducción se realizó en forma simultánea al tratamiento con ALA.

### **VI.3. Tratamiento fotodinámico de linfocitos.**

Se sembraron placas de 6 pocillos conteniendo  $1 \times 10^7$  células por pocillo. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ , en medio MEM con 10% suero fetal bovino en presencia de ALA 0,6 mM por 3 horas. Luego de la incubación las células se irradiaron durante 5 minutos y finalizado el tratamiento se reemplazó el medio por medio fresco libre de ALA y Con-A, y las células se incubaron durante otras 21 horas.

#### **VI.4. Determinación de actividades enzimáticas:**

Luego del tratamiento con ALA, luz o TFD, los linfocitos fueron cosechados, resuspendidos en PBS, sonificados y empleados para la medición de las distintas actividades enzimáticas y para las determinaciones de glutatión.

- **Superóxido dismutasa (SOD):** la actividad total de la SOD se midió a 340 nm, monitoreando la inhibición de la oxidación del NADPH (Paoletti y col., 1986). Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de enzima que inhibía la reducción del NADPH al 50%.
- **Glutation preoxidasa (GPx):** la actividad total de la GPx se determinó monitoreando la oxidación del NADPH a 340 nm utilizando agua oxigenada como oxidante (Flohe y col., 1984). Una unidad de actividad corresponde a la oxidación de un nmol de NADPH por minuto por miligramo de proteína.
- **Catalasa (CAT):** la actividad de la catalasa se determinó siguiendo la tasa de consumo de agua oxigenada a 240 nm. Una unidad de actividad corresponde a 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumida por minuto por miligramo de proteína (Aebi y col., 1984).

La actividad de todas las enzimas fue medida a  $25 \pm 1$  °C.

#### **VI.5. Contenido de Proteínas .**

El contenido de proteínas se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu utilizando reactivo de fenol y seroalbumina bovina como standard (Lowry y col., 1951).

#### **VI.6. Contenido de Glutation.**

El contenido de GSH y GSSG en linfocitos normales y activados se determinó fluorométricamente mediante el método de Hissin y col., 1976. Los resultados se expresaron como la relación molar entre GSH y GSSG.



## **VII. Preparación y utilización de scavengers.**

Los scavengers, aminoácidos, antioxidantes y compuestos sulfurados, se disolvieron en sales de Earle estériles y ajustando el pH a 7,4. Se incubaron las células LM2 en presencia de ALA y scavengers durante 3 horas y luego se las irradió con distintas dosis de luz láser. En algunos casos los compuestos antioxidantes estuvieron presentes también durante el período de irradiación, y durante 19 horas post irradiación.

## **VIII. Fuentes de luz.**

### **VIII.1. Láser**

Para las experiencias con la línea celular LM2, linfocitos y explantes, se utilizó un láser con colorante rodamina (Modelo DL30, Oxford Lasers) bombeado por una láser de vapor cobre (CU15A, Oxford Lasers) de longitud de onda de 630 nm. Se empleó una fibra óptica de 400- $\mu$ m de diámetro acoplada a un distribuidor de luz frontal (Modelo FD2, Medlight, Ecublens, Suiza) y se lo posicionó de modo que generara un haz de luz de 3.5 cm de diámetro, produciendo un área de tratamiento de intensidad uniforme. La potencia de salida de la fibra se ajustó a la dosis de luz deseada antes de cada aplicación mediante un medidor de potencia (Modelo LM-100XL, Coherent, Auburn, CA).

### **VIII.2. Lámparas**

Para las experiencias con la línea celular LM3 se utilizó un set de 2 tubos fluorescentes (Osram L 36W/10), con un espectro de luz entre 400 y 700 nm y una potencia radiante máxima a 600 nm. Las placas se colocaron a una distancia de 60 cm de la fuente de luz. La potencia de luz emitida se midió con un radiómetro Yellow Springs Kettering modelo 65 (Yellow Spring, HO, USA)

## **IX. Análisis estadístico**

Para establecer las diferencias significativas entre los grupos se utilizó el test de t de Student desapareado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . En el caso de las experiencias *in vivo* se emplearon tres ratones por grupo de tratamiento. En las experiencias *in vitro* cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se presentaron como la media  $\pm$  la Desviación Estándar de los experimentos.

## **Referencias**

- Aebi H., *Catalase in vitro*, *Methods Enzymol.*, (Colowick, Kaplan eds), *Acad. Press inc.*, New York, **105**: (1984) 121-126.
- Ashton PR., Boyd SE., Brown CL., Jayaraman N., Nopogodiev SA., Stoddart JF. Convergent synthesis of carbohydrate-containing dendrimers. *Chem. Eur. J.* **2**: (1996) 1115-28.
- Battah SH., Chee CE., Nakanishi H., Gerscher S., MacRobert AJ., Edwards C. Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjugate Chem.*, **12**: (2001) 980-988.
- Denizot J F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods*, **89**: (1986) 271-277.
- Di Venosa G., Fukuda H., Perotti C., Batlle A. & Casas A. A simple method for separating ALA from ALA derivatives using ionic exchange chromatography. (Submitted to *J. Photochem. Photobiol. B*).
- Falk, J. Porphyrins and metalloporphyrins. In: *Biochim. Biophys. Acta-Library*, vol. 2. (1964) Elsevier Publishing Company: Amsterdam, London, New York.
- Flohe L., Gunzler W. *Assays of glutathione peroxidase*, *Methods Enzymol.*, (Colowick, Kaplan eds), *Acad. Press inc.*, New York, **105**: (1984) 114-121.
- Fukuda H.; Paredes S. & Batlle A. Tumor-localizing properties of porphyrins. *In vitro* studies using the porphyrin precursor aminolevulinic acid in free and liposome encapsulated forms. *Drug Des. Deliv.*, **5**: (1989) 133-139.
- Galli S, Colombo L, Vanzuli S, Daroqui M, Vidal M, Jasniz A, Lustig E & Eiján A. Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.*, **17**: (2000) 1259-1265.
- Hissin P., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.*, **74**: (1976) 214-226.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr L., Randall R. Protein measurement with the phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **219**: (1951) 435-437.
- Mauzerall, M. & Granick, S. The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* **219**: (1956) 435-437.

- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts, *Anal. Biochem.*, **154**: (1986) 536-541.
- Polo,C.F.; Navone,N.M.; Afonso,S.G.; Vazquez,E.S.; Buzaleh,A.M.; Bianchi,A.; Schoua,E. & Batlle,A. (1988). Induction of porphyrin biosynthesis in tissue explants and the effect of antimitotics. *ATLA* **16**: 137-147
- Takeya, H. (1992) Preparation of 5-aminolevulinic acid alkyl eters as herbicides. *Chem. Abs.* **116**: 189633 m.
- UK-Coordinating Committee on Cancer Research. UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (London, UKCCCR), 1988
- Werbajh SE, Urtreger AJ, Puricelli LI, de Lustig ES, Bal de Kier Joffe E, Kornblihtt AR  
Downregulation of fibronectin transcription in highly metastatic adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* **440**: (1998) 277-281.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

# **I. Eficiencia en la síntesis de porfirinas *in vitro*, utilizando ALA y He-ALA**

## **I.1. Dependencia de la síntesis de porfirinas con el número de células, tiempo de incubación y concentración de ALA o He-ALA.**

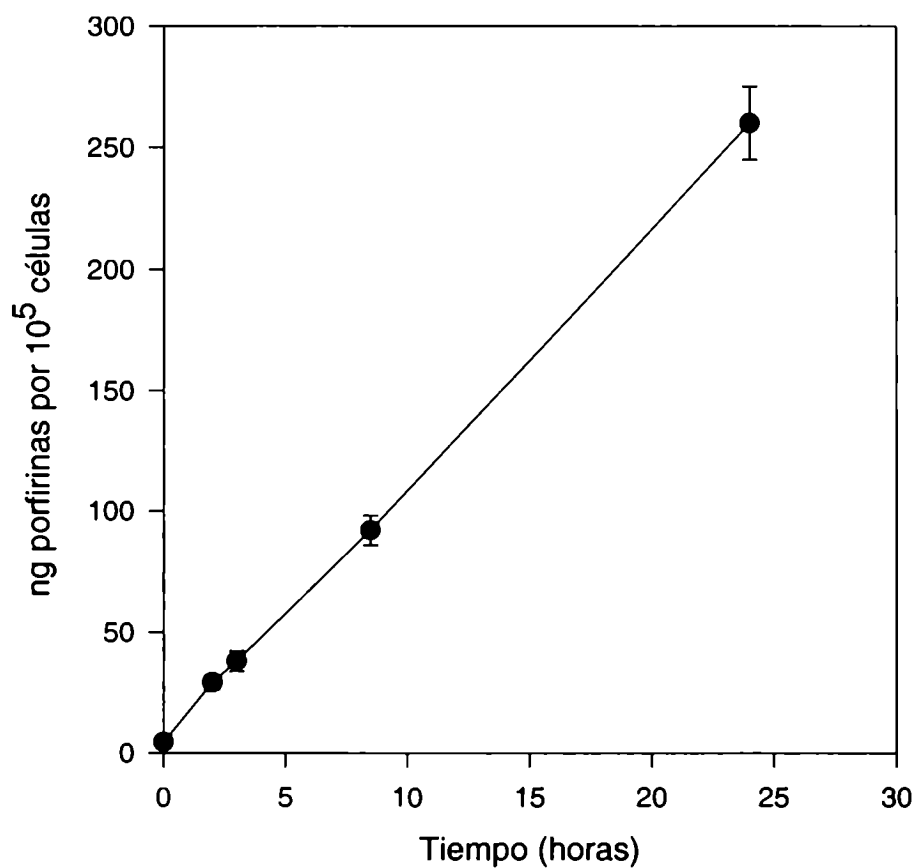
Empleando la línea celular LM2, derivada del adenocarcinoma mamario murino M2, se determinó la concentración de células necesaria para obtener la mejor síntesis de porfirinas, así como también las concentraciones de ALA/He-ALA y el tiempo de incubación óptimos.

La máxima síntesis de porfirinas se obtuvo incubando con ALA 0,6 mM durante 3 horas, empleando entre  $3$  y  $3,5 \times 10^4$  células por pocillo. Cuando se aumentó el número de células por encima de  $3,5 \times 10^4$ , se observó una leve disminución en la síntesis de tetrapirroles por número de células y cuando se empleó un número de células inferior a  $3 \times 10^4$  células, la acumulación de porfirinas fue muy baja.

En la figura I.1 se muestra la cinética de acumulación de porfirinas intracelulares. Puede observarse que el contenido celular de porfirinas aumenta linealmente con el tiempo de incubación, indicando que las enzimas del camino del hemo no están saturadas en esas condiciones. Un perfil similar se observó utilizando concentraciones mayores de ALA.

En la figura I.2 se puede observar la dependencia de la síntesis de porfirinas con la concentración de ALA o de He-ALA. La acumulación de porfirinas comienza a ser significativa a concentraciones de ALA superiores a 0,05 mM, luego aumenta linealmente, para llegar a un máximo de  $47 \pm 8$  ng/ $10^5$  células a una concentración 0,6 mM, manteniéndose después en ese plateau. Se sintetizó esa misma cantidad de porfirinas empleando una concentración de He-ALA 60 veces menor (0,01 mM). Con este derivado la máxima síntesis de porfirinas fue de  $75 \pm 4$  ng/ $10^5$  células, cantidad 1,6 veces superior a la máxima síntesis con ALA.

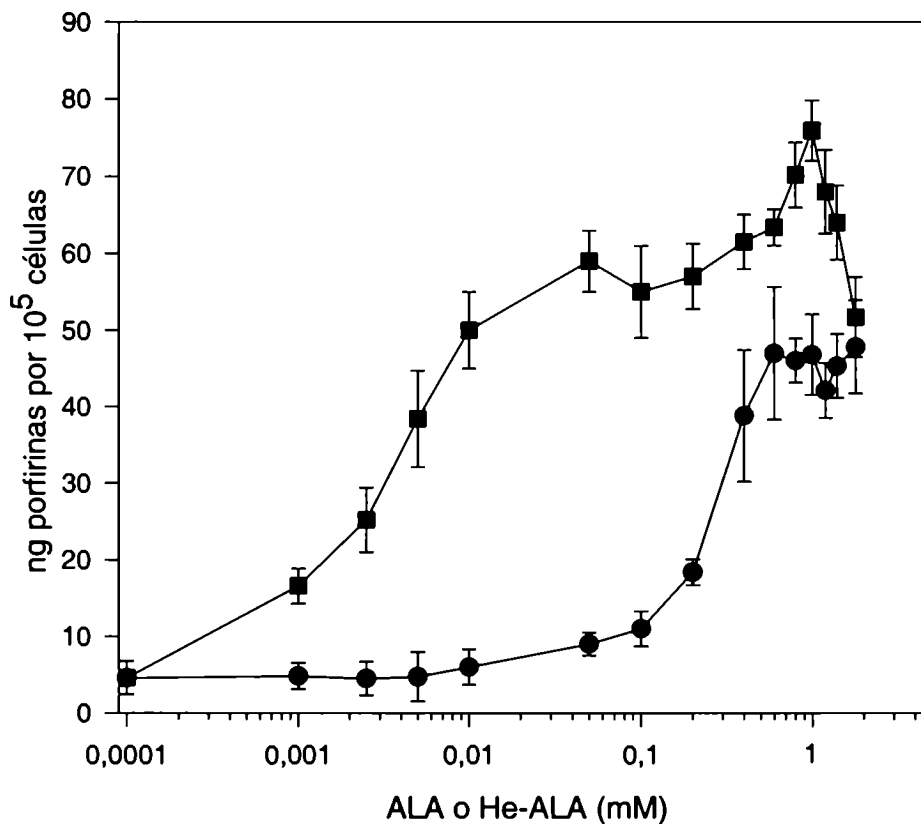
Las porfirinas liberadas al medio fueron alrededor de 10 % de la cantidad retenida intracelularmente para todas las concentraciones de ALA y He-ALA utilizadas.



***Figura I.1: Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación.***

*Se sembraron  $3,5 \times 10^4$  células LM2 por pocillo y se incubaron durante diferentes periodos en presencia de ALA 0,6 mM. Las porfirinas intracelulares se determinaron fluorométricamente y se relativizaron por número de células presentes al comienzo del experimento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la desviación estándar.*





***Figura I.2: Síntesis de porfirinas a partir de ALA o He-ALA.***

*Se sembraron  $3,5 \times 10^4$  células LM2 por pocillo y se incubaron en presencia de diferentes cantidades de ALA (●) o He-ALA (■) durante 3 horas. Las porfirinas intracelulares se determinaron fluorométricamente y se relativizaron por número de células presentes al comienzo del experimento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la desviación Estándar.*

## I.2 Citotoxicidad inducida por la TFD a partir de ALA o He-ALA.

Las células expuestas a concentraciones de ALA/He-ALA tales que produjeran cantidades similares de porfirinas, fueron irradiadas con diferentes dosis lumínicas y se determinó la supervivencia mediante el método de MTT como se explica en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la tabla I.1.

Cuando la dosis de luz utilizada fue  $0,6 \text{ J/cm}^2$ , la viabilidad disminuyó aproximadamente al 50 % para el ALA y 60 % para el He-ALA. Cuando se empleó una dosis de luz de  $1,5 \text{ J/cm}^2$ , la supervivencia celular fue aproximadamente del 20 % para ambos compuestos. Dosis de luz mayores produjeron la muerte casi total. En esta experiencia, no se observaron diferencias significativas entre ambos compuestos.

***Tabla I.1: Supervivencia celular luego de la TFD con distintas dosis de luz.***

	ALA	He-ALA
Control	$100 \pm 7$	$100 \pm 7$
$0,6 \text{ J/cm}^2$	$45 \pm 5,6$	$60 \pm 8,2$
$1,5 \text{ J/cm}^2$	$18 \pm 2,4$	$25 \pm 3,1$
$3,0 \text{ J/cm}^2$	$4,1 \pm 0,9$	$2,5 \pm 0,9$
$15 \text{ J/cm}^2$	$3,9 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,6$
$18 \text{ J/cm}^2$	$2,8 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$

*Las células se incubaron con ALA 0,6 mM o He-ALA 0,008 mM durante 3 horas en medio libre de suero. Luego se irradiaron con diferentes dosis lumínicas y se incubaron 19 horas en medio con suero. Las células sobrevivientes se determinaron mediante el ensayo de MTT, y se expresan como porcentaje del control no irradiado incubado en presencia de ALA/He-ALA.*

La tabla I.2 muestra la eficiencia de la TFD con concentraciones crecientes de ALA o He-ALA. A concentraciones tan bajas como 0,005 mM de He-ALA, la viabilidad celular disminuyó casi un 50 %. Para lograr ese mismo porcentaje de muerte

celular con ALA, se necesitó una concentración 60 veces mayor (0,3 mM). Al aumentar la concentración del derivado a 0,01 mM la viabilidad celular se redujo aún más llegando a sobrevivir sólo entre el 1-3 % de las células.

***Tabla I.2: Supervivencia celular luego de la TFD con diferentes concentraciones de ALA/He-ALA.***

	ALA	He-ALA
Control	100 ± 7	100 ± 7
0,005 mM	100 ± 8	54,9 ± 6
0,01 mM	100 ± 8	1,3 ± 0,3
0,05 mM	100 ± 5	2,5 ± 0,5
0,1 mM	95 ± 5	1,2 ± 0,7
0,2 mM	80 ± 3	1,3 ± 0,4
0,3 mM	50 ± 4	1,5 ± 0,25

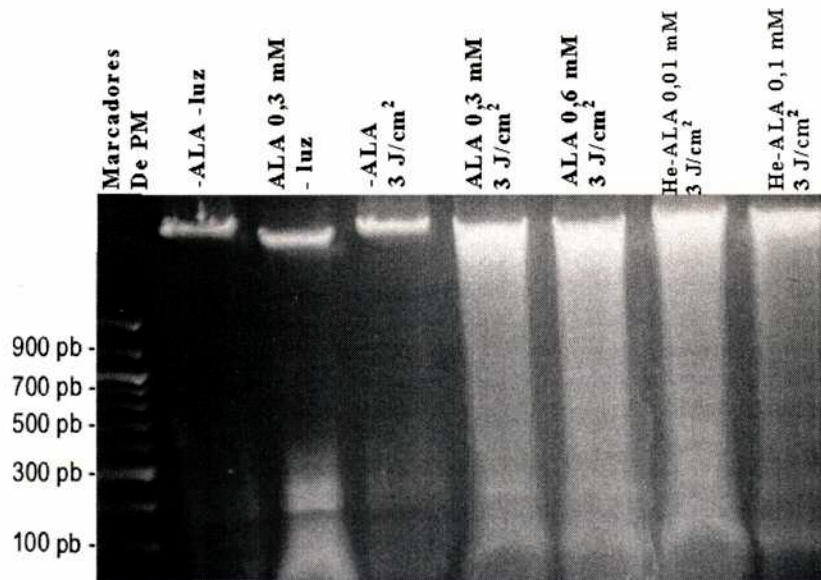
*Las células se incubaron durante 3 horas en medio libre de suero con diferentes concentraciones de ALA o He-ALA, se irradiaron con una dosis lumínica de 9 J/cm<sup>2</sup> y se incubaron otras 19 horas en medio con suero. Las células sobrevivientes se determinaron mediante el ensayo de MTT, y se expresan como porcentaje del control no irradiado incubado en presencia de ALA/He-ALA.*

### **I.3 Evidencia de apoptosis en células LM2 tratadas con TFD a partir de ALA o He-ALA.**

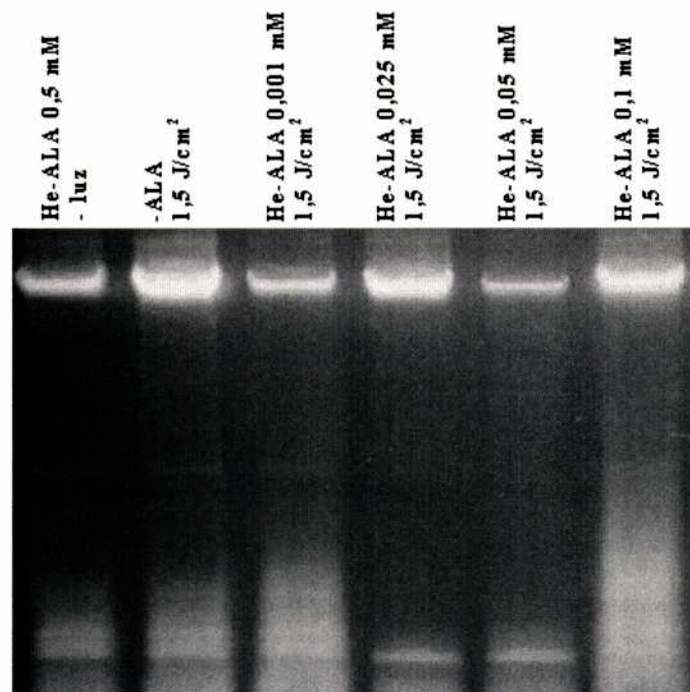
Para detectar la aparición de multímeros nucleosomales luego del tratamiento con ALA/ He-ALA y TFD, se utilizó la técnica electroforética. Como puede observarse en la figura I.3, no hubo evidencias de clivaje internucleosomal en las células no tratadas, tratadas sólo con ALA, sólo con He-ALA, o sólo luz, esas calles muestran únicamente ADN de alto peso molecular. En las calles correspondientes a los controles incubados con ALA y sin irradiar, se encontraron pequeñas cantidades de ADN de bajo peso molecular, originado por un leve grado de necrosis. Cuando las células se expusieron a

bajas concentraciones de ALA o He-ALA y dosis lumínicas relativamente altas ( $3 \text{ J/cm}^2$ ), se detectó el típico patrón en escalera de los multímeros nucleosomales en fragmentos de 180 pares de bases (figura I.3 A). En todas las células tratadas con TFD, se observa un fondo proveniente del ADN intranucleosomal cortado, ya sea por un proceso de necrosis o de apoptosis.

A



B



**Figura I.3:** Electroforesis de ADN en gel de agarosa, en de células tratadas con TFD a partir de ALA o He-ALA.

Las células se expusieron 3 horas a diferentes concentraciones de ALA o He-ALA y se irradiaron con dosis lumínicas de 3 J/cm<sup>2</sup> (A) ó 1.5 J/cm<sup>2</sup> (B). Luego de 19 horas se extrajo el ADN y se corrió la electroforesis en geles de agarosa. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados bajo una luz de 312 nm. Se incluyen los controles no tratados y no irradiados.

#### **I.4 Discusión**

En concordancia con los datos de otros autores (Steinbach y col. 1995, Gaullier y col., 1997), encontramos que la producción de porfirinas a partir de ALA exógeno es dependiente de la densidad celular. Asimismo, en un trabajo de Moan y col. (1998) empleando células de pulmón, y células de adenocarcinoma de colon, el número de células por área que producía la máxima síntesis de porfirinas se encontraba dentro del orden de los resultados de nuestro trabajo.

Una concentración de He-ALA 60 veces más baja que la de ALA, indujo la misma cantidad de porfirinas en las células LM2. Otros autores han obtenido resultados similares con distintos tipos de células (Gaullier y col., 1997 y Uehlinger y col., 2000).

A iguales concentraciones, el He-ALA indujo 1,6 veces más porfirinas que el ALA. Sin embargo cabe destacar que la cantidad de porfirinas necesaria para producir la muerte celular total en este modelo es mucho menor que el máximo contenido logrado bajo las condiciones óptimas.

El ALA mantuvo un plateau luego de alcanzar el máximo nivel de porfirinas, mientras que el He-ALA a altas concentraciones produjo una disminución en el contenido de porfirinas acumuladas, en concordancia con la toxicidad en oscuridad encontrada a esas concentraciones, en cambio el ALA no fue significativamente tóxico en el rango de concentraciones utilizadas.

Comparando la producción de porfirinas en función de la fototoxicidad inducida, encontramos que cuanto mayor es la cantidad de porfirinas acumuladas, mayor es el daño producido. Gaullier y col. (1997) empleando cultivo de células humanas y animales obtuvieron un patrón similar. En este trabajo encontramos que la PPIX formada a partir de ALA o su derivado, sensibilizan a las células de igual forma para la fotoinactivación.

Independientemente del pro-fotosensibilizante utilizado, las células tratadas con TFD expuestas a dosis lumínicas altas, mostraron la fragmentación del ADN internucleosomal característico de un proceso apoptótico. Estos resultados indican que luego del clivaje y conversión a porfirinas, el éster de ALA remanente o la cadena de alcohol liberada, no interfieren con el mecanismo de citotoxicidad inducida por la fotosensibilización. La presencia de un chorreado, producto de la digestión al azar del

ADN, sugiere que también se induce en cierto grado la necrosis. La presencia de trazas de ADN cortado al azar en células tratadas sólo con ALA o con el derivado, sugiere que parte de la necrosis se induce como consecuencia de la toxicidad en oscuridad.

## **II. Síntesis de porfirinas en explantes de tumor M2 expuestos a ALA o He-ALA, libre y liposomal**

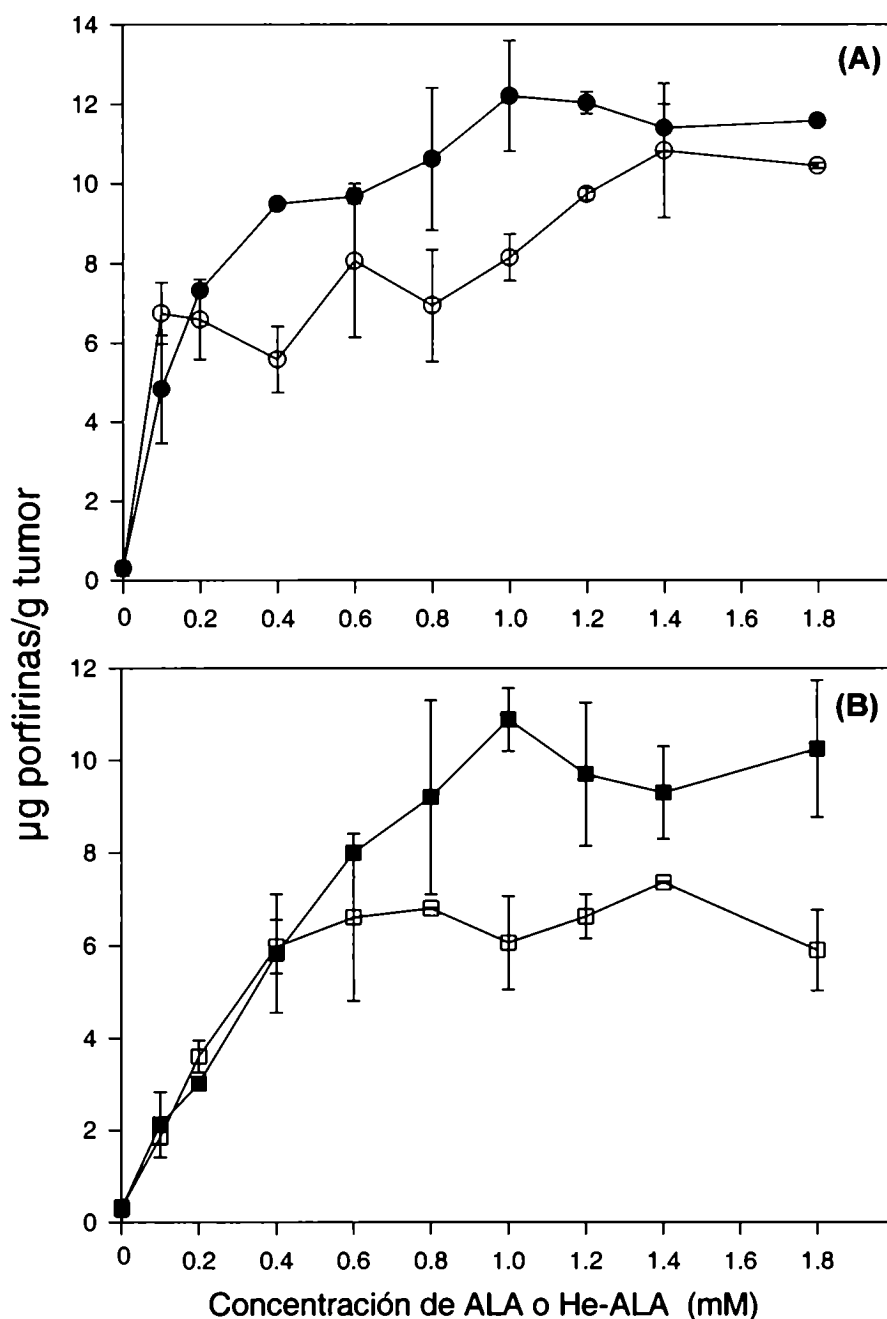
Con el fin de optimizar el daño producido por la TFD y teniendo en cuenta que un entorno lipofílico favorecería la entrada del precursor, y dado que el He-ALA demostró ser más eficiente que ALA en la línea celular LM2, realizamos experiencias *ex vivo* utilizando ALA y su derivado He-ALA encapsulados en liposomas, y comparamos su eficiencia con los compuestos libres. Para ello se prepararon liposomas multilamelares neutros según se describe en Materiales y Métodos, y utilizamos un modelo de explantes tisulares desarrollado en nuestro laboratorio (Polo y col., 1988).

### **II.1. Síntesis de porfirinas en función de la dosis de ALA o He-ALA.**

Se incubaron explantes de adenocarcinoma mamario M2 con diferentes concentraciones de ALA y He-ALA libre y liposomal, tal como se detalló en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la figura II.1. Se puede observar que en la medida que aumenta la concentración de ALA/He-ALA, tanto libre como liposomal, aumenta la cantidad de porfirinas acumuladas. Se alcanza una saturación a 1 mM para el ALA libre ( $12,20 \pm 1,39$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g de tejido) y 1,4 mM para el ALA liposomal ( $10,83 \pm 1,64$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g de tejido). También se pueden ver los puntos de saturación para el He-ALA: 1 mM para He-ALA libre ( $10,88 \pm 0,68$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g de tejido) y 0,4 mM para el He-ALA liposomal ( $6,56 \pm 0,14$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g de tejido).

A bajas concentraciones y para ambos compuestos (0,2 mM para ALA y 0,4 mM para He-ALA), no se observaron diferencias significativas en la cantidad de porfirinas generadas, independientemente de que se emplearan los compuestos en forma libre o liposomal. A concentraciones más elevadas, las porfirinas acumuladas a partir de las formulaciones liposomales fueron entre un 10 y un 40 % menor, dependiendo de la concentración utilizada, en los explantes tratados tanto con ALA como con He-ALA.



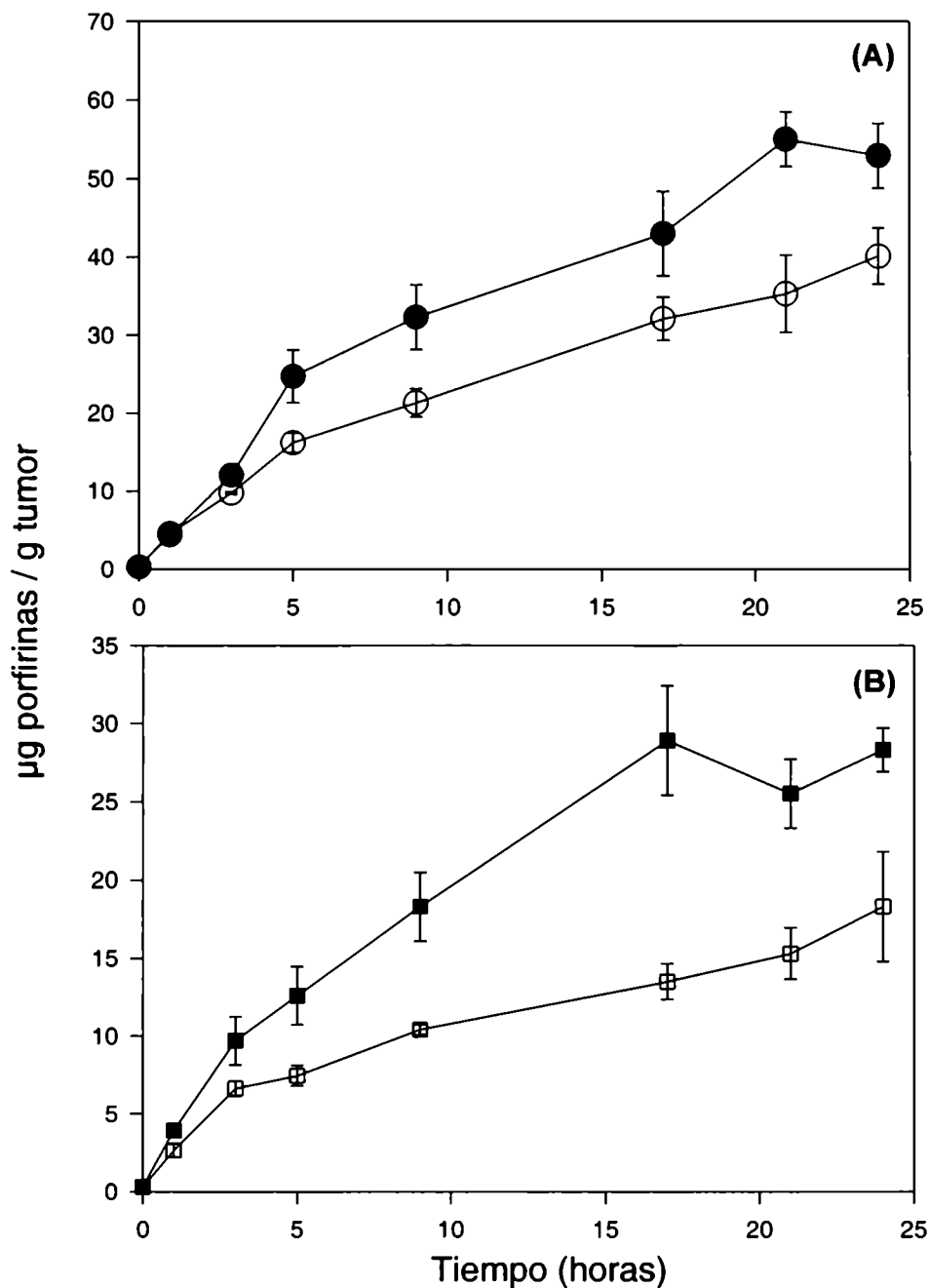


**Figura II.1:** Síntesis de porfirinas a partir de ALA y He-ALA libre y liposomal, en explantes de tumor M2.

Los explantes se incubaron 3 horas en presencia de diferentes concentraciones de (A) ALA libre (●), liposomal (○), y (B) He-ALA libre (■), liposomal (□), en medio sin suero. Al finalizar la incubación, las porfirinas se cuantificaron como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error muestran la desviación estándar.

En la figura II.2 se muestra la cinética de acumulación de las porfirinas intracelulares. Durante el período de 24 horas estudiado, tanto con ALA como con He-ALA el contenido celular de porfirinas aumenta linealmente, para cualquiera de las formulaciones utilizadas. Con los compuestos libres, se alcanzó un plateau a las 20 horas de incubación. Para ambas formulaciones la síntesis de porfirinas fue siempre mayor a partir de ALA.

Las porfirinas liberadas al medio de incubación fueron entre el 30 y el 35 % de la cantidad acumulada intracelularmente para todas las concentraciones de ALA y He-ALA utilizadas y para ambas formulaciones.



**Figura II.2:** Síntesis de porfirinas en función del tiempo a partir de ALA y He-ALA libre y liposomal en explantes de tumor M2.

Los explantes se incubaron durante diferentes tiempos en presencia de (A) ALA libre (●) o liposomal 0,6 mM (○), y (B) He-ALA libre (■) o liposomal 0,6 mM (□) en medio sin suero. Las porfirinas se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error muestran la desviación estándar.

## **II.2. Daño fotodinámico a partir de ALA y He-ALA, libre y liposomal en explantes de tumor M2. Estudios histológicos**

Dado que el He-ALA había inducido apoptosis al igual que el ALA en la línea celular LM2 (capítulo I), se estudió si existían diferencias en los daños producidos por el tratamiento fotodinámico con ambos compuestos. Para esto se analizaron los cambios morfológicos en cortes histológicos de los explantes tratados y sus controles correspondientes mediante microscopía óptica y electrónica.

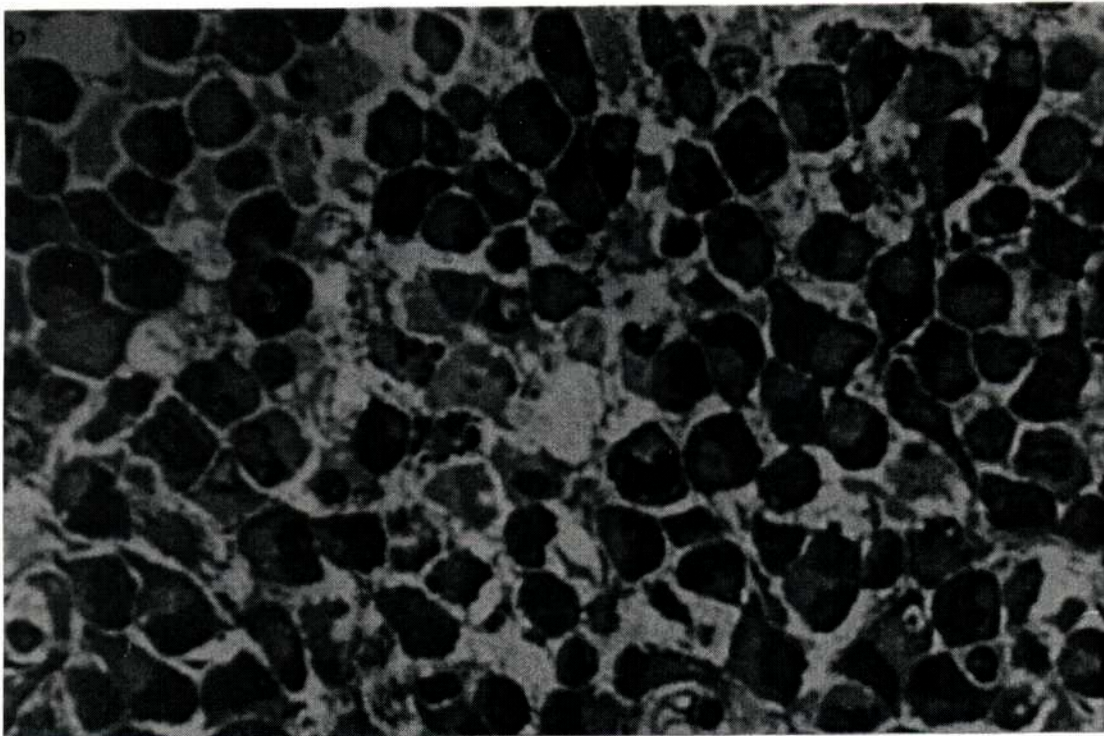
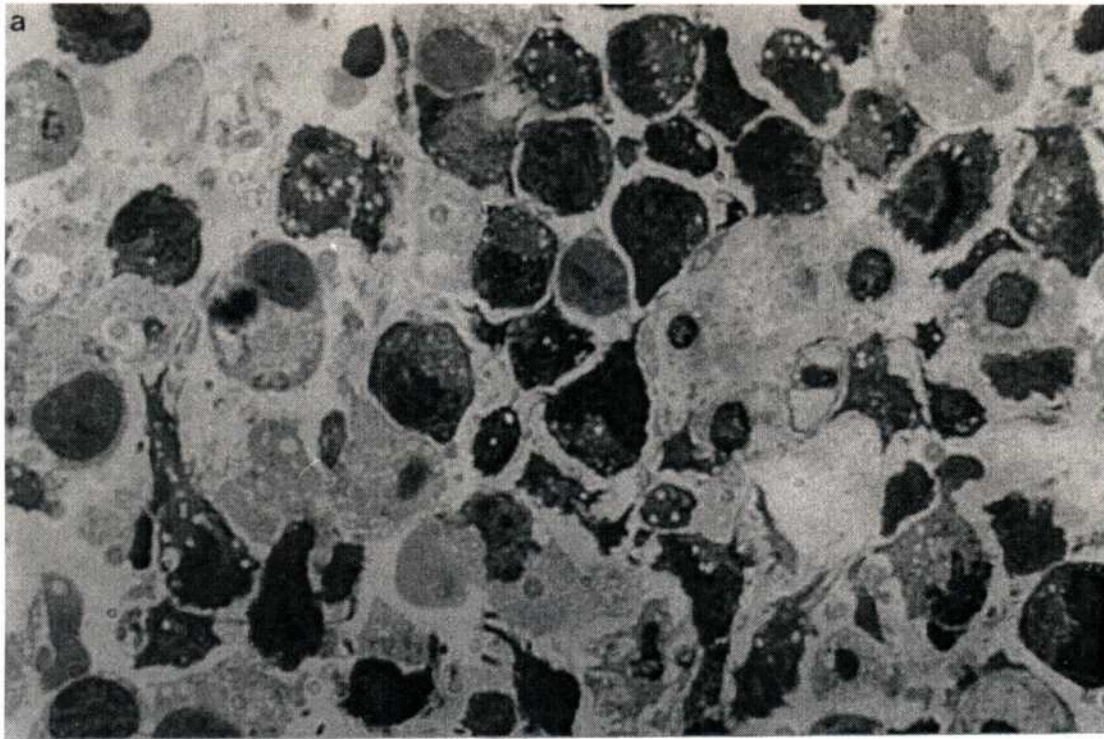
En los explantes fijados 4 horas luego del tratamiento con ALA-TFD libre o liposomal, se observaron por microscopía óptica algunas de las alteraciones más comunes, como por ejemplo la vacuolización y la formación de vesículas en el citoplasma (figura II.3).

Mediante microscopía electrónica se observó un severo hinchamiento de las mitocondrias y del retículo endoplasmático, disrupción de membranas e invaginaciones, pérdida del espacio intersticial debido al agrandamiento general de la célula (figuras II4 y II5); en cambio el núcleo se mantuvo intacto.

Con la misma dosis de luz, a las 24 horas post TFD, el daño progresó aún más y se pudo observar muerte de células tumorales, restos celulares y nucleares. (figura II.6). Estas características de daños tempranos y tardíos fueron idénticos en los explantes tratados con TFD a partir de ALA o He-ALA libres o liposomales.

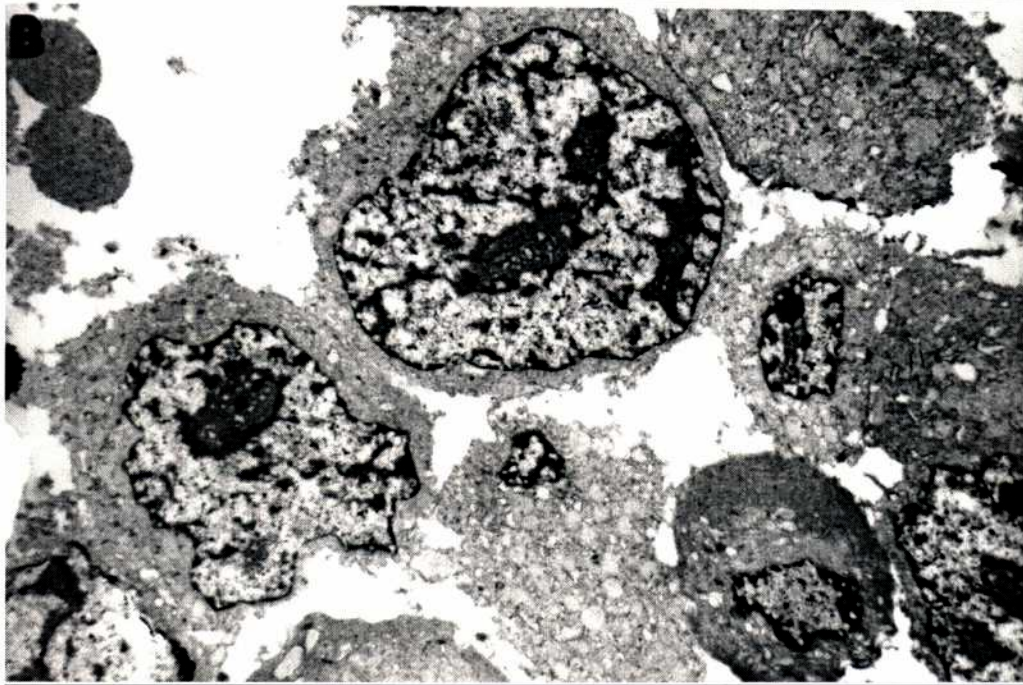
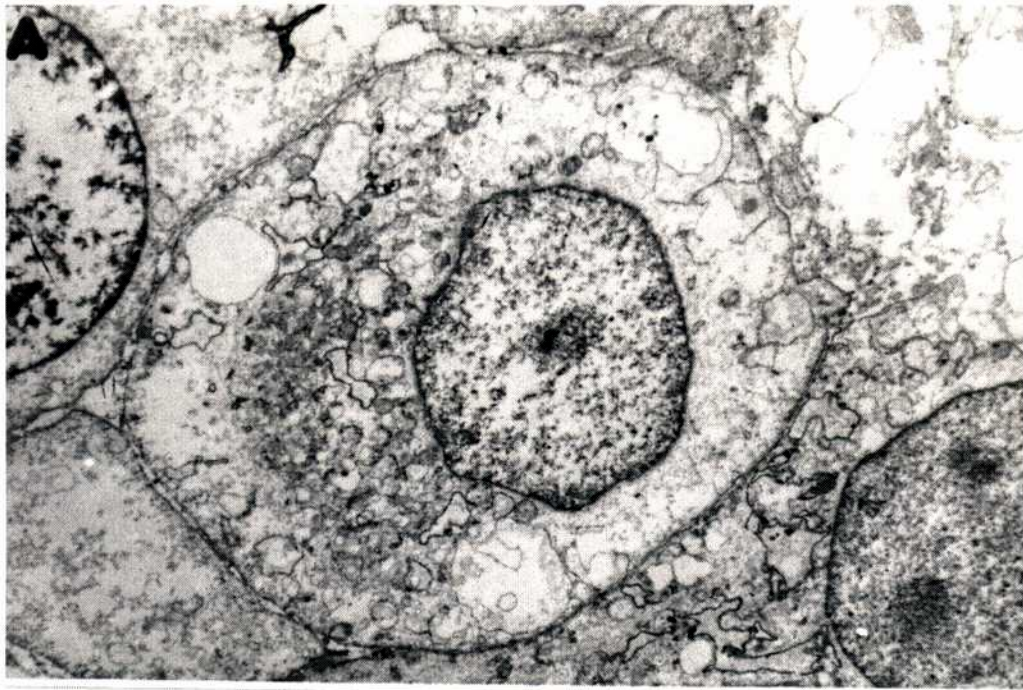
Los explantes controles, tratados sólo con luz o sólo con ALA, fueron normales e iguales a los explantes que no fueron tratado ni con luz ni con ALA (figura 3 B).(V.3 B)

En los tejidos tratados con ALA liposomal pero que no fueron irradiados, se observó la presencia de vesículas de fosfolípidos que estaban por ingresar a la célula en el citoplasma y en algunos espacios intercelulares. (figura II.6 B). Luego de la irradiación, se pudo observar algunos liposomas aún libres entre los restos celulares. (figura II.6 A). El detalle de los liposomas rodeados por membrana celular se observa en la micrografía electrónica de la figura II.5 B.



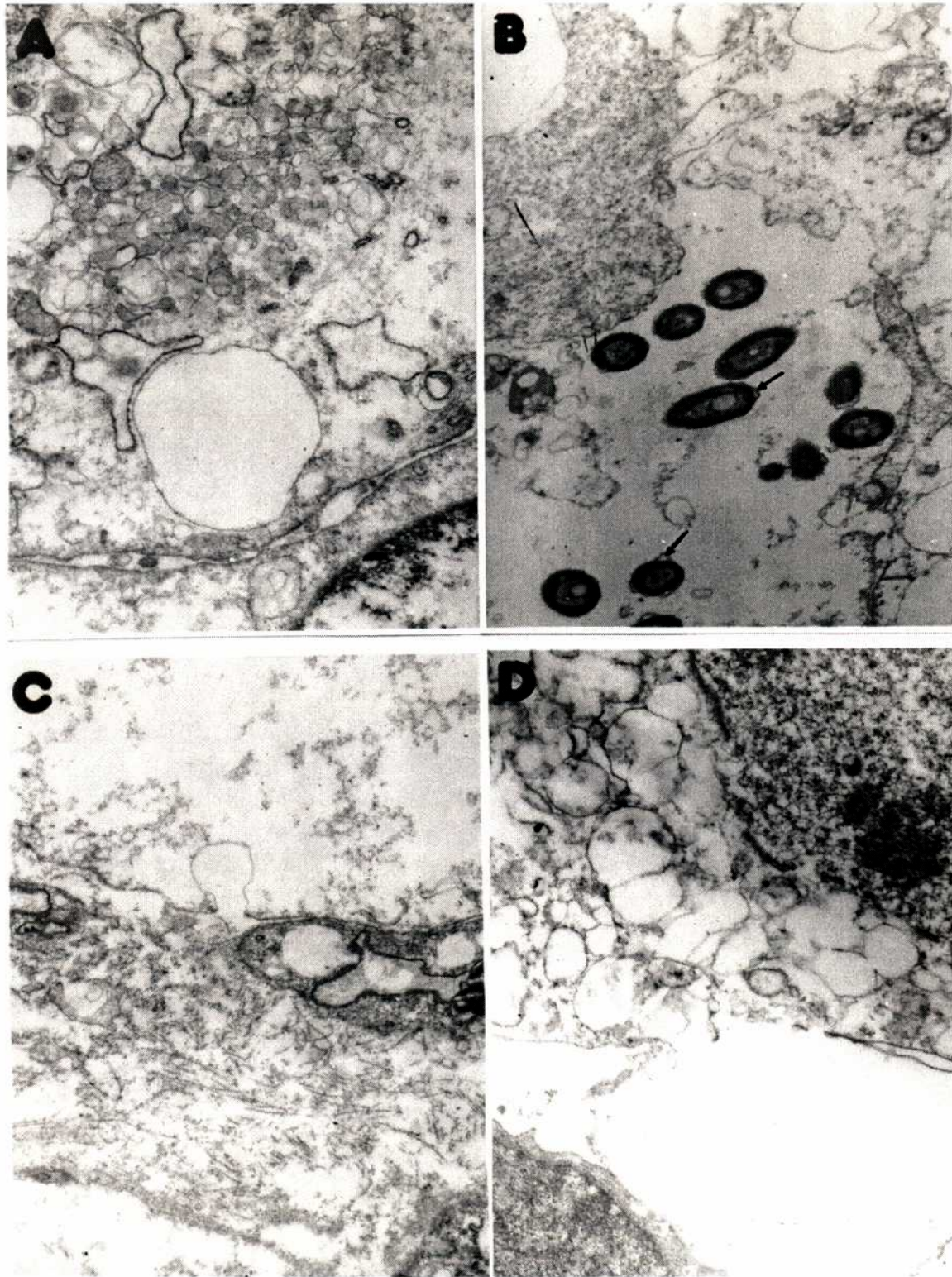
***Figura II.3: Microscopía óptica de explantes de tumor tratados con ALA libre-TFD y no tratados.***

*(A) explante incubado 3 horas con ALA libre 0,6 mM, luego irradiado con una dosis lumínica de 190 J/cm<sup>2</sup> y fijado 4 horas después. Se puede observar vacuolización y vesiculización del citoplasma. El núcleo permanece intacto (1000X). (B) explante control incubado en las mismas condiciones, pero en ausencia de ALA y no irradiado. (630X).*



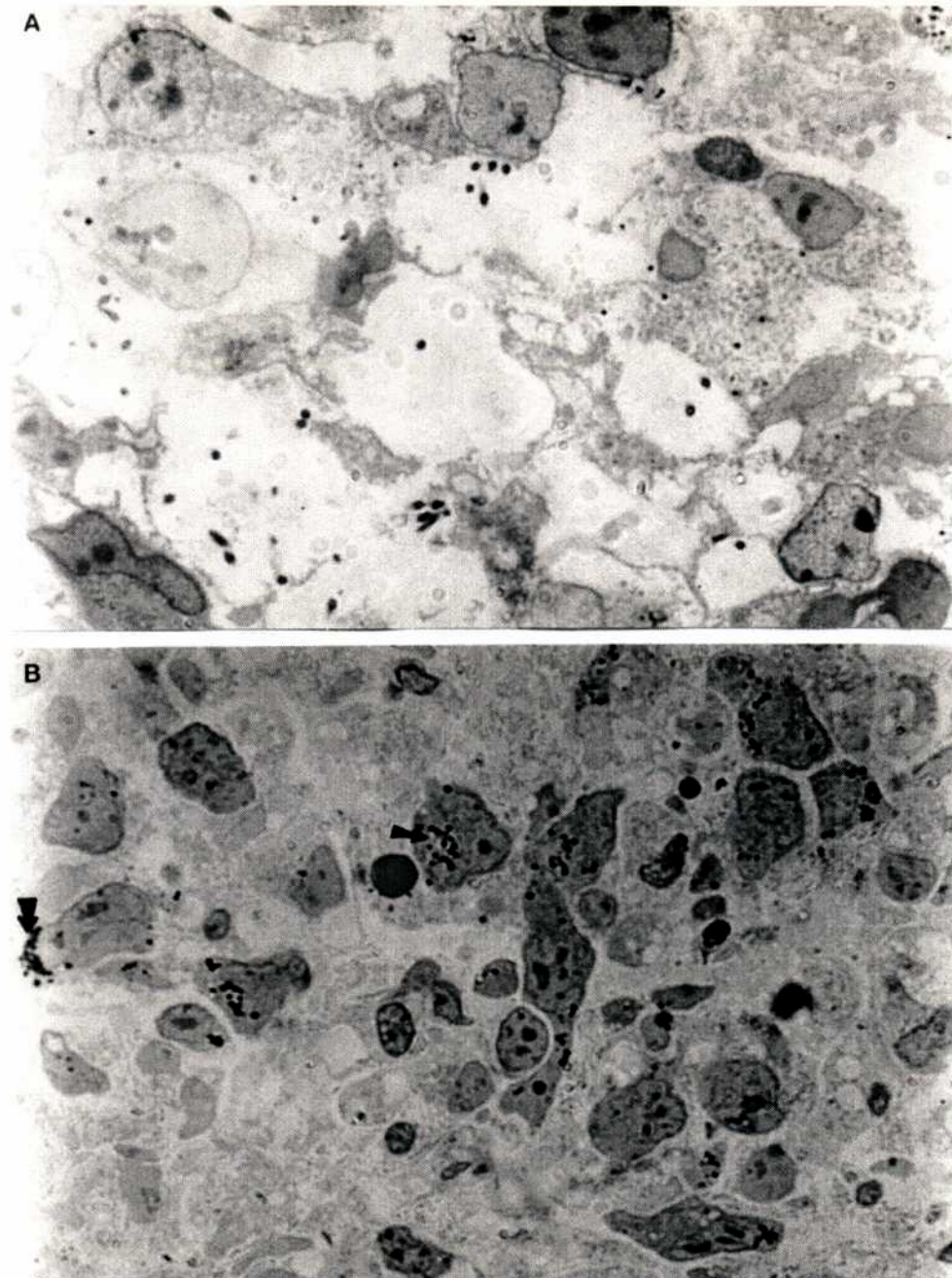
***Figura II.4: Microscopía electrónica de explantes de tumor tratados con ALA libre-TFD y no tratados.***

*(A) explante incubado 3 horas con ALA libre 0,6 mM, irradiado con una dosis lumínica de 190 J/cm<sup>2</sup> y fijado 4 horas después. Se puede observar el hinchamiento de mitocondrias y retículo endoplasmático, y pérdida del espacio intersticial debido al agrandamiento general de la célula. (3000X). (B) explante control incubado en las mismas condiciones, pero en ausencia de ALA y no irradiado. (3000X).*



**Figura II.5:** *Microscopía electrónica de explantes de tumor tratados con ALA libre-TFD.*

(A, C y D): *explantes incubados 3 horas con ALA libre 0,6 mM, (D) o encapsulado, irradiados con 190 J/cm<sup>2</sup> y fijado 4 horas después. (A) detalle del hinchamiento de mitocondrias y retículo endoplasmático (7000X). (B) detalle de ALA liposomal rodeado por la membrana celular (flechas) (7000X) (C) invaginación de la membrana plasmática (D) Pérdida de la integridad de membrana citoplasmática (7000X).*



**Figura II.6:** Microscopía óptica de explantes de tumor tratados con ALA liposomal-TFD y no tratados.

(A) explante incubado 3 horas con ALA liposomal 0,6 mM, irradiado con  $190 \text{ J/cm}^2$  y fijado 24 horas después. Se puede observar pérdida de la integridad celular. Restos de células y núcleos sueltos (100X) (B) Explantes control incubados con ALA liposomal y no irradiados. Se pueden ver liposomas en el citoplasma (flechas pequeñas) y algunos en el espacio intracelular justo antes de ser endocitados o fusionarse con la membrana plasmática (flechas grandes) (1000X).



### II.3. Discusión

En nuestro modelo de cultivo de explantes de tejidos, el encapsulamiento tanto del ALA como del He-ALA, no incrementó la tasa de síntesis de porfirinas en el tumor. Más aún, cuando se expuso la línea celular tumoral LM2 derivada del adenocarcinoma mamario M2 tanto a ALA como a He-ALA liposomal, se produjo una menor cantidad de PPIX comparado con los mismos compuestos libres (datos no mostrados). Había producido en contraste, la administración de ALA liposomal *in vivo* un incremento en la acumulación de porfirinas en el tejido tumoral (Fukuda y col., 1992). Estas diferencias entre los resultados *in vivo* e *in vitro* se pueden atribuir a la ausencia de un sistema vascular y esto debe tenerse en cuenta para estudiar la performance real del tratamiento de TFD.

El He-ALA no aumentó la síntesis de porfirinas, por el contrario, fue significativamente menor comparada con el ALA a partir de las 5 horas de incubación. En explantes de piel de rata, la síntesis de porfirinas a partir de He-ALA sólo sobrepasa la síntesis de porfirinas a partir de ALA a ciertos tiempos de incubación (Casas y col., 1999).

Empleando la línea celular LM2 habíamos encontrado que la máxima cantidad de porfirinas se sintetizaban a partir de ALA 0,6 mM y que la misma cantidad se producía con una concentración 60 veces mas baja de He-ALA. También habíamos demostrado que las porfirinas formadas a partir tanto de ALA como de He-ALA, sensibilizan a las células en igual forma para la fotoinactivación (Capítulo I). Estas diferencias entre los resultados obtenidos con las líneas celulares y los tumores sólidos parentales podría atribuirse al confinamiento del He-ALA en el espacio intersticial y consecuentemente la limitada disponibilidad para las células; o a una diferencia en la expresión y la actividad de las esterasas en la línea celular comparada con el tumor parental.

Se ha demostrado que los liposomas son endocitados por la membrana plasmática y/o se fusionan con ella, de este modo pueden introducir su contenido en el citoplasma celular (Margolis y col., 1982). La presencia de liposomas (figura 5B) rodeados por la membrana celular apoya la teoría de que los liposomas son incorporados por endocitosis.

No se conoce aún la localización del ALA o del He-ALA dentro del liposoma, pero la naturaleza hidrofílica de la molécula del ALA indicaría que muy probablemente queda retenido en el espacio acuoso interno entre las capas lipídicas en el liposoma

multilaminar. Debido a que el He-ALA es más lipofílico que el ALA, debería distribuirse entre la fase acuosa y lipídica de los liposomas; por lo tanto se esperaría que los compuestos se liberaran en forma diferente.

La permeabilidad de los liposomas aumenta cuando interacciona con las células, plasma o suero, así como también con proteínas específicas del plasma, especialmente lipoproteínas. Los lípidos se pueden intercambiar entre los liposomas y las lipoproteínas principalmente LDL (Rodal y col., 1998) y en algunos casos puede ocurrir la ruptura completa del liposoma. En nuestro caso, el uso de medio libre de suero minimiza este efecto. Además, los liposomas compuestos de fosfolípidos neutros como la fosfatidilcolina, son más estables, y sólo el 24 % de sus componentes se pierde en 7 horas (Hunt, 1982).

No hubo diferencias entre el daño subcelular inducido por la TFD con ALA liposomal comparado con ALA libre, indicando que los mecanismos de muerte celular inducidos serían los mismos. La PPIX se genera en la mitocondria y se redistribuye en el citoplasma y en la membrana con el consecuente daño mitocondrial y de retículo endoplasmático. El daño mitocondrial directo es el blanco principal del ALA-TFD (Iinuma y col., 1994). El retículo endoplasmático y otras estructuras membranosas se podrían dañar indirectamente por acción de los intermediarios reactivos del oxígeno provenientes del fotosensibilizante lipofílico PPIX. El núcleo, sin embargo, permanece intacto en los estadios tempranos del daño celular inducidos tanto por el ALA libre o liposomal luego de la TFD, pero los cambios tardíos inducen la muerte celular por necrosis, incluyendo la disrupción de la estructura nuclear.

### **III. Experiencias *in vitro* con citoprotectores contra el daño fotodinámico a partir de ALA en la línea celular LM2.**

A fin de evaluar los mecanismos de acción de la TFD y buscando una mejor estrategia de tratamiento, que sea capaz de proteger los tejidos sanos y aumentar la eficiencia de la terapia, se estudió la acción de diversos agentes citoprotectores en la modulación de la TFD. Para esto se utilizaron aminoácidos con acción protectora, antioxidantes y scavengers de radicales libres o del oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) formados durante el tratamiento. En la tabla III.1 se muestra la acción principal de los compuestos empleados.

***Tabla III.1: Acción de algunos scavengers de radicales libres, aminoácidos, antioxidantes y compuestos sulfurados contra el daño inducido por ALA-TFD.***

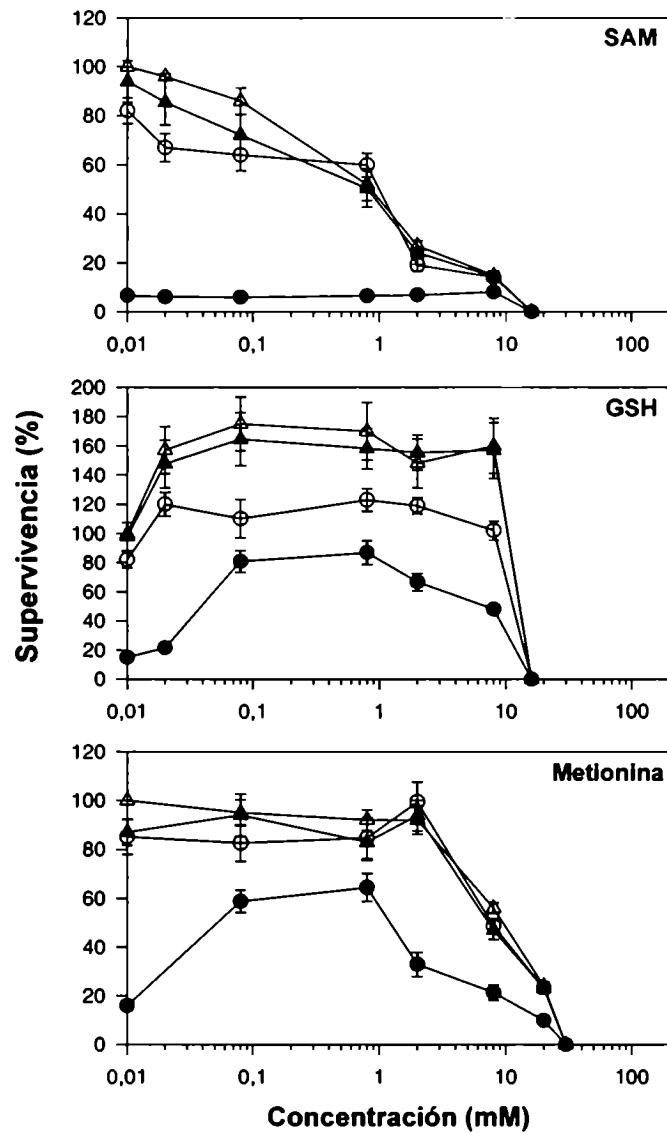
	Modo de Acción
SAM	Precursor de GSH. Puede atravesar membranas celulares
NAC	Actúa como scavenger mediante el metabolismo de tioles o aumentando el metabolismo de GSH. Secuestrante de $^1O_2$
GSH	Scavenger de radicales libres. Donante de hidrógeno
Cisteína	Precursor de GSH
GSSG	Producto de la oxidación de GSH. Sin acción citoprotectora
Metionina	Precursor de GSH
Triptofano	Principalmente secuestrante de $^1O_2$ .
Manitol	Principalmente scavenger del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )
Glicina	Su oxidación ayuda a mantener el estado redox de la célula.
Melatonina	Principalmente scavenger de $\cdot OH$ pero también de varios radicales libres

*SAM, S-adenosilmetionina, NAC, N-acetilcisteína, GSH, glutati3n reducido, GSSG, glutati3n oxidado.*

Se incubaron las células en presencia de ALA y diferentes concentraciones de agentes citoprotectores como se detalla en Materiales y Métodos. En las figuras III.1 a III.4 se muestra la acción de los diversos agentes estudiados sobre la viabilidad celular bajo cuatro condiciones experimentales diferentes: (a) el efecto del protector sobre la viabilidad celular, (b) la acción fotoactiva potencial del compuesto cuando se lo ilumina, (c) la acción citotóxica cuando se lo incubaba con ALA y (d) el efecto modulador sobre la acción citotóxica inducida por el ALA-TFD.

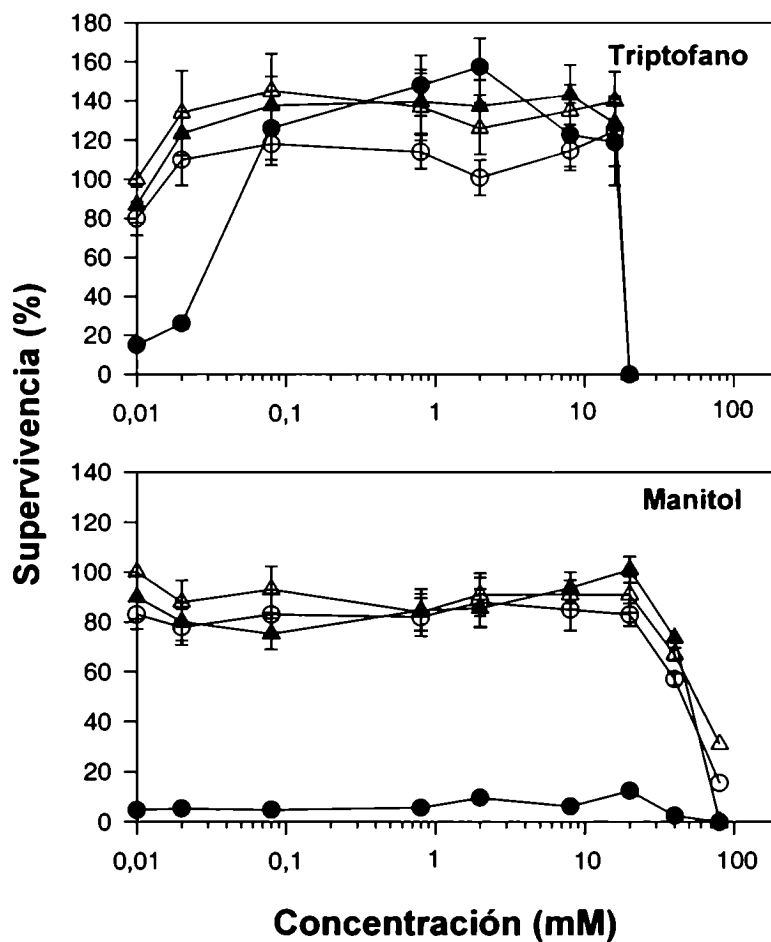
Ninguno de los compuestos resultó ser tóxico *per se* a bajas concentraciones. Empleados en altas concentraciones disminuyeron la viabilidad celular en más del 20 %: por encima de 0,02 mM para SAM, 3 mM para melatonina y cisteína, 4 mM para glicina y metionina, 15 mM para GSSG y 20 mM para NAC, triptofano, GSH y manitol.

No encontramos ninguna acción fotoactiva de los compuestos en ausencia de ALA, y cuando fueron incubados con ALA pero no irradiados, en general hubo una reversión de la toxicidad en oscuridad generada por el precursor. La excepción fue el GSSG que aumentó la citotoxicidad inducida por ALA. Como patrón general, las concentraciones a las que los compuestos protegieron contra la citotoxicidad inducida por ALA fueron similares a las concentraciones que protegieron contra los daños de la TFD.



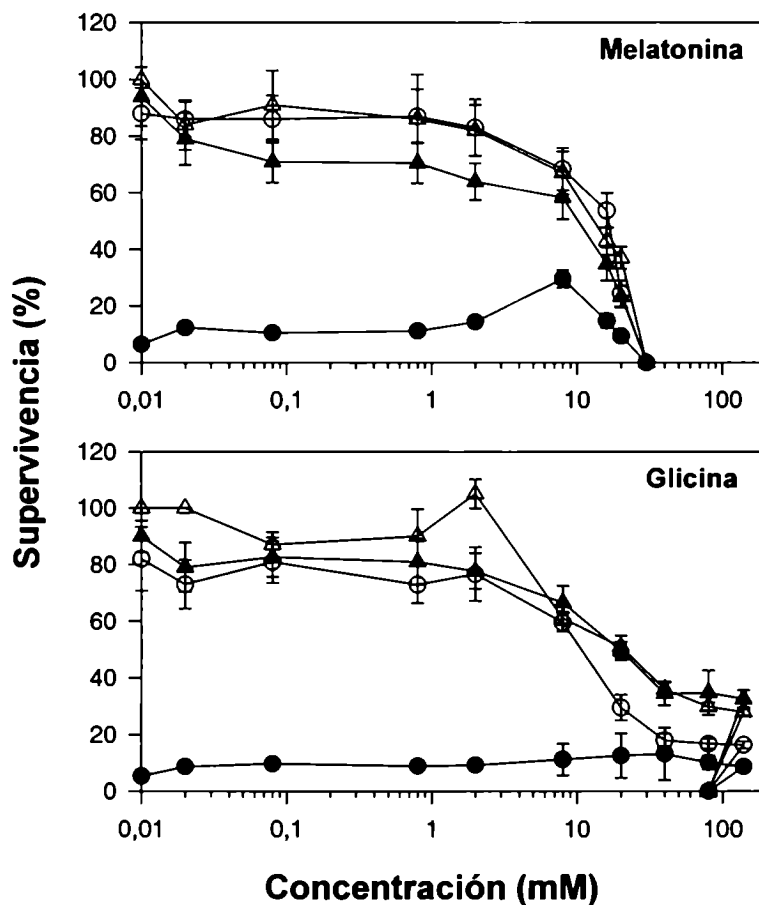
**Figura III.1:** Efecto de SAM, GSH y metionina sobre la supervivencia inducida por la TFD, el ALA y la exposición a la luz.

El SAM, GSH y metionina se agregaron a las células 24 horas antes de la TFD, durante la incubación con ALA, durante el período de exposición a la luz y por 19 horas luego del tratamiento. (○) células tratadas sólo con ALA, (●) Células tratadas con ALA-TFD, (▲) células irradiadas sin ALA, (△) células sin tratamiento. El ensayo de MTT se realizó luego de cambiar el medio por medio libre de scavengers. El porcentaje de supervivencia fue referido al control de células sin tratar con TFD y sin exposición a los scavengers. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.



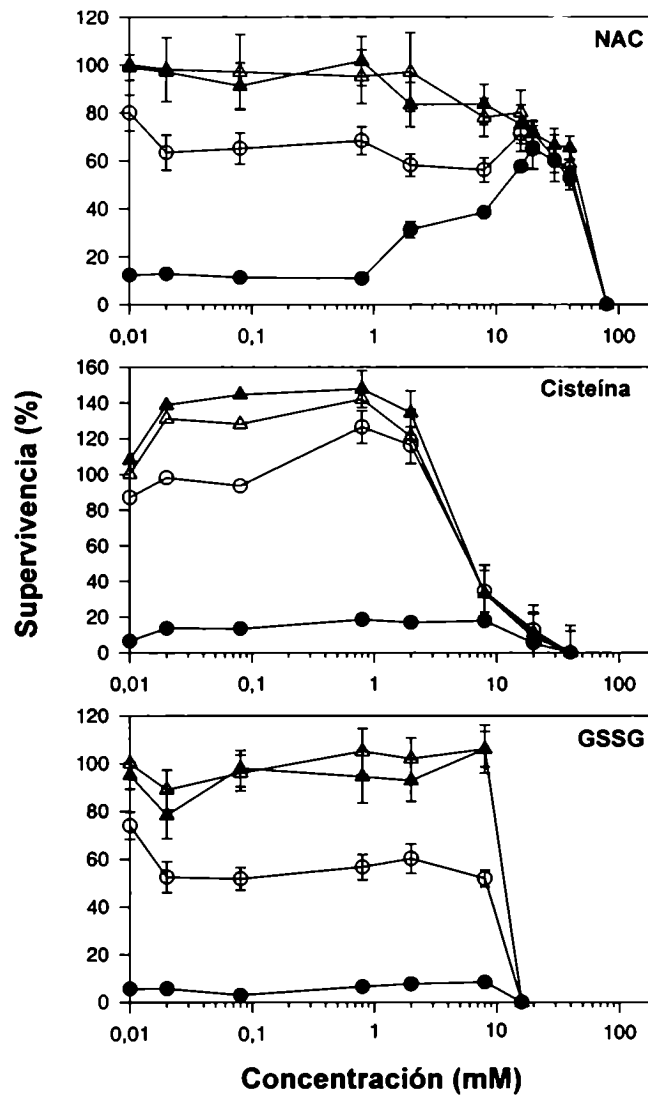
**Figura III.2:** Efecto de triptofano y manitol sobre la supervivencia inducida por la TFD, el ALA y la exposición a la luz.

El triptofano y el manitol se agregaron a las células 24 horas antes de la TFD, durante la incubación con ALA, durante el período de exposición a la luz y por 19 horas luego del tratamiento. (○) células tratadas sólo con ALA, (●) Células tratadas con ALA-TFD, (▲) células irradiadas sin ALA, (△) células sin tratamiento. El ensayo de MTT se realizó luego de cambiar el medio por medio libre de scavengers. El porcentaje de supervivencia fue referido al control de células sin tratar con TFD y sin exposición a los scavengers. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.



**Figura III.3:** Efecto de melatonina y glicina sobre la supervivencia inducida por la TFD, el ALA y la exposición a la luz.

La melatonina y la glicina se agregaron a las células 24 horas antes de la TFD, durante la incubación con ALA, durante el periodo de exposición a la luz y por 19 horas luego del tratamiento. (○) células tratadas sólo con ALA, (●) Células tratadas con ALA-TFD, (▲) células irradiadas sin ALA, (Δ) células sin tratamiento. El ensayo de MTT se realizó luego de cambiar el medio por medio libre de scavengers. El porcentaje de supervivencia fue referido al control de células sin tratar con TFD y sin exposición a los scavengers. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.



**Figura III.4:** Efecto de NAC, cisteína y GSSG sobre la supervivencia inducida por la TFD, el ALA y la exposición a la luz.

La NAC, la cisteína y el GSSG se agregaron a las células 24 horas antes de la TFD, durante la incubación con ALA, durante el período de exposición a la luz y por 19 horas luego del tratamiento. (○) células tratadas sólo con ALA, (●) Células tratadas con ALA-TFD, (▲) células irradiadas sin ALA, (△) células sin tratamiento. El ensayo de MTT se realizó luego de cambiar el medio por medio libre de scavengers. El porcentaje de supervivencia fue referido al control de células sin tratar con TFD y sin exposición a los scavengers. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.

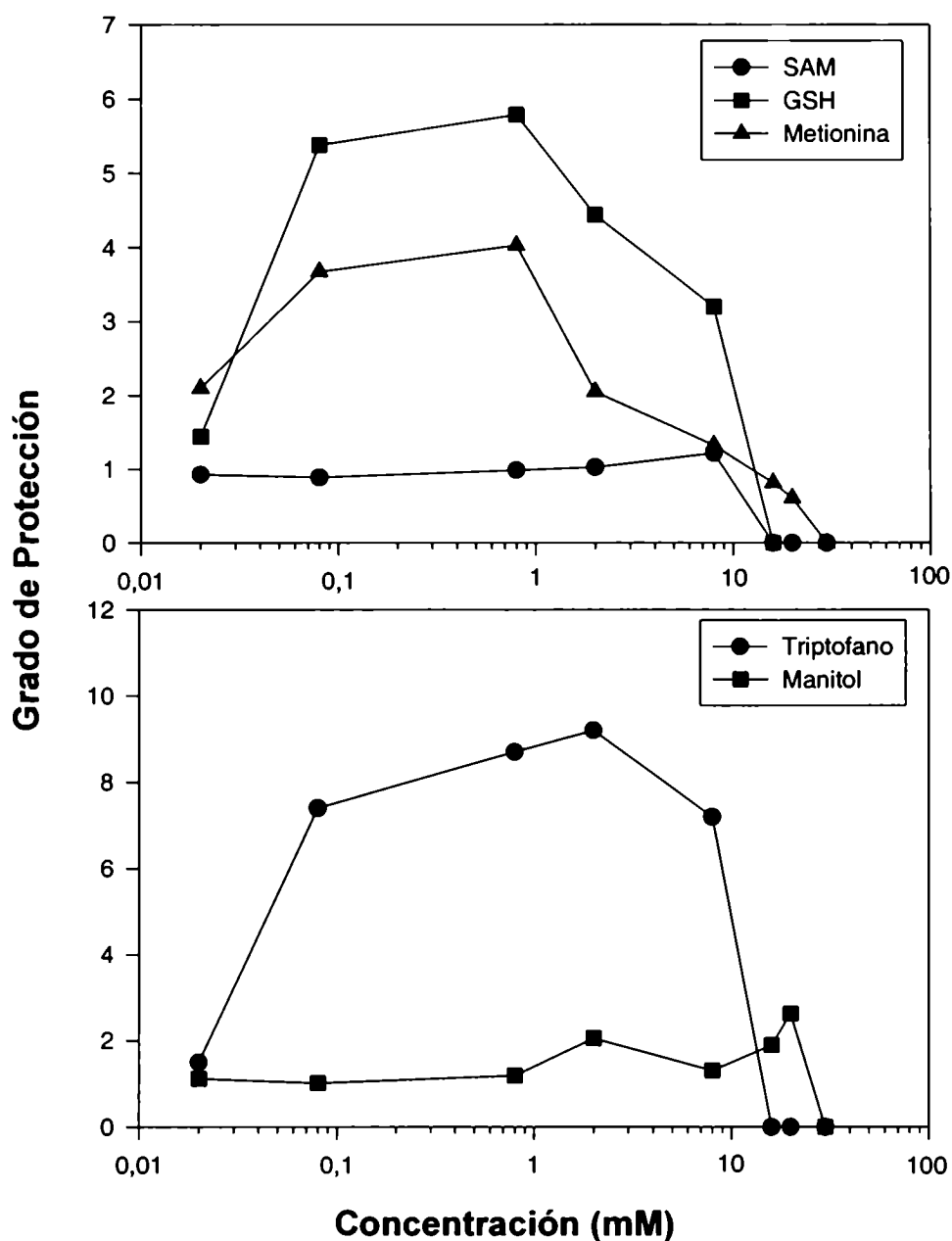


El efecto de estos compuestos protectores sobre la toxicidad inducida por el ALA-TFD se analiza más extensamente en las figuras III.5 y III.6.

Para estudiar en forma comparativa el efecto de los scavengers, antioxidantes y compuestos sulfurados, se definió el grado de protección (GP) como la relación entre la supervivencia luego del ALA-TFD en presencia del protector y la supervivencia luego del ALA-TFD en ausencia del protector.

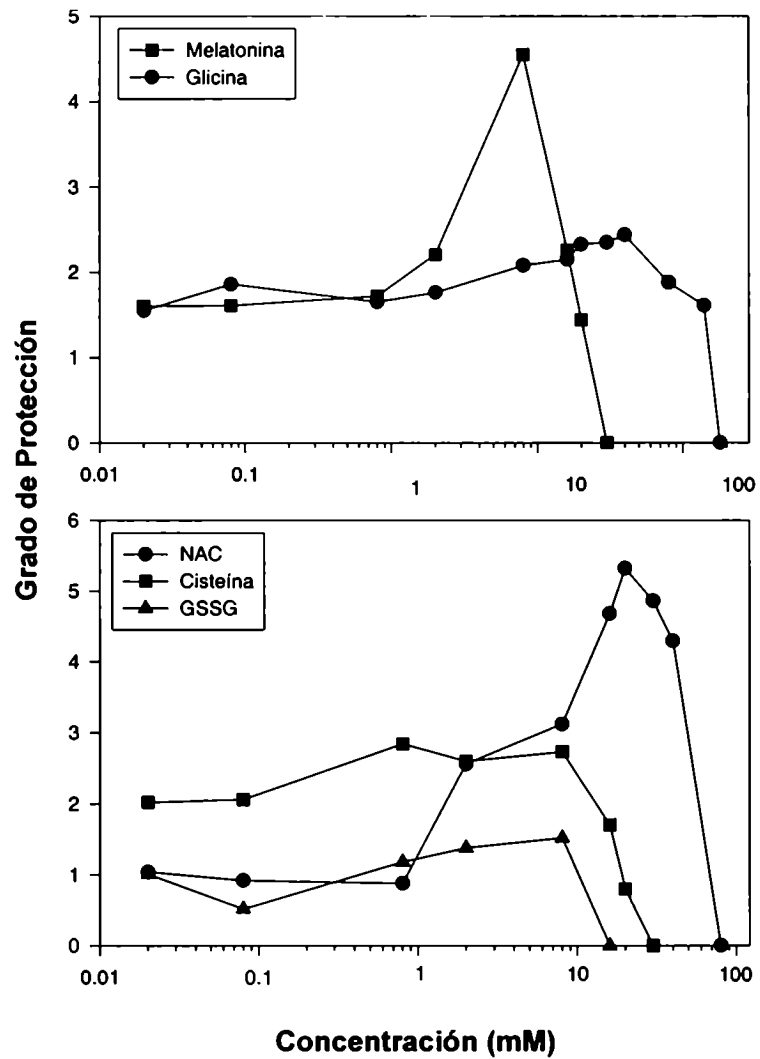
Dependiendo del compuesto, el máximo grado de protección se encontró a distintas concentraciones. L-triptofano (GP = 9,2 a 2 mM), glutatión reducido (GP = 5,8 a 0,8 mM), N-acetil-L-cisteína (GP = 5,3 a 20 mM), melatonina (GP = 4,5 a 8 mM), L-metionina (GP = 4,0 a 0,8 mM) fueron los mejores protectores contra los daños producidos por la TFD. Le siguieron L-cisteína (GP = 2,8 a 8 mM), manitol (GP = 2,6 a 20 mM), y glicina (GP = 2,4 a 40 mM), mientras que el glutatión oxidado y la S-adenosil-L-metionina no ejercieron ningún efecto protector.

En otro set de experimentos las células fueron expuestas a los compuestos protectores sólo durante el período previo a la iluminación, o sólo durante el período de irradiación o luego de la misma y a todas las combinaciones posibles de estas condiciones experimentales. El máximo GP se encontró cuando las células fueron expuestas a los compuestos antes y durante la irradiación, mientras que el agregado de los protectores luego de la TFD no aumentaba la supervivencia celular (datos no mostrados).



**Figura III.5:** Efecto de los protectores sobre la supervivencia de las células luego del tratamiento con ALA-TFD.

SAM, GSH y metionina, triptofano y manitol se agregaron a las células 24 horas antes de la TFD, durante el tratamiento con ALA, durante el período de exposición a la luz y por 19 horas luego del tratamiento. El ensayo de MTT se realizó luego de 19 horas y luego de cambiar el medio por medio libre de scavengers. El GP es la relación entre la supervivencia celular luego del tratamiento con ALA-TFD en presencia de los diferentes compuestos y la supervivencia sin los protectores.



**Figura III.6: Efecto de los protectores sobre la supervivencia luego del tratamiento con ALA-TFD.**

*Glicina, melatonina, NAC, cisteína y GSSG se agregaron a las células 24 horas antes de la TFD, durante el tratamiento con ALA, durante el período de exposición a la luz y por 19 horas luego del tratamiento. El ensayo de MTT se realizó luego de 19 horas y luego de cambiar el medio por medio libre de scavengers. El GP es la relación entre la supervivencia celular luego del tratamiento con ALA-TFD en presencia de los diferentes compuestos y la supervivencia sin los protectores.*

### III.1. Discusión

El L-triptofano, un reconocido y eficiente agente secuestrante de oxígeno singlete, fue el mejor protector entre todos los compuestos analizados, alcanzando un GP de 9,2 a concentraciones tan bajas como 2 mM. Por otro lado el manitol, un scavenger del radical hidroxilo sólo mostró una baja protección (GP = 2,6 a 20 mM). Aunque la especificidad para secuestrar los radicales libres no es total, estos resultados indican la importancia del oxígeno singlete en la muerte celular mediada por ALA-TFD.

En cuanto a los compuestos sulfurados, el GSH fue altamente protector. El aminoácido esencial metionina se puede convertir en SAM, el cual mediante una serie de transulfuraciones reacciona dando cisteína y de allí se transforma en GSH. Por otra parte el aminotiol NAC puede actuar como scavenger de radicales libres uniéndose al grupo sulfhidrilo reducido tanto sea a través del metabolismo de tioles o incrementando el metabolismo de GSH. El NAC por sí mismo puede actuar como secuestrante de oxígeno singlete. *In vivo* NAC puede formar cisteína, cistina, metionina, glutatión y disulfuros mixtos (Baas y col., 1991). Nosotros encontramos que el GSH (GP = 5,8 a 0,8 mM), NAC (GP = 5,3 a 0,8 mM) y metionina (GP = 4,0 a 0,8 mM), cuando se los utiliza a las concentraciones de máxima protección, brindan una mayor protección que la L-cisteína (GP = 2,8 a 0,8 mM) la cual induce una leve protección. Sin embargo cabe destacar que se necesitan concentraciones mucho mayores de NAC para inducir el mismo efecto que el producido por el GSH.

Para la mayoría de los compuestos la mayor protección se alcanzó a concentraciones relativamente altas, pero hay que tener en cuenta que concentraciones por encima de 1 mM no son farmacológicamente relevantes.

Sorpresivamente, el SAM, no mostró ninguna protección frente al ALA-TFD, probablemente debido a que concentraciones mayores a 0,02 mM resultaron ser tóxicas, un resultado no esperado. En cambio como era previsible, el GSSG no tuvo efecto protector, ni aumentó el efecto de la TFD.

La viabilidad celular de los controles no tratados y de las células tratadas con ALA-TFD aumentó en un 60 % en presencia de GSH, mostrando una activación inespecífica del metabolismo celular. Por otro lado el L-triptofano incrementó en un 40 % la viabilidad de las células no tratadas, pero se observó un aumento mucho mayor en

las células tratadas con TFD (140 %), demostrando una acción protectora específica contra el daño producido por la TFD.

La hormona de la glándula pineal, melatonina, es un potente scavenger del  $\bullet\text{OH}$  (Reiter y col., 1991). Se ha descrito su acción como neutralizador del peróxido de hidrógeno, del  $^1\text{O}_2$ , el anión peroxinitrito y el óxido nítrico, además de estimular varias enzimas antioxidantes (Reiter y col., 2000). Cuando la melatonina se administra *in vivo* se observa una disminución en la actividad de algunas enzimas antioxidantes al igual que cuando se administra ALA, pero cuando ambas drogas se administran conjuntamente, la melatonina antagoniza los efectos del ALA (Tomas-Zapico 2002). Nuestros resultados muestran que este compuesto es un excelente protector (GP = 4,5 a 8 mM), casi al mismo nivel que los compuestos sulfurados NAC y metionina.

Además del oxígeno singulete, que es el agente citotóxico primario de la TFD, se generan otras especies reactivas de oxígeno interconvertibles, en forma mayoritaria el radical hidroxilo (Henderson & Miller, 1986). Más aun, el oxígeno singulete que es una forma de oxígeno muy activa, es capaz de inducir la formación de radicales libres de oxígeno. (Hideg y col., 1994, Buettner, 1981). Estos dos hechos explican el por qué de la capacidad de la melatonina de proteger contra el daño inducido por el ALA-TFD.

La protección ejercida por el aminoácido triptofano probablemente se deba a que secuestra el  $^1\text{O}_2$  (Henderson & Millar, 1986), mientras que la leve acción de la glicina se puede atribuir a la oxidación directa de la molécula (Baas y col., 1995). En concordancia con nuestros resultados, Henderson y Miller encontraron en células CHO que el triptofano inhibía el daño producido por la TFD con Photofrin. Se ha observado que la glicina protegía contra las radiaciones ionizantes (Baas y col., 1995) pero hasta el momento no se ha demostrado una acción protectora contra la TFD.

Los máximos grados de protección se encontraron cuando las células se incubaron con los compuestos antes y durante la TFD, mientras que su incubación después de la TFD no incrementó la protección ni el porcentaje de supervivencia. En contraste con nuestros resultados, en células leucémicas murinas, el agregado de Trolox o  $\alpha$ -tocoferol durante los 60 minutos posteriores a la TFD con estaño-etiopurpurina, indujeron una protección parcial contra la apoptosis y la fototoxicidad (Kessel & Luo, 1996). Sin embargo, la distinta localización subcelular de los fotosensibilizantes podría dar origen a diferentes patrones de protección.

En base a nuestros resultados observamos que el L-triptofano, un potente secuestrante del oxígeno singulete, es el mejor protector contra los daños de la TFD

seguido de compuestos sulfurados como el GSH, el NAC, metionina y la melatonina. La presencia del protector antes y durante la iluminación con luz láser es crucial para la protección. Estos resultados son importantes para proteger a los tejidos normales de los efectos secundarios producidos por la TFD.

#### **IV. TFD en Linfocitos Activados y en Reposo.**

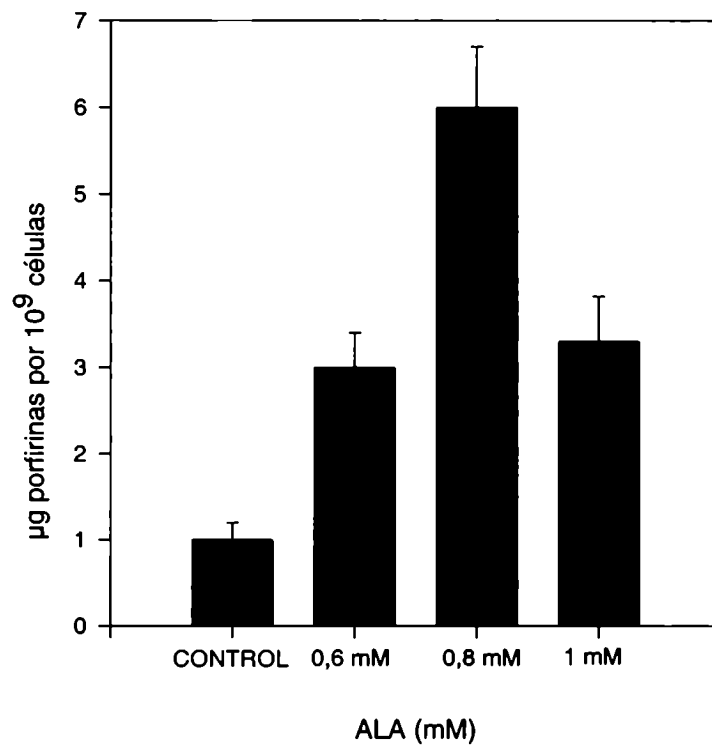
Dado que la luz visible o UV es capaz de inducir la activación de algunas enzimas antioxidantes en células mononucleares, y que la activación de dichas enzimas podría modular la resistencia al daño inducido por la TFD, se decidió estudiar el efecto del ALA-TFD en linfocitos, activados y en reposo, de bazo de ratón.

Se evaluó la síntesis de porfirinas en función de la dosis y el tiempo de incubación, la supervivencia celular a distintas dosis de luz y tiempo luego del tratamiento con ALA-TFD, así como la respuesta de las células a través de la medición de actividad de distintas enzimas antioxidantes.

##### **IV.1. Síntesis de porfirinas en linfocitos activados y en reposo.**

La figura IV.1 muestra la acumulación de porfirinas en función de la dosis de ALA. La concentración de porfirinas se incrementó en forma dosis dependiente con el aumento en la concentración de ALA, alcanzando un pico con ALA 0,8 mM. Por encima de esa concentración la cantidad de porfirinas se redujo a casi la mitad. La acumulación de porfirinas a partir de ALA 0,6 mM fue 3 veces el valor del control y fue suficiente para fotosensibilizar las células, por lo que esa concentración se usó para los experimentos de TFD.

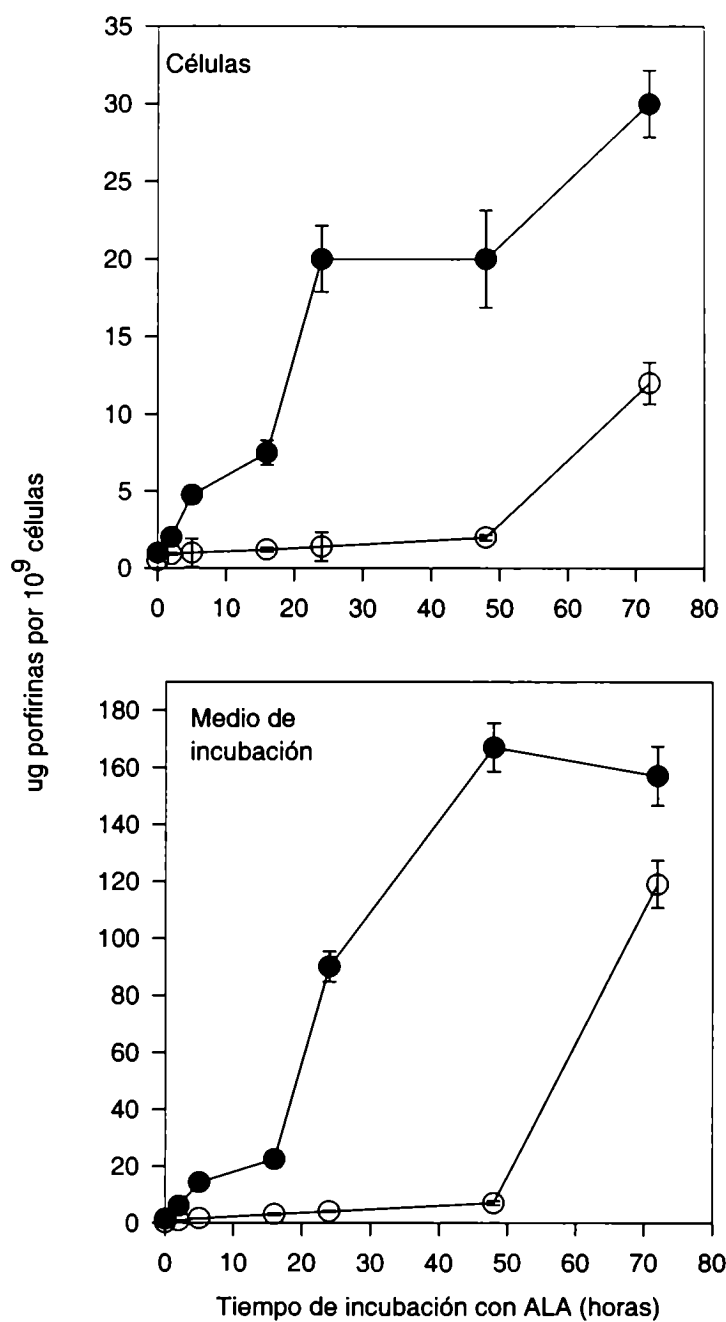
La figura IV.2 describe la acumulación de porfirinas en función del tiempo en linfocitos activados y en reposo, así como en sus correspondientes medios de incubación. En linfocitos activados con concanavalina A (Con A) la cantidad de porfirinas se incrementó rápidamente dentro de las primeras 24 horas de incubación con ALA. Entre las 24 y 48 horas se mantuvo en un plateau, y luego la síntesis se incrementó nuevamente entre las 48 y las 72 horas. La liberación de porfirinas al medio de incubación aumentó casi linealmente durante las primeras 48 horas en presencia de ALA.



***Figura IV.1: Acumulación de porfirinas en función de la dosis de ALA en linfocitos activados.***

*Los linfocitos estimulados 72 horas con Con A se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de ALA. Tres horas después se determinó el contenido total de porfirinas (células + medio) fluorométricamente y se relativizó por número de células. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error la Desviación Estándar.*





**Figura IV.2:** Acumulación de porfirinas en función del tiempo en linfocitos activados y en reposo.

Los linfocitos se incubaron con ALA 0,6 mM durante diferentes tiempos. (●) linfocitos estimulados 72 horas con Con A; (○) linfocitos no estimulados. El contenido de porfirinas en las células y el medio de incubación se determinaron fluorométricamente y se relativizó por número de células. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error la Desviación Estándar.

De la síntesis total de porfirinas, es decir la suma de porfirinas de las células y el medio de incubación (tabla IV.1), se puede inferir que la síntesis de porfirinas en linfocitos activados es lineal hasta las 48 horas alcanzando luego un plateau. Considerando la alta cantidad de porfirinas liberadas a partir de las 24 horas, se seleccionó este tiempo de incubación para realizar los experimentos de TFD.

En linfocitos activados, la cantidad total de porfirinas sintetizadas a partir de ALA luego de 24 horas, es casi 25 veces la encontrada en células en reposo. Sin embargo, durante períodos de incubación de 72 horas, la síntesis en células en reposo se incrementa marcadamente, de modo que la cantidad de porfirinas formadas por las células activadas es sólo 1,5 veces la producida por células en reposo.

El porcentaje de porfirinas liberadas en el medio por los linfocitos activados y en reposo se incrementó ligeramente con el tiempo de incubación.

***Tabla IV.1: Porfirinas totales y liberadas al medio de incubación en función del tiempo de incubación con ALA.***

Tiempo de incubación con ALA (h)	Con A		- Con A	
	Contenido total de porfirinas ( $\mu\text{g}$ por $10^9$ cel.)	Porcentaje liberado al medio	Contenido total de porfirinas ( $\mu\text{g}$ por $10^9$ cel.)	Porcentaje liberado al medio
0	2,4	0	1,0	0
2	8,1	75	1,7	47
5	19	75	2,5	60
16	30	75	4,2	71
24	110	81	4,4	90
48	187	89	9,2	77
72	187	83	131	90

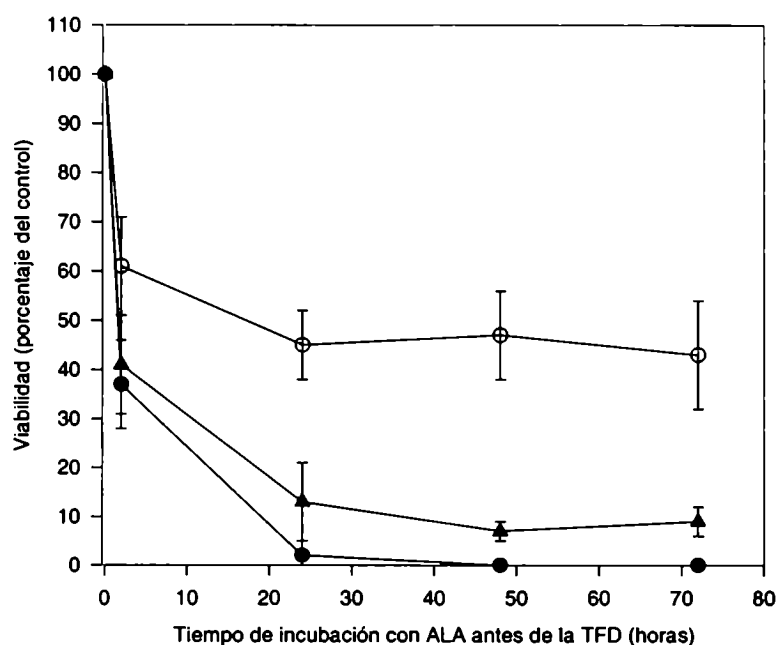
*Los linfocitos se incubaron con ALA 0,6 mM durante diferentes tiempos. Las células se activaron mediante la incubación con Con A durante 72 horas y se realizaron controles de linfocitos no estimulados. El contenido de porfirinas en las células y el medio se determinó flourométricamente luego de la extracción, se relativizó por número de células, y se calculó el porcentaje de porfirinas liberadas al medio.*

## **IV.2. Respuesta de los linfocitos activados y en reposo al ALA-TFD.**

Examinamos la respuesta de las células expuestas a bajas y altas dosis de luz, luego de diferentes tiempos de incubación en presencia del pro-fotosensibilizante ALA (figura IV.3). Los tiempos más largos de exposición a ALA, se correlacionan con una mejor respuesta al tratamiento con TFD. Las dosis de luz más elevadas también incrementaron la toxicidad. Luego de 2 horas de exposición al ALA, en las células activadas se produjo un 50% de mortalidad por la irradiación con una dosis lumínica de 2,1 ó 12,2 J/cm<sup>2</sup>.

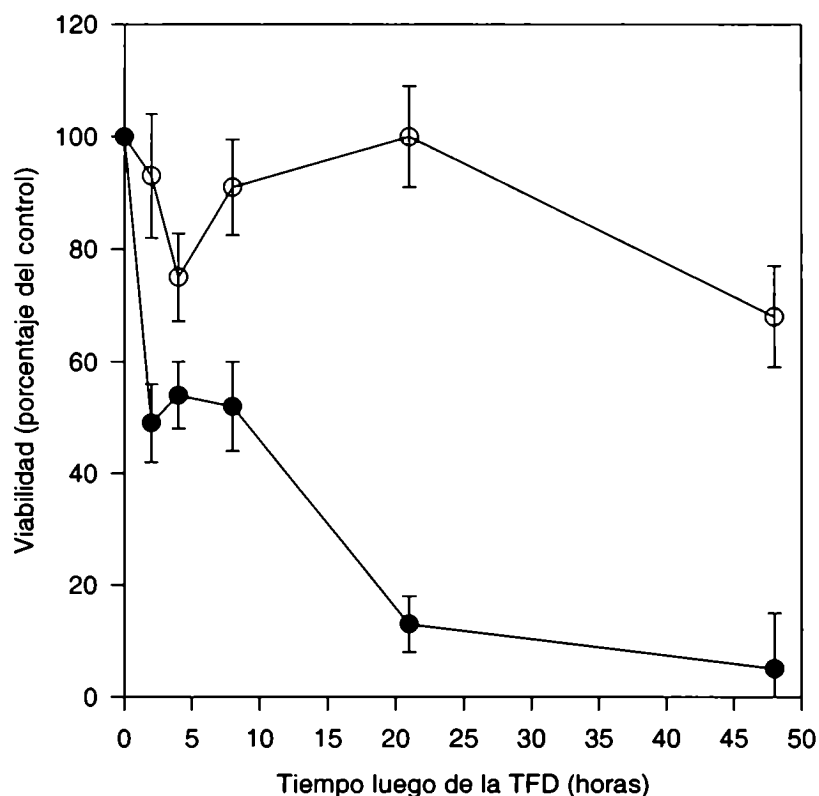
A pesar de la baja cantidad de porfirinas acumuladas en linfocitos en reposo, luego de 2 horas de incubación con ALA, el 40% de las células morían con las dosis altas de luz y esta respuesta tóxica no se incrementó significativamente con periodos más largo de incubación con ALA. Luego de 18 hs de exposición a ALA se indujo sólo 50% de muerte celular.

La supervivencia de linfocitos activados y en reposo a diferentes tiempos luego de la TFD con bajas dosis de luz (3,1 J/cm<sup>2</sup>) se muestra en la figura IV.4 En células activadas por mitógenos, la viabilidad disminuyó rápidamente, quedando sólo el 50% de la cantidad de linfocitos iniciales 2 horas luego de la irradiación. A partir de ese momento la disminución se hizo más gradual y 48 horas luego de la TFD sólo el 15% de las células sobrevivieron. El tratamiento de TFD de linfocitos en reposo disminuyó la supervivencia al 75% a las 4 horas, pero las células se recuperaron rápidamente de este daño transitorio, de modo que el porcentaje de linfocitos sobrevivientes fue 100% a las 24 horas, disminuyendo nuevamente al 65% a las 48 horas.



***Figura IV.3: Supervivencia celular luego de diferentes tiempos de incubación con ALA antes de la TFD.***

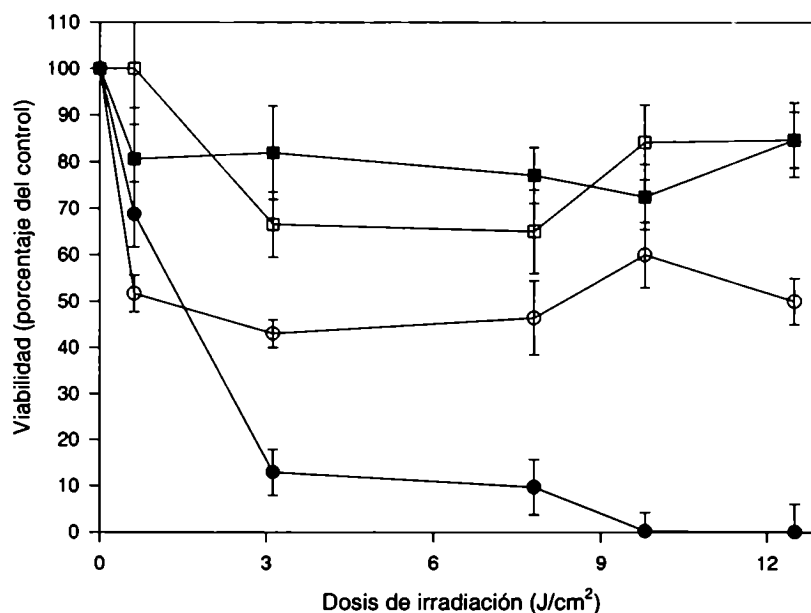
*Los linfocitos estimulados con Con A por 72 horas, se incubaron en presencia de ALA 0,6 mM durante diferentes tiempos y luego se irradiaron con 3,1 (▲) ó 12,2 J/cm<sup>2</sup> (●). (○), linfocitos control no estimulados con Con A, incubados con ALA e irradiados con 12,2 J/cm<sup>2</sup>. Finalizada la irradiación las células se incubaron en medio libre de ALA y Con A por 21 horas y luego se realizó el MTT. El porcentaje de viabilidad se calculó a partir de los respectivos controles no irradiados.*



**Figura IV.4:** *Supervivencia celular a diferentes tiempos luego de la TFD a partir de ALA.*

(●) *Linfocitos estimulados 72 horas con Con A, incubados en presencia de ALA 0,6 mM durante 24 horas e irradiados con 3,1 J/cm<sup>2</sup>. Luego las células se incubaron en medio libre de ALA y Con A, durante distintos tiempos y se realizó el ensayo de MTT. (○) Linfocitos no estimulados incubados con ALA 0,6 mM por 24 horas e irradiados con 3,1 J/cm<sup>2</sup>. Los porcentajes de viabilidad se calcularon en base a los respectivos controles no irradiados.*

En la figura IV.5 se muestra la respuesta de linfocitos activados y en reposo, previamente expuestos durante 24 horas a ALA, a diferentes dosis lumínicas, así como la toxicidad marginal de la luz sola sobre las células incubadas sin ALA. En linfocitos activados el porcentaje de supervivencia de células expuestas a ALA-TFD disminuyó con el aumento de la dosis lumínica, y una dosis de 0,6 J/cm<sup>2</sup> indujo el 50% de muerte celular. En células en reposo, el mismo porcentaje de muerte se observó luego de la exposición a 1,5 J/cm<sup>2</sup>. En células tratadas sólo con luz, se observó un descenso en la viabilidad de 20-30% tanto en células activadas como en células en reposo.



**Figura IV.5:** Supervivencia de linfocitos activados y en reposo luego del ALA-TFD con diferentes dosis lumínicas.

(●) Linfocitos estimuladas 72 horas con Con A, incubados en presencia de ALA 0,6 mM durante 24 horas e irradiados con diferentes dosis de luz. Luego las células se incubaron en medio libre de ALA y Con A, durante distintos tiempos y se realizó el MTT. Células no estimuladas (○) incubadas con ALA e irradiadas. Células control estimuladas (■) o no estimuladas con Con A (□) incubadas en medio libre de ALA e irradiadas. Los porcentajes de viabilidad se calcularon en base a los respectivos controles no irradiados.

### IV.3. Respuesta antioxidante de células sobrevivientes al ALA-TFD.

Los linfocitos activados o no, se incubaron en presencia de ALA y luego de realizar la irradiación y los controles adecuados, se procedió a la determinación de la actividad de diversas enzimas del sistema antioxidante de defensa celular.

La actividad de SOD en linfocitos activados (tabla IV.2) disminuyó aproximadamente un 30 % por el tratamiento con luz, independientemente de la exposición a ALA. Esta disminución también se observó, aunque en un menor grado, en

linfocitos en reposo. El tratamiento con ALA en sí mismo no provocó una disminución significativa en la actividad enzimática.

***Tabla IV.2: Actividad de la Superóxido Dismutasa luego de la TFD en linfocitos activados y en reposo.***

	- ALA		+ ALA	
	- Luz	+Luz	-Luz	+Luz
+ Con A	164,2 ± 11,1	104,8 ± 9,1	153,9 ± 12,2	97,3 ± 6,8
- Con A	170,1 ± 7,4	126,3 ± 13,1	156,7 ± 13,5	127,5 ± 10,8

*Se incubaron  $2,5 \times 10^6$  linfocitos en medio conteniendo ALA 0,6 mM y se estimularon con Con A durante 72 horas. Luego las células se irradiaron con una dosis lumínica de  $3,1 \text{ J/cm}^2$  y se incubaron por 19 horas. Pasado ese tiempo se centrifugaron, se resuspendieron en PBS y se sonicaron para la determinación de la actividad enzimática. También se realizaron controles de células sin estimular y controles sin ALA y sin irradiar. La actividad de SOD se expresa como unidades enzimáticas, corregidas por la viabilidad celular. Cada punto corresponde al promedio de 3 experiencias independientes  $\pm$  el Desvío Estándar.*

La actividad de CAT (tabla IV.3) en linfocitos activados y en reposo, disminuyó significativamente tanto por la luz como por el tratamiento con ALA. En linfocitos tratados con ALA-TFD (+ALA + Luz) la disminución en la actividad no fue la suma de sus efectos independientes, sino que fue menos marcada. También se destaca que en células activadas tratadas con TFD, se observó un incremento significativo en la actividad enzimática al compararlo con ALA ( $p= 0,02$ ) o células tratadas sólo con luz ( $p= 0,002$ ), superando la toxicidad ejercida por la luz, la cual no se observó en linfocitos en reposo.

***Tabla IV.3: Actividad de Catalasa luego de la TFD en linfocitos activados y en reposo.***

	- ALA		+ ALA	
	- Luz	+Luz	-Luz	+Luz
+ Con A	78,49 ± 9,15	40,48 ± 5,82	48,15 ± 3,42	57,99 ± 6,93
- Con A	67,74 ± 8,42	48,58 ± 7,61	37,66 ± 4,25	42,12 ± 7,31

*Se incubaron  $2,5 \times 10^6$  linfocitos en medio conteniendo ALA 0,6 mM y se estimularon con Con A durante 72 horas. Luego las células se irradiaron con una dosis lumínica de  $3,1 \text{ J/cm}^2$  y se incubaron por 19 horas. Pasado ese tiempo se centrifugaron, se resuspendieron en PBS y se sonicaron para la determinación de la actividad enzimática. También se realizaron controles de células sin estimular y controles sin ALA y sin irradiar. La actividad de Catalasa se expresa como unidades enzimáticas según se detalla en Materiales y Métodos, corregidas por la viabilidad celular. Cada punto corresponde al promedio de 3 experiencias independientes  $\pm$  el Desvío Estándar*

En la tabla IV.4 se observa que el tratamiento con ALA-TFD indujo un incremento de 2 veces en la actividad de glutatión peroxidasa en células activadas, pero ni la luz ni el ALA solos produjeron cambios significativos. Sin embargo, en células en reposo se observó una ligera pero significativa disminución de la actividad enzimática ( $p=0,02$ ) luego del tratamiento con TFD, y nuevamente no se observaron cambios en células expuestas sólo a la luz o al ALA.

Se determinó el contenido de GSH y GSSG luego del tratamiento con ALA-TFD (tabla IV.5). En linfocitos activados, tanto la luz como la TFD indujeron un ligero pero significativo descenso en la relación GSH/GSSG ( $p=0,04$  y  $p=0,03$  respectivamente) cuando se lo comparó con el control de -ALA-Luz. En linfocitos en reposo, la TFD disminuyó marcadamente la relación GSH/GSSG ( $p=0,002$ ) comparada con el control -ALA-Luz, mientras que ni la luz ni el ALA solos produjeron cambios significativos.



**Table IV.4: Actividad de Glutación Peroxidasa luego de la TFD en linfocitos activados y en reposo.**

	- ALA		+ ALA	
	- Luz	+Luz	-Luz	+Luz
+ Con A	75,18 ± 10,12	80,70 ± 6,52	89,21 ± 9,91	179,82 ± 14,82
- Con A	53,84 ± 3,52	57,83 ± 5,32	46,60 ± 8,14	35,42 ± 3,15

Se incubaron  $2,5 \times 10^6$  linfocitos en medio conteniendo ALA 0,6 mM y se estimularon con Con A durante 72 horas. Luego las células se irradiaron con una dosis luminica de  $3,1 \text{ J/cm}^2$  y se incubaron por 19 horas. Pasado ese tiempo se centrifugaron, se resuspendieron en PBS y se sonicaron para la determinación de la actividad enzimática. También se realizaron controles de células sin estimular y controles sin ALA y sin irradiar. La actividad de Glutación Peroxidasa se expresó como unidades enzimáticas según se detalla en Materiales y Métodos, corregidas por la viabilidad celular. Cada punto corresponde al promedio de 3 experiencias independientes ± el Desvío Estándar.

**Table IV.5: Contenido GSH/GSSG en linfocitos tratados con TFD.**

	- ALA		+ ALA	
	- Luz	+Luz	-Luz	+Luz
+ Con A	40,3 ± 2,8	35,7 ± 3,5	40,9 ± 4,5	36,4 ± 1,9
- Con A	41,6 ± 4,3	37,4 ± 2,1	44,4 ± 3,7	34,4 ± 3,3

Se incubaron  $10^7$  linfocitos en medio conteniendo ALA 0,6 mM durante 24 horas y se estimuló con Con A durante 72 horas. Luego las células se irradiaron con una dosis luminica de  $3,1 \text{ J/cm}^2$ . 19 horas después de la iluminación se determinó la relación molar GSH/GSSG. También se realizaron controles incubados sin ALA, sin estimular con Con A y sin irradiar. Los datos presentados corresponden al promedio ± DS de la relación GSH/GSSG de 5 experimentos independientes.

#### **IV.4. Discusión.**

Luego de la incubación de linfocitos activados en presencia de dosis crecientes de ALA, el contenido de porfirinas aumentó hasta llegar a 0,8 mM, utilizando concentraciones superiores el contenido de porfirinas disminuyó. Otros autores observaron el mismo descenso en la síntesis de porfirinas a concentraciones altas de ALA en linfocitos de sangre periférica (Hryhorenko y col., 1998), el cual puede ser atribuido a la toxicidad en oscuridad de altas concentraciones de ALA que afectan el metabolismo celular. También encontramos un incremento tardío en la síntesis de porfirinas en linfocitos en reposo luego de 72 horas de incubación con ALA.

Eléouet y col. (1997) encontraron que los linfocitos de sangre periférica normal activados por el mitógeno “pokeweed”, acumulaban 50% más de porfirinas que los controles no estimulados, y las células T activadas por fitohemaglutinina sintetizaban 100% más de PPIX luego de 3 horas de incubación con ALA. Nosotros encontramos tasas de incremento del mismo orden cuando comparamos linfocitos activados y en reposo en nuestro modelo de linfocitos esplénicos murinos, pero obtuvimos relaciones más grandes cuando se prolongaba el tiempo de incubación.

El aumento de porfirinas liberadas al medio con el tiempo de incubación, refleja probablemente cambios en la permeabilidad celular debido a los efectos tóxicos del ALA en oscuridad durante períodos de incubación largos.

En células estimuladas, el descenso en la supervivencia celular con el incremento del tiempo de exposición al ALA, se correlaciona con la alta acumulación de porfirinas. En linfocitos en reposo, a pesar de la baja cantidad de porfirinas presentes luego de 2 horas de exposición al ALA, el 40% de las células muere luego de la irradiación, y esta respuesta no se incrementó más al aumentar el tiempo de incubación con ALA, a pesar de que la cantidad de porfirinas sintetizadas a las 72 horas es mayor. Estos resultados sugieren que la cantidad de porfirinas no es el factor limitante en las células en reposo, sino que la razón para esta falta de correlación podría deberse al bajo estado metabólico celular, como es la disminución en la producción de radicales libres.

Las células en reposo se recuperaron del efecto de una irradiación sub-letal 24 horas después de la TFD. Esto es probablemente debido al daño provocado por la TFD con bajas cantidades de fotosensibilizante acumulado en estas células inactivadas, lo cual resultó en una disminución subsecuente de la actividad deshidrogenasa, ya que esta

enzima es la que se evalúa en el ensayo de MTT. Entonces la viabilidad probablemente disminuye debido a la baja capacidad replicativa de los linfocitos inactivados.

Weiss y col. (2003) investigaron el impacto del tratamiento con ALA en cultivo de hepatocitos humanos, encontrado que el agregado exógeno de SOD fue capaz de reducir el daño celular. En nuestro caso la luz roja y no el tratamiento con ALA induce una disminución en las actividades SOD y CAT. Esto puede influir en el descenso de viabilidad observado en linfocitos expuestos a la luz sin previa fotosensibilización con ALA (figura IV.5). Esta disminución en la actividad pudo inducir daños asociados con el nivel incrementado de ROS en estado estacionario, siendo ésta una característica general del estrés oxidativo.

El ALA solo también disminuyó la actividad CAT tanto en linfocitos en reposo como en linfocitos activados. En cambio, el ALA-TFD indujo un aumento en la actividad CAT comparado con la disminución en la actividad producida en células tratadas sólo con luz o ALA, por lo tanto la TFD parece recuperar la disminución en la actividad CAT ocurrida luego del tratamiento con luz. Existen varios reportes de la acción protectora de esta enzima agregada en forma exógena, contra los radicales libres inducidos por ALA (Hiraku y col., 1996; Princ y col., 1998) y contra el daño producido en el ADN (Yusof y col., 1999). Sin embargo también hay estudios *in vivo* que indican que la administración crónica de ALA produce una marcada disminución en la actividad CAT y SOD (Tomas-Zapico y col., 2002). En cambio en plantas tratadas con ALA la actividad de la CAT aumenta marcadamente (Nishihara y col., 2003); en tanto que mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, deficientes en ALA-S y con baja expresión de mensajero de CAT, crecidas en presencia de ALA mostraban 10 veces más mensajero que los controles (Richter y col., 1980).

La única enzima inducida por sobre los valores normales fue la GPX en las células activadas sobrevivientes a la TFD, pero no en linfocitos en reposo. Esta enzima antioxidante pudo haber contribuido a la eliminación de los hidroperóxidos durante el tratamiento de TFD. Este incremento de la actividad enzimática afectó los niveles de glutatión, tal como se refleja en la marcada disminución de la relación GSH / GSSG. Sin embargo, en linfocitos activados y en reposo, la luz roja indujo una leve disminución en esta relación lo cual no se correlaciona con ningún cambio en la GPX, probablemente debido a una posible disminución en la actividad de GSH reductasa.

La enzima CAT cataliza la eliminación del agua oxigenada, y compite con la GPX por un sustrato común. Hay evidencias de que bajo condiciones fisiológicas la enzima

GPX tiene un rol más importante que la CAT, y sólo a altas concentraciones de agua oxigenada se torna más importante su descomposición mediante la actividad CAT, y esta puede ser la razón por la cual sólo se vio una respuesta antioxidante de la GPX.

El hecho de que la respuesta antioxidante se observe sólo en linfocitos activados era de esperar, ya que los linfocitos en reposo son relativamente resistentes al ALA TFD (Rittnhouse-Diakun y col., 1995; Hryhorenko y col., 1999).

El análisis de la respuesta antioxidante en nuestro sistema es complicado por el hecho de que el ALA pueda actuar como pro-oxidante conduciendo a una respuesta antioxidante por parte de la célula (Demasi y col., 1997), por otro lado la PPIX sintetizada a partir de ALA puede inhibir la peroxidación lipídica en la oscuridad (Williams y col., 1999).

Una dosis única de TFD indujo una respuesta antioxidante adaptativa en linfocitos activados dentro de las 19 horas post irradiación, reflejado en el incremento neto de la actividad GPX y en una leve reversión en la disminución de la actividad CAT por el tratamiento con luz. No se puede descartar la posibilidad de inducir una respuesta antioxidante fuerte concomitante con la resistencia a los tratamientos sucesivos.

La respuesta al estrés mediado por TFD es indicativo de cambios moleculares y celulares, por lo tanto puede ser utilizado como una medida de efectividad de la terapia. Sin embargo, el estrés sub-letal esta implicado en otras modificaciones como la inducción de enzimas antioxidantes y cambios en los niveles de glutatión intracelular. Sólo las células activadas fueron capaces de desarrollar una respuesta antioxidante adaptativa a la TFD, como consecuencia de su sensibilidad al tratamiento. Esto es importante ya que las enzimas antioxidantes pueden modular la resistencia al daño inducido por el estrés oxidativo inducido por la TFD (Michiels y col., 1994), y dosis sub-letales podrían inducir este fenotipo resistente.

## **V. Aplicación de ALA y He-ALA en forma tópica en tumor M2 implantado en ratones en forma subcutánea.**

Dado el amplio uso de la TFD actualmente para tratar lesiones superficiales y con el objetivo de incrementar la eficacia de la TFD se comparó la síntesis de porfirinas a partir de ALA y He-ALA aplicados en forma tópica en distintas formulaciones, en ratones BALB/c portadores del tumor M2. Se usaron formulaciones en crema y loción adicionadas o no con etanol y DMSO, las cuales se topicaron sobre la zona tumoral durante 5 minutos como se detalla en Materiales y Métodos.

### **V.1. Síntesis de porfirinas en función de la dosis de ALA o He-ALA.**

Los niveles de porfirinas en función de la dosis luego de la aplicación tópica de ALA o He-ALA en tumor, piel normal y piel peritumoral, se muestran en la figura V.1 A-C. En el tumor, luego de la aplicación de ALA en crema o loción, la acumulación de porfirinas fue aumentando con la cantidad de ALA aplicada, alcanzando un plateau a 5 y 15 mg respectivamente. El valor de porfirinas más alto se encontró con 15 mg de ALA en loción con un pico de  $1,75 \pm 0,45$   $\mu\text{g}$  porfirinas/g tejido. En general, ALA en loción produjo valores 3 veces más altos que el ALA en crema.

Cuando se usó He-ALA en crema o loción, los niveles de porfirinas no aumentaron en forma significativa sobre los niveles basales.

El agregado de 10 % de DMSO al ALA en loción incrementó la producción de porfirinas formadas a partir de los 15 mg ALA, aunque los valores no fueron significativamente más altos que la loción. Cuando se emplearon 20 mg ALA en loción o en loción con DMSO, se obtuvieron  $1,75 \pm 0,25$  y  $2,5 \pm 0,5$   $\mu\text{g}$  porfirinas/g tumor respectivamente. En cambio el agregado de DMSO al He-ALA en loción no aumentó la cantidad de porfirinas sintetizadas.

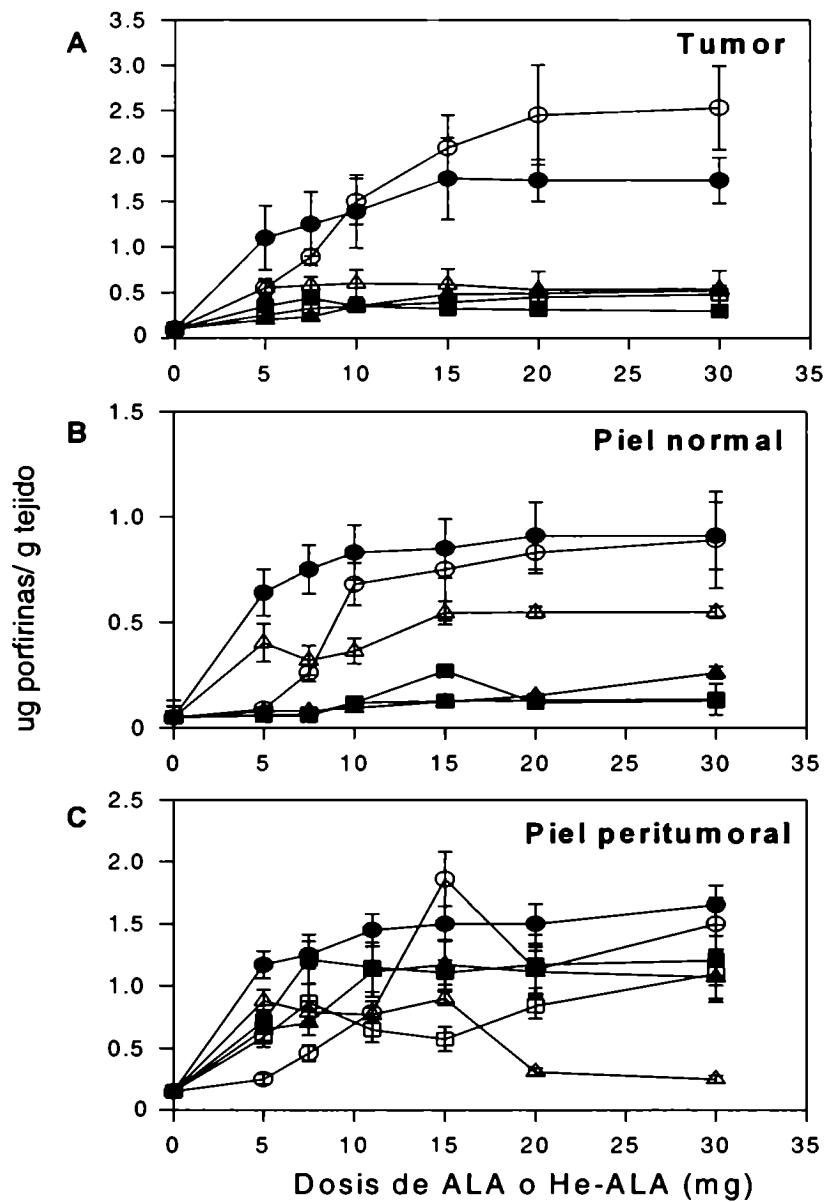
En la piel normal, el ALA en loción indujo la máxima síntesis de porfirinas, alcanzando un plateau de  $0,83 \pm 0,13$   $\mu\text{g}$  / g tejido con 10 mg de ALA. El agregado de DMSO solamente igualó los valores obtenidos con la loción en el rango de 10 a 30 mg ALA. Nuevamente los valores de porfirinas inducidos por el He-ALA en crema o loción no superaron los valores basales.

En la piel peritumoral se alcanzó un plateau entre los 5 y los 7,5 mg tanto para el ALA como para el He-ALA, y la cantidad de porfirinas acumuladas fueron similares para ambos compuestos independientemente del vehículo utilizado. El empleo de ALA en crema en dosis mayores a 15 mg indujo una cantidad de porfirinas significativamente menor comparado con los valores alcanzados en el plateau ( $0,29 \pm 0,04$ ,  $P < 0,05$ ). El agregado de DMSO al ALA en loción mostró un pico a los 15 mg ALA ( $1,8 \pm 0,4$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g tejido), pero el resto de los valores fueron similares a los obtenidos con ALA en loción sola. El agregado de DMSO a He-ALA en loción no aumentó la síntesis de porfirinas sino que por el contrario la redujo.

La figura V.2 A-C muestra la acumulación de porfirinas en función de la dosis de ALA o He-ALA, en hígado, riñón y bazo. En hígado, se obtuvieron picos agudos con 10 mg de ALA en crema y loción más DMSO ( $6,2 \pm 0,85$  y  $4,1 \pm 0,25$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g tejido respectivamente). Luego de la topicación de He-ALA y ALA en loción, se observó un leve aumento en la acumulación de porfirinas pero los valores obtenidos no fueron significativamente diferentes al los valores control.

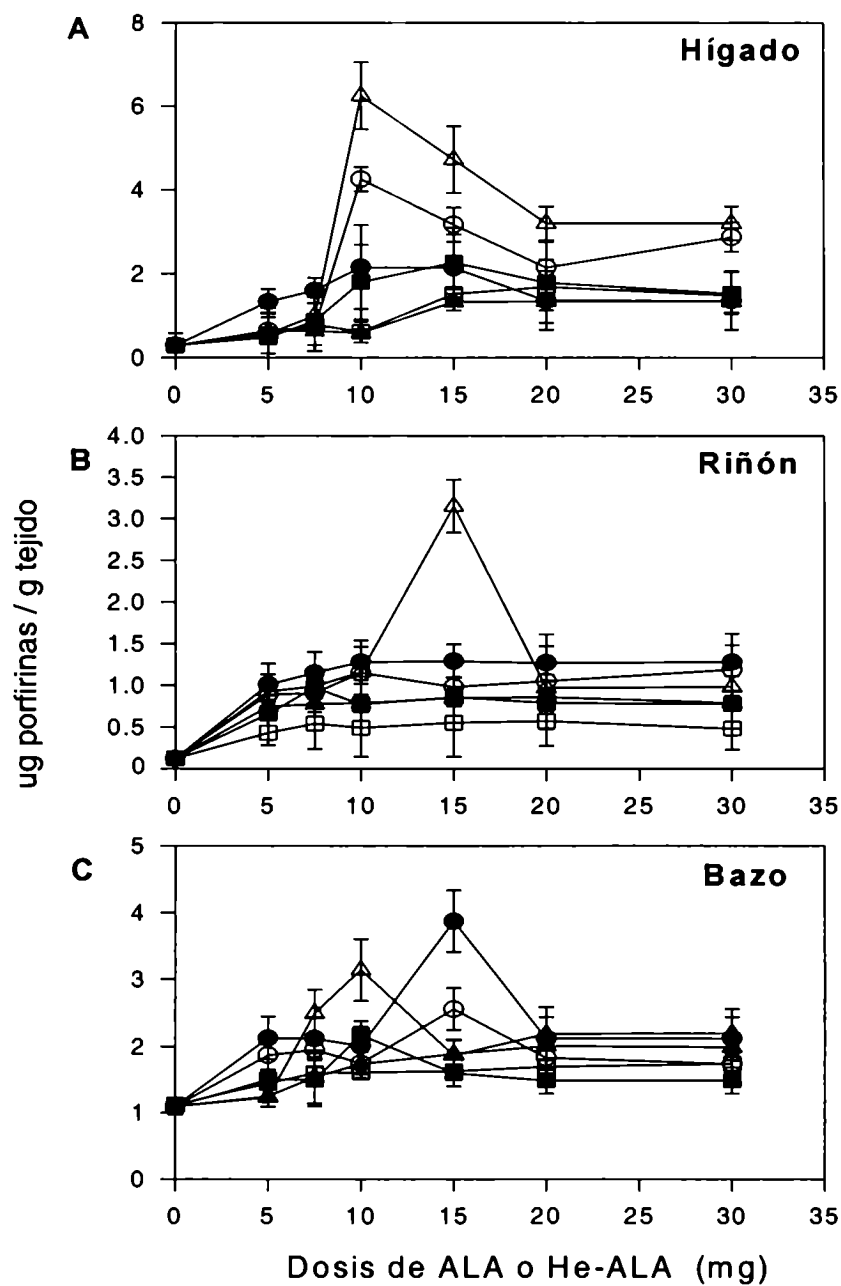
En riñón la acumulación máxima de porfirinas se alcanzó con 15 mg de ALA en crema ( $3,2 \pm 0,3$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g tejido). Luego de la aplicación de ALA en loción o loción más DMSO, los valores de porfirinas doblaron los valores control. El tratamiento con He-ALA no incrementó significativamente la cantidad de porfirinas por sobre los valores controles en todo el rango estudiado, independientemente del vehículo.

En el bazo, los niveles de porfirinas más altos se acumularon luego de la aplicación de 10 mg ALA en crema y 15 mg ALA en loción ( $3,2 \pm 0,5$  y  $3,9 \pm 0,5$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g tejido respectivamente). Nuevamente los valores de porfirinas obtenidos a partir de He-ALA fueron levemente mayores que el control pero sin cambios significativos en todo el rango utilizado. El agregado de DMSO a las formulaciones de ALA o He-ALA no aumentó la formación de porfirinas.



**Figura V.1:** Acumulación de porfirinas luego de la aplicación tópica sobre tumor y piel normal de varias concentraciones de ALA o He-ALA.

Diferentes cantidades de ALA crema ( $\Delta$ ), ALA loción ( $\bullet$ ), ALA loción/DMSO ( $\circ$ ), He-ALA crema ( $\blacktriangle$ ), He-ALA loción ( $\blacksquare$ ), He-ALA loción/DMSO ( $\square$ ) se aplicaron sobre el tumor. Tres horas después se extrajo, el tumor (A), la piel normal (B), la piel peritumoral (C) y se determinaron las porfirinas como se detalla en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.



**Figura V.2:** Acumulación de porfirinas luego de la aplicación tópica sobre tumor y piel normal de varias concentraciones de ALA o He-ALA.

Diferentes cantidades de ALA crema (Δ), ALA loción (●), ALA loción/DMSO (○), He-ALA crema (▲), He-ALA loción (■), He-ALA loción/DMSO (□) se aplicaron sobre el tumor. Tres horas después se extrajeron, el hígado (A), el riñón (B) y el bazo (C) y determinaron las porfirinas como se detalla en materiales y métodos. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.



En las tablas V.1 y V.2 se muestra el patrón de acumulación de porfirinas en pulmón, corazón, oreja, intestino, vejiga y cerebro, luego de la aplicación tópica de ALA en crema o loción respectivamente. Usando ambas formulaciones el corazón y el intestino mostraron un marcado incremento en los niveles de porfirinas. Además de estos tejidos, la oreja y la vejiga, mostraron un aumento de porfirinas en forma dosis dependiente luego de la aplicación de ALA en loción.

Por otro lado, el He-ALA aplicado en crema incrementó los niveles basales de porfirinas en forma dosis dependiente en corazón (control  $0,29 \pm 0,03$  vs 30 mg He-ALA  $0,57 \pm 0,05$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g tejido  $P < 0,05$ ) y vejiga (control  $0,36 \pm 0,03$  vs 30 mg He-ALA  $0,83 \pm 0,08$   $\mu\text{g}$  porfirinas / g tejido  $P < 0,05$ ), mientras que en los otros tejidos permanecieron dentro de los valores normales del control. En cuanto al He-ALA en loción, no indujo cambios significativos en los niveles de porfirinas en ninguno de los tejidos estudiados. (datos no mostrados)

***Tabla V.1: Distribución de las porfirinas en los tejidos luego de la aplicación de diferentes cantidades de ALA en crema.***

	Pulmón	Corazón	Oreja	Intestino	Vejiga	Cerebro
Control	$0,49 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,01$
7,5 mg ALA	$0,53 \pm 0,07$	$0,65 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,03$	$1,53 \pm 0,23$	$0,51 \pm 0,07$	$0,11 \pm 0,05$
15 mg ALA	$0,60 \pm 0,09$	$1,89 \pm 0,21$	$0,21 \pm 0,05$	$1,79 \pm 0,23$	$0,63 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,01$
20 mg ALA	$0,43 \pm 0,06$	$2,53 \pm 0,15$	$0,11 \pm 0,05$	$1,83 \pm 0,26$	$0,58 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,02$
30 mg ALA	$0,50 \pm 0,07$	$2,83 \pm 0,41$	$0,20 \pm 0,05$	$2,15 \pm 0,31$	$0,40 \pm 0,06$	$0,17 \pm 0,02$

*Se aplicaron distintas concentraciones de ALA en crema sobre el tumor en forma tópica. Tres horas después los animales se sacrificaron y se determinaron las porfirinas en los tejidos fluorométricamente. Los valores se expresan en  $\mu\text{g}$  porfirinas / g tejido.*

**Tabla V.2: Distribución de las porfirinas en los tejidos luego de la aplicación de diferentes cantidades de ALA en loción.**

	Pulmón	Corazón	Oreja	Intestino	Vejiga	Cerebro
Control	0,49 ± 0,08	0,29 ± 0,03	0,15 ± 0,05	0,37 ± 0,07	0,36 ± 0,03	0,11 ± 0,05
7,5 mg ALA	0,28 ± 0,05	1,43 ± 0,03	0,58 ± 0,06	1,19 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,15 ± 0,02
15 mg ALA	0,39 ± 0,05	1,53 ± 0,21	0,82 ± 0,07	1,41 ± 0,12	0,53 ± 0,07	0,17 ± 0,03
20 mg ALA	0,45 ± 0,03	1,91 ± 0,41	1,24 ± 0,10	1,43 ± 0,11	0,93 ± 0,06	0,15 ± 0,03
30 mg ALA	0,52 ± 0,04	2,13 ± 0,33	1,45 ± 0,34	1,97 ± 0,25	0,88 ± 0,09	0,20 ± 0,04

*Se aplicaron distintas concentraciones de ALA en loción sobre el tumor en forma tópica. Tres horas después los animales se sacrificaron y se determinaron las porfirinas en los tejidos fluorométricamente. Los valores se expresan en µg porfirinas / g tejido.*

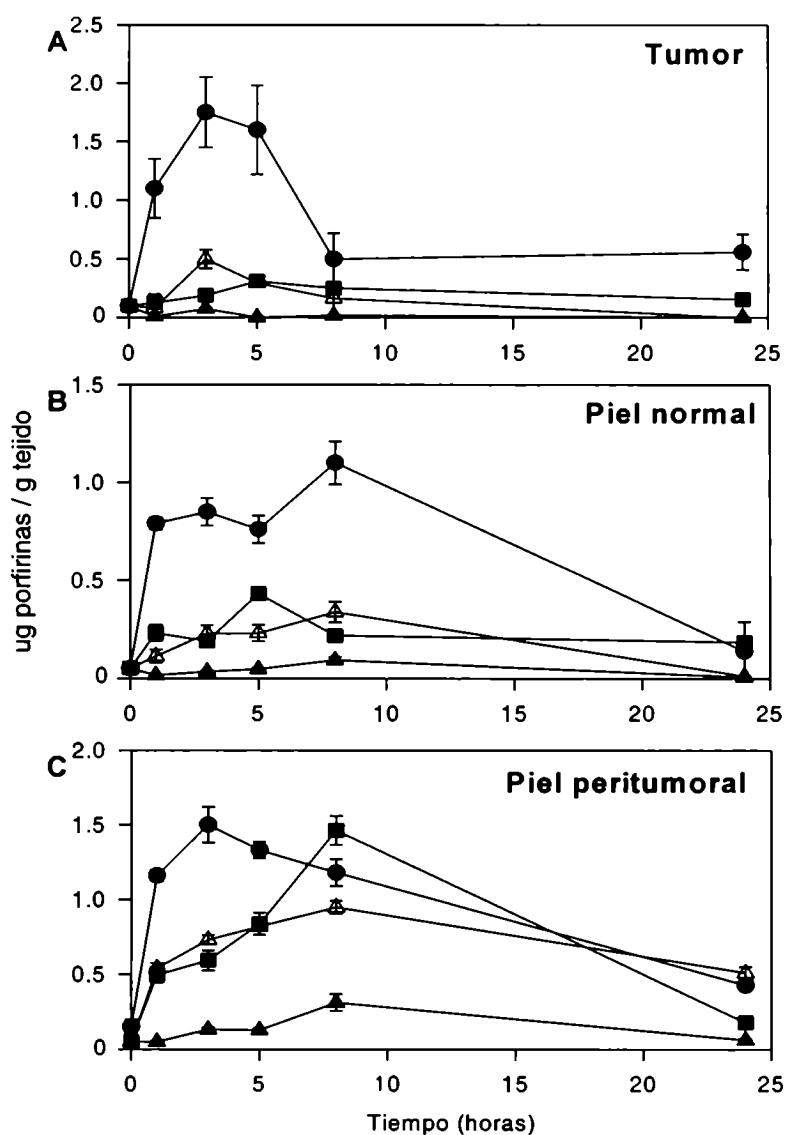
## **V.2. Síntesis de porfirinas en función del tiempo.**

En la figura V.3 A-C se muestra la acumulación de porfirinas en función del tiempo luego de la administración de ALA o He-ALA en crema o loción en tumor, piel normal y piel peritumoral. La máxima acumulación en tumor se encontró a las 3 horas luego de la aplicación de ALA. He-ALA en loción indujo un leve pero significativo aumento a las 5 horas, en cambio el He-ALA en crema no indujo síntesis de porfirinas.

En piel normal ambas preparaciones de ALA indujeron un pico de porfirinas a las 8 horas. Mientras que con He-ALA en loción se indujo un pico bien definido a las 5 horas, nuevamente la formulación en crema no produjo cambios significativos.

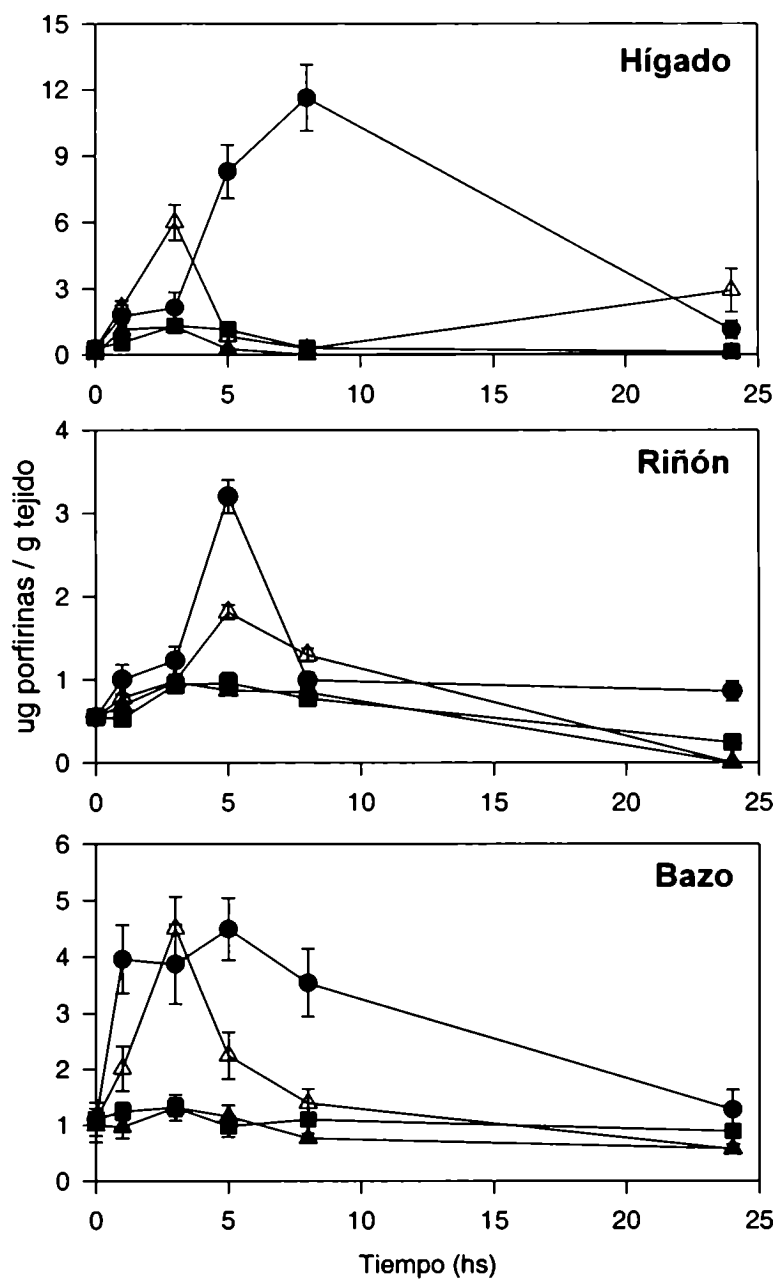
La piel peritumoral mostró un máximo a las 3 horas luego de la aplicación de ALA en loción, mientras que el ALA en crema y las dos formulaciones de He-ALA indujeron picos a las 8 horas. En este tejido los valores obtenidos con He-ALA en loción fueron tan altos como los obtenidos con ALA en loción.

En la figura V.4 A-C se grafican las curvas para hígado, riñón y bazo. En los tres tejidos ambas formulaciones de ALA produjeron picos a distintos tiempos, en cambio las formulaciones de He-ALA no indujeron cambios significativos en la síntesis de porfirinas.



**Figura V.3:** Acumulación de porfirinas inducidas por la aplicación tópica de ALA o He-ALA en función del tiempo.

A distintos tiempos luego de la aplicación sobre el tumor de 10 mg de ALA crema ( $\Delta$ ), 15 mg de ALA loción ( $\bullet$ ), 15 mg de He-ALA crema ( $\blacktriangle$ ) y 15 mg de He-ALA loción ( $\blacksquare$ ) se extrajeron los tejidos y las porfirinas como se detalla en materiales y métodos. Tumor (A), piel normal (B), piel peritumoral (C). Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.



**Figura V.4:** Acumulación de porfirinas inducidas por la aplicación tópica de ALA o He-ALA en función del tiempo.

A distintos tiempos luego de la aplicación sobre el tumor de 10 mg de ALA crema ( $\Delta$ ), 15 mg de ALA loción ( $\bullet$ ), 15 mg de He-ALA crema ( $\blacktriangle$ ) y 15 mg de He-ALA loción ( $\blacksquare$ ) se extrajeron los tejidos y las porfirinas como se detalla en materiales y métodos. Hígado (A), riñón (B), bazo (C). Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.

### V.3. Discusión

A partir de estos resultados podemos decir que el He-ALA induce la síntesis de porfirinas en la piel peritumoral pero no alcanza al tejido tumoral tan eficientemente. Sólo 5 horas después de la aplicación del He-ALA en loción, los niveles de porfirinas tumorales sobrepasaron los valores del control. Las porfirinas formadas a partir de He-ALA fueron mayores que el control en la piel normal distante, pero no fue así en el tejido tumoral. La concentración de porfirinas en los órganos internos permaneció dentro de los valores basales cuando se empleó He-ALA.

Más aún, en la piel peritumoral, aunque el He-ALA en loción indujo una síntesis de porfirinas igual a la inducida por el ALA en loción, la cantidad del éster necesario es 1,5 veces mayor que la de ALA. En cuanto al He-ALA administrado en crema, éste indujo una síntesis de porfirinas sustancialmente menor que en loción, reforzando la importancia del vehículo para la TFD cuando el compuesto se aplica en forma tópica.

Moan y col. (2001) estudiaron la formación de PPIX luego de la aplicación tópica de ALA, ALA metil éster, y He-ALA en piel normal y peritumoral de un adenocarcinoma subcutáneo de colon humano. Por medio de la señal de fluorescencia de la piel peritumoral *in vivo*, encontraron que el ALA induce los mismos niveles de PPIX comparados con el He-ALA aplicado en la formulación de crema al 20 % en piel peritumoral, pero en la piel distante normal no se detectaba fluorescencia.

Es posible que la capacidad de los ésteres para inducir la acumulación de PPIX en los distintos tejidos dependa de factores tales como el tipo de tumor, el estado metabólico, la localización, y del tipo de éster aplicado (Tunstall y col., 2002).

En nuestro trabajo hemos encontrado que los niveles de porfirinas inducidos en la piel peritumoral por el He-ALA son iguales a aquéllos obtenidos a partir de ALA y por medio de la extracción química de porfirinas hemos demostrado que el He-ALA no induce una acumulación significativa de fotosensibilizante en el tumor subcutáneo.

En concordancia con nuestros resultados, Van den Akker y col. (2000 b) demostraron que el estrato córneo era la principal barrera para la penetración del He-ALA. Estos autores encontraron que el éster no inducía una producción mayor de PPIX en piel normal de ratón comparado con el ALA. Empleando una formulación en crema y "tape-stripping" para eliminar el estrato córneo de la piel, demostraron que ésta era la capa limitante en la producción de PPIX.

Este grupo también demostró, utilizando ratones sin pelo, que el ALA pentil éster producía una cantidad de porfirinas levemente mayor que el ALA en lesiones cutáneas precancerosas inducidas por UVB, mientras que en la piel normal, los niveles de porfirinas eran iguales a partir de ambos compuestos. Encontraron además mayores niveles de PPIX en el estrato córneo de la piel lesionada, pero no en las capas displásicas de la epidermis, mostrando que este éster difunde pobremente en comparación con el ALA. Las lesiones consistían en queratosis actínica y seborreica, y en carcinoma de células escamosas.

En la piel peritumoral los picos de He-ALA se demoraron en comparación con el ALA en loción, y esto puede deberse ya sea al paso adicional de clivaje de la cadena de alcohol por la esterasa, o por la dificultad para atravesar el estrato córneo. El hecho de que la síntesis de porfirinas inducida a partir de ALA en crema también se demorara, favorece la última hipótesis. Aplicando compuestos que aumentan la penetración de las drogas, tales como el DMSO que influye directamente sobre la región acuosa entre la cabeza lipídica polar de los grupos de la bicapa, alterando la capacidad de solubilización de este sitio, promoviendo la partición en la piel, se espera estimular la síntesis de porfirinas. Sin embargo el intento de aumentar la síntesis de porfirinas en tumor a partir de He-ALA mediante el agregado de DMSO falló, por el contrario, los valores obtenidos fueron aún más bajos que el control. Sin embargo Van den Akker y col. (2000 a), encontraron que utilizando compuestos como los derivados de azacicloalcanos, la producción de porfirinas a partir del He-ALA se incrementaba. Estas diferencias se pueden atribuir a diferentes mecanismos de acción para estos compuestos.

## **VI. Topicación de ALA o He-ALA en papilomas generados químicamente.**

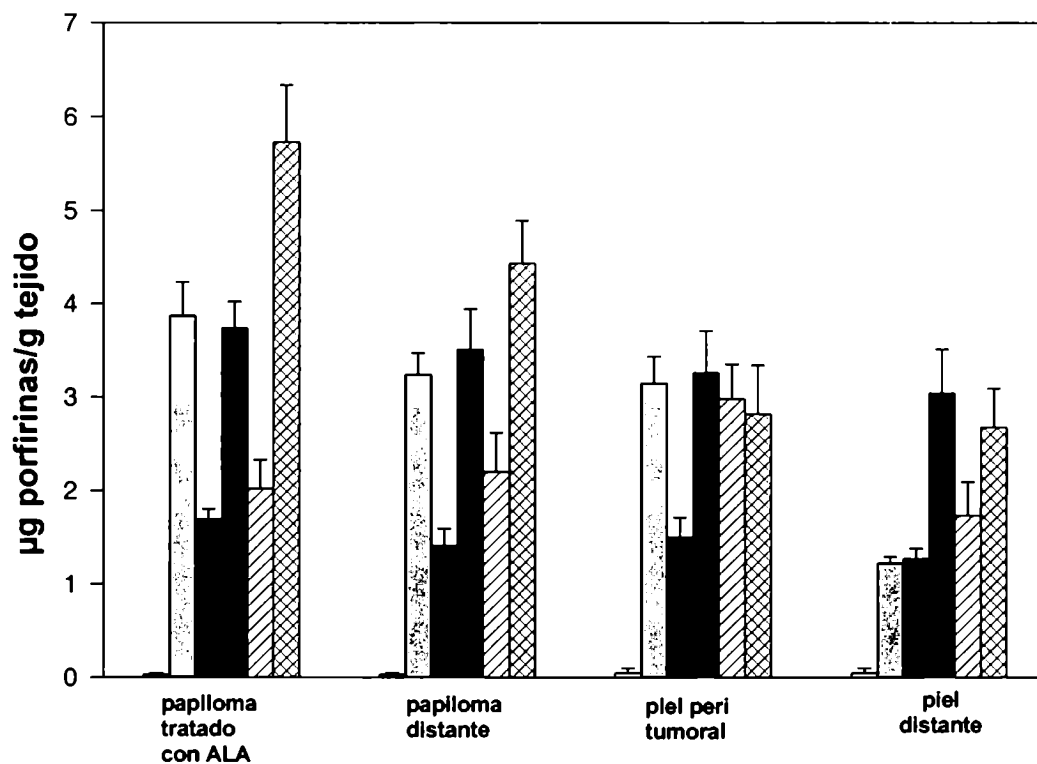
Siguiendo la línea de lesiones superficiales, se comparó la eficacia del ALA y el He-ALA aplicados en forma tópica en diferentes vehículos, utilizando como modelo animal ratones SENCAR con papilomas generados químicamente mediante la topicación con DMBA, como se detalla en materiales y métodos. En cada experiencia se topicó un único papiloma y se estudió la acumulación de porfirinas en los distintos órganos incluyendo el tumor topicado, así como los papilomas distantes no tratados.

En la figuras VI.2 y VI.2 se muestra la síntesis de porfirinas en papilomas tratados, papilomas distantes, piel peritumoral y piel normal distante, luego de la topicación de ALA o He-ALA en diferentes formulaciones. La formulación en crema fue tan eficiente como la formulación en loción para inducir la síntesis de porfirinas en papilomas tratados con ALA (figura VI.1) En el caso de la loción la acumulación de tetrapirroles aumentó significativamente con el agregado de etanol a la loción o DMSO y etanol ( $P=0,001$  y  $P=0,0007$  respectivamente), pero no con DMSO sólo. La formulación DMSO/etanol indujo 3,5 veces más acumulación de porfirinas que la loción sola.

Un patrón totalmente diferente se observó para los papilomas tratados con He-ALA (figura VI.2), donde la formulación en crema fue el mejor vehículo, induciendo 3,5 veces más porfirinas que la loción sola. Con el agregado de DMSO a la loción de He-ALA la síntesis de porfirinas aumentó 1,5 veces.

En los papilomas distantes independientemente del vehículo utilizado la cantidad de porfirinas encontrada fue igual a la de los papilomas a los que se les había aplicado ALA, excepto por la loción con DMSO/etanol, la cual indujo una acumulación significativamente menor de porfirinas ( $P=0,03$ ). En el caso del He-ALA, la cantidad de porfirinas sintetizadas en los papilomas distantes fue la mitad de las porfirinas acumuladas en papilomas tratados con He-ALA para todos los vehículos excepto para la loción.

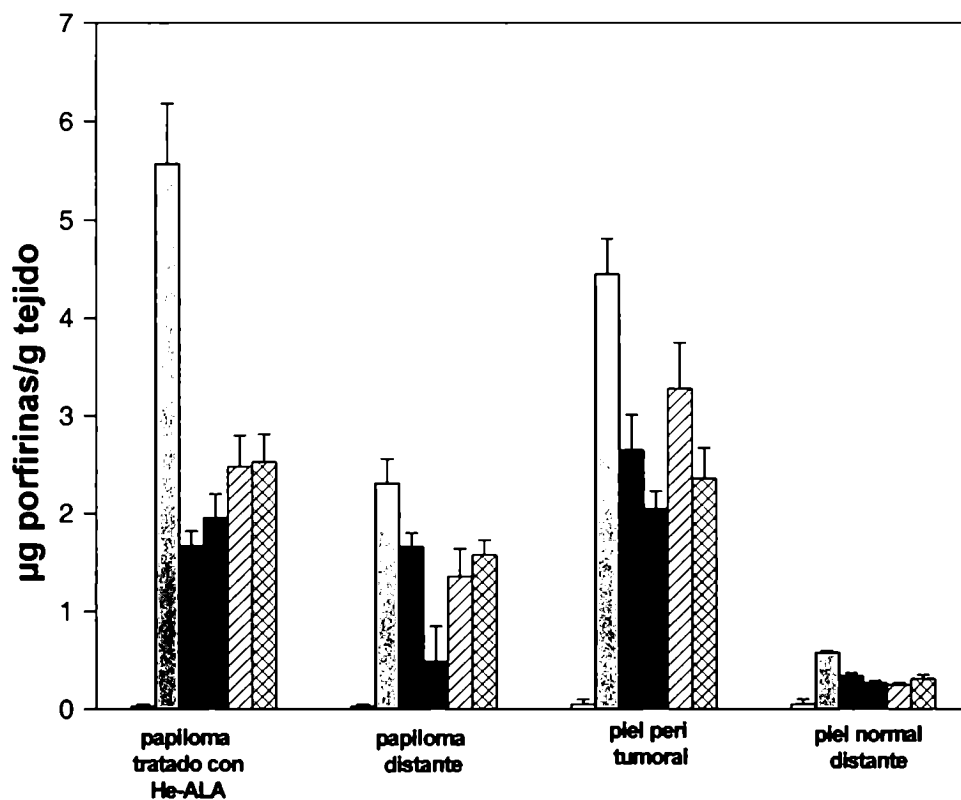
En general, la piel normal peritumoral que también se la trató con ALA o con el éster, concentró niveles de porfirinas similares a los encontrados en los papilomas tratados con ALA o He-ALA, la excepción fue la piel tratada con ALA en loción con DMSO/etanol, que acumuló la mitad de porfirinas tumorales.



**Figura VI.1:** Síntesis de porfirinas en ratones con papilomas luego de la aplicación tópica de ALA.

Se determinaron las porfirinas luego de 3 horas de aplicado el ALA en diferentes vehículos: (□) control sin tratamiento, crema (▨), loción (■), loción/ etanol (▧), loción/DMSO (▩) y loción/etanol/DMSO (▩). Las barras representan valores de porfirinas promedio de 3 experiencias independientes (media ± Desvío Estándar).





**Figura VI.2:** Síntesis de porfirinas en ratones con papilomas luego de la aplicación tópica de He-ALA.

Se determinaron las porfirinas luego de 3 horas de aplicado el He-ALA en diferentes vehículos: (□) control sin tratamiento, crema (▨), loción (■), loción/ etanol (■), loción/DMSO (▧) y loción/etanol/DMSO (▩). Las barras representan valores de porfirinas promedio de 3 experiencias independientes (media ± Desvío Estándar).

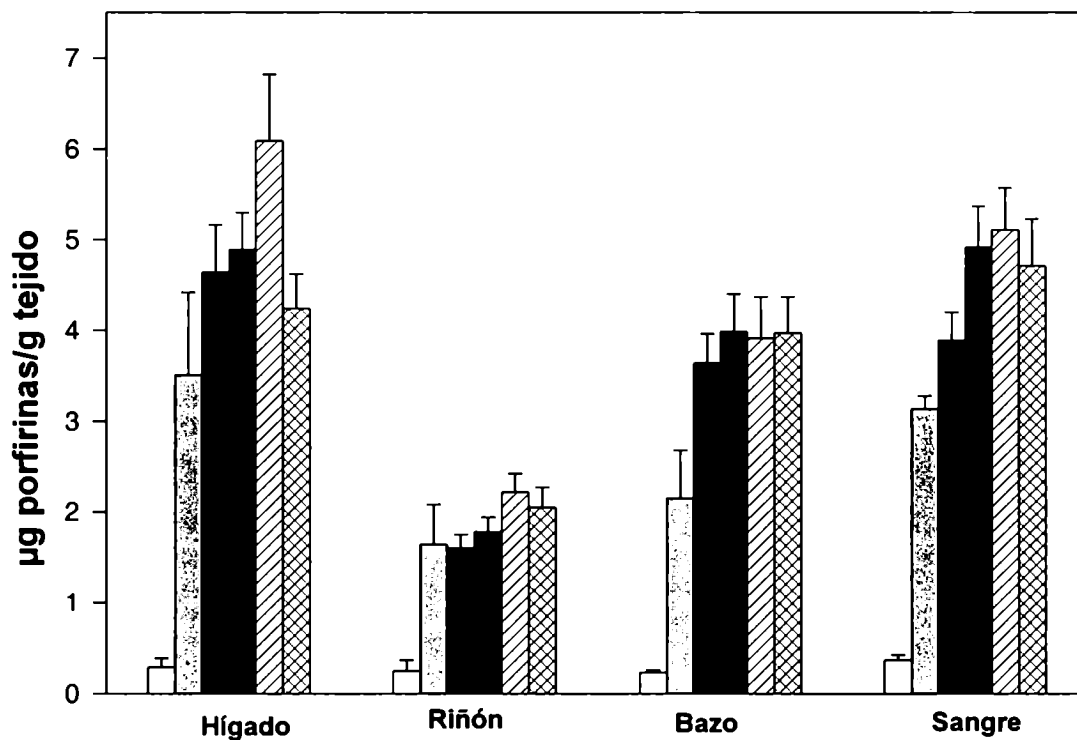
En la piel distante normal, los niveles de porfirinas fueron menores que los encontrados en los tumores tratados tanto con ALA como con He-ALA. Pero la relación papiloma tratado a piel normal distante fue diferente según el vehículo utilizado. Las formulaciones en crema, tanto para ALA como para el He-ALA, indujeron mayores relaciones. En general, con He-ALA se obtuvieron mayores diferencias en esas relaciones, las que se incrementaron marcadamente cuando se agregó etanol o DMSO a la loción. (tabla VI.1)

***Tabla VI.1: Relación de porfirinas de papilomas a piel normal distante.***

	Relación de ALA	Relación de He-ALA
Control <sup>a</sup>	0,6	0,6
Crema	3,2	9,6
loción	1,3	4,9
loción/etanol	1,2	7,2
loción/DMSO	1,1	9,9
loción/DMSO/etanol	2,1	8,1

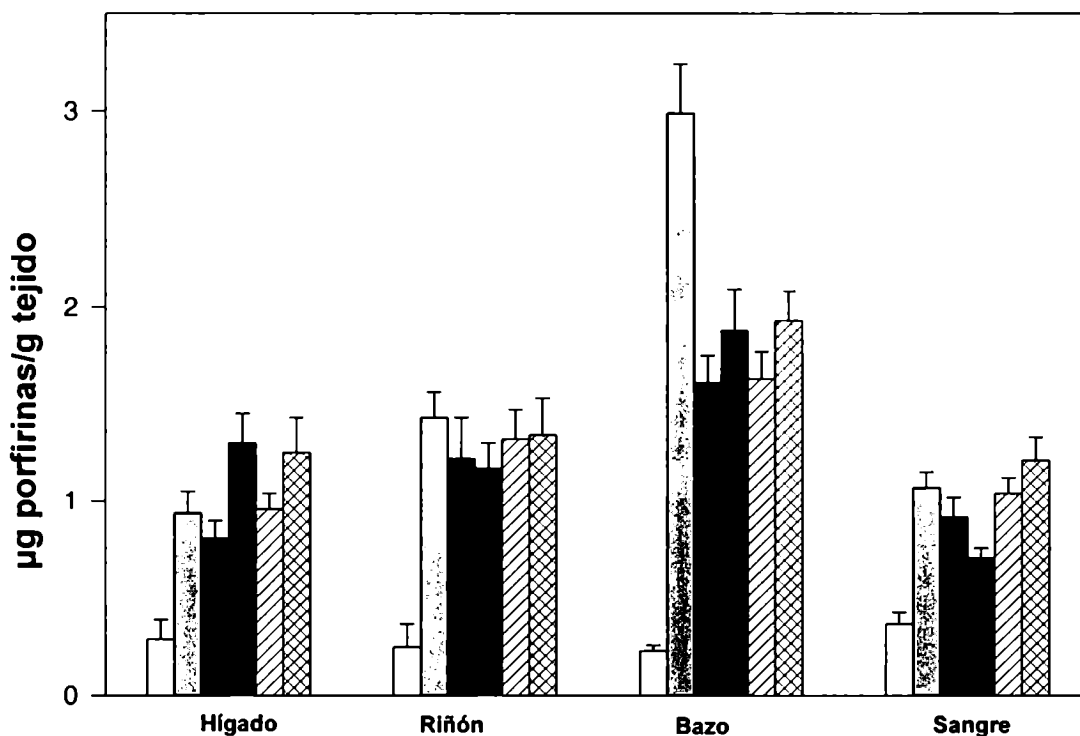
*Las porfirinas se determinaron a las 3 horas luego de la aplicación de ALA o He-ALA a un solo papiloma en diferentes vehículos. La relación papiloma / piel normal se calculó con los datos de las figuras VI.1 y VI.2.*

Las figuras VI.3 y VI.4 muestran la acumulación de porfirinas en los órganos internos luego de la topicación de los papilomas con ALA o con He-ALA respectivamente. Como patrón general para todos los vehículos, la cantidad de porfirinas acumuladas en hígado, riñón, bazo y sangre, fue mayor en los ratones tratados con ALA comparados con los ratones tratados con He-ALA, y ese incremento fue diferente en los distintos tejidos.



**Figura VI.3:** Síntesis de porfirinas en tejidos de ratones portadores de tumor luego de la aplicación de ALA tópico.

Se determinaron las porfirinas luego de 3 horas de aplicado el ALA en diferentes vehículos: (□) control sin tratamiento, crema (◻), loción (■), loción/ etanol (▨), loción/DMSO (⊠) y loción/etano/DMSO (⊞). Las barras representan valores de porfirinas promedio de 3 experiencias independientes (media ± Desvío Estándar).

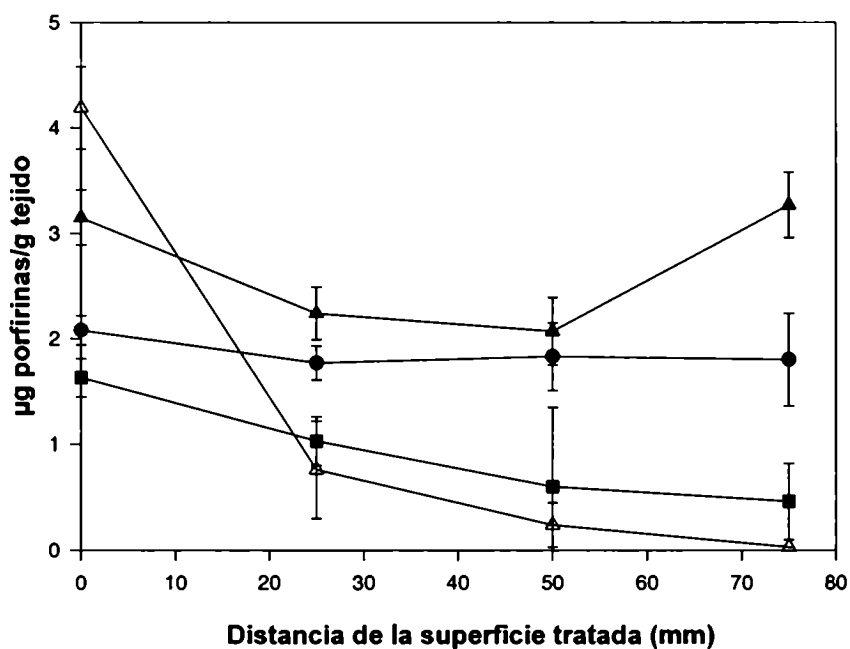


**Figura VI.4:** Síntesis de porfirinas en tejidos de ratones portadores de tumor luego de la aplicación de He-ALA tópico.

Se determinaron las porfirinas luego de 3 horas de aplicado el ALA en diferentes vehículos: (□) control sin tratamiento, crema (▨), loción (■), loción/ etanol (■), loción/DMSO (▧) y loción/etanol/DMSO (▧). Las barras representan valores de porfirinas promedio de 3 experiencias independientes (media ± Desvío Estándar).

En la figura VI.5 se muestran las porfirinas formadas a partir del ALA en loción en la piel normal de ratones que no tienen tumor. La síntesis de porfirinas varió según la distancia al punto de aplicación y no se observó selectividad por el sitio de aplicación. El ALA en crema produjo una síntesis de porfirinas más confinada a la zona de aplicación, aunque en la zona ventral del ratón (75 mm de distancia), la concentración de porfirinas no fue significativamente diferente a la sintetizada en la zona tratada.

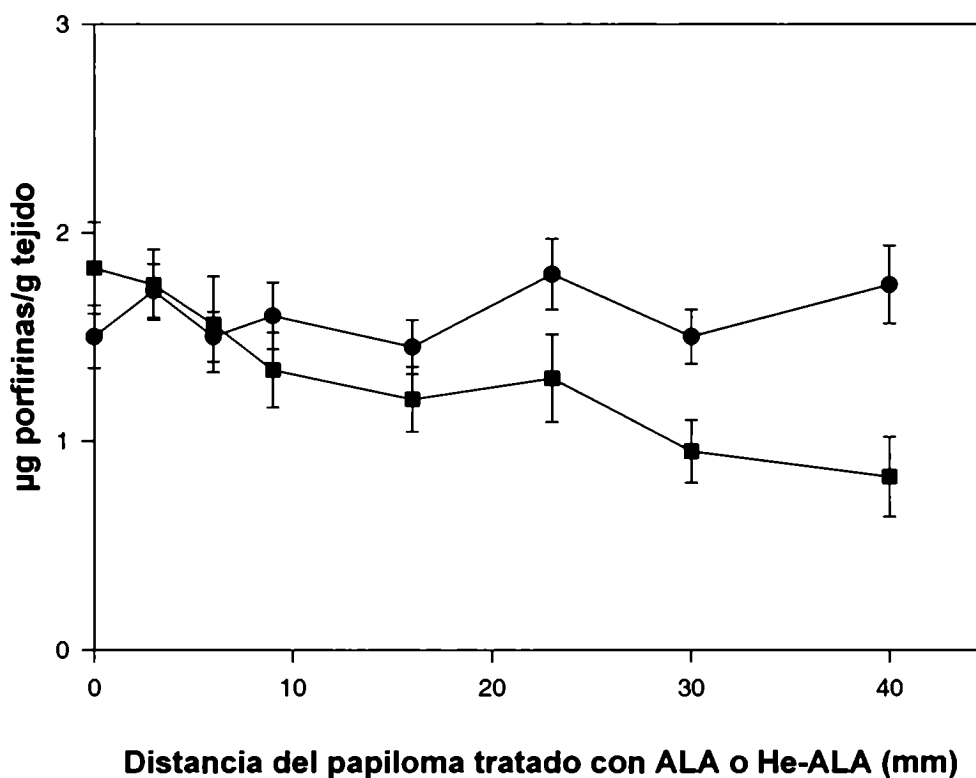
En la piel tratada con He-ALA ya sea en loción o en crema, se indujo una acumulación de porfirinas fuertemente dependiente de la distancia al sitio de aplicación, y la formulación en crema fue la que indujo una menor síntesis de porfirinas en los sitios distantes al punto de aplicación.



**Figura VI.5:** Distribución de porfirinas en piel normal distante de ratones sin tumor.

Se midieron las porfirinas 3 horas después de la aplicación tópica de ALA loción (●), He-ALA loción (■), ALA crema (▲) He-ALA crema (Δ) como se detalla en materiales y métodos, en un área de piel normal y se determinó la acumulación de porfirinas en sitios distantes, comparado con el sitio de aplicación. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error la Desviación Estándar.

En la figura VI.6 se observa que luego de la aplicación de ALA en loción a un solo papiloma, las porfirinas se distribuyeron uniformemente en los otros papilomas distantes, mientras que el He-ALA indujo una mayor concentración de porfirinas en el papiloma tratado y la acumulación de porfirinas en los papilomas distantes decrecía en función de la distancia al sitio de aplicación.



***Figura VI.6: Distribución de porfirinas en papilomas distantes.***

*Las porfirinas se midieron 3 horas luego de la aplicación tópica de ALA (●) o He-ALA (■) loción en un único papiloma de ratones portadores de papilomas como se detalla en materiales y métodos. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barra de error la Desviación Estándar.*

## VI.1. Discusión

En los papilomas inducidos químicamente se acumularon cantidades de porfirinas similares tanto con ALA como con He-ALA administrados en sus formulaciones óptimas y empleando cantidades equimolares de las pro-drogas. La formulación en loción conteniendo DMSO y etanol fue el mejor vehículo para administrar ALA en los papilomas, mientras que la crema fue la formulación más eficiente para administrar el He-ALA.

Sin embargo, el uso de crema como vehículo tanto para el ALA como para el He-ALA, indujo una mayor relación porfirinas tumorales / porfirinas de piel normal. En consecuencia, la crema debería ser el vehículo elegido para el tratamiento con He-ALA de lesiones malignas de la piel. En el caso del ALA, aunque la loción con DMSO y etanol indujo niveles de porfirinas más elevados en tumor, el uso de crema también debería recomendarse en los casos en que se necesite una mayor selectividad.

En general en los papilomas distantes la cantidad de porfirinas acumuladas a partir de ALA no varió significativamente con los valores obtenidos en los papilomas tratados con ALA, demostrando que tanto el ALA como las porfirinas sintetizadas a partir de éste se pueden distribuir a través de la vasculatura y acumularse en tumores distantes. Por otro lado, en los papilomas distantes tratados con He-ALA se obtuvo una menor síntesis de porfirinas, mostrando que el He-ALA y/o las porfirinas formadas por el precursor se encuentran más selectivamente localizadas en el sitio de aplicación.

Con respecto a los tejidos alejados del sitio de aplicación, los niveles de porfirinas en piel distante normal fueron menores que los niveles de porfirinas en papilomas distantes, mostrando que las porfirinas se acumulaban preferentemente en el tumor más que en piel normal a pesar de que tanto el ALA como el He-ALA se hubieran aplicado en zonas lejanas.

Además de la selectividad en la acumulación de porfirinas a partir de He-ALA en piel, la cantidad de tetrapirroles acumulados en órganos internos fue mucho menor en ratones tratados con He-ALA que en aquellos tratados con ALA. Incluso al compararse ALA en loción con DMSO/etanol con He-ALA en crema, el mejor vehículo para cada componente, la síntesis de porfirinas en el hígado y en la sangre fue 4 veces menor en el último, mostrando que independientemente del vehículo, el uso de He-ALA provee una clara ventaja en la acumulación selectiva de porfirinas.

Peng y col. (1996) aplicaron ALA y sus ésteres derivados (metil, etil y propil) en piel normal de ratón y detectaron la fluorescencia del tejido mediante un sistema de monitoreo óptico. No encontraron porfirinas en otras áreas que no sean en las que se les aplicó el éster en crema, mientras que en el caso del ALA, se observó una fluorescencia significativa en la piel fuera del área de aplicación. El grupo de Moan también encontró, mediante la medición de fluorescencia directa, que la aplicación tópica de ALA inducía la síntesis de porfirinas en puntos distantes de la piel (Moan y col., 2001)

En nuestro trabajo, mediante la extracción de porfirinas, los valores de fluorescencia en piel distante así como en órganos internos fue mucho menor en los ratones tratados con He-ALA que para los tratados con ALA, aunque en ambos casos los valores fueron muchos más elevados que los niveles basales.

El confinamiento al lugar de aplicación logrado mediante el uso de He-ALA demuestra que el ALA, y no las porfirinas, es la molécula principal más factible de ser distribuida a través del sistema sanguíneo. Moan y col. (2003) observaron que la aplicación tópica de ALA o sus ésteres era capaz de inducir la síntesis de porfirinas en los órganos internos, y dada la cinética diferencial de ambos compuestos era evidente que el ALA y los ésteres eran los que pasaban a la circulación para inducir la formación de porfirinas en órganos remotos.

Es probable que el He-ALA aplicado en forma tópica se retenga en el estrato córneo, el cual podría actuar como un reservorio (Rougier & Lotte, 1986), y difundir superficialmente conduciendo al patrón de acumulación de porfirinas en piel dependiente de la distancia del sitio de aplicación.

Al respecto, Van den Akker y col. (2000b), demostraron que el estrato córneo de la piel era la principal barrera para la penetración del He-ALA, y que inducía una menor síntesis de porfirinas que el ALA en piel normal. El mismo grupo (Van den Akker y col., 2000 a) utilizando pentil éster, observó que éste también difunde pobremente en comparación con el ALA, ya que no alcanzaba la capa displásica de la epidermis.

En nuestro trabajo, la acumulación de porfirinas en órganos internos luego de la aplicación tópica de He-ALA en papilomas, muestra que este compuesto alcanza la dermis. Aún en estos papilomas hiperqueratóticos, esta molécula difunde libremente, lo cual podría indicar que el He-ALA puede ser altamente útil tal como ya ha sido probado para el ALA metil éster (Fritsch y col., 1998) en el tratamiento de queratosis actínica y verruga vulgaris. Más aún, luego de la aplicación de He-ALA en piel normal de ratones



no portadores de tumor, también se encontró el mismo patrón de porfirinas en órganos internos.

La forma en que se aplicaron las lociones y las cremas, mediante el frotado de la superficie durante 5 minutos tanto en piel normal como en piel lesionada, podría facilitar la penetración del éster a capas más profundas. Una explicación adicional acerca del confinamiento del He-ALA, es que la conversión intracelular del éster en ALA libre en el sitio de aplicación puede prevenir el flujo del ALA hidrolizado al sistema sanguíneo para llegar a los tejidos no tumorales.

El confinamiento de porfirinas y, muy probablemente del He-ALA, implica poder evitar los efectos adversos. En el caso del uso tópico de ALA en lesiones leves, aunque la fotosensibilidad de la piel y la acumulación de porfirinas en hígado no han mostrado ser un problema clínico, el confinamiento de He-ALA al sitio de aplicación podría prevenir cualquier citotoxicidad en el tejido normal.

En base a esto, variando la composición del vehículo, es posible obtener niveles similares de porfirinas usando tanto ALA como su éster derivado, y con la ventaja adicional de que el He-ALA produce una síntesis de porfirinas confinada al lugar de aplicación tópica, más eficientemente que el ALA.

## **VII. Experiencias *in vivo* con ALA y He-ALA aplicados en distintas vías y distintos vehículos.**

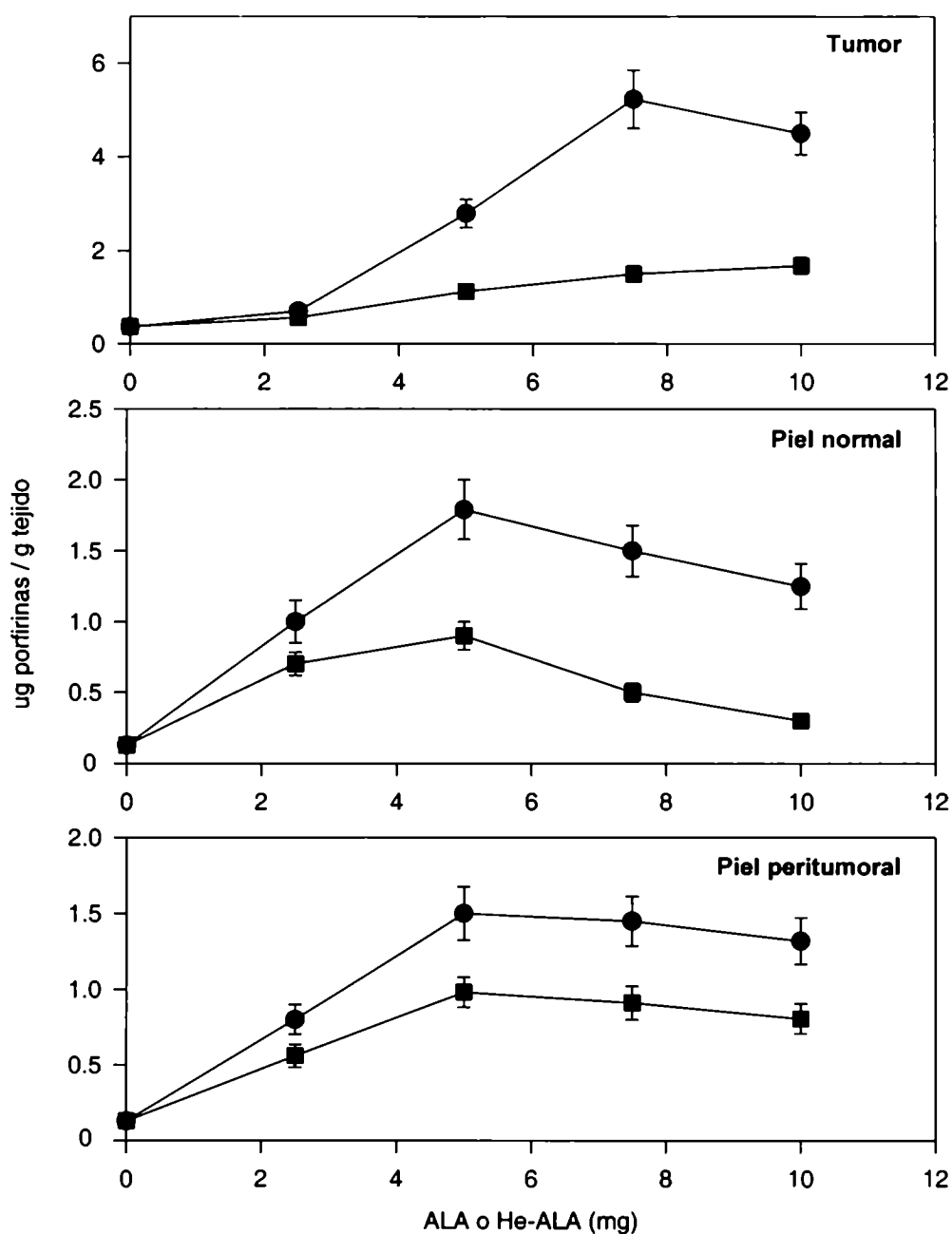
### **VII.1. Acumulación de porfirinas en diferentes tejidos luego de la administración i.p. de ALA o He-ALA en ratones portadores de tumor M2.**

Se emplearon ratones BALB/C inoculados con el adenocarcinoma mamario murino M2 en forma subcutánea, y se comparó la síntesis de porfirinas a partir de ALA y He-ALA inyectados por vía i.p.. A tal fin se analizó la acumulación de porfirinas en distintos tejidos en función de la dosis y del tiempo.

La figura VII.1 muestra la síntesis de porfirinas en tumor, piel normal y piel peritumoral luego de la administración i.p. de dosis crecientes de ALA o He-ALA.

En todos los tejidos, el ALA produjo una mayor acumulación de porfirinas que el He-ALA. En el tejido tumoral la administración de 7,5 mg de ALA indujeron un plateau de  $5,23 \pm 0,62$   $\mu\text{g}$  de porfirinas por gramo de tejido, mientras que el He-ALA sólo produjo un leve incremento dosis dependiente en la síntesis de porfirinas, alcanzando una acumulación máxima de  $1,68 \pm 0,18$   $\mu\text{g}$  de porfirinas por gramo de tejido a los 10 mg. Dosis mayores de He-ALA fueron letales para los animales, mientras que las dosis mayores a 30 mg de ALA produjeron una disminución en la síntesis de porfirinas y, a esta dosis, los ratones revelaron una trombosis peritoneal en la autopsia.

En la piel normal tanto el He-ALA como el ALA produjeron una máxima acumulación de porfirinas a una concentración de 5 mg. En piel peritumoral se observó un patrón similar para ambos compuestos, produciéndose el plateau también a los 5 mg, obteniendo valores de porfirinas similares a los de la piel normal.

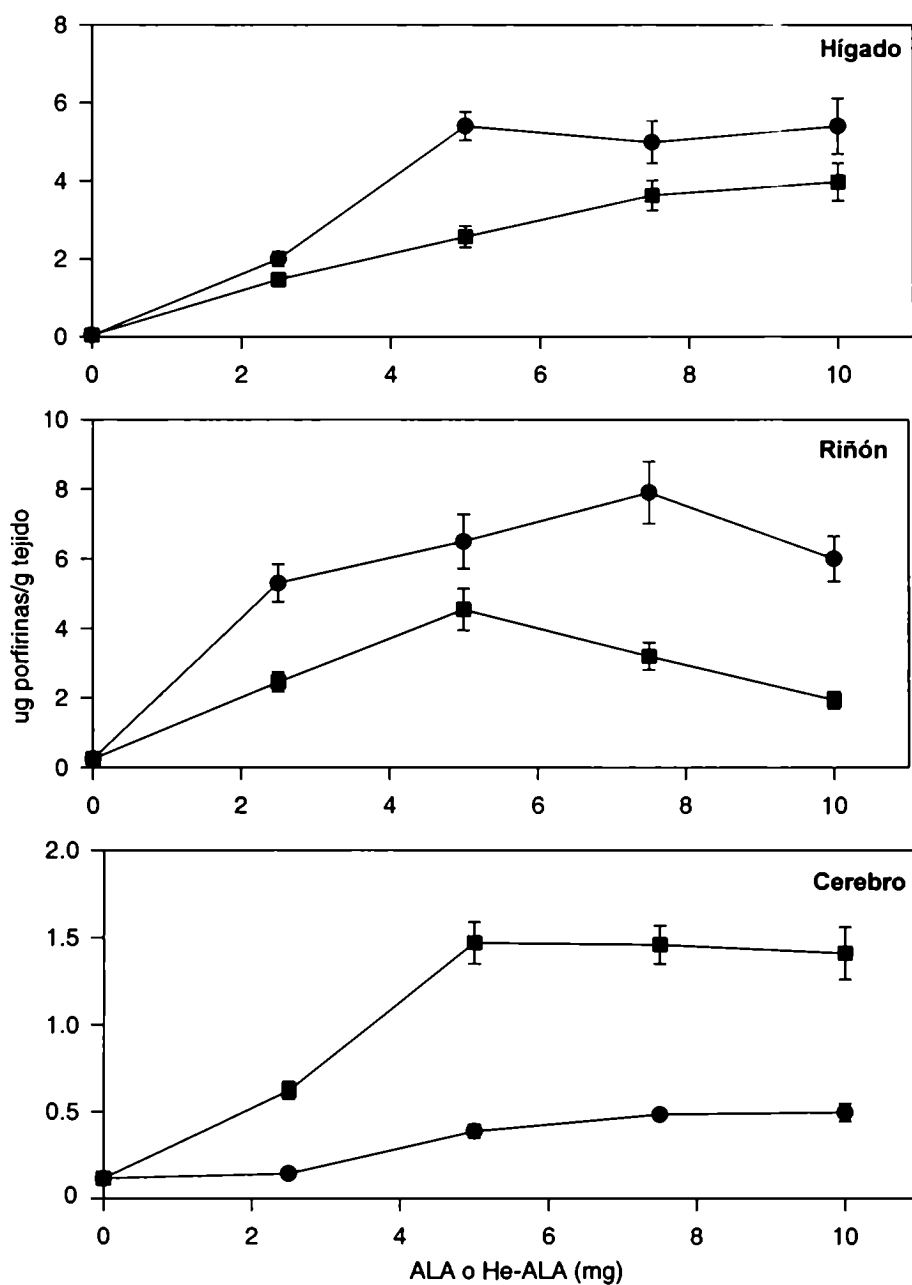


**Figura VII.1:** *Acumulación de porfirinas en tumor, piel normal y piel peritumoral.*

*Luego de 3 horas de la administración i.p. de dosis crecientes de ALA (●) o He-ALA (■), se extrajeron los tejidos y se obtuvieron las porfirinas como se detalla en materiales y métodos. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.*

En la figura VII.2 se grafica la síntesis de porfirinas en hígado, riñón y cerebro luego de la administración i.p. de diferentes dosis de ALA o He-ALA. En el hígado se encontró un plateau con 5 mg de ALA, mientras que con He-ALA se observó un incremento de porfirinas dosis dependiente, alcanzando el máximo a 10 mg. En riñón se obtuvo una cantidad máxima de porfirinas con 7,5 mg de ALA mientras que el He-ALA sólo produjo un leve pico a los 5 mg.

El cerebro fue el único tejido en el que el He-ALA indujo mayor síntesis de porfirinas que el ALA. Con 5 mg de He-ALA se produjo un plateau de  $1,47 \pm 0,12 \mu\text{g}$  de porfirinas por gramo de tejido, produciendo una síntesis 50 veces mayor que la obtenida en forma basal. Mientras que el ALA, apenas alcanzó un plateau de  $0,48 \pm 0,02 \mu\text{g}$  porfirinas / g tejido, cantidad 15 veces mayor al nivel basal.



**Figura VII. 2:** Acumulación de porfirinas en hígado, riñón y cerebro.

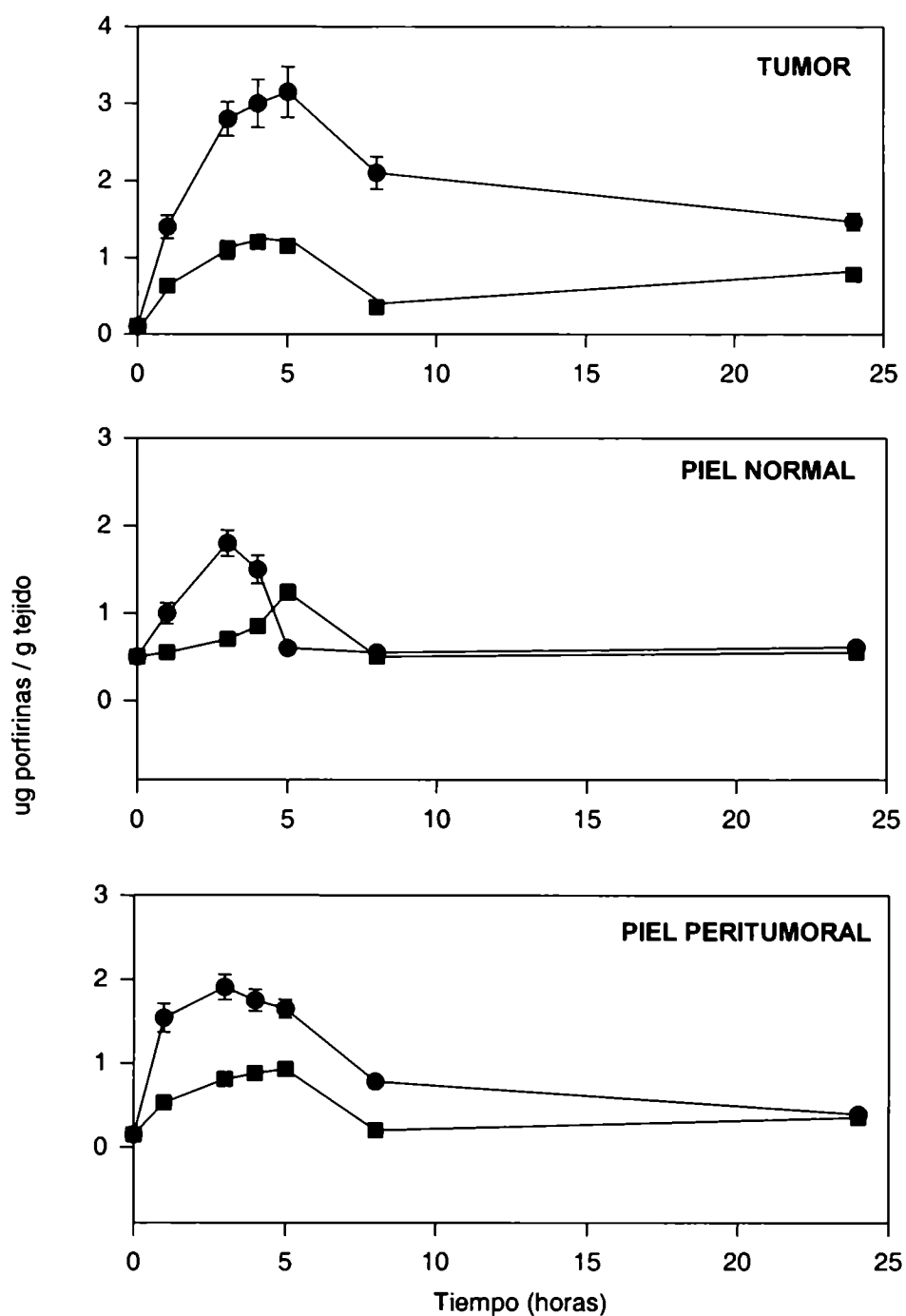
Luego de 3 horas de la administración i.p. de dosis crecientes de ALA (●) o He-ALA (■), se extrajeron los tejidos y se obtuvieron las porfirinas como se detalla en materiales y métodos. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.

La figura VII.3 muestra la acumulación de porfirinas en tumor, piel normal y piel peritumoral en función del tiempo, luego de la administración i.p. de 5 mg de ALA o He-ALA. Para estos tejidos, independientemente del tiempo, la acumulación de porfirinas fue mayor con ALA. En tumor y piel peritumoral tanto el ALA como el He-ALA indujeron un máximo en la síntesis de porfirinas entre las 3 y las 5 horas. En la piel normal el ALA indujo un pico a las 3 horas mientras que el He-ALA lo produjo a las 5 horas.

La figura VII.4 muestra las síntesis de porfirinas en hígado, riñón y cerebro, a partir de ALA o He-ALA administrados vía i.p. En hígado el ALA indujo un pico a las 3 horas, mientras que el He-ALA observa un hombro entre las 3 y las 8 horas. Luego la síntesis de porfirinas disminuyó hasta alcanzar los valores basales a las 24 horas de la administración de ambos compuestos. En riñón el He-ALA indujo un máximo a las 3 horas y el ALA un pico más amplio entre la hora y las 4 horas.

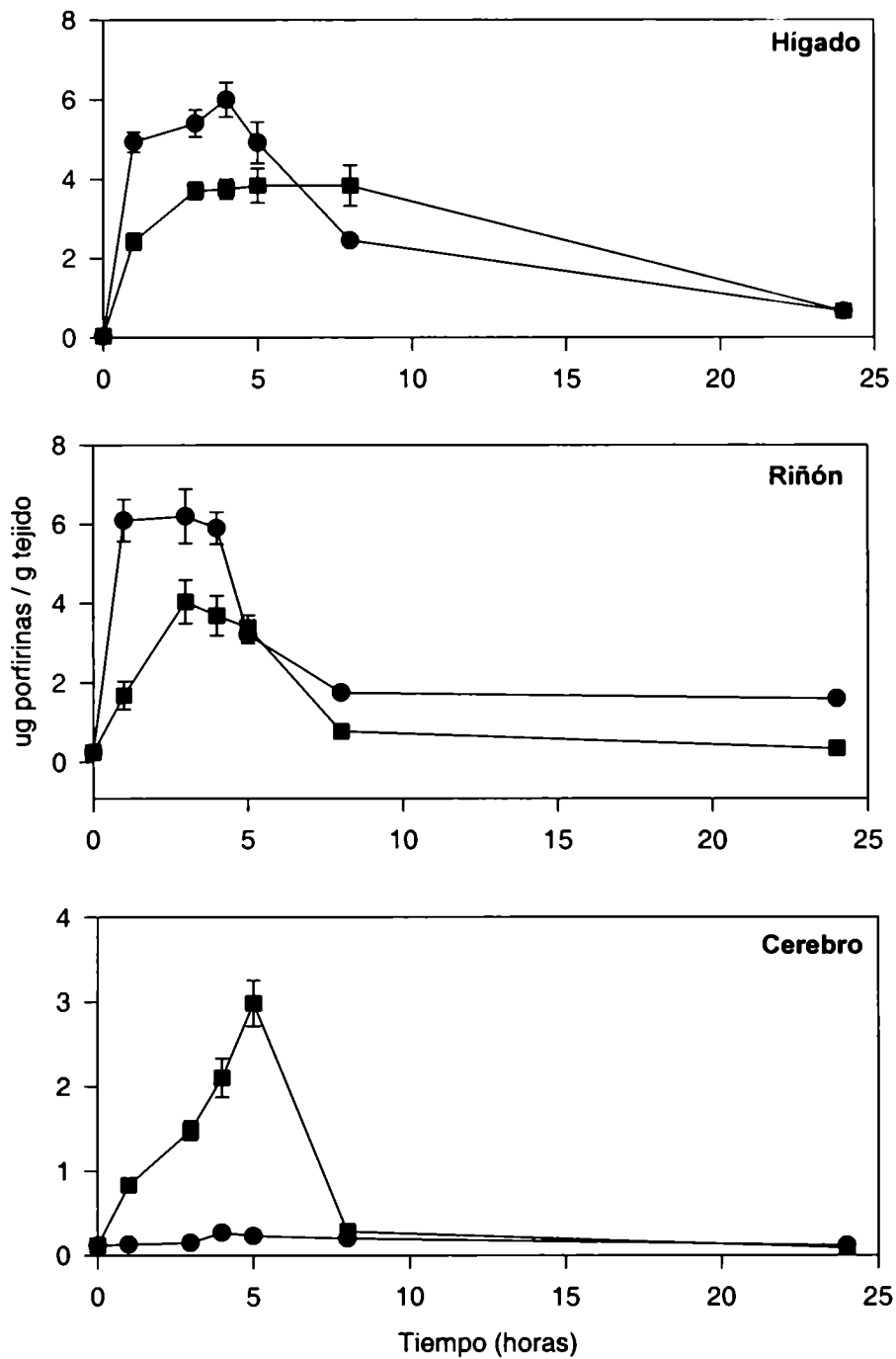
En cerebro el He-ALA produjo una máxima síntesis de porfirinas de  $2,98 \pm 0,27$   $\mu\text{g}$  por gramo de tejido a las 5 horas, mientras que el ALA indujo un máximo de  $0,27 \pm 0,03$   $\mu\text{g}$  de tejido a las 4 horas. En ambos casos los valores retornaron a los valores basales luego de las 24 horas de administradas las drogas.

El corazón, el pulmón, el intestino, el bazo, la vejiga y la oreja en general sintetizaron una cantidad de porfirinas dos veces mayor a partir de ALA comparada con He-ALA. (datos no mostrados)



**Figura VII.3:** Acumulación de porfirinas a distintos tiempos en tumor, piel normal y piel peritumoral

Luego de la administración i.p. de 5 mg de ALA (●) o He-ALA (■), se extrajeron los tejidos a distintos tiempos y se obtuvieron las porfirinas como se detalla en materiales y métodos. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.



**Figura VII.4:** Acumulación de porfirinas a distintos tiempos en hígado, riñón y cerebro.

Luego de la administración i.p. de 5 mg de ALA (●) o He-ALA (■), se extrajeron los tejidos a distintos tiempos y se obtuvieron las porfirinas como se detalla en materiales y métodos. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Las barras de error muestran la Desviación Estándar.



## VII.2. Síntesis de porfirinas a partir de ALA y He-ALA, en cultivos de explantes de órganos como medida de la actividad esterasa.

Para determinar si las diferencias en la acumulación de porfirinas entre los distintos tejidos se debían a la entrada y/o distribución de ALA o He-ALA, o a una diferencia en la actividad de las esterasas, se emplearon cultivos de los distintos órganos expuestos a ALA o He-ALA. (tabla VII.1).

La cantidad de porfirinas sintetizadas a partir de de explantes de tumor M2, hígado, riñón, piel normal, piel peritumoral, bazo, pulmón, corazón, intestino, cerebro y vejiga incubados con He-ALA fueron similares a la obtenida a partir de ALA y entre 10-15 veces mayor a los valores basales.

***Tabla VII.1: Síntesis de porfirinas en explantes incubados con ALA o He-ALA***

Tejido	Control	ALA	He-ALA
Tumor	0,33 ± 0,02	5,17 ± 0,26	5,83 ± 0,38
Hígado	0,24 ± 0,10	3,91 ± 0,45	2,89 ± 0,31
Bazo	1,69 ± 0,13	8,76 ± 0,55	9,21 ± 0,82
Riñón	0,35 ± 0,05	7,16 ± 0,74	5,89 ± 0,42
Piel peritumoral	0,39 ± 0,05	2,78 ± 0,33	2,64 ± 0,24
Piel normal	0,07 ± 0,09	1,76 ± 0,22	1,99 ± 0,15
Pulmón	0,28 ± 0,04	1,62 ± 0,14	2,02 ± 0,19
Intestino	0,78 ± 0,06	7,51 ± 0,35	8,04 ± 0,45
Vejiga	0,11 ± 0,03	2,71 ± 0,31	2,60 ± 0,17
Cerebro	0,08 ± 0,03	1,44 ± 0,20	1,28 ± 0,26
Corazón	0,31 ± 0,05	5,68 ± 0,66	4,73 ± 0,31

*Los explantes se incubaron 3 horas con ALA o He-ALA 0,6 mM. Las porfirinas se extrajeron y se determinaron según se describe en materiales y métodos. El control corresponde a los niveles basales de porfirinas del tejido. Los valores representan el promedio de tres determinaciones independientes ± el Desvío Estándar y se expresan en µg porfirinas / g tejido.*

### VII.3. Comparación en la síntesis de porfirinas luego de la administración de ALA o He-ALA en ratones portadores de tumor M2.

Con el fin de mejorar la eficiencia de la TFD se comparó la síntesis de porfirinas a partir de ALA y He-ALA en función de la vía de administración i.p. e i.v.. El perfil de porfirinas acumuladas en los órganos principales como tumor, piel normal, piel peritumoral, hígado, riñón, cerebro y bazo, así como en corazón, pulmón, intestino, vejiga y oreja mostró que no hay diferencias significativas entre ambas vías de administración para la mayoría de los tejidos, independientemente de la droga utilizada (datos no mostrados)

### VII.4. Acumulación de ALA y He-ALA en cerebro luego de la administración i.p. de ambas drogas.

Debido a la alta acumulación de porfirinas encontradas en cerebro a partir de He-ALA administrado por vía sistémica, y la alta toxicidad de este compuesto, resultó interesante estudiar que ocurría con la entrada del éster en el cerebro comparado con el ALA. Para esto se inyectaron ratones vía i.p. con concentraciones equimolares de ALA y He-ALA (10 y 15 mg respectivamente) y se determinaron las cantidades de ALA y/o He-ALA acumuladas en cerebro. Debido a la alta toxicidad observada para el He-ALA, los animales se sacrificaron 5 minutos luego de la inyección. Como se puede ver en la tabla VII.2, se encontró que el cerebro acumulaba 6,7 veces más He-ALA comparado con el ALA.

***Tabla VII.2: Niveles de ALA y He-ALA en cerebro.***

	nmol ALA o He-ALA/g cerebro
Control	17 ± 3
ALA	60 ± 5
He-ALA	404 ± 10

*Los ratones se inyectaron i.p. con 15 mg de He-ALA y 10 mg de ALA; 5 minutos después se sacrificaron y se determinó el contenido de ALA, He-ALA y PBG en el cerebro como se describe en materiales y métodos. Los valores de PBG fueron indetectables. El control corresponde a niveles basales de ALA en cerebro de ratones no tratados.*

## VII.5. Discusión

Encontramos que la síntesis de He-ALA era menor que la obtenida a partir de ALA en la mayoría de los tejidos, y esto no dependía de la dosis ni del tiempo luego de la administración de cualquiera de las drogas, ni tampoco del método de administración sistémica utilizado (i.v. o i.p). Tunstall y col. (2002) observaron que luego de la administración i.v. de un grupo de ésteres derivados de ALA, la síntesis de porfirinas en tumor y en otros órganos internos era muy baja comparada con los valores alcanzados por el ALA.

Por otro lado utilizando cultivo de explantes de órganos, se demostró que la síntesis de porfirinas a partir de He-ALA era igual a la obtenida a partir del ALA en todos los tejidos estudiados, indicando que las esterases eran igualmente activas en todos los órganos analizados. Esto sugiere que la distribución tanto del He-ALA como de las porfirinas formadas a partir de él es la razón por la cual la acumulación de porfirinas es menor cuando se lo compara con ALA. No está claro aún por qué los ésteres difieren en la acumulación de PPIX *in vivo* e *in vitro*. Algunos tejidos con baja cantidad de grasas fueron capaces de utilizar los ésteres de ALA, sugiriendo que la captación de los derivados esterificados por los tejidos ricos en grasas no es la razón por la cual no pueden alcanzar al tumor con efectividad (Tunstall y col., 2002). En base a esto, es probable que *in vivo*, en el pasaje del He-ALA de la circulación a los tejidos, la molécula sea retenida por las estructuras vasculares.

El único tejido que acumulaba una cantidad mayor de porfirinas a partir de He-ALA comparado con el ALA fue el cerebro. Dado que el ALA tiene una estructura de zwitterión, lo cual normalmente dificulta el pasaje de la barrera lipofílica hematoencefálica (Krogsgaard-Larsen y col., 2000), es de esperar que el uso de derivados de ALA más lipofílicos, favorezca el pasaje de éstos al cerebro.

La estructura de la barrera hemato-encefálica permitiría que moléculas lipofílicas como el He-ALA extravasen y alcancen el cerebro, mientras que el resto de los capilares retienen la molécula. El rol de la lipofilicidad es ampliamente conocido y es importante en la entrada de químicos al sistema nervioso central. Midiendo el coeficiente de partición aparente de los ésteres de ALA entre el octanol y el agua (P),

Uehlinger y col. (2000) determinaron que el valor del log de P para el He-ALA es 1,8, mientras que para el ALA el valor es de -1,5. Se ha demostrado que el compuesto más potente que actúa en el sistema nervioso central tiene un valor de log de P de  $2 \pm 0,5$  (Hansch y col., 1987).

Además de tener una alta lipofilidad, la barrera hemato-encefálica tiene un sistema de transportadores específicos y proteínas transportadoras (Gloor y col., 2001). Aunque el sistema de transporte de He-ALA en neuronas o células de la glia aún no ha sido muy estudiado, en nuestro sistema de células el ALA y el He-ALA parecen entrar a través de distintos mecanismos (Casas & Batlle 2002; Bermúdez Moretti y col., 2002). Esta podría ser la razón por la cual la llegada del He-ALA al cerebro es diferente a la de los otros tejidos.

La cantidad de ALA/He-ALA acumulada en el cerebro 5 minutos después de la inyección de He-ALA es casi 7 veces más alta que la encontrada luego de la administración de ALA. Esto se correlaciona bien con los niveles 7 veces mayor de porfirinas encontrados en cerebro a partir de He-ALA comparado con ALA.

La rápida y repentina muerte de los ratones a altas concentraciones podría deberse a la toxicidad inducida por el He-ALA o bien al rápido clivaje del éster por las esterasas de cerebro para liberar ALA y hexanol, ambos compuestos muy dañinos a altas concentraciones.

La cantidad de ALA/He-ALA que encontramos en cerebro es igual a  $0,5 \mu\text{M}$  luego de la administración de He-ALA y  $0,073 \mu\text{M}$  a partir de ALA. La cantidad de ALA presente en el líquido cefaloraquídeo de pacientes porfíricos durante un ataque agudo está entre  $0,027$  y  $21 \mu\text{M}$  (Sweeney y col., 1970; Percy & Shanley, 1979; Gorchein & Weber, 1987). Sin embargo no podemos predecir a partir de estos datos y de nuestros resultados si el He-ALA puede o no asemejar los efectos de un ataque agudo de porfiria.

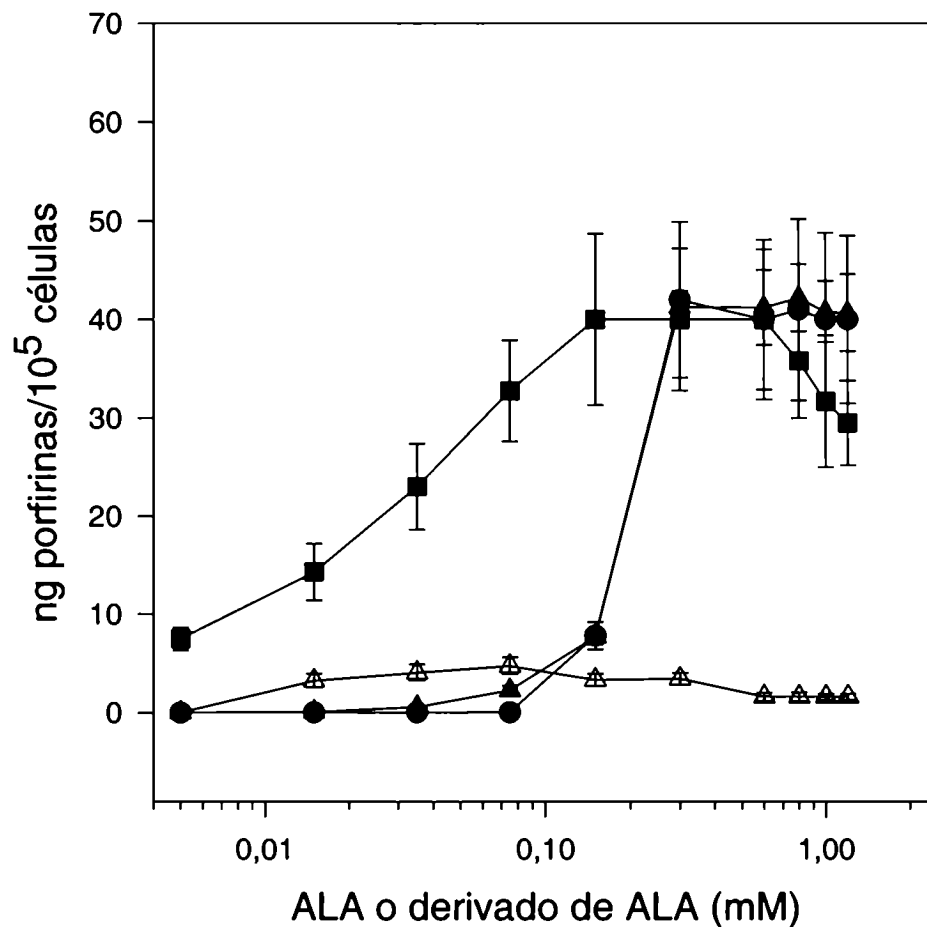
En conclusión, se propone que el uso clínico de bajas dosis de He-ALA administrado en forma sistémica, probablemente contribuiría a la detección y tratamiento de tumores de cerebro. Aunque hay que tener mucho cuidado con los posibles efectos secundarios y su posible toxicidad asociada al ALA, He-ALA o el hexanol como producto de la hidrólisis.

## **VIII. Síntesis de porfirinas y TFD a partir de ALA y sus ésteres derivados de cadena larga.**

Se empleó la línea celular LM3 para analizar la eficiencia del ALA comparada con sus ésteres derivados: THP-ALA, UND-ALA y He-ALA, en la inducción de la síntesis de porfirinas. Se estudió la misma en función de la dosis y el tiempo, así como el daño inducido por la TFD a partir de cada uno de los derivados y las distintas dosis de luz. Se analizó además la acumulación del ALA intracelular proveniente de ALA o sus derivados y el PBG generado.

### **VIII.1. Síntesis de porfirinas en función de la dosis de ALA o sus derivados.**

La figura VIII.1 muestra la síntesis de porfirinas en función de la concentración de ALA o los derivados de ALA. Encontramos diferentes puntos de saturación para los diferentes compuestos: ALA y THP-ALA 0,3 mM, He-ALA 0,15 mM y UND-ALA en 0,075 mM. La máxima síntesis de porfirinas a partir de ALA, THP-ALA y He-ALA fue alrededor de  $40 \mu\text{g}/10^5$  células, en tanto que UND-ALA sólo produjo  $4,5 \mu\text{g}/10^5$  células, aún bajo las mejores condiciones. La síntesis de porfirinas a partir de ALA y THP-ALA mostró un marcado incremento a partir de 0,1 mM, alcanzando rápidamente el plateau. Por otro lado el He-ALA y el UND-ALA aumentaron la síntesis de porfirinas en forma gradual a medida que se incrementaba su concentración.

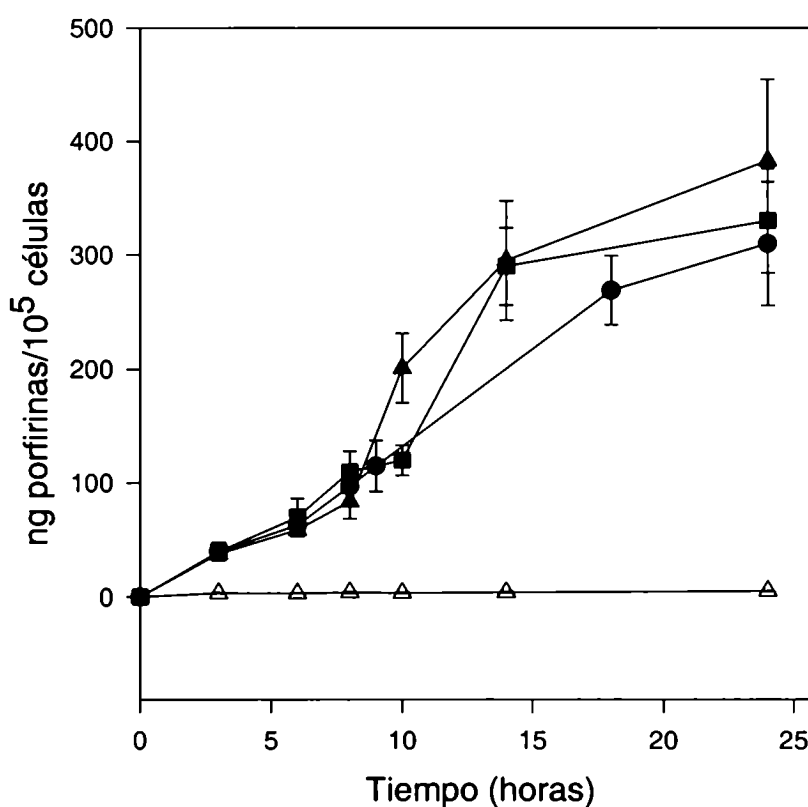


***Figura VIII.1: Síntesis de porfirinas a partir de ALA y derivados de ALA.***

*Se incubaron las células LM3 en presencia de diferentes cantidades de ALA (●), He-ALA (■), THP-ALA (▲) y UND-ALA (Δ) durante 3 horas. Se determinaron las porfirinas intracelulares fluorométricamente y se relativizaron por número de células presentes al comienzo del experimento. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error la Desviación Estándar.*

## VIII.2. Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación con ALA y sus derivados.

La figura VIII.2 muestra la síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación en presencia de ALA o sus derivados, en un período entre 3 y 24 horas. La síntesis a partir de ALA, THP-ALA y He-ALA mostró un incremento casi lineal. Con UND-ALA 0,3 mM la cantidad de porfirinas fue muy baja a todo lo largo del período de incubación.



**Figura VIII.2:** Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación en presencia de ALA o sus derivados.

Se incubaron las células durante distintos tiempos en presencia de 1,2 mM de ALA (●), He-ALA (■) y THP-ALA (▲); y 0,3 mM de UND-ALA (Δ) en placas de 24 wells. Las porfirinas intracelulares se determinaron mediante el uso de un fluorómetro y se relativizaron por el número de células presentes al comienzo del experimento. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error la Desviación Estándar.

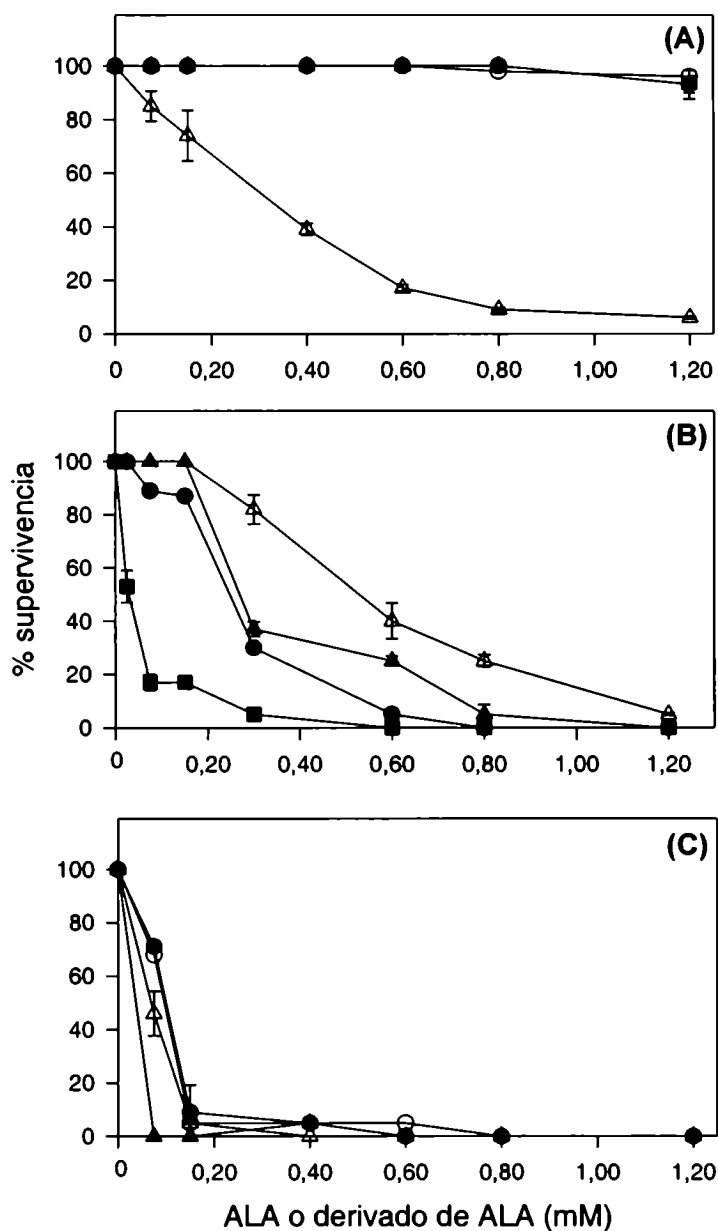
### **VIII.3. Citotoxicidad celular inducida por la TFD a partir de ALA y sus derivados.**

La figura VIII.3 muestra la toxicidad de los compuestos en la oscuridad y la toxicidad de la TFD variando las concentraciones de ALA o sus derivados. El UND-ALA fue el único compuesto intrínsecamente tóxico para las células en la oscuridad, mostrando una toxicidad del 50 % con 0,3 mM (figura VIII.3 A).

Cuando se ilumina con una dosis de  $0,25 \text{ J/cm}^2$ , el He-ALA a bajas dosis fue más efectivo que el ALA, dado que forma una mayor cantidad de porfirinas (figura VIII.3B). Mientras que el ALA y el THP tienen un comportamiento similar, observándose una toxicidad del 50 % recién a partir de 0,3 mM con la misma dosis lumínica. Utilizando una dosis mayor de luz la eficiencia de los compuestos fue similar mostrando una drástica disminución en la supervivencia celular (figura VIII.3C)

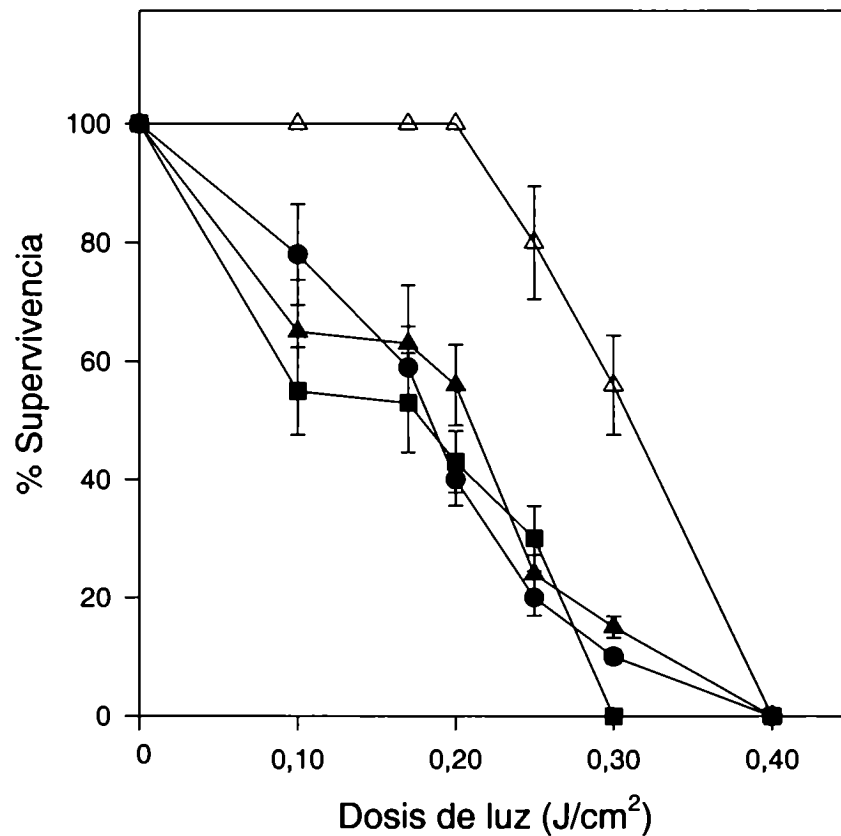
La respuesta a la TFD con ALA o sus derivados variando la dosis de luz se muestra en la figura VIII.4. Se utilizaron concentraciones de ALA y de los ésteres tales que produjeran la máxima síntesis de porfirinas. Se puede observar que al aumentar la dosis de luz, la toxicidad producida por la TFD aumenta en forma similar para ALA, THP-ALA y He-ALA, mientras que para el UND-ALA, se observa una disminución de la viabilidad de un 40 % con una concentración de 0,3 mM. Concentraciones superiores de UND-ALA condujeron a la muerte celular completa pero como ya se viera en la figura anterior, debido a la toxicidad intrínseca del derivado y no al efecto de la TFD.





**Figura VIII.3:** Toxicidad en oscuridad e inducida por la TFD a partir de ALA o derivados de ALA.

Las células se incubaron en presencia de diferentes cantidades de ALA (●), He-ALA (■), THP-ALA (▲) y UND-ALA (△) durante 3 horas en oscuridad (A) o expuestas a 0,25 (B) y 0,4 J/cm<sup>2</sup> de luz (C). El ensayo de MTT se realizó a las 19 horas. Las células sobrevivientes se expresan como el porcentaje del control no irradiado pero expuesto a ALA o los derivados. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error la Desviación Estándar.



***Figura VIII.4: TFD con ALA o derivados y su dependencia de la dosis lumínica.***

*Las células se incubaron durante 3 horas en presencia de una dosis fija de ALA (0,6 mM) (●), THP-ALA (0,6 mM) (▲) o He-ALA (0,6 mM) (■), UND-ALA (0,3 mM) (Δ) y se expusieron a dosis de luz variables. El ensayo de MTT se realizó a las 19 horas. Las células sobrevivientes se expresan como el porcentaje del control no irradiado pero expuesto a ALA o los derivados. Los datos representan el promedio de 3 experiencias independientes y las barras de error la Desviación Estándar.*

#### **VIII.4. Acumulación de ALA y PBG intracelular a partir de los distintos compuestos.**

Dada la baja eficiencia de los derivados en producir una mayor cantidad de porfirinas comparados con el ALA, se estudió qué ocurría con los ésteres una vez ingresados a las células. Para esto se determinó el contenido intracelular total de ALA y PBG provenientes del ALA o sus derivados. Se determinó además qué proporción del ALA total correspondía a ALA y a los ésteres, para ello se separaron los compuestos mediante una cromatografía en columnas de intercambio iónico descrita en Materiales y Métodos.

La tabla VIII.1 muestra la acumulación de ALA y PBG en células tratadas con ALA o los derivados de ALA. Se puede observar claramente que el ALA o el He-ALA acumulado a partir de He-ALA fue 4 veces mayor que el ALA acumulado a partir de ALA. Sin embargo los valores de PBG acumulado a partir de He-ALA no fueron mayores y tampoco lo fueron las porfirinas sintetizadas (ver figura VIII.1) debido a la baja conversión de He-ALA a ALA (sólo 20 %).

La cantidad de ALA y/o THP-ALA acumulado a partir de THP-ALA fue 2,8 veces mayor que la cantidad formada a partir de ALA pero sólo el 40% se hidrolizó a ALA; y nuevamente el contenido de PBG y porfirinas sintetizadas permanecieron sin cambios. El ALA y/o UND-ALA acumulado a partir de UND-ALA fue muy bajo y no se pudo separar por cromatografía.

**Tabla VIII.1: ALA y PBG acumulados en las células LM3.**

	pmoles ALA o ALA derivados/10 <sup>5</sup> cel. <sup>1</sup>	ALA (porcentaje de ALA + ALA derivado) <sup>2</sup>	Pmoles PBG/10 <sup>5</sup> cel.
Control	1,62 ± 0,07	N.D.	0,75 ± 0,03
ALA	13,05 ± 0,90	100 %	1,5 ± 0,11
He-ALA <sup>1</sup>	42,41 ± 6,20	20 %	1,7 ± 1,3
UND-ALA	3,15 ± 0,12	N.D.	0,8 ± 0,04
THP-ALA	36,3 ± 4,78	40 %	2,07 ± 0,46

Se determinaron el ALA y el PBG como se describió en materiales y métodos luego de 3 horas de exposición a ALA, THP-ALA y He-ALA 0,6 mM; y UND-ALA 0,3 mM. Los controles corresponden a los niveles basales de células sin tratamiento. N.D.: no detectable. <sup>1</sup> Las determinaciones de ALA corresponden a ALA + derivado de ALA intracelularmente acumulado en las células, sin distinguir entre ALA y su derivado.

<sup>2</sup> Determinado por cromatografía de intercambio iónico.

#### **VIII.5. Comparación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA y sus derivados en explantes de tumor LM3.**

Una vez determinado el contenido intracelular del ALA o sus derivados y sabiendo que ocurría la hidrólisis de los ésteres, se evaluó que proporción del “ALA” intracelular era utilizado por las células para la síntesis de porfirinas. Empleando explantes de tumor LM3, se analizó el contenido de porfirinas inducidas por cada compuesto.

La tabla VIII.2 muestra la síntesis de porfirinas en explantes de tumor LM3 a partir de ALA y derivados de ALA 0,6 mM. A partir de He-ALA y THP-ALA la síntesis de porfirinas fue similar a la producida por ALA, en cambio UND-ALA produjo una cantidad de porfirinas 5 veces menor, a penas superando los niveles basales.

***Tabla VIII.2: Síntesis de porfirinas en explantes de tumor LM3 incubados con ALA o derivados de ALA.***

	µg porfirinas/g tejido
Control	0,33 ± 0,02
ALA	5,17 ± 0,26
He-ALA	5,83 ± 0,38
UND-ALA	1,18 ± 0,07
THP-ALA	5,53 ± 0,27

*Los explantes de tumor se incubaron durante 3 horas con ALA, THP-ALA y He-ALA 0,6 mM; y UND-ALA 0,3 mM. Las porfirinas se extrajeron y se determinaron como se describió en materiales y métodos. Los controles corresponden a los niveles basales de porfirinas en el tejido.*

#### **VIII.6. Síntesis de porfirinas *in vivo*, luego de la aplicación sistémica de ALA o sus derivados en ratones portadores de tumor LM3.**

Dado que la síntesis de porfirinas en los explantes a partir del ALA y de los derivados era semejante, lo cual indicaba que los ésteres entraban al tumor y además que la actividad de las esterasas era similar para todos los derivados en este tejido, evaluamos la respuesta *in vivo* del ALA y sus ésteres en el tumor LM3 luego de ser administrados vía i.p.

La tabla VIII.3 muestra la síntesis de porfirinas y la acumulación de ALA o sus derivados en tumor LM3 luego de la administración sistémica de concentraciones equimolares de ALA o sus derivados en ratones inoculados con las células tumorales LM3. Bajo estas condiciones el ALA fue el mejor inductor de la síntesis de porfirinas, seguido por el THP-ALA, el He-ALA y por último el UND-ALA. El ALA llegó al tumor en mucha mayor cantidad que los derivados a los 10 minutos de ser administrados vía i.p. sin embargo a las 3 horas se encontró la misma cantidad de ALA retenido en este tejido tanto a partir de ALA como de sus derivados.

**Tabla VIII.3: Síntesis de porfirinas y contenido de ALA en tumor LM3 a partir de ALA o derivados de ALA luego de la administración sistémica a los ratones.**

	nmol ALA o derivado de ALA /g tejido a 10 min.	nmol ALA o derivado de ALA /g tejido a 3 h	nmol porfirinas/g tejido at 3 h
Control	12,5 ± 0,9	12,5 ± 0,9	0,36 ± 0,05
ALA	170,2 ± 8,4	15,11 ± 5,1	15,9 ± 1,12
He-ALA	56,3 ± 10,3	12,9 ± 1,5	3,11 ± 0,42
UND-ALA	28,2 ± 3,1	11,2 ± 3,4	2,64 ± 0,23
THP-ALA	37,0 ± 5,2	17,8 ± 2,8	8,83 ± 0,95

Se administraron vía i.p. concentraciones equimolares de ALA o sus derivados (3,3 mg ALA, 5 mg He-ALA, 5,2 mg THP-ALA y 6,3 mg UND-ALA) a ratones portadores de tumor LM3. luego de 10 minutos se determinó el contenido de ALA y luego de 3 horas se cuantificaron el ALA y las porfirinas en el tumor. Los niveles de PBG a los 10 minutos y a las 3 horas fueron indetectables.

### VIII.7 Discusión.

La síntesis de porfirinas a partir de He-ALA *in vitro* aumenta linealmente desde el comienzo de la curva de concentración. En cambio el ALA y el THP-ALA indujeron la síntesis de porfirinas a partir de 0,1 mM. Esto sugiere que el mecanismo de entrada a la célula es diferente para ambos compuestos comparado con el He-ALA. Mientras que la entrada de ALA y THP-ALA parecen necesitar de una concentración umbral, la entrada de He-ALA se da aún en concentraciones muy bajas.

Se ha demostrado que la entrada de ALA en la línea celular LM3 ocurre tanto por difusión como por transporte activo, este ultimo mediado probablemente por miembros de la familia de transportadores GAT (Bermudez Moretti y col., 2002). También se ha demostrado que la entrada de ALA a las células renales y de intestino tiene lugar mediante un transporte activo relativamente lento (Döring y col., 1998 a y b)

Gederaas y col. (2001) encontraron evidencias de que el ALA y al menos algunos ésteres entraban en las células por diferentes rutas. Nuestros resultados sugieren que el

He-ALA se incorpora a la célula por un sistema de transporte diferente al del ALA y del THP-ALA. Krieg y col. (2003) estudiaron la cinética de formación de porfirinas luego de exponer líneas celulares de colon humano y fibroblastos a He-ALA y Benzil-ALA. A partir de estos ésteres se detectaba la formación de porfirinas mucho antes que a partir del ALA, apoyando la hipótesis de que la difusión pasiva del He-ALA ocurre mucho más rápido que el transporte activo de la molécula de ALA vía  $\beta$ -transportadores. En forma similar, estudios cinéticos llevados a cabo por Whitaker y col. (2000) postulan que el Pentil-ALA se incorpora a las células de pancreotoma a una velocidad mucho mayor que la del ALA, lo cual indica que las esterases no están limitando la síntesis de porfirinas y que el éster debe translocarse mediante una rápida difusión.

Es decir entonces que, dependiendo del tipo de pro-droga, estarían involucrados diferentes sistemas de transporte para alcanzar el umbral de ALA requerido para inducir la síntesis de porfirinas.

Kloek y col., (1998) han observado que los ésteres de ALA de cadena larga tienden a permanecer en la membrana celular, y por lo tanto inducir una menor síntesis de PPIX. Nosotros encontramos que en las células, el UND-ALA a bajas concentraciones (hasta 0,1 mM) conducía a una mayor síntesis de porfirinas que la obtenida a partir de ALA, si bien no se pudo incrementar esta cantidad al aumentar la concentración del éster por arriba de 0,1 mM.

Eléouet y col. (2000) demostraron que cuando las células tumorales de glia de rata se exponían a THP-ALA, éstas se fotosensibilizaban en forma más eficiente que las células expuestas a concentraciones equimolares de ALA. Los mismos autores observaron que el THP-ALA sensibilizaba a las células a concentraciones tan bajas como 18  $\mu$ M. Sin embargo en las células LM3 nosotros no encontramos que el THP-ALA fuera mejor pro fotosensibilizante que el ALA. Basamos las diferencias en la respuesta a la TFD de las células, en que los diferentes ésteres del ALA ingresan por distintos mecanismos de transporte a la célula, y que este mecanismo puede además variar para cada tipo celular.

Se requiere la mitad de He-ALA comparado con ALA para obtener la misma cantidad de porfirinas. Sin embargo, a pesar de que se acumula 4 veces más ALA/He-ALA a partir del He-ALA, el valor de porfirinas en el plateau para ambos compuestos es similar. Esto demuestra que la transformación del He-ALA en porfirinas es el paso limitante y no la entrada del precursor a la célula.

Para evaluar si la conversión de He-ALA a ALA por medio de las esterasas era o no el paso limitante, separamos el ALA del He-ALA mediante cromatografía en columnas de intercambio iónico. Encontramos que el 80 % del compuesto total era He-ALA mientras que sólo el 20 % era ALA. Esto significa que las esterasas están limitando la conversión a ALA y por lo tanto a porfirinas.

Algo similar ocurrió con el THP-ALA. Alrededor de 2,8 veces más ALA/THP-ALA se acumuló en las células, y sólo el 40 % se convirtió en ALA. Esto puede estar relacionado con algún tipo de regulación a través de las esterasas, la cual provee la cantidad de ALA necesaria para convertirse en porfirinas, probablemente a través de una regulación por producto final. Respecto a esto podemos decir que tal vez las esterasas estén reguladas a través del camino biosintético del hemo. Sin embargo se necesitan más datos para poder confirmar esta hipótesis.

La cantidad de ALA/UND-ALA a partir de UND-ALA fue muy baja y no se la pudo separar del ALA por medio de las columnas de intercambio iónico. Pero en este caso hubo una buena correlación entre el ALA acumulado y las porfirinas sintetizadas, aparentemente al estar en condiciones no saturantes para las esterasas.

Los datos obtenidos a partir de experiencias *in vitro* con explantes de tumor LM3 coinciden con los resultados obtenidos en células. Empleando ALA o ésteres de ALA 0,6 mM, la síntesis de porfirinas a partir de ALA, He-ALA y THP-ALA, es similar, mientras que la acumulación de porfirinas a partir de UND-ALA apenas sobrepasa los niveles basales. Estos resultados indican una buena correlación entre ambos modelos *in vitro*, los cuales son marcadamente diferentes de los datos *in vivo*.

Se ha probado previamente que el He-ALA induce una considerable síntesis de porfirinas *in vitro* pero no *in vivo*. Estas diferencias entre los resultados en líneas celulares y sus tumores parentales, se puede atribuir a: (a) la baja capacidad del He-ALA para cruzar la estructura vascular para alcanzar las células tumorales, (b) retención de He-ALA en el espacio intersticial y consecuentemente limitada disponibilidad para las otras capas celulares, (c) la acción y expresión diferencial de las esterasas en las líneas celulares comparado con el tumor parental.

La administración vía i.p. de los derivados He-ALA y UND-ALA dio como resultado una acumulación de porfirinas 5 veces menor en tumor que lo obtenido con concentraciones equimolares de ALA. El THP-ALA indujo la mitad de las porfirinas obtenidas a partir de ALA. La concentración de los derivados empleada no se pudo aumentar debido a que fueron letales para los ratones.



Cuando la línea celular LM3 se expuso a UND-ALA, encontramos que la toxicidad se debía a la liberación del alcohol luego de la acción de la esterasa (datos no mostrados). Sin embargo, *in vivo* la toxicidad del He-ALA y el UND-ALA podría estar provocada por un mecanismo diferente. Cuando se utilizaron dosis de He-ALA y UND-ALA muy altas, los ratones murieron dentro de los 5 minutos post inyección. Basados en la observación de que el He-ALA induce una alta síntesis de porfirinas en el cerebro (capítulo VII), sospechamos que el He-ALA es neurotóxico, sin embargo esto no es aplicable para el caso del UND-ALA, ya que este derivado produce una muy baja síntesis de porfirinas en cerebro (datos no mostrados)

En el tumor se retuvieron alrededor de 170 nmoles de ALA/g tejido luego de 10 minutos de la inyección de ALA, mientras que los derivados se acumulaban de 3 a 5 veces menos. Sin embargo, luego de 3 horas la concentración de ALA era similar para todos los compuestos.

La síntesis de porfirinas *in vitro* no refleja la eficiencia de la síntesis *in vivo*, ni la acumulación de ALA o sus derivados *in vitro* se correlaciona con los datos obtenidos *in vivo*, demostrando la dificultad y la complejidad para extrapolar los resultados de los datos *in vitro* a un modelo *in vivo*. Los datos sugieren que luego de la administración i.p. de ALA o los ésteres derivados, la retención del derivado en los vasos sanguíneos en la fase inicial de distribución o bien dentro de los capilares juega un rol esencial en la disponibilidad del ALA.

La relevancia del uso de derivados de ALA, se basa en la posibilidad de disminuir la cantidad de derivado administrado para obtener iguales cantidades de porfirinas y ganar selectividad. Nuestros resultados subrayan la importancia de trabajar con los derivados de ALA en condiciones no saturantes de la actividad de las esterasas y/ o del camino del hemo. Sin embargo se requieren más estudios en relación a los puntos de saturación de las esterasas y su regulación.

## Referencias.

- Baas P, van Mamsom I, van Tinteven H, Stewart F, van Zandwijk N. Effect of N-acetylcysteine on Photofrin induced skin photosensitivity in patients. *Lasers Surg. Med.*, **16**: (1995) 359-67.
- Baas, P.; Oppelaar, H.; van der Valk, M.; van Zandwijk, N. & Stewart, F. Partial protection of photodynamic-induced skin reactions in mice by N-acetylcysteine: a preclinical study. *Photochem. Photobiol.*, **59**: (1994) 448-454.
- Battah SH., Chee CE., Nakanishi H., Gerscher S., MacRobert AJ., Edwards C. Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjugate Chem.*, **12**: (2001) 980-988.
- Bermúdez Moretti M, Correa García S, Perotti C, Batlle A & Casas A.  $\delta$ -aminolevulinic acid transport in mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *Br. J. Cancer*, **87**: (2002) 471-474.
- Buettner G. Thiyl free radical production with hematoporphyrin derivative, cysteine and light: a spin-trapping study. *FEBS.*, **177**: (1984) 295-299.
- Casas A, Batlle A, Butler A, Robertson D, Brown E, MacRobert A & Riley P. Comparative effect of ALA derivatives on Protoporphyrin IX production in human and rat skin organ cultures. *Br. J. Cancer*, **80**: (1999) 1525-1532.
- Casas, A. & Batlle, A. Rational design of 5-aminolevulinic acid derivatives aimed at improving Photodynamic Therapy. *Curr Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2**, (2002) 465-475
- Demasi M., Costa C., Pascual C., Llesuy S., Bechara E. Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. *Free Radic. Res.*, **26**: (1997) 235-43.
- Döring F., Walter J., Will J., Föcking M., Boll M., Amasheh S., Clauss W., Daniel H. Delta aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J. Clin. Invest.*, **101**: (1998 a) 2761-67.
- Döring F., Will J., Amasheh S., Clauss W., Ahlbrecht H., Daniel H. Minimal molecular determinants of substrate for recognition by the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, **273**: (1998 b) 23211-18.
- Eléouet S., Carré J., Vonarx V., Heyman D., Lajat D. Y., Patrice T., Delta-aminolevulinic acid-induced fluorescence in normal human lymphocytes, *J. Photochem. Photobiol.*, **41**: (1997) 22-29.

- Eléouet S., Rousset N., Carré J., Bourré L., Vonarx V., Lajat Y., Beijersbergen van Henegouwen G. & Patrice T. *In vitro* fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by 5-aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters. *Photochem. Photobiol.*, **71**: (2000) 447-454.
- Fritsch C.; Homey B.; Stahl W.; Lehemann P.; Ruzicka T.& Sies H. Preferential relative porphyrin enrichment in solar keratoses upon topical application of 5-aminolevulinic acid methyl ester. *Photochem. Photobiol.*, **68**: (1998) 218-221.
- Fukuda H., Paredes S & Batlle A. Tumour-localizing properties of porphyrins. *In vivo* studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**: (1992) 433-436.
- Gaullier J, Berg K, Peng Q, Anholt H, Selbo P, Ma L & Moan J. Use of 5-Aminolevulinic Acid Esters to improve Photodynamic Therapy on Cells in Culture. *Cancer Res.*, **57**: (1997) 1481-1486
- Gederaas JM., Holroyd A., Brown SB., Vernon D., Berg K. 5-aminolevulinic acid methyl ester transport on amino acid carriers in a human colon adenocarcinoma cell line. *Photochem. Photobiol.*, **73**: (2001) 164-169.
- Gloor S.; Wachtel M.; Bolliger M.; Ishihara H.; Landmann R. & Frei K. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res. Rev.*, **36**: (2001) 258-264.
- Gorchein A. & Webber R. 5-aminolevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: studies in normal, uraemic and porphyric subjects. *Clin. Sci.*, **72**: (1987) 103-112.
- Gossner L, Stolte M, Sroka R, Rick K, May A, Hahn E & Ell C. Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid. *Gastroenterology*, **114**: (1998) 448-455.
- Hansch C.; Bjorkroth J. & Leo, A. Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *J. Pharm. Sci.*, **76**: (1987) 663-687.
- Henderson, B. & Miller, A. Effects of scavengers of reactive oxygen and radical species on cell survival following photodynamic treatment *in vitro*: comparison with ionizing radiation. *Radiat. Res.*, **108**: (1986) 196-205.
- Hideg E, Spetea C, Vass I. Singlet oxygen and free radical production during acceptor- and donor-side-induced photoinhibition. Studies with spin trapping EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1186**: (1994) 143-152.

- Hiraku Y. & Kawanishi S., Mechanism of oxidative DNA damage induced by delta-aminolevulinic acid in the presence of copper ion, *Cancer Res.*, **56**: (1996) 1786-1793 .
- Hryhorenko E., Oseroff A., Morgan J., Rittenhouse-Diakun K., Deletion of alloantigen-activated cells by aminolevulinic acid-based photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **69**: (1999) 560-565.
- Hryhorenko E., Rittenhouse-Diakun K., Harvey N., Morgan J., Stewart C., Oseroff A., Characterization of endogenous protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in resting and activated peripheral blood lymphocytes by four-color flow cytometry, *Photochem. Photobiol.*, **67**: (1998) 565-572.
- Hunt C. Liposomes disposition *in vivo*. V. Liposome stability in plasma and implications for drug carrier function. *Biochim. Biophys. Acta*, **719**: (1982) 450-463.
- Kessel D. & Luo Y. Delayed oxidative photodamage induced by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **64**: (1996) 601-604.
- Kloek J; Akkermans W & Beijersbergen van Henegouwen G. Derivatives of 5-Aminolevulinic acid for Photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, **67**: (1998) 150-154.
- Krieg R., Uihlein D., Murthum T., Endlicher E., Hausmann F., Messmann H. & Knuechel R. Improving the use of 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced Protoporphyrin IX (PPIX) for the gastrointestinal tract by esterification - an *in vitro* study. *Cell Mol. Bio.*, **48**: (2002) 917-923.
- Krogsgaard-Larsen P., Frolund B. & Frydenvang K. GABA uptake inhibitors, design, molecular pharmacology and therapeutic aspects. *Curr. Pharm. Design*, **6**: (2000) 1193-1209.
- Margolis L., Victorov A. & Bergelson L. Lipid-cell interactions. A novel mechanism of transfer of liposome-entrapped substances into cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **720**: (1982) 259-265.
- Michiels C., Raes M., Touissant O., Renacle J.. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and SOD Cu/Zn for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.*, **17**: (1994) 235-248.
- Moan J, Bech O, Gaullier J, Stokke T, Steen H, Ma L & Berg K. Protoporphyrin IX accumulation in cells treated with 5-aminolevulinic acid: dependence on cell density, cell size and cell cycle. *Int. J. Cancer*, **75**: (1998) 134-139.

- Moan J., Ma LW., Iani V. On the pharmacokinetics of topical applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *Int. J. Cancer*, **92**: (2001) 139-143.
- Moan J., Ma LW., Juzaniene A., Iani V., Juzenas P., Apricena F., Peng Q. Pharmacology of protoporphyrin IX in Nude Mice after application of ALA and alal esters. *Int. J. Cancer*, **103**: (2003) 132-135.
- Nishihara E., Kondo K., Parvez M., Takahashi K., Watanabe K. & Tanaka K. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *J. Plant Physiol.*, **160**: (2003) 1085-91.
- Peng Q, Moan J, Warloe T, Iani V, Steen H, Bjørseth A & Nesland J. Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J. Photochem. Photobiol. B*, **34**: (1996) 95-96.
- Percy V. & Shanley B. Studies on haem biosynthesis in rat brain. *J. Neurochem.*, **33**: (1979) 1267-1274.
- Princ F., Juknat A., Amitrano A., Battle A., Effect of reactive oxygen species promoted by delta-aminolevulinic acid on porphyrin biosynthesis and glucose uptake in rat cerebellum, *Gen. Pharmacol.*, **31**: (1998) 143-148.
- Reiter R, Tan D, Poeggeler B, Chen L, Menendez-Pelaez A. Melatonin, free radicals and cancer initiation. In: *Advances in Pineal Research*; 7. G Maestroni, A Conti & R Reitter (eds.) John Libbey & Company Ltd. (1994) 211-28.
- Reiter, R., Tsan D., Osuna C. & Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *J. Biomed. Sci.*, **7**: (2000) 444-458
- Richter K., Ammerer G., Hartter E. & Ruis H. The effect of delta-aminolevulinic acid on catalase T-messenger RNA levels in delta-aminolevulinic acid synthase-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **255**: (1980) 8019-22.
- Rittenhouse-Diakun K., Van Leengoed H., Morgan J., Hryhorenko E., Paszkiewicz J., Whitaker J., Oseroff A.. The role of transferrin receptor (CD71) in photodynamic therapy of activated and malignant lymphocytes using the heme precursor 5-aminolevulinic acid (ALA), *Photochem. Photobiol.* **61**: (1995) 523-528.
- Rodal GH., Rodal SK., Moan J, Berg K. Liposome-bound Zn (II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **45**: (1998) 150-159.
- Rougier A & Lotte C. Correlations between horny layer concentration and percutaneous absorption. In *Pharmacology and skin: 1. Skin Pharmacokinetics*. Eds. B. Shroot & Schaefer, Switzerland. (1986)

- Rud E, Gederaas G, Brown S, Holroyd J, Vernon D, Hogset A, Moan J & Berg K. Cellular uptake mechanisms for 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic methyl ester. 8th Congress Eur. Soc. Photobiol., Granada, Spain, *Book of Abstracts*, (1999) S136, pp. 85.
- Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstadter F & Knuchel R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.*, **62**: (1995) 887-895.
- Sweeney V., Pathak M., Asbury A. Acute intermittent porphyria, increased ALA-synthetase activity during an acute attack. *Brain*, **93**: (1970) 369-380.
- Tomas-Zapico C., Martinez-Fraga J., Rodriguez-Colunga M., Tolivia D., Hardeland R. & Coto-Montes A. Melatonin protects against delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage in male Syrian hamster Harderian glands. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**: (2002) 544-53.
- Tomas-Zapico C., Martinez-Fraga J., Rodriguez-Colunga MJ., Tolivia D., Hardeland R. & Coto-Montes A. *Int.* Melatonin protects against delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage in male Syrian hamster Harderian glands. *J. Biochem. Cell Biol.*, **34**: (2002) 544-53.
- Tunstall RG., Barnett AA., Schofield J., Griffiths J., Vernon DI., Brown SB., Roberts DJH. Porphyrin accumulation induced by 5-aminolevulinic acid esters in tumour cells growing *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Cancer*, **87**: (2002) 246-250.
- Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H & Lange N. 5-aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J. Photochem. Photobiol. B*, **54**: (2000) 72-80.
- Van den Akker, J., de Bruijn H., Beijersbergen van Henegouwen G., Star W. & Sterenberg, H. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics and localization after topical application of ALA pentyl ester and ALA on hairless mouse skin with UVB-induced early skin cancer. *Photochem. Photobiol.*, **72**: (2000a) 399-406.
- Van den Akker, J., Iani, V, Star W., Sterenberg, H. & Moan, J. Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic to normal nude mouse skin: differences in Protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the *stratum corneum*. *Photochem. Photobiol.*, **72**: (2000b) 681-689.

- Weiss T., Pahernik S., Scheruebl I., Jauch K. & Thasler W. Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *J. Hepatol.*, **38**: (2003) 476-82.
- Whitaker C, Battah S, Forsyth M, Edwards C, Boyle R, Matthews K Photosensitization of pancreatic tumour cells by 5-aminolevulinic acid esters. *Anti-Cancer Drugs Design* **15**: (2000) 161-170.
- Wiechers, J. The barrier function of skin in relation to percutaneous absorption of drugs. *Pharm. Weekbl (Sci)* **11**: (1989) 185-198.
- Williams M., Krootjes B., van Steveninck J., van der Zee J. The pro- and antioxidant properties of protoporphyrin IX. *Biochim. Biophys Acta*, **1211**: (1999) 310-16.
- Yusof M., Yildiz D. & Ercal N. N-acetyl-L-cysteine protects against delta-aminolevulinic acid-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Toxicol. Lett.*, **106**: (1999) 41-7.

## Conclusiones Generales

- La síntesis de porfirinas *in vitro*, en cualquiera de las líneas celulares utilizadas, es dependiente del número de células y aumenta en función del tiempo de incubación y de la concentración de ALA o He-ALA utilizada. Además a mayor concentración de porfirinas mayor es el daño inducido por la TFD.
- En la línea celular LM2 el He-ALA induce la misma cantidad de porfirinas que el ALA, con la ventaja de que se necesita emplear una concentración 60 veces menor que la de ALA. A concentraciones equimolares, el He-ALA induce 1,6 veces más porfirinas. Las porfirinas sintetizadas a partir de ambos derivados sensibilizan a la célula de igual forma, induciendo la fragmentación del ADN internucleosomal característica del proceso apoptótico.
- Utilizando el modelo de explantes de tumor, observamos que el encapsulamiento de las pro-drogas no incrementó significativamente la síntesis de porfirinas. Pudimos comprobar además que los liposomas penetran en las células mediante fusión con la membrana plasmática.
- Empleando nuestro modelo de cultivo de linfocitos esplénicos murinos, observamos que la síntesis de porfirinas a partir de ALA es más elevada en los linfocitos activados que en los linfocitos en reposo. Estos resultados se correlacionaron con una mayor disminución en la supervivencia, luego de la TFD, demostrando que el ALA-TFD es útil para diversas líneas celulares.
- En ese mismo modelo, se observó que, como consecuencia de su sensibilidad al tratamiento, sólo las células activadas eran capaces de generar una respuesta antioxidante adaptativa a la TFD, particularmente reflejado en el aumento de la actividad de la GPX. Esto es importante ya que las enzimas antioxidantes pueden modular la resistencia al daño inducido por el estrés oxidativo generado durante la TFD, además de ser utilizado como parámetro de efectividad de la terapia.



- Mediante el uso de diferentes agentes protectores contra el daño fotodinámico, tales como secuestrantes de radicales libres, antioxidantes y compuestos sulfurados, se demostró la importancia de las especies reactivas de oxígeno en la muerte celular inducida por el ALA-TFD. Muchos de los compuestos que protegen a las células contra el daño inducido por la TFD, están relacionados con el metabolismo del GSH, lo que constituye un dato interesante a tener en cuenta para mejorar la estrategia del tratamiento, como mecanismo de protección de las células normales frente a los efectos secundarios.
- Luego de la aplicación tópica de ALA y He-ALA, en tumores subcutáneos, se observó que si bien la síntesis de porfirinas a partir de He-ALA es menor, la acumulación de los tetrapirroles es más localizada en piel peritumoral y el contenido de porfirinas en los órganos internos se encuentra dentro de los valores basales.
- Cuando se aplicó He-ALA tópicamente sobre papilomas inducidos químicamente, se observó que variando la composición del vehículo se puede obtener una síntesis de porfirinas similar tanto a partir de ALA como de He-ALA, utilizando las formulaciones óptimas para ambos compuestos. La mejor formulación para el ALA fue la loción con el agregado de DMSO y etanol, mientras que la crema fue la mejor formulación para aplicar el He-ALA
- En este modelo el He-ALA indujo nuevamente una síntesis de porfirinas más selectivamente localizada en el sitio de aplicación, tumor y piel peritumoral. Esto sugiere que el empleo de He-ALA podría ser ventajoso en el caso de lesiones superficiales, en comparación con el ALA. La acumulación de porfirinas en piel normal y papilomas distantes disminuye en forma dependiente con la distancia al sitio de aplicación, con la ventaja adicional de que la síntesis en los órganos internos se encuentra dentro de los valores basales, lo cual evitaría una posible acción tóxica en dichos órganos.
- *In vivo* el He-ALA administrado en forma sistémica, indujo una síntesis de tetrapirroles menor que la obtenida a partir del ALA en los distintos tejidos,

independientemente del tiempo y la vía de administración. El He-ALA es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica e inducir una síntesis de porfirinas mucho mayor en cerebro que el ALA, lo cual le otorga una ventaja importante para el tratamiento de tumores cerebrales.

- De acuerdo a los resultados *in vitro*, obtenidos mediante el uso de distintos ésteres derivados de ALA en la línea celular LM3, se puede postular que el mecanismo de entrada a la célula es diferente para los distintos compuestos. En el caso del ALA y el THP-ALA sería necesaria una concentración umbral para que se produzca la incorporación de los mismos a la célula.
- El hecho de que los derivados THP-ALA y He-ALA se acumulen en mayor cantidad que el ALA y que la síntesis de porfirinas sea similar en el plateau, sugiere que la conversión del éster a ALA y/o el pasaje de ALA a porfirinas, y no la entrada a la célula, es el paso limitante. Esto lleva a pensar que podría existir algún tipo de regulación del tipo feedback entre el pool de ALA libre y/o el camino biosintético del hemo con la actividad de las esterasas. Por lo tanto es de importancia emplear los ésteres en condiciones no saturantes para las enzimas.
- Se observó una buena correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* con la línea celular LM3 y *ex vivo* con explantes de tumor LM3, sin embargo queda en evidencia la complejidad y dificultad para correlacionar estos resultados con los resultados *in vivo*, y se postula que los capilares serían de gran importancia en la disponibilidad de ALA a partir de los ésteres y ayudaría en parte a explicar las diferencias obtenidas.

✚ En base a los resultados obtenidos *in vitro*, observamos que los ésteres derivados de ALA tienen un rol promisorio en el mejoramiento de la TFD, estimulando una mayor síntesis de porfirinas. Dado que el pool de ALA libre o bien algún componente del camino del hemo podría estar regulando la hidrólisis de los ésteres a ALA, es importante tener en cuenta el hecho de trabajar en condiciones no saturantes para las esterasas. *In vivo*, mediante la aplicación tópica de He-ALA en dos modelos tumorales, se demostró una localización más selectiva de este derivado comparado con el ALA. Por otro lado el He-ALA fue capaz de atravesar la barrera hematoencefálica en forma más eficiente que el ALA, estimulando una alta concentración de porfirinas en cerebro. Lo que destaca la importancia que este derivado podría tener en el tratamiento de tumores cerebrales. Encontramos además que muy probablemente los capilares juegan un rol fundamental en la biodisponibilidad del ALA y sus derivados en los modelos *in vivo* empleados. Si bien aún son necesarios más estudios, postulamos que los diversos derivados podrían localizarse más selectivamente en diferentes órganos. Por lo tanto sería de gran importancia poder dilucidar los mecanismos que regulan la localización y conversión de los ésteres, y determinar el rol que juegan los capilares en la distribución de las pro-drogas, para lograr aumentar la eficiencia de la terapia fotodinámica.