

Tesis Doctoral

# Selectividad de la terapia fotodinámica empleando ALA y otros fotosensibilizantes. Rol de la vasculatura en el daño fotodinámico

Rodríguez, Lorena Gabriela

2011

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

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

Cita tipo APA:

Rodríguez, Lorena Gabriela. (2011). Selectividad de la terapia fotodinámica empleando ALA y otros fotosensibilizantes. Rol de la vasculatura en el daño fotodinámico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rodríguez, Lorena Gabriela. "Selectividad de la terapia fotodinámica empleando ALA y otros fotosensibilizantes. Rol de la vasculatura en el daño fotodinámico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Selectividad de la terapia fotodinámica empleando ALA y otros  
fotosensibilizantes. Rol de la vasculatura en el daño  
fotodinámico.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lorena Gabriela Rodríguez

Director de tesis: Dra. Alcira M. del C. Batlle de Albertoni

Director Asistente: Dra Adriana G. Casas

Consejero de Estudios: Dra Lilia Lauría

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Hospital de Clínicas "José de San Martín"- UBA.

Buenos Aires, 2011

# **SELECTIVIDAD DE LA TERAPIA FOTODINAMICA EMPLEANDO ALA Y OTROS FOTOSENSIBILIZANTES. ROL DE LA VASCULATURA EN EL DAÑO FOTODINAMICO**

## **RESUMEN**

La Terapia Fotodinámica (TFD), es un tratamiento para el cáncer y otras patologías, basado en la activación de un fotosensibilizante (FS) ante la exposición a la luz.

Uno de los mayores desafíos de la TFD es aumentar su selectividad por las células neoplásicas. En este trabajo hemos estudiado la selectividad de FSs (Foscan, Merocianina 540, naranja de Acridina, Clorina, Verteporfin y Photofrin) y pro-FSs (ALA) por las células tumorales en un modelo de línea celular normal/tumoral, HB4a y HB4a-Ras transfectada establemente con el oncogén Ras.

Para ello hemos comparado la acumulación y localización subcelular de diversos FSs y la respuesta a la TFD y encontramos que las células transfectadas con Ras son resistentes respecto a su parental. Por lo que nuestro objetivo de trabajo se focalizó en estudiar las causas de dicha resistencia en las células HB4a-Ras. Hemos hipotetizado que dicha resistencia se puede deber a una menor adhesión al sustrato y adhesión célula-célula debido a una desorganización de la E-cadherina y a alteraciones en el citoesqueleto en F-actina y vinculina.

Otro aspecto importante de la fotosensibilización es el rol de la vasculatura. En esta Tesis estudiamos cual es el blanco preferencial (vascular o tumoral) de la TFD. Los estudios *in vivo* indican que tanto el daño tumoral directo como el vascular son fundamentales, mientras que *in vitro*, las células endoteliales HMEC-1 son más resistentes a la TFD con FSs tetrapirrólicos que algunas líneas mamarias tumorales y que los queratinocitos humanos, aunque no ocurre lo mismo con FSs de otras estructuras tales como la Merocianina 540 y naranja de Acridina.

Las diferencias de selectividad por las células endoteliales para los distintos FSs podrían ser explotadas para su uso en el tratamiento de patologías específicas.

Hemos concluido que la selectividad de la TFD varía fuertemente con la estirpe celular, y que la estructura del FS es esencial en dicho proceso. Asimismo, la expresión de oncogenes en los tumores, sería un factor determinante en la efectividad del tratamiento.

**Palabras claves**

Terapia fotodinámica, vasculatura, resistencia, citoesqueleto, adhesión celular, oncogén Ras

# SELECTIVITY OF THE PHOTODYNAMIC THERAPY EMPLOYING ALA AND OTHER FOTOSENSITISERS. ROLE OF THE VASCULATURA IN THE PHOTODYNAMIC DAMAGE

## ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) involves the administration of a photosensitiser (FS) which is activated by light of an appropriate wavelength to treat cancer and other diseases.

Tumour selectivity is one of the major challenges in the PDT field. In the present work we have studied FSs (Foscan, Merocyanin 540, Acridine orange, Clorine, Verteporphin and Photofrin) and pro-FS (ALA) selectivity for tumour cells employing the normal/tumour cell line pair model HB4a and HB4a-Ras.

We have compared accumulation and intracellular distribution of a panel of FSs, and we have found that HB4a-Ras cells are resistant to PDT treatment. Taking into account this finding, we then focused on the study of the mechanism of PDT resistance. We hypothesised that a decreased cell-substratum and cell-cell adhesion due to E-cadherin, F-actin and vinculin disorganization, were involved in the development of resistance.

The role vasculature in PDT photodamage has largely been discussed. We decided to study vascular and tumour targets in the in vivo and in vitro photodynamic processes. Our results suggest that whereas in vivo both targets are equally damaged by PDT, in vitro, human endothelial HMEC-1 cells are more resistant to PDT employing tetrapyrrolic PSs than some mammary tumour lines and human keratinocytes, but not employing FSs dyes such as Merocyanin 540 and Acridine orange. These differences in selectivity between different FSs could be exploited for the treatment of specific pathologies.

The main conclusion of this work was that PDT selectivity strongly depends on cell type, and that FS structure is crucial on the process. Moreover, oncogene expression may be a key point in the prediction of the tumours that can profit from PDT.

**Keywords**

Photodynamic Therapy, vasculature, resistance, cytoskeleton, cell adhesion, Ras oncogene

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Alcira Batlle, por su guía, su consejo y por fomentar constantemente mi progreso.

A la Dra. Adriana Casas, por haberme brindado su guía, sus conocimientos como así también su confianza y generosidad.

A la Dra. Gabriela Di Venosa, por la paciencia que tuvo en mis primeros pasos en esta carrera y por estar siempre dispuesta a brindarme una mano no solo en lo referente a lo laboral sino también en el plano personal. Al Lic. Leandro Mamone por su colaboración, en estos últimos años.

A la Dra. Silvia Vanzulli por su ayuda y aportes en la elaboración de parte de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Alejandra Cicarelli, Julieta Teijo, Berenice Diez, Xoana Granata, Silvina Ruspini, Laura Varela, Verónica Goni, Federico Colombo, Alejandra Caballero y Marcelo Guolo, por hacer del CIPYP un ámbito agradable y amigable, a pesar de que muchas veces las cosas no salieran tan bien como uno las esperaba, siempre supieron darme una palabra de aliento para seguir adelante. Por las innumerables comidas de terapia grupal. Gracias por hacer que ir a trabajar fuera algo divertido y ameno.

Al grupo que conforma el CIPYP, por su buena disponibilidad, su amabilidad y por siempre buscar facilitar mi trabajo y generar un buen lugar de trabajo. Especialmente a Victoria Castillo, que sin su predisposición para tener el material limpio y listo, nada de lo que está escrito en esta tesis hubiera sido posible.

Al CONICET por entender la importancia de este trabajo de Tesis otorgando las Becas y los subsidios necesarios para su realización.

A Lumii por permitirnos la utilización del láser de 635 nm. Especialmente a Claudio y al Ing. Petino por estar siempre dispuestos a resolver mis inquietudes y sugerencias.

A la empresa Conifarma por la provisión de Verteporfín.

A la Fundación Bunge y Born por creer en este proyecto y colaborar en mi capacitación fuera y dentro del país. No solo me dieron la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos, sino vivir una experiencia única y personal.

A todos los integrantes del laboratorio del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UAM-España, muchas de las técnicas que desarrolle en este

trabajo fueron gracias a la paciencia y dedicación que tuvieron conmigo. Y a través de ellas pude conocer gente maravillosa.

A mi familia, uno de mis pilares fundamentales, definitivamente nada de este trabajo hubiera sido posible sin su apoyo incondicional y sus palabras de aliento. La persona que soy y en la que me convertí es solo producto del inmenso amor que siempre me han sabido brindar. Agradezco a Dios cada día, por la hermosa familia que tengo, no solo por mis papas, mi hermano, mi cuñada y mis sobrinos sino también por mis abuelos, tíos, primos y familia política. Muchos de ellos a lo largo de la elaboración de esta tesis han partido, pero sé que me cuidan desde donde se encuentran.

A mis amigos: Mari, Pepa, Solchín, Noe, Martus, Ari, Marian, Ani, Coki, Rodo, Nati, Romi, Gus, Andre, Ale, Lupe y Pau. Han logrado que el tránsito por la vida sea algo agradable y especial. Gracias por entenderme, ayudarme y sostenerme cuando lo he necesitado, por permitirme entrar en sus vidas. Y dentro de mis amigos destaco la colaboración del Dr. Martín Rivas por su infinita generosidad y ayuda con muchas de las técnicas de esta tesis.

A toda la gran familia del Instituto San José de Villa Devoto (Congregación de Hermanas, directivos, docentes, personal administrativo, preceptores, alumnos y ex-alumnos) por creer siempre en mi y enseñarme cada día a ser mejor persona.

A mis ahijados y sobrinos, son los motores que mueven mi vida. Gracias por enseñarme que la felicidad esta en las cosas simples.

A Marian por creer siempre en mí e inclusive ver en mi más de lo que yo veía. Por tu inmenso amor, tu paciencia y tu compañerismo. Te amo!

Y finalmente a Dios, por hacer que ciencia y religión no fuera un problema para mí sino la prueba fiel de que se complementan.



## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>Palabras claves</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>Keyword</b>	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>5</b>
<b>INDICE</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>I. Terapia fotodinámica del cáncer</b>	<b>14</b>
<b>I.1. Introducción</b>	<b>14</b>
<b>I.2. Historia de la TFD</b>	<b>15</b>
<b>I.3. Fotoquímica</b>	<b>16</b>
<b>I.4. Mecanismos de acumulación de los FSs en los tumores</b>	<b>19</b>
<b>I.5. Sitios subcelulares blancos de la TFD</b>	<b>20</b>
<b>I.6. Fotosensibilizantes de uso común en TFD</b>	<b>21</b>
<b>I. 6.1 Precursores de FSs</b>	<b>22</b>
<b>I.6.2 Porfirinas</b>	<b>24</b>
<b>I.6.2.1 Photofrin II</b>	<b>24</b>
<b>I.6.2.2 Verteporfin</b>	<b>25</b>
<b>I.6.3 Clorinas</b>	<b>26</b>
<b>I.6.3.1 Clorina e6</b>	<b>26</b>
<b>I.6.3.2 m-THPC</b>	<b>27</b>
<b>I.6.4 Colorantes</b>	<b>27</b>
<b>I.6.4.1 Merocianinas</b>	<b>27</b>
<b>I.6.4.2 Naranja de Acridina</b>	<b>28</b>
<b>I.7. Fuentes de luz de uso en TFD</b>	<b>29</b>
<b>I.8. Aplicaciones de la TFD</b>	<b>30</b>
<b>I.8.1 TFD en el tratamiento del cáncer</b>	<b>30</b>
<b>I.8.2 Fotodetección</b>	<b>31</b>
<b>I.8.3 Otras aplicaciones no oncológicas de la TFD</b>	<b>32</b>
<b>II. Matriz extracelular, adhesión celular y citoesqueleto</b>	<b>34</b>
<b>II.1. Adhesión celular</b>	<b>34</b>

<b>II.1.1 Uniones adherentes</b>	<b>34</b>
<b>II.1.1.1 Las cadherinas</b>	<b>35</b>
<b>II.1.2 Contactos focales</b>	<b>36</b>
<b>II.1.2.1 Integrinas</b>	<b>37</b>
<b>II.1.2.2 Vinculina</b>	<b>39</b>
<b>II.2 Matriz extracelular</b>	<b>39</b>
<b>II.3 Citoesqueleto</b>	<b>40</b>
<b>III. Mecanismos de resistencia a la TFD</b>	<b>42</b>
<b>III.1. Adhesión celular, MEC y citoesqueleto en relación a la resistencia a TFD</b>	<b>43</b>
<b>III.2. Mecanismos de resistencia a TFD asociados a oncogenes</b>	<b>45</b>
<b>IV. El rol de la vasculatura en la TFD</b>	<b>47</b>
<b>VI.1. ALA-TFD y vasculatura</b>	<b>48</b>
<b>IV.2. Tratamiento fotodinámico de lesiones no cancerosas vasculares</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>51</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>73</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>74</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>75</b>
<b>I. Fotosensibilizantes</b>	<b>75</b>
<b>II. Líneas celulares</b>	<b>75</b>
<b>II.1 LM2</b>	<b>75</b>
<b>II.2 HB4a y HB4a-Ras</b>	<b>75</b>
<b>II.3 HMEC-1</b>	<b>76</b>
<b>II.4 PAM212</b>	<b>76</b>
<b>II.5 HaCat</b>	<b>76</b>
<b>II.6 MCF-7</b>	<b>76</b>
<b>III. Determinación del número de células</b>	<b>77</b>
<b>IV. Cuantificación de porfirinas intracelulares sintetizadas a partir de ALA</b>	<b>77</b>
<b>V. Cuantificación de FS intracelular por extracción química</b>	<b>77</b>
<b>VI. Tratamiento de TFD</b>	<b>78</b>
<b>VI.1 Fuente de luz</b>	<b>78</b>
<b>VI.2 Ensayo de viabilidad de MTT</b>	<b>79</b>
<b>VI.3 Dosis letal 50</b>	<b>79</b>
<b>VII. Experimentos de localización subcelular de los FSs</b>	<b>79</b>
<b>VIII. Tinción con azul de Toluidina</b>	<b>80</b>

<b>IX. Ensayos de inmunofluorescencia</b>	<b>80</b>
<b>X. Ensayos de Westernblot</b>	<b>81</b>
<b>XI. Ensayos de adhesión a proteínas de MEC</b>	<b>82</b>
<b>XII. Ensayo de TFD de células en suspensión</b>	<b>82</b>
<b>XIII. Determinación de proteínas celulares</b>	<b>82</b>
<b>XIV. Crecimiento celular y tiempo de duplicación celular</b>	<b>82</b>
<b>XV. Tratamiento estadístico</b>	<b>82</b>
<b>XVI. Experimentos in vivo</b>	<b>83</b>
<b>XVI.1 Animales</b>	<b>83</b>
<b>XVI.2 Procedimiento de Terapia Fotodinámica in vivo</b>	<b>83</b>
<b>XVI.2.1 Láser de 635 nm</b>	<b>84</b>
<b>XVI.3 Estudios histológicos luego de TFD in vivo</b>	<b>84</b>
<b>XVI.4 Seguimiento de crecimiento tumoral post-TFD in vivo</b>	<b>84</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>86</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>88</b>
<b>I. Resistencia de las células transfectadas con el oncogén Ras a la Terapia fotodinámica mediada por ALA</b>	<b>88</b>
<b>I. 1 Caracterización de las células HB4a y HB4a-Ras</b>	<b>88</b>
<b>I.2 Síntesis de porfirinas a partir de ALA en células HB4a y HB4a-Ras</b>	<b>89</b>
<b>I.3 Tratamiento fotodinámico a partir de ALA en células HB4a y HB4a-Ras</b>	<b>93</b>
<b>I. 4 Discusión</b>	<b>94</b>
<b>I.5 Conclusión</b>	<b>96</b>
<b>II. Resistencia de las células transfectadas con el oncogén Ras a la Terapia fotodinámica con diversos FSs y su relación con la adhesión celular</b>	<b>97</b>
<b>II. 1 Toxicidad en oscuridad de los FSs</b>	<b>97</b>
<b>II. 2 Cuantificación de FSs y Terapia Fotodinámica</b>	<b>97</b>
<b>II. 2.1 Photofrin II</b>	<b>98</b>
<b>II. 2.2 Verteporfin</b>	<b>100</b>
<b>II. 2.3 Merocianina 540</b>	<b>102</b>
<b>II. 2.4. Naranja de Acridina</b>	<b>104</b>
<b>II. 2.5 m-THPC</b>	<b>106</b>
<b>II. 2.6 Clorina e6</b>	<b>108</b>
<b>II. 3. Experimentos de localización subcelular de FSs</b>	<b>110</b>
<b>II. 4 Morfología celular</b>	<b>113</b>

<b>II. 5. Ensayos de inmunofluorescencia</b>	<b>114</b>
<b>II. 6. Expresión por Westernblot de E-cadherina, vinculina, actina, <math>\beta</math>1 y <math>\beta</math>3 integrina, MDR y survivina en células HB4a y HB4a-Ras</b>	<b>116</b>
<b>II. 7 Ensayo de adhesión celular a proteínas de MEC</b>	<b>117</b>
<b>II. 9 Ensayos de TFD con células en suspensión</b>	<b>118</b>
<b>II. 10 Discusión</b>	<b>120</b>
<b>II.11 Conclusión</b>	<b>124</b>
<b>III. Cambios en la distribución de actina y E-cadherina inducidos por la TFD a partir de ALA</b>	<b>126</b>
<b>III.1 Morfología celular luego de distintos tiempos de ALA-TFD en células HB4a y HB4a-Ras</b>	<b>126</b>
<b>III.2 Cambios en la distribución de actina inducidos por ALA-TFD</b>	<b>129</b>
<b>III.3 Cambios en la distribución de E-cadherina inducidos por ALA-TFD</b>	<b>131</b>
<b>III.4 Discusión</b>	<b>133</b>
<b>III. 5 Conclusión</b>	<b>135</b>
<b>IV. Terapia Fotodinámica mediada por ALA en las células HMEC-1</b>	<b>136</b>
<b>IV.1. Síntesis de porfirinas a partir de ALA en células HMEC-1</b>	<b>136</b>
<b>IV. 2. Tratamiento fotodinámico a partir de ALA en células HMEC-1</b>	<b>138</b>
<b>IV.3. Comparación de síntesis de porfirinas y respuesta a ALA-TFD en células HMEC-1 y un panel de distintas líneas celulares</b>	<b>139</b>
<b>III.4. Discusión</b>	<b>141</b>
<b>IV.5 Conclusión</b>	<b>144</b>
<b>V. Terapia Fotodinámica con diversos FSs en células vasculares y no vasculares</b>	
<b>V.1 Toxicidad en oscuridad de los FSs</b>	<b>145</b>
<b>V.2 Cuantificación de FS intracelular acumulado en células HMEC-1 y HaCaT y eficiencia de la TFD</b>	<b>145</b>
<b>V. 2.1 Photofrin II</b>	<b>145</b>
<b>V. 2.2 Verteporfin</b>	<b>148</b>
<b>IV. 2.3 Merocianina 540</b>	<b>150</b>
<b>V. 2.4. Naranja de Acridina</b>	<b>152</b>
<b>V. 2.5 m-THPC</b>	<b>154</b>
<b>V. 2.6 Clorina e6</b>	<b>156</b>
<b>V.3 Comparación de la acumulación intracelular de FS en células HMEC-1, HaCaT, MCF-7 y HB4a-Ras y su relación con la eficiencia de la TFD</b>	<b>158</b>

<b>V.4 Discusión</b>	<b>160</b>
<b>V. 5 Conclusiones</b>	<b>162</b>
<b>VI. Regresión tumoral inducida por TFD con varios fotosensibilizantes y el rol de la vasculatura en la eficiencia de la TFD in vivo</b>	<b>164</b>
<b>VI.1 Regresión tumoral inducida por la TFD con Photofrin. Verteporfin y m-THPC.</b>	<b>164</b>
<b>VI.2 Análisis histológicos de los tumores tratados con TFD: daño vascular y tumoral</b>	<b>166</b>
<b>VI.2 Discusión</b>	<b>172</b>
<b>VI. 3 Conclusión</b>	<b>174</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>175</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>186</b>

## ABREVIATURAS

ALA: Acido 5-aminolevúlico.

ALA-TFD: Terapia fotodinámica basada en ALA.

BDP-MA: Verteporfin.

BSA: Seroalbúmina bovina.

CAM-DR: Cell adhesion-mediated drug resistance.

CAM-RR: Cell adhesion-mediated radioresistance.

Ce6: Clorina e6.

DL<sub>50</sub>: Dosis letal 50.

DMRE: Degeneración macular relacionada con la edad.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

FAP: Fotoangioplastía.

FD: Fotodiagnóstico.

Fe-Quel: Ferroquelatasa.

FS: Fotosensibilizante.

FSs: Fotosensibilizantes.

HIF: Factor inducible por hipoxia.

Hp: Hematoporfirina.

HpD: Derivado de Hematoporfirina.

HUVEC: Cultivo de células primarias de endotelio de vena umbilical humana.

i.p.: Intraperitoneal.

i.v. Intravenoso.

MC540: Merocianina 540 (5-[3-sulfopropil-2(3H)-benzoxalidina]-2-buteniliden]-1,2dibutil-2-ácido tiobarbitúrico).

MEC: Matriz extracelular.

m-THPC: tetrahidroxifenil clorina (Foscan®).

NA: Naranja de Acridina.

NVC: Neovascularización coroidea.

MEM: Medio Mínimo Esencial.

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazoly)-2,5-difeniltetrazoliobromuro

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

PII: Photofrin®.

PII-TFD: Terapia Fotodinámica basada en Photofrin.

PBS: Buffer fosfato de sodio.

PBGasa: Protoporfirinógeno oxidasa.

PpIX: Protoporfirina IX.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RPMI 1640: Medio Roswell Park Memorial Institute.

RTK: Receptor tirosina quinasa.

SFB: Suero fetal bovino.

TFD: Terapia Fotodinámica.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

Zn-PC: Zn ftalocianina.

# **INTRODUCCIÓN**

## **I. Terapia fotodinámica del cáncer**

### **I.1. Introducción**

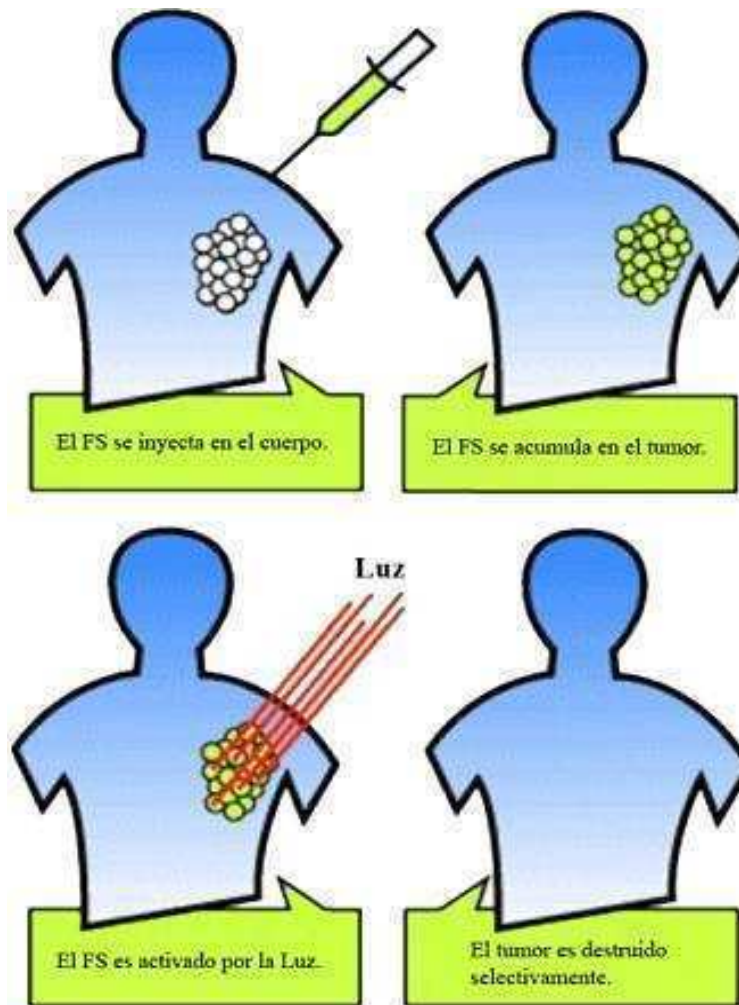
La Terapia Fotodinámica (TFD), es un tratamiento para el cáncer y otras patologías, originado en el descubrimiento de que ciertos tipos de compuestos, llamados agentes fotosensibilizantes (FS), pueden destruir a una célula tumoral cuando ésta es expuesta a la luz.

La combinación de la luz con el FS da lugar a una reacción fotoquímica, mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS), que resultan citotóxicas y destruyen selectivamente las células tumorales (Figura I.1).

Es un tratamiento sumamente prometedor para tumores superficiales o de fácil acceso por vía endoscópica, y se basa en la acumulación preferencial del FS 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 se puede repetir o usar 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 I.1.** Principios básicos de la Terapia Fotodinámica.

## **I.2. Historia de la TFD**

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

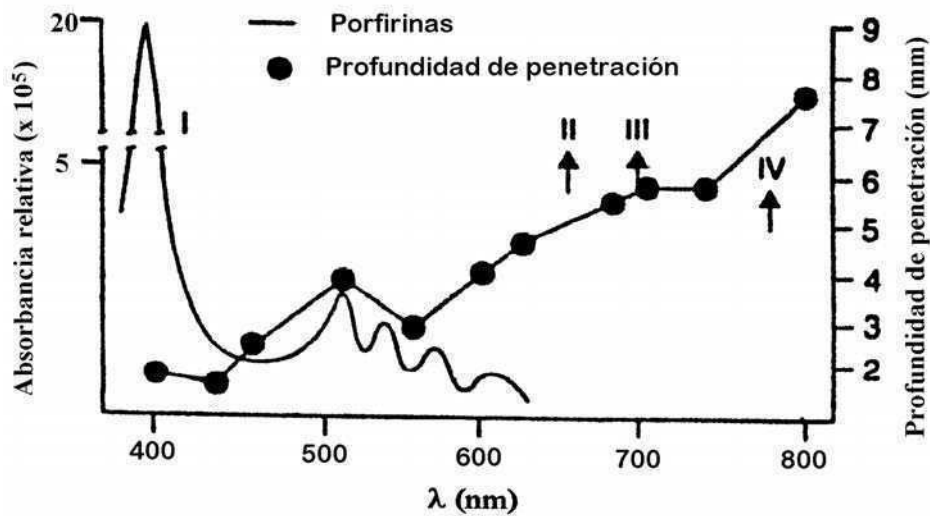
En 1942, Auler y Banzer ya habían observado la particular afinidad del FS Hp por el tejido neoplásico, confirmada más tarde por Figge et al. (1948), quienes describieron la fluorescencia de las porfirinas acumuladas en el tumor cuando se las iluminaba con la lámpara de Wood.

Lipson et al. en 1961 mejoraron la localización tumoral del FS mediante acetilación y posterior reducción de la preparación cruda, obteniendo el derivado de Hematoporfirina (HpD). El hallazgo del HpD como un efectivo FS tumoral y el posterior desarrollo de equipos láser y sistemas ópticos de transmisión de la luz, llevaron a la aplicación 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 luz ultravioleta. Diamond et al. (1972) evaluaron los efectos terapéuticos en gliomas murinos irradiando a longitudes de onda más largas, en tanto que Dougherty et al. (1975) realizaron los primeros estudios de TFD en tumores animales. El primer caso clínico de TFD fue un paciente con cáncer de vejiga, a quien se le administró HpD y se lo sometió a una irradiación transuretral (Kelly & Swell, 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.

### **I.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 FSs, se extiende 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 tales como hemoglobina y melanina, es escasa. Como la penetración de la luz en los tejidos aumenta con longitudes de onda mayores (Van Gemert et al., 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 (Figura I.2).

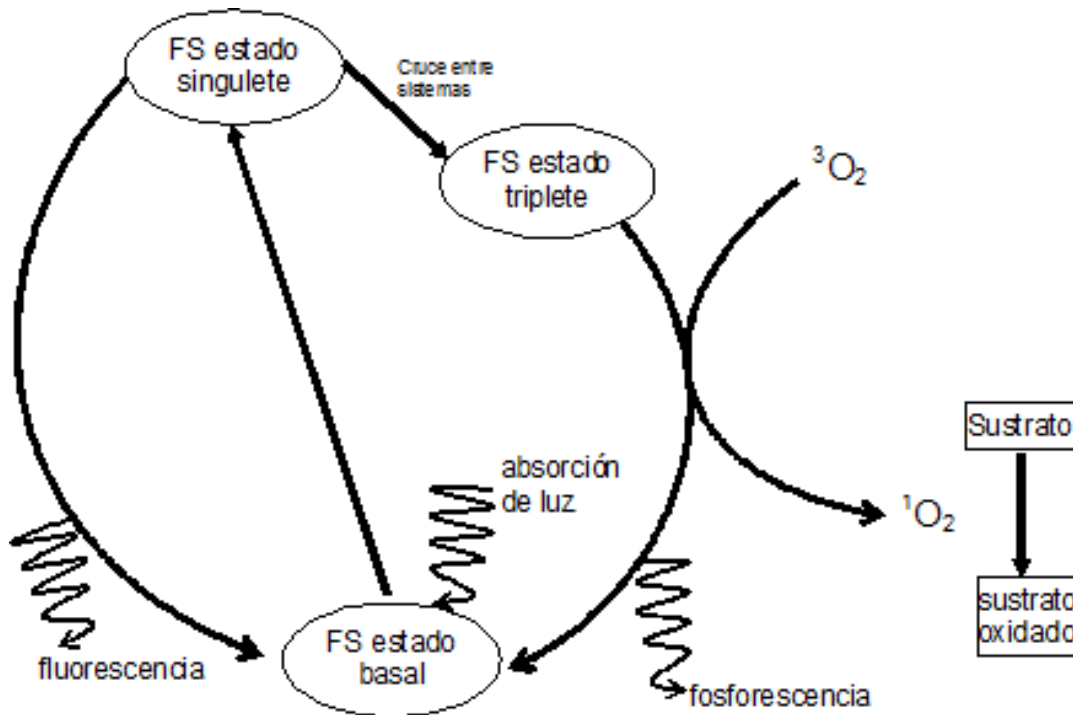


**Figura I.2.** Espectro típico de absorción de las porfirinas y profundidad de penetración en la piel.

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

El efecto inicial de la TFD es la formación de ROS, catalizada por la luz, principalmente el radical oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) a partir del oxígeno disponible en los tejidos (Weishaupt et al., 1976). Esta especie sería la responsable del daño tisular inducido por la TFD. También se observó que la presencia de secuestrantes de oxígeno singulete suprimían los efectos fototóxicos (Valenzano, 1987).

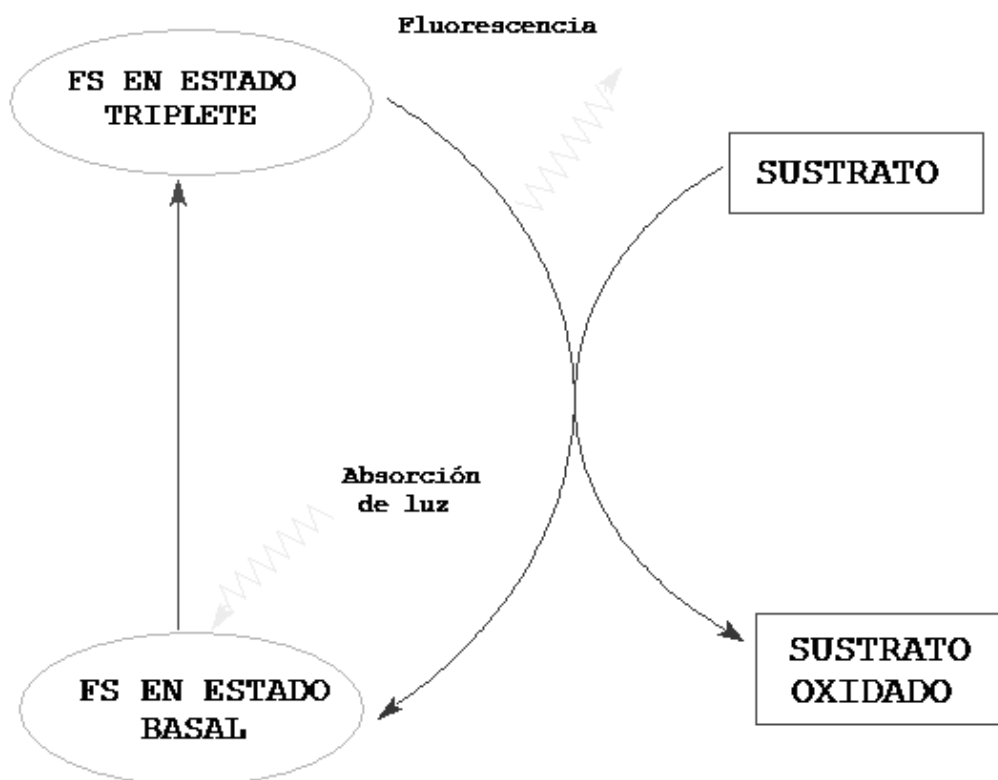
La activación del oxígeno puede ocurrir por dos mecanismos diferentes: la absorción de energía suficiente como para revertir el spin de un electrón desapareado, o por reducción monovalente. Si una molécula de porfirina absorbe un fotón, pasa a un estado de excitación singulete de vida media extremadamente corta. Luego el FS 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 FS 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 FS en estado triplete al oxígeno molecular generando el oxígeno singulete, el cual es altamente reactivo. Este tipo de mecanismo se denomina reacción fotoquímica tipo II (Figura I.3).



**Figura I. 3.** Interacción entre el FS y el oxígeno en la reacción fotoquímica tipo II.

Al absorber la luz el 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 a su vez puede oxidar otras biomoléculas.

Un camino alternativo es que la interacción se dé entre el FS 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 y se denomina reacción fotoquímica tipo I (Buettner & Need, 1985; Van Steveninck et al., 1986; Athar et al., 1989) (Figura I.4).



**Figura I. 4.** Esquema de la reacción fotoquímica alternativa tipo I.

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

#### **I.4. Mecanismos de acumulación de los FSs en los tumores**

Uno de los mayores desafíos de la TFD es aumentar su selectividad por las células tumorales. No se conoce todavía la razón por la cual los FSs se concentran preferentemente en el tejido maligno, aunque se han propuesto diversas teorías que explican los posibles mecanismos o la combinación de éstos que podrían estar actuando sobre cada FS en particular.

En el caso de las porfirinas, la acumulación selectiva podría deberse en parte a la afinidad porfirina/lipoproteína, debilidad de la vasculatura tumoral, drenaje linfático disminuido, receptores de LDL con mucha actividad o una escasa conversión a hemo debida a una baja actividad de la enzima ferroquelatasa en el caso del pro-fotosensibilizante ALA (Wilson et al., 1991). Existe también 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). De esta manera las porfirinas entrarían junto con las lipoproteínas a la célula, así como también se incorporarían FS hidrofóbicos o vehiculizados en liposomas (Chen et. al., 2005). También se propuso que el bajo pH intratumoral, producto de la pobre oxigenación sumada a una alta actividad glicolítica, estaría afectando la ionización de algunas porfirinas que aumentan su lipofilicidad a pHs bajos, quedando éstas retenidas en el tumor (Pottier & Kennedy, 1990). Los tumores habitualmente tienen incrementado el número de cuerpos lipídicos, en particular de micelas neutras, además de contar con membranas celulares más hidrofóbicas que las de las células normales. Ambos fenómenos podrían también explicar la acumulación de los FSs hidrofóbicos en este tipo de células (Freitas, 1990). La debilidad de la vasculatura tumoral, unida a un drenaje linfático disminuido favorecería asimismo la formación de agregados de porfirinas o complejos con proteínas en el espacio intersticial (Bugleski et al., 1981).

### **I.5. Sitios subcelulares blancos de la TFD**

Existen diversos blancos celulares de daño fotodinámico y estos dependen principalmente de la naturaleza química del FS empleado, de la concentración, tiempo de exposición, vehículo y dosis lumínica. Según las características de los FSs, éstos presentan distinta localización subcelular. Estos sitios de acción pueden ser biomoléculas o bien organelas como las mitocondrias, los microsomas, los lisosomas, el núcleo y el retículo endoplasmático (Moan et al., 1989; Jori, 1990).

Hay amplio consenso en señalar las membranas celulares como uno de los sitios principales de daño (Girotti, 1990; Chapman et al., 1991). La reacción de los ROS con los lípidos poliinsaturados es una de las 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 esta hipótesis. Las proteínas así modificadas serían más susceptibles a la proteólisis (Prinsze et al., 1990; Farr & Kogoma, 1991).

Es sabido que el oxígeno singulete y otras ROS conducen a la peroxidación lipídica y daños en la membrana citoplasmática, ADN, estructuras del citoesqueleto, etc. (Moan et al., 1992). Pero el mecanismo final de la muerte celular puede deberse tanto a la necrosis como a la apoptosis, dependiendo del FS utilizado, la concentración, el tiempo de

exposición, la dosis de luz, la fuente de luz y el tipo celular (He et al., 1994; Dellinger et al., 1996; Noodt et al., 1996; Miyamoto et al., 1999). Se conoce que los FSs que se localizan en mitocondrias o lisosomas son altamente efectivos, ya sea desencadenando respuesta necrótica o apoptótica (Stockert et al., 2004).

Además, mecanismos de apoptosis y autofagia, ocurren luego de la TFD. La autofagia está asociada con el aumento de la supervivencia a bajos niveles del fotodaño en muchas células, sirviendo como una respuesta de pro-supervivencia en la vía de reciclado al daño de organelas (Kessel et al., 2009). La autofagia ofrece protección de los efectos fototóxicos en bajas dosis de TFD, pero puede servir como modelo de muerte alternativa cuando la dosis de TFD aumenta (Kessel et al., 2007; 2010).

Dentro de los FSs, los derivados de las porfirinas suelen presentar una localización preferentemente mitocondrial, aunque esto varía en función del tipo celular y el tiempo de exposición. En cambio, otras estructuras tales como la merocianina se localizan preferentemente en membranas celulares, mientras que la naranja de Acridina se localiza en núcleo, mitocondrias y lisosomas. Sin embargo, aún no existen trabajos que documenten las diferencias subcelulares de ubicación de dichos compuestos entre células tumorales y normales.

## **I.6. Fotosensibilizantes de uso común en TFD**

Hay un gran número de FSs en distintas fases de investigación clínica, y principalmente se trata de estructuras que contienen anillos tetrapirrólicos tales como los derivados de porfirinas, ftalocianinas, texafirina y clorinas. Porfircenos, colorantes, y otras entidades también han sido empleadas en TFD.

**Tabla I.1:** Fotosensibilizantes de uso comercial en TFD.

COMPUESTO	DROGA	SUSTANCIA	EMPRESA	SITIO WEB
Porfirina	Photofrin®	HpD	Axcan Pharma, Inc.	<a href="http://www.axcan.com">www.axcan.com</a>
Porfirina	Levulan®	ALA	DUSA Pharmaceuticals, Inc.	<a href="http://www.dusapharma.com">www.dusapharma.com</a>
Porfirina	Metvix®	Me-ALA	Photocure ASA	<a href="http://www.metvix.com">www.metvix.com</a>
Porfirina	Visudyne®	Vertiporfin	Novartis Pharmaceuticals	<a href="http://www.visudyne.com">www.visudyne.com</a>
Texafirina	Antrin®	Lutexafirina	Pharmacylics	<a href="http://www.pharmacylics.com">www.pharmacylics.com</a>
Clorina	Foscan®	Temoporfirina	Biolitec Pharma Ltd.	<a href="http://www.bioletcpharma.com">www.bioletcpharma.com</a>
Clorina	LS11	Talaporfina	Light Science	<a href="http://www.lightsciences.com">www.lightsciences.com</a>
Clorina	Photochlor	HPPH	RPCI	<a href="http://www.roswellpark.org">www.roswellpark.org</a>
Colorante	Photosens®	ftalocianina	General Physics Institute	<a href="http://www.gpi.ru">www.gpi.ru</a>

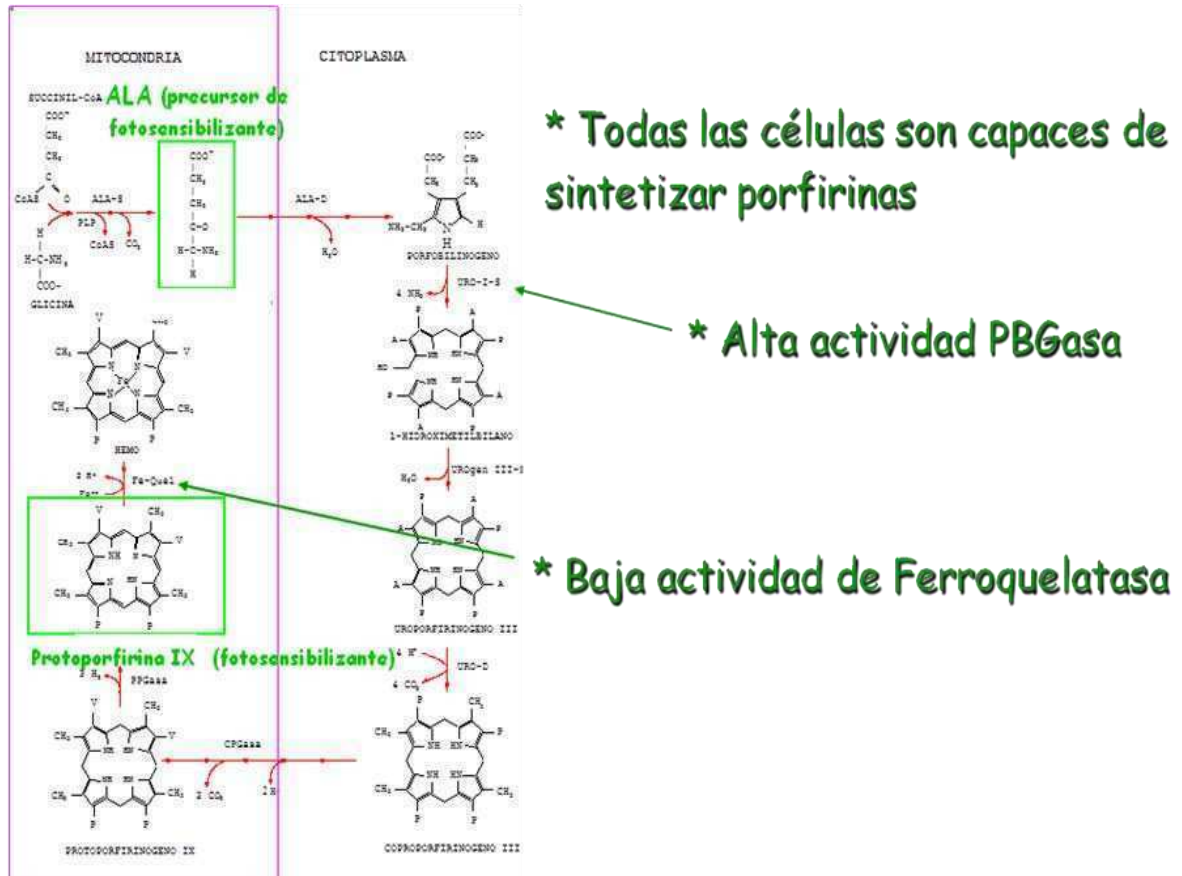
### I. 6.1 Precursores de FSs

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es la pro-droga que induce la síntesis del FS Protoporfirina IX (PpIX). Luego de la administración de ALA, las células tumorales generan PpIX a través del camino biosintético del hemo.

La idea consiste en “by-pasear” la enzima limitante del camino del hemo, el ALA-sintetasa, mediante la administración de un exceso de su producto, el ALA, lo cual conduce a la acumulación de porfirinas, en particular PpIX (Figura I.5) en las células malignas (Battle et al., 1975; Malik y Lugaci, 1987; Navone et al., 1988; Fukuda et al., 1989; Fukuda et al., 1990; Navone et al., 1990 a, 1990 b, 1990 c; Kennedy et al., 1990) .

La TFD basada en ALA (ALA-TFD) se centra en tres importantes hechos: a) todas las células poseen la capacidad de formar porfirinas a partir de precursores del hemo, b) en tejidos malignos y en regeneración, se ha encontrado disminuida la actividad de la enzima ferroquelatasa, c) en estas mismas células se ha hallado que la actividad de la porfobilinogenasa (PBGasa) está aumentada (Leivovici et al., 1988; Schoenfeld et al., 1988; Navone et al., 1990; El-Sharabasy et al., 1992; Rubino & Rasetti, 1996).





**Figura I.5.** Mecanismo de selectividad de la PpIX en tumores.

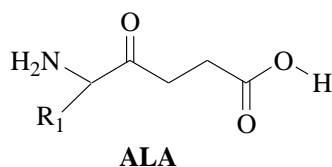
Además de la selectividad, la ventaja que presenta la fotosensibilización endógena con ALA es que la PpIX tiene una estructura molecular definida, con un máximo de absorción en la zona roja del espectro en los 630 nm (Pottier et al., 1986). Otra ventaja del uso terapéutico del ALA es la corta vida media de los efectos fotosensibilizantes de la PpIX comparada con otros compuestos, que no se prolongan por no más de 48 horas (Kennedy et al., 1990; Fukuda et al., 1992a).

En 1999, la FDA y la ANMAT aprobaron el ALA bajo el nombre comercial Levulan para el tratamiento de la queratosis actínica en cara y cuero cabelludo utilizando una fuente de luz policromática (Ormrod & Jarvisl, 2000; Szeimies & Laudthaler, 2002).

A causa de su baja lipofilicidad (Figura I.6), el ALA difunde lentamente a través de las membranas celulares (Gaullier et al., 1997). Por lo tanto, se debe aplicar una gran cantidad de ALA en la piel para asegurar una acumulación adecuada en el tejido a tratar. Con el objetivo de aumentar su tasa de difusión, se han desarrollado derivados del ALA que poseen mayor lipofilicidad, como por ejemplo los derivados metil-ALA y hexil-ALA.

La prodroga derivada del ALA entra más rápidamente a las células y es hidrolizada enzimáticamente a ALA, conduciendo a la formación de PpIX (Vena et al., 2004). Además, el ALA y sus derivados pueden aplicarse para el fotodiagnóstico de tumores (mediante fluorescencia), aumentando la sensibilidad de detección respecto a las técnicas diagnósticas convencionales (Gilaberte et al., 2006).

El derivado metil ALA formulado en crema, Metvix®, está autorizado y comercializado en Europa, Australia, Nueva Zelanda y Brasil para el tratamiento de carcinoma basocelular superficial y nodular y queratosis actínicas pequeñas y no pigmentadas y la enfermedad de Bowen (Szeimies et al., 2007). El hexil ALA está actualmente en proceso de autorización para diagnóstico temprano de cáncer de vejiga.



**Figura I.6.** Estructura química del ALA

## I.6.2 Porfirinas

### I.6.2.1 Photofrin II

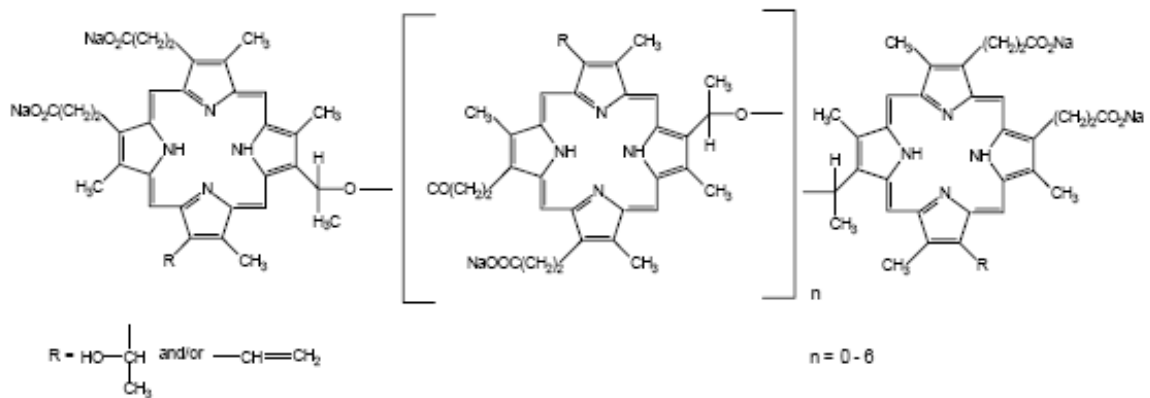
Es una mezcla de oligómeros formados por uniones éter o éster sumando hasta 8 porfirinas (Figura I.7). Esta mezcla tiene una pobre absorción en la región roja del espectro de luz (longitudes de onda mayores a 600 nm), a las cuales la penetración de la luz en los tejidos es mayor.

Photofrin II ® (PII) fue el primer FS aprobado para su uso en pacientes, como curativo en estadios tempranos de cáncer o como paliativo en estadios avanzados (Dougherty, 1987).

PII fue aprobado para TFD por la ANMAT en los siguientes casos:

- **Cáncer de Pulmón endobronquial a células no pequeñas** (estadio temprano).
- **Cáncer de Pulmón endobronquial a células no pequeñas** (estadio avanzado obstructivo).
- **Cáncer de Esófago obstructivo.**
- **Esófago de Barret.**

• **Cáncer Papilar de Vejiga** (2da línea).



**Figura I.7.** Estructura química del Photofrin

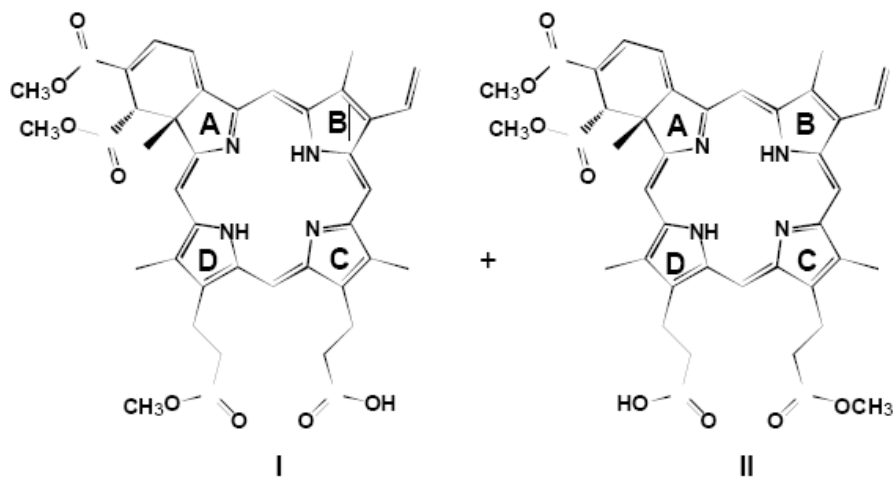
### I.6.2.2 Verteporfin

Entre los FSs de segunda generación se encuentran los derivados benzoilados de las porfirinas, Verteporfin o BPD-MA (Benzoporfirina derivado, anillo A monoácido), un derivado porfirínico muy usado en la clínica.

Verteporfin es una mezcla 1:1 de dos regioisómeros (I y II) (Figura I.8). Estas moléculas poseen fuertes picos de absorción entre 650 y 700 nm, con un máximo de absorción en 690 nm, y poseen a la vez características hidrofóbicas e hidrofílicas.

La formulación comercial liposomal de Verteporfin es el Visudyne®, el cual fue lanzado al mercado para el uso de la TFD en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (Verteporfin Round Table Participants, 2005). También se ha practicado la ablación endometrial (Wyss et al., 1994) con TFD empleando Verteporfin.

En la TFD del cáncer, Verteporfin ha sido empleado en el tratamiento de cáncer de próstata (Momma et al., 1998), y en modelos experimentales de rhabdomiosarcomas (Davis et al., 1993) y melanomas (Buseti et al., 1999), siendo este último particularmente importante considerando la escasa respuesta de estas lesiones pigmentadas a los FSs empleados hasta el momento, debido a la absorbancia de la melanina a las longitudes de onda de irradiación.



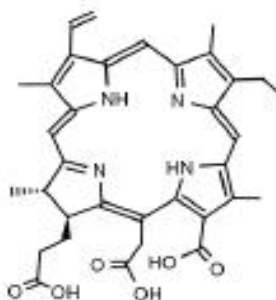
**Figura I.8.** Estructura química de Verteporfin.

### I.6.3 Clorinas

Existe un gran interés en identificar nuevos FSs que absorban luz a longitudes de onda más largas que el PII. La mayor parte de este interés se ha dirigido hacia las clorinas (porfirinas reducidas), que absorben fuertemente en la región roja del espectro visible entre 640-700 nm, dependiendo de los sustituyentes del macrociclo (Spikes, 1990).

#### I.6.3.1 Clorina e6

La Clorina e6 (Ce6) deriva de la clorofila a (Figura I.9), y se sabe que en ciertos tipos celulares, se une a sitios difusos del citoplasma fuera de las organelas o en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Merlin, 2003). Al ser inyectada en ratones portadores de tumor, Ce6 induce una alta relación de FS tumor/piel, lo cual es un indicador de alta selectividad (Kostenich et al., 1994).

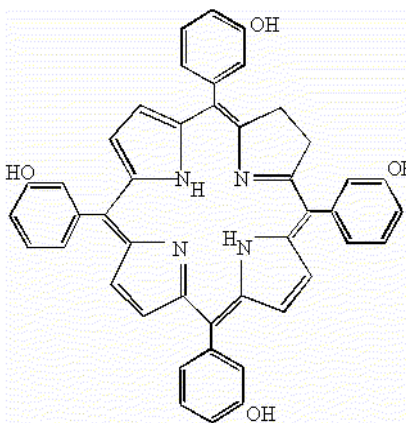


**Figura I.9.** Estructura química de Clorina e6

### I.6.3.2 m-THPC

El derivado más difundido de las clorinas, la tetrahidroxifenil clorina (m-THPC) difiere de las porfirinas sólo en la presencia de un centro de saturación (Figura I.10), y esto resulta en un aumento de la selectividad y la acción fotodinámica (Berenbaum et al., 1986). Su absorción máxima es a 652 nm.

Foscan® es el nombre comercial de m-THPC, y se ha usado exitosamente y aprobado por la ANMAT para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello avanzados (Brown et al., 2004).



**Figura I.10.** Estructura química del m-THPC.

### I.6.4 Colorantes

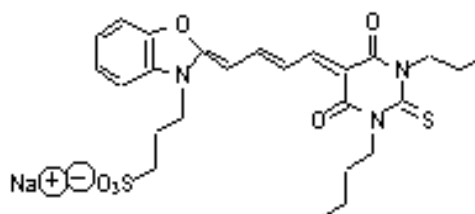
Entre los FSs no porfirínicos, existen algunos colorantes que han sido usados en TFD con cierta eficacia.

#### I.6.4.1 Merocianinas

La Merocianina 540 (MC540) (5-[3-sulfopropil-2(3H)-benzoxalidina)-2-buteniliden]-1,2-dibutil-2-ácido tiobarbitúrico) (Figura I.11) es un cromóforo hetetocíclico cargado negativamente.

Es útil especialmente para el tratamiento de leucemias así como para la inactivación de virus (Sieber, 1987). MC540 media una fotólisis eficaz contra una amplia gama de leucemias y tumores sólidos, y aunque se usa en la clínica, su mecanismo de

acción aún no es del todo conocido. En contraste con otros FSs, se ha reportado que MC540 entra a la célula pero se acumula en sus membranas. Los lípidos de la membrana son considerados el blanco del fotodaño dirigido por el oxígeno singulete. Su corta longitud de onda de absorción limita su uso a tumores superficiales (Diwu & Lown, 1994).

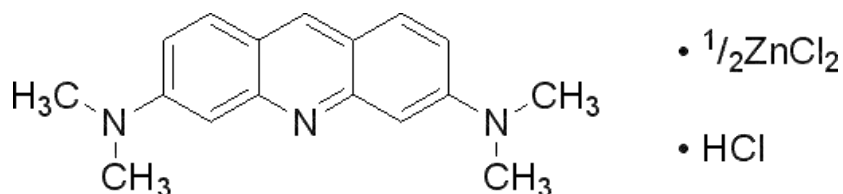


**Figura I.11:** Estructura química de la Merocianina 540

#### I.6.4.2 Naranja de Acridina

Entre los colorantes, la naranja de Acridina (NA) es un colorante catiónico fluorescente que interactúa con el ADN y el ARN, intercalándose o por atracción electrostática. Las aminoacridinas derivadas de la NA fueron usadas hace mucho tiempo como sondas fluorescentes y su blanco celular depende de su estructura (Wainwright et al., 1998). La proflavina, es una excelente sonda para ácidos nucleicos, mientras que su bis-dimetilamino análogo (Figura I.12) se acumula en los lisosomas en función del gradiente de pH (de Duve et al., 1974). La fotoinactivación que se ha visto en levaduras y células de mamíferos por NA se relaciona con el fotodaño al ADN y ARN (Diwu y Lown, 1994).

Cuando se une al ADN, tiene un espectro muy similar a la fluoresceína, con un máximo de excitación de 502 nm y un máximo de emisión de 525 nm (verde). Cuando está asociado a ARN el máximo de excitación es de 406 nm (azul) y el máximo de emisión es de 650 nm (rojo).



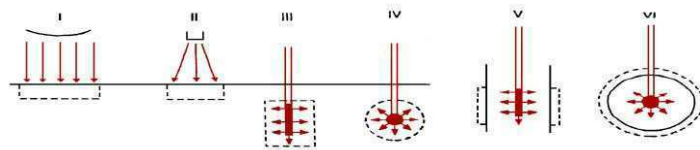
**Figura I.12.** Estructura química de naranja de Acridina

## I.7. Fuentes de luz de uso en TFD

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

El advenimiento de los láseres combinados con las fibras ópticas amplió el rango de aplicaciones de la TFD, ya que la luz de una longitud de onda acotada adecuadamente con una potencia de salida definida puede aplicarse prácticamente en cualquier sitio del cuerpo ya sea intersticial o endoscópicamente (Figura I.13).

- Fuentes de luz no coherentes: lámparas (baja potencia y amplio espectro de  $\lambda$ ).
- Fuentes de luz coherentes: láseres (alta potencia y  $\lambda$  única).



**Figura I.13.** Sistemas de aplicación de luz en TFD.

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

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

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

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

Una alternativa prometedora es la que se emplea en la actualidad, que es la tecnología de láseres diiodo que emiten a una longitud de 630 nm, que son más económicos, más pequeños y fácilmente transportables (Wilson, 1989).

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

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

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

La salida de la fibra puede hacerse isotrópica introduciendo en la punta una esfera o cilindro de algún material que disperse la luz (Arnfield et al., 1986). Las fibras ópticas múltiples son adecuadas para el tratamiento de grandes volúmenes de tejido (Marijnissen et al., 1992).

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

## **I.8. Aplicaciones de la TFD**

### **I.8.1 TFD en el tratamiento del cáncer**

Los usos principales de la TFD incluyen principalmente los tumores superficiales y los de fácil acceso por vía endoscópica. Aunque el desarrollo de fibras ópticas intersticiales permite la irradiación de tumores sólidos de difícil acceso, se puede decir que hoy en día hay pocos tumores que no hayan sido tratados con TFD.

En el tratamiento de tumores dermatológicos, la TFD ha sido usada en carcinomas de células basales, enfermedad de Bowen, melanoma no melanótico, linfomas cutáneos de células T, carcinomas de células escamosas, sarcomas de Kaposi, metástasis dérmicas de carcinoma mamario y carcinomas basocelulares (Tomio et al., 1984; Calzavara-Pinton, 1995).



Además, tumores como los de pulmón, vejiga, cavidad oral, esófago, endometrio, mama y cerebro han sido recientemente tratados con éxito con TFD empleando sistemas de fibras ópticas para llevar a cabo la iluminación (Grant et al., 1993; Gossner et al., 1998; Jichlinski et al., 2001; Kelly et al., 2002).

Aparte de su uso para el tratamiento de tumores sólidos, la TFD también se emplea como purga ex-vivo de células tumorales remanentes en médula ósea antes del autotransplante y en el tratamiento hematológico de linfomas de células T (Greibenová et al., 1998). También se ha empleado la TFD para el tratamiento de carcinomatosis peritoneales y para esterilización de la zona peritumoral en la TFD intraoperatoria (Molpus et al., 1996; Momma et al., 1998; Ris et al., 2005).

La Tabla I.2 resume una gran parte de los estudios clínicos actuales que se encuentran en distintas fases para el uso de la TFD en diferentes tumores.

**Tabla I.2:** Tumores tratados con TFD en estudios clínicos en la actualidad

- ◆ Carcinoma de células escamosas
- ◆ Linfoma cutáneo de células T
- ◆ Sarcoma de Kaposi
- ◆ Neoplasia intraepitelial cervical y vaginal
- ◆ Cáncer gastrointestinal no avanzado: estómago y esófago.
- ◆ Cáncer de ducto biliar
- ◆ Recurrencias de cáncer de próstata
- ◆ Cáncer no operable de páncreas.
- ◆ Glioblastomas y astrocitomas
- ◆ Tumores oculares
- ◆ Mesoteliomas

### **I.8.2 Fotodetección**

Uno de los aspectos más interesantes del uso de los FSs es el aprovechamiento de su fluorescencia intrínseca para la detección de tumores tales como los de vejiga, esófago y bronquios en el Fotodiagnóstico (FD) (Ackroyd et al., 2001; Fotinos et al., 2006). El uso de la fotodetección intraoperatoria con posterior remoción quirúrgica o fotodinámica de la masa tumoral, promete también mejorar sensiblemente la calidad de vida en pacientes con

tumores cerebrales (Ishihara, 2007). También se empleó diagnóstico fotodinámico para determinar los márgenes quirúrgicos en cáncer de mama (Ladner et al., 2001).

### **I.8.3 Otras aplicaciones no oncológicas de la TFD**

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

La TFD se usa como terapia antimicrobiana, incluyendo el tratamiento de úlceras crónicas, quemaduras infectadas (Jori et al., 2006), y una variedad de infecciones orales (Demidova et al., 2004). Una ventaja clave en la clínica de la TFD de las lesiones cutáneas es la buena curación y el excelente resultado cosmético post-tratamiento. Además las leishmaniasis cutáneas han sido recientemente tratadas con éxito con TFD (van der Snoek et al., 2008).

La ventaja de la TFD es que se puede usar en caso de resistencias a antibióticos (Bertolini et al., 1984; Nitzan et al., 1987; Wilson & Pratten, 1994). También se han desarrollado técnicas ópticas empleando FS en el monitoreo de infecciones (Hamblin et al., 2003).

Además la TFD de componentes celulares de la sangre se está estudiando para su uso como técnica de esterilización reduciendo el riesgo de transmisión de enfermedades por transfusión (Ben-Hur et al., 1996; Lin et al., 1997).

Enfermedades con componentes de autoinmunidad tales como la artritis inflamatoria (Chowdhary et al., 1998), encefalomiелitis autoinmune (Leong et al., 1996) y psoriasis (Senior et al., 1998) también han sido tratadas con esta terapia.

Otro de los usos emergentes de la TFD es la denominada Fotoangioplastia (FAP), que consiste en la TFD de lesiones ateroscleróticas y, potencialmente, restenóticas (Rockson, 2000, Chou, 2002). Para ello se han empleado hasta el momento FSs de segunda generación y la irradiación de las zonas afectadas se lleva a cabo mediante sistemas de fibras ópticas.

El FS Verteporfn ha sido empleado en la TFD de lesiones oftalmológicas tales como la neovascularización coroidea (NVC) secundaria a la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), lesiones NVC subfoveales ocultas, NVC por miopía

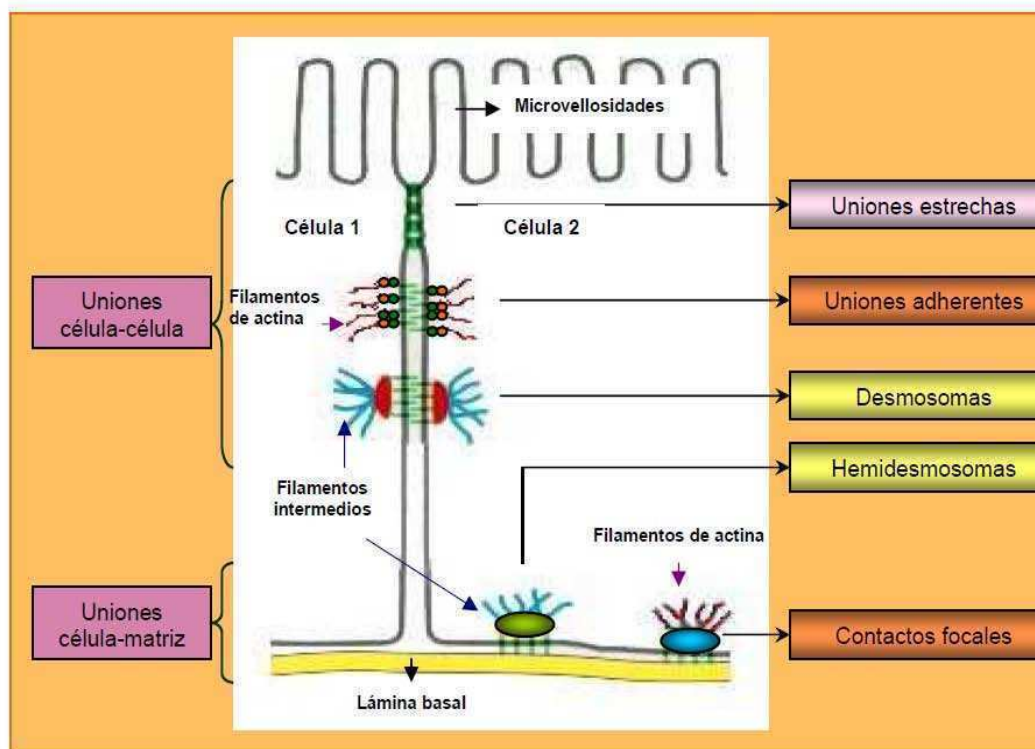
patológica, por histoplasmosis ocular y por causas idiopáticas. Además lesiones no NVC tales como melanomas coroidales (Young et al., 1996) y hemangiomas coroidales (Barbazetto et al., 2000) se han tratado con éxito.

## II. Matriz extracelular, adhesión celular y citoesqueleto

### II.1. Adhesión celular

Las uniones celulares se encuentran en todos los tejidos, siendo especialmente abundantes en el tejido epitelial (Figura II.1)

En los puntos de contacto célula-célula y célula-matriz extracelular, las uniones celulares son modificaciones especializadas de la membrana plasmática. Se encuentran constituidas por proteínas transmembrana que se unen, a través de proteínas adaptadoras, al citoesqueleto (Lodish et al., 2008).

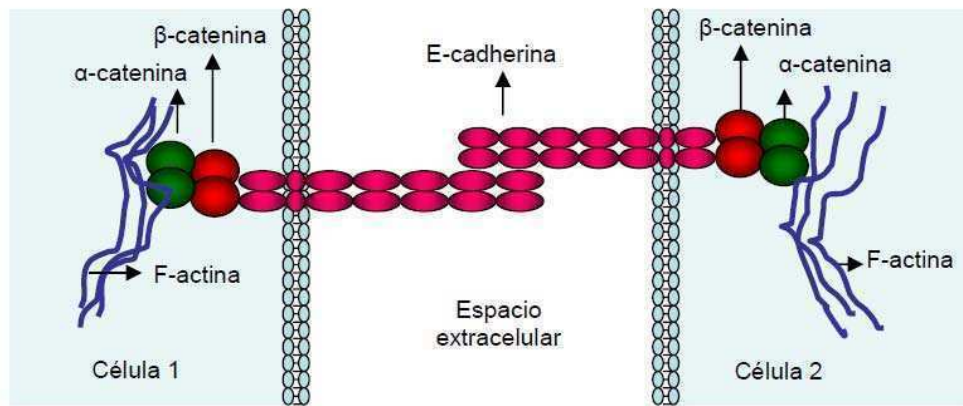


**Figura II.1.** Principales tipos de uniones celulares que conectan las células epiteliales del intestino.

#### II.1.1 Uniones adherentes

Las uniones adherentes se establecen entre células adyacentes para poner en contacto sus citoesqueletos y así conferir resistencia mecánica al tejido. Son contactos

puntuales o lineales dispuestos alrededor de las célula (Nagafuchi, 2001). En la Figura II.2 se esquematiza una unión adherente.



**Figura II.2.** Representación esquemática de una unión adherente.

### II.1.1.1 Las cadherinas

Las cadherinas median la adhesión célula-célula en todos los tejidos sólidos del cuerpo. La adhesividad de las cadherinas depende de la presencia de calcio extracelular, la propiedad que da origen a su nombre (adherencia de calcio). Se caracterizan por ser glicoproteínas de 750-900 aminoácidos con un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático y uno extracelular. Las cadherinas de una célula forman dímeros paralelos, los cuales establecen uniones con los dímeros de cadherina de células vecinas.

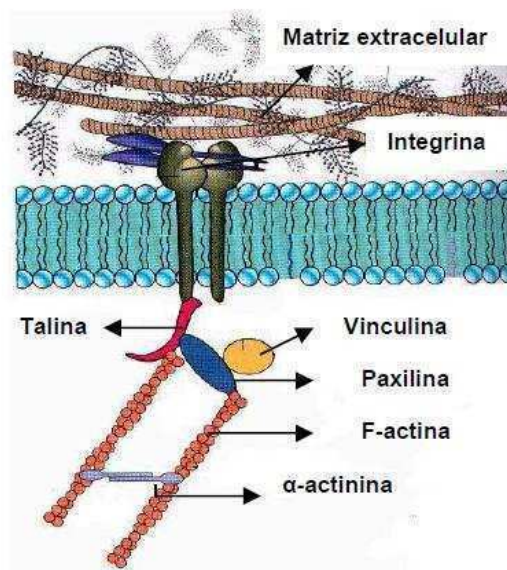
La E-cadherina es la cadherina mejor caracterizada y la primera en ser descrita. Se concentra en las uniones adherentes de las células epiteliales maduras. Su dominio citoplasmático, contiene el lugar de unión a la proteína adaptadora β-catenina, con la que interacciona en proporción 1:1. La β-catenina, a su vez, actúa de puente entre la E-cadherina y la α-catenina. La α-catenina interacciona con componentes del citoesqueleto como la actina y la α-actinina (Nagafuchi, 2001).

La regulación de la expresión de la E-cadherina es un proceso controlado que se lleva a cabo durante el desarrollo, la formación de tejidos y la organogénesis. Sin embargo, la regulación de su expresión también juega un rol esencial en procesos patológicos, tales como la progresión tumoral. La pérdida de expresión o de la función de esta proteína es un evento importante para la invasión de células epiteliales tumorales. Los mecanismos moleculares involucrados en la disminución de la expresión de esta proteína

durante la progresión tumoral incluyen cambios genéticos, epigenéticos y transcripcionales. Se han encontrado alteraciones en el locus de E-cadherina en carcinomas de mama y carcinomas gástricos. Los procesos epigenéticos incluyen la hipermetilación del promotor de E-cadherina. La sobreexpresión de represores transcripcionales de E-cadherina, pertenecientes a la familia Snail, podría actuar como inductora del proceso de invasión (Peinado et al., 2004).

### II.1.2 Contactos focales

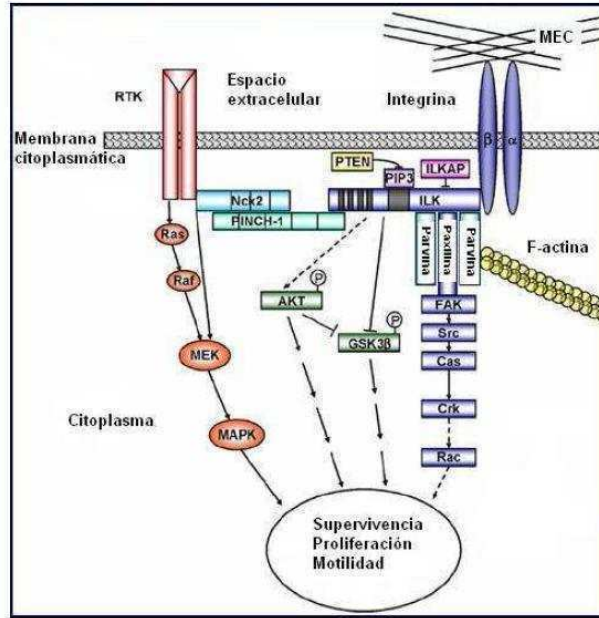
Los contactos focales facilitan las interacciones célula-matriz. Por medio de este tipo de unión, los filamentos de actina del citoesqueleto pueden conectarse a los componentes de la matriz extracelular (Figura II.3). Consisten de integrinas y adaptadores asociados a integrinas, tales como talina, paxilina y vinculina (Hehlgans et al., 2007).



**Figura II.3.** Esquema de un contacto focal.

Además de sus funciones puramente estructurales, las integrinas median señales desde el espacio extracelular al interior de las células a través de las moléculas señalizadoras FAK, ILK, PINCH y Nck2 (Figura II.4). Por vía de estas moléculas, las integrinas interaccionan cercanamente y cooperativamente con el receptor tirosina quinasa (RTK) para regular la adhesión, supervivencia, proliferación, forma celular, polaridad, migración y diferenciación (Watt, 2002) Se encontró que en células tumorales de diversos orígenes (tales como mama, colon o piel) la función y regulación de dichas proteínas es

parcialmente alterada y así puede contribuir al fenotipo maligno y a la resistencia multidroga innata y adquirida. Una variedad de opciones terapéuticas tienen en cuenta la influencia de las integrinas en el crecimiento de las células tumorales, en la metástasis y la resistencia e incluyen inhibidores de quinasas, anticuerpos anti-integrinas o ARN de interferencia (Alghisi et al., 2006; Hehlhans et al., 2007).



**Figura II.4.** Cascada de señalización en una adhesión focal. MEC: Matriz extracelular. RTK: Receptor tirosina quinasa

### II.1.2.1 Integrinas

Las moléculas de adhesión celular de la familia de las integrinas consisten de 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ , las cuales forman 24 heterodímeros  $\alpha\beta$  conocidos, dependiendo del tipo celular y la función celular. Cada subunidad de integrina tiene un dominio extracelular grande, uno de transmembrana corto y uno intracelular pequeño. Como se explicó anteriormente, las integrinas son los receptores principales para las proteínas de la matriz extracelular, tales como el colágeno, la fibronectina y la laminina.

Estos ligandos (Ver tabla II.1), que se unen al dominio extracelular de las integrinas, inducen cambios conformacionales, la activación de cascadas de señales y reclutamiento de complejos multiproteicos a las áreas de adhesión focal (Hehlhans et al., 2007).

**Tabla II.1:** Tabla de ligandos extracelulares que se unen a integrinas (Plow et al., 2000).

<b>Ligando</b>	<b>Integrina</b>
Colágenos	$\alpha_1\beta_1, \alpha_2\beta_1, \alpha_{11}\beta_1, \alpha_{1b}\beta_3$
Colágeno desnaturalizado	$\alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_{11b}\beta_3$
Citotactina/tenascina-C	$\alpha_8\beta_1, \alpha_9\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_6$
Decorsina	$\alpha_{11b}\beta_3$
Desintegrinas	$\alpha_v\beta_3, \alpha_{11b}\beta_3$
E-cadherina	$\alpha_E\beta_7$
Epiligrina	$\alpha_3\beta_1$
Fibronectina	$\alpha_2\beta_1, \alpha_3\beta_1, \alpha_4\beta_1, \alpha_4\beta_7, \alpha_5\beta_1, \alpha_8\beta_1, \alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5, \alpha_v\beta_8, \alpha_{11b}\beta_3$
Fibrinógeno	$\alpha_5\beta_1, \alpha_M\beta_2, \alpha_v\beta_3, \alpha_x\beta_2, \alpha_{11b}\beta_3$
ICAM-1	$\alpha_L\beta_2, \alpha_M\beta_2$
ICAM-2,3,4,5	$\alpha_L\beta_2$
Invasina	$\alpha_3\beta_1, \alpha_4\beta_1, \alpha_5\beta_1, \alpha_6\beta_1$
Laminina	$\alpha_1\beta_1, \alpha_2\beta_1, \alpha_6\beta_1, \alpha_7\beta_1, \alpha_6\beta_4, \alpha_v\beta_3$
Osteopontina	$\alpha_v\beta_3$
Plasminógeno	$\alpha_{11b}\beta_3$
Protrombina	$\alpha_v\beta_3, \alpha_{11b}\beta_3$
Trombospondina	$\alpha_3\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_{11b}\beta_3$
VCAM-1	$\alpha_4\beta_1, \alpha_4\beta_7$
Vitronectina	$\alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5, \alpha_{11b}\beta_3$

Los cambios en los patrones de expresión de las integrinas afectan de diferente manera a la invasión y la metástasis. Por ejemplo, la sobreexpresión de integrinas  $\alpha_6\beta_4$  fue encontrada en tumores de piel, de cabeza y cuello y podría explicar el aumento de la adhesión de las células tumorales en el proceso de metástasis (Mercurio et al., 2001). Por otro lado, la reducción de los niveles de integrinas promueve la desunión del tumor primario y el crecimiento invasivo. Una expresión reducida de  $\alpha_2, \alpha_3$  y  $\alpha_5$  integrinas se puede encontrar en diferentes carcinomas (Mizejewski, 1999).



### **II.1.2.2 Vinculina**

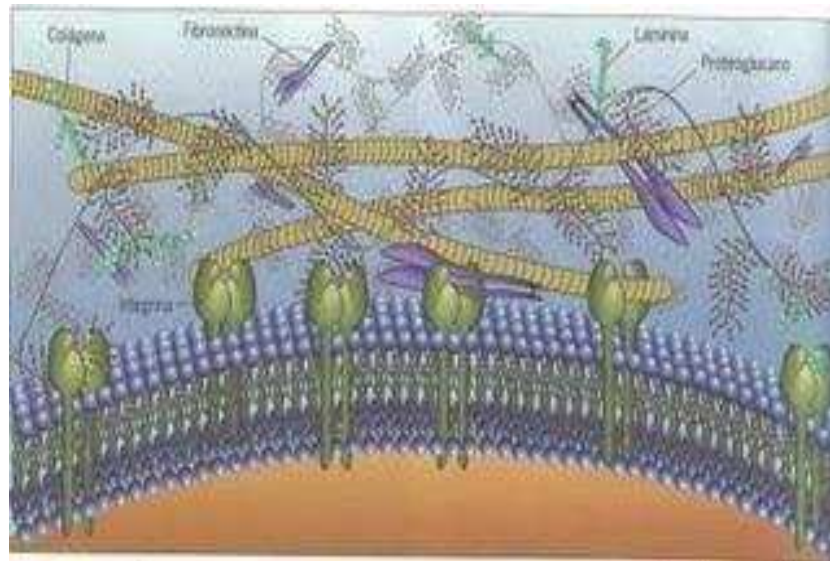
Vinculina es una proteína de 117 KDa que se asocia a las adhesiones focales. Posee un extremo N-terminal ácido y uno C-terminal básico, separados por un segmento medio rico en prolina. En las adhesiones focales, el extremo N-terminal de la vinculina se une a la talina, la cual a su vez se une a las integrinas, y el extremo C-terminal se une a la actina y paxilina. De este modo, el complejo sirve para anclar los filamentos de actina a la membrana.

La expansión y movimiento celular ocurre mediante el proceso de unión entre las integrina y las moléculas de la matriz extracelular. La pérdida de vinculina afecta una variedad de funciones celulares, alterando la formación del complejo y evitando la adhesión. Así, la ausencia de esta proteína demuestra una disminución de la expansión celular, acompañada por la reducción de la formación de fibras de estrés, presencia de pocas adhesiones focales, e inhibición de la formación de lamelipodios. Se ha descubierto que las células deficientes en vinculina tienen conos de crecimiento que avanzan más lentamente, así como filopodios y lamelipodios menos estables (Goldmann et al., 2001).

La adquisición de un fenotipo invasivo o metastático en neoplasias a menudo se correlaciona con una reducida adhesividad celular. Las células cancerosas que no expresan vinculina son altamente metastásicas y móviles (Subauste et al., 2004).

## **II.2 Matriz extracelular**

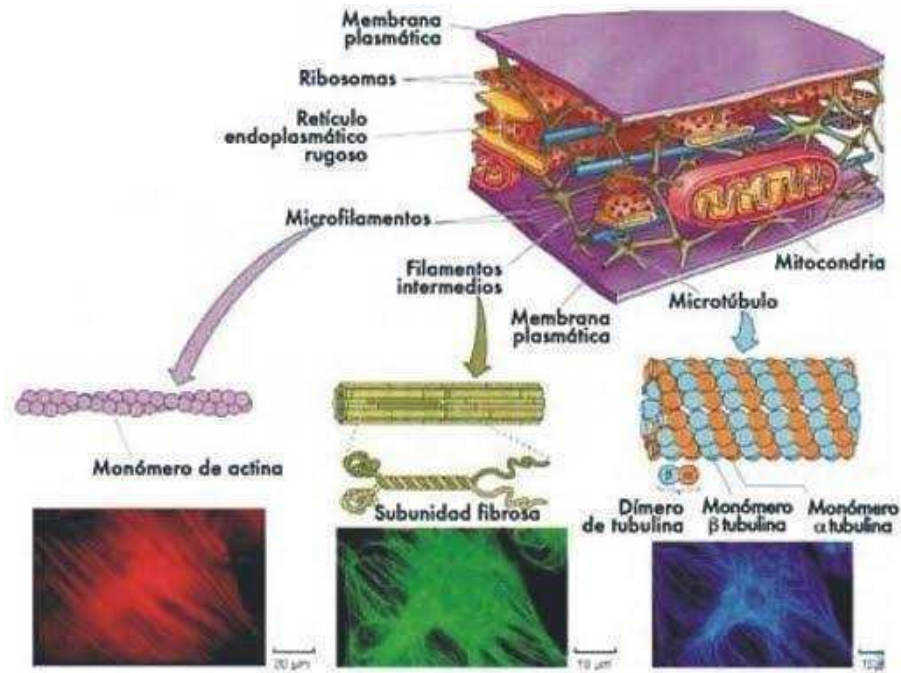
La matriz extracelular (MEC) está compuesta por colágeno, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas no colagenadas tales como fibronectina y laminina (Figura II.5). La MEC forma un complejo, una red tridimensional entre las células de diferentes tejidos de un órgano de manera específica. La MEC es una estructura dinámica que interactúa con las células y genera señales por círculos de retroalimentación para controlar el comportamiento de las células. Así, las macromoléculas de la MEC son bioactivas y modulan acontecimientos celulares como la adhesión, la migración, la proliferación, la diferenciación, y la supervivencia (Järveläinen et al, 2009). La adhesión célula-MEC está regulada por las integrinas.



**Figura II.5.** Esquema de la matriz extracelular

### **II.3 Citoesqueleto**

El citoesqueleto tiene por función estabilizar la estructura de la célula, organizar el citoplasma con todas sus organelas y producir movimiento. Está formado por tres tipos de filamentos proteicos principalmente: actina, microtúbulos y filamentos intermedios (Figura II.6).



**Figura II.6.** Esquema del citoesqueleto.

La actina es una proteína que se asocia espontáneamente entre sí para formar un polímero lineal y helicoidal en presencia de ATP. Estos filamentos tienen importancia en el movimiento de la célula y en la forma celular. Se agrupan en la corteza celular, que es una zona que rodea, por dentro, la membrana plasmática (Perry et al., 1965; Mangeat et al. 1984; 1988).

Los microtúbulos están formados por tubulina, en sus dos formas  $\alpha$  y  $\beta$ , que al unirse, forman un heterodímero, unidad básica de los microtúbulos (Wilson, 1975). Su forma principal está dada por la agrupación de 13 protofilamentos, que es una larga fila de heterodímeros, que se unen mediante GTP, sin consumirlo.

Los microtúbulos son los encargados del transporte dentro de la célula, la ubicación de las organelas y la generación de movimiento. El transporte mediado por microtúbulos está determinado por las proteínas denominadas dineínas y kinesinas.

Los filamentos intermedios están constituidos por fibras unidas entre sí por enlaces hidrofóbicos (al igual que las anteriores), encargados de generar la resistencia mecánica (Lazarides, 1982).

### III. Mecanismos de resistencia a la TFD

A diferencia de la quimioterapia y radioterapia, la TFD implica la combinación de dos agentes: los FSs y la luz. Algunos autores han inducido resistencia a la TFD incrementando la dosis de FS (Mayhew et al., 2001; Singh et al., 1991) o bien la dosis de luz (Luna et al., 1991; Casas et al., 2006) y en ambos casos se encontró niveles similares de resistencia.

Los mecanismos de resistencia atribuidos a los FSs son compartidos con los mecanismos generales de resistencia, y pueden ser atribuidos a: (i) tasas diferentes de captación o eflujo del FS, (ii) tráfico intracelular alterado del FS, (iii) disminución de la actividad del FS, y (iv) aumento de la inactivación del FS.

Cuando la fotoactivación del FS ocurre, se forman ROS, y durante la primera etapa, aumenta la inactivación de las especies citotóxicas a través de las enzimas antioxidantes (Henderson et al., 1986; Gomer et al., 1996). Además las proteínas de shock térmico juegan un rol de chaperonas intracelulares para otras proteínas, plegando y asistiendo en la estabilidad de su conformación, previniendo un plegamiento no deseado y ayudando a estabilizar proteínas parcialmente dañadas (Shackley et al., 2002) y así ayudar a reponer el daño causado por la TFD. En un segundo paso luego del fotodaño, ocurre un aumento en la reparación del daño inducido a proteínas, membranas y aún ADN. En esta misma etapa, se induce a nivel génico, una respuesta de estrés luego de que ocurrió la TFD, resultando en la modulación de la proliferación, desprendimiento de las células del sustrato, e inducción de las vías de supervivencia, además de otras múltiples vías de señalización extracelular (Ruhdorfer et al., 2007).

Además, la TFD puede inducir hipoxia en los tejidos como resultado del daño vascular y del consumo de oxígeno, pudiendo ser éste otro factor en la aparición de células resistentes (Ruhdorfer et al., 2007)

La matriz celular y los componentes del citoesqueleto se han encontrado asociados a los mecanismos generales de resistencia a drogas y en particular, existen evidencias de su rol en la resistencia a TFD (Thompson et al., 1992)

Aunque la mayor parte de los mecanismos de resistencia a TFD ya han sido descriptos para la quimioresistencia, en muchos casos, no existe resistencia cruzada entre

la TFD y la quimioterapia (Casas et al., 2011) . Esta observación está apoyada por el éxito de la combinación de TFD con quimioterapia.

### **III.1. Adhesión celular, MEC y citoesqueleto en relación a la resistencia a TFD**

El comienzo de la resistencia a drogas de quimioterapia a menudo está asociado con la alteración de la expresión de adhesión y los componentes del citoesqueleto (Cianfriglia et al., 1991; Thompson et al., 1992).

Recientemente, se ha visto que la interacción célula-célula y célula-matriz resulta de la reorganización del citoesqueleto y la activación de múltiples vías de transducción de señales que directamente influyen en la supervivencia de la célula, el crecimiento y la diferenciación. Pruebas experimentales muestran que la activación de vías anti-apoptóticas iniciadas por la adhesión celular en las células tumorales, causan la resistencia a distintos tratamientos. El fenómeno es conocido como resistencia a drogas mediada por adhesión celular, en inglés, cell adhesion- mediated drug resistance (CAM-DR). Este mecanismo se describió a partir de la observación de que en algunos casos la adhesión in vitro de las células a proteínas de la MEC protege de la apoptosis inducida por los agentes quimioterapéuticos (Hayashi et al., 1995). Además se ha visto expresión diferencial de moléculas de adhesión en células resistentes a la quimioterapia.

Además de la quimioterapia, también la adhesión celular a proteínas de la MEC mejora la supervivencia celular durante la radioterapia. De modo similar al mecanismo CAM-DR, se ha dado en llamarlo, radioresistencia mediada por adhesión celular (CAM-RR) (Cordes et al., 2003). La reducción del tamaño de la célula y de la adhesión a las proteínas de la MEC se han encontrado frecuentemente asociadas con la reversión de la radioresistencia en células que sobreexpresan integrinas unidas a quinasas (Cordes et al., 2004).

Margaron et al. (1997) mostraron una disminución en la adhesión en células tratadas con BPD-TFD. Además, se vio que la menor expresión de  $\beta$ -integrina podría ser la razón de la disminución transitoria de la adhesión a colágeno IV, fibronectina, laminina y vitronectina de células de cáncer de ovario humano OVCAR3 después de la fotosensibilización con Verteporfin (Runnels et al., 1999).

La proteína de adhesión fibronectina y sus receptores de integrinas juegan un rol importante en el desarrollo del tumor. Las células tumorales son menos adhesivas que las células normales, lo que contribuye a la separación de las células tumorales y a la

metástasis. Rudhorfer et al. (2007) observaron regulación negativa del gen de la fibronectina luego de tratamiento con TFD-ALA de la línea celular de carcinoma escamoso A-431. Este hecho puede caracterizar el principio del redondeo de la célula que termina en el desprendimiento de la célula del sustrato luego de una injuria. Como efecto secundario a este proceso, se podrían facilitar la migración in vitro y la metástasis in vivo. Luego de PII-TFD en líneas celulares de carcinoma de colon, se encontró una disminución transitoria en la adhesión y en la expresión de moléculas de adhesión (Rousset et al., 1999).

Según algunos autores, la disminución en la adhesión podría representar una disminución en el potencial metastásico de células de cáncer tratadas con TFD. Sin embargo, han sido reportados tanto el aumento (Momma et al., 1998) como la disminución (Casas et al., 2008) en la capacidad metastásica de las células que sobreviven a la TFD, y estas diferencias pueden ser atribuidas a los diferentes FSs, a las dosis de luz y al modelo celular empleado.

El efecto de la TFD sobre la adhesión celular ha sido motivo de controversias. Algunos autores han encontrado disminución mientras que otros encontraron aumento en la adhesión de las células al plástico, la MEC y a las células endoteliales (Foultier et al., 1994; Vonarx et al., 1995 Runnels et al., 1999). La TFD usando BPD inhibe la adhesión celular sin alteración de la expresión de integrinas (Margaron et al., 1997). Además, la TFD reduce la invasión de las células del músculo liso y la migración de los fibroblastos, generando una barrera de la matriz frente a la invasión vascular de las células migratorias, inhibiendo la hiperplasia de la íntima (Overhaus et al., 2000).

Señales extracelulares, el desprendimiento celular y los procesos de cambios de forma de la célula reciben o transmiten información vía señales intracelulares como p38MAPK, ERK1/2 o JNK. Sanovic et al. (2009) encontraron que las vías p38MAPK, ERK, JNK y la vía de señalización de Ras impulsan la supervivencia y/o la apoptosis después TFD con el FS Hipericina.

Los genes que codifican las integrinas  $\beta 1$ , integrina 3 e integrina 6 son regulados negativamente luego de la TFD-Hipericina (Sanovic et al., 2009). Como consecuencia, se observa una reducción en la transducción de señales de la MEC y en la adhesión celular en la fase temprana del daño fotodinámico que lleva a la detención del ciclo celular y la apoptosis. De manera similar, se encontró regulación negativa de los precursores de la integrina 2 y  $\beta 3$  luego de la TFD- Hipericina en un modelo de cáncer de mama (Buytaert et al., 2008).

Ha sido demostrado que las integrinas- $\beta 1$  desempeñan un rol preponderante en el desprendimiento celular del sustrato y en la inducción de apoptosis provocada por la pérdida de E-cadherina después de TFD con Ftalocianina de Zinc (Galaz et al., 2005). Esto refuerza la hipótesis del rol en la regulación negativa de las integrinas en la promoción de la separación de las células y la apoptosis.

Uno de los blancos de la TFD es el citoesqueleto (Lee et al., 1995). Cualquier perturbación en este sistema puede llevar a la progresión tumoral y a la metástasis (Vonarx et al., 1995).

La regulación positiva de la familia Rho GTPasa 3 (RhoE) por la TFD-Hipericina probablemente contribuye al proceso de separación de células y el control de los cambios de la actina del citoesqueleto, ya que esto inhibe las integrinas presentes en las adhesiones focales y la formación de fibras de estrés de actina que rodean la célula (Sanovic et al., 2009).

En nuestro laboratorio hemos encontrado que las células resistentes a TFD-ALA son menos invasivas y migratorias. Sin embargo estas células resistentes mostraron in vitro un aumento de la unión de las proteínas de colágeno I de la MEC, sin sobreexpresión de la integrina  $\beta 1$ , principal molécula involucrada en la unión de colágeno I (Casas et al., 2008). Además, los clones resistentes exhiben menor cantidad de fibras de estrés, y una desorganización de la actina cortical. También se observó desorganización de E-cadherina,  $\beta$ -catenina (proteínas de adhesión célula a célula) y vinculina (proteína asociada al citoesqueleto) (Casas et al., 2008). La reorganización del citoesqueleto y de las proteínas de adhesión puede establecer un correlato con el bajo fenotipo metastático hallado.

La vimentina es una proteína principal del citoesqueleto, y es degradada en respuesta a varios inductores de la apoptosis (Hashimoto et al., 1998; Casas et al., 2008). Se ha visto que la vimentina confiere la resistencia a la TFD por disminución de la translocación de la caspasa-3 (Belichenko et al., 2001).

### **III.2. Mecanismos de resistencia a TFD asociados a oncogenes**

Las proteínas de la familia Ras comprenden un grupo de pequeñas proteínas que se unen a GTP, y juegan un rol esencial en el control de la actividad crucial de las vías de señalización que regulan la proliferación celular normal (Barbacid, 1987). Mutaciones en las proteínas Ras producen defectos en la actividad de GTPasa y en la activación

constitutiva de las señales río abajo. Alrededor del 20 al 30% de los tumores humanos presentan activación constitutiva de alguna de las proteínas de la familia Ras, lo cual demuestra la importancia de esta vía de señalización durante la carcinogénesis.

La activación constitutiva de Ras influye considerablemente en varios aspectos del fenotipo maligno, incluyendo alteraciones del crecimiento tumoral, e influyendo en los procesos de invasión y metástasis (Barbacid, 1987; Downward, 2003). En este sentido, está descrito que la sobreexpresión de las proteínas Ras está involucrada en la resistencia a la muerte celular (Santibanez and Hurtado, 2005; Wakabayashi et al., 2007).

Además, existe una asociación entre resistencia a radioterapia y la activación de varios oncogenes, incluyendo Ras (Jones et al., 2001). Por otra parte, la inhibición de Ras aumenta la radiosensibilidad. Se ha postulado que río abajo de la vía de Ras podría existir un blanco importante para mejorar la radioterapia. El bloqueo de PI3 kinasa aumenta la respuesta a la radiación in vitro o in vivo en células activadas por esta vía de señalización. Por otra parte, se ha encontrado una alta proporción de tumores con AKT fosforilado, (blanco río abajo de PI3 kinasa), en pacientes que mostraron resistencia a radioterapia (McKenna & Muschel, 2003).

Recientemente se ha avanzado en la elucidación de las vías de supervivencia celular mediadas por adhesión, y se han identificado diversos mediadores tales como Ras, involucrados en los procesos de CAM-DR (Schmidmaier & Baumann, 2008).

En relación a la TFD, Espada et al. (2009) han descrito que la activación oncogénica de H-Ras en queratinocitos murinos PAM212 puede prevenir la muerte celular, debido a la pérdida de adhesión mediada por E-cadherina. El fotodaño inducido por la TFD en células PAM212 con Ftalocianina de Zn, un FS que actúa sobre complejos de adhesión mediados por E-cadherina, fue inhibido en células que expresaban constitutivamente H-Ras.



#### **IV. El rol de la vasculatura en la TFD**

Un aspecto importante de la fotosensibilización es el rol de la vasculatura. La TFD causa la destrucción de las células tumorales por toxicidad directa vía apoptosis o necrosis, o por inducción de hipoxia celular como resultado del colapso de la microcirculación tumoral. Dicho colapso puede ser inducido por fotodaño al endotelio vascular o bien por la liberación de sustancias vasoactivas. Además, otro mecanismo alternativo, para la modulación del crecimiento celular es la activación del sistema inmune (Nowis, 2005).

In vivo, la preferencia del blanco vascular versus el tumoral es altamente dependiente de la distribución relativa del FS en cada uno de esos compartimentos. Esta distribución está dada por las propiedades farmacocinéticas de los FSs y la eficiente manipulación de los intervalos de droga-luz durante el tratamiento de la TFD. La TFD usada con intervalos cortos de exposición al FS tiene como blanco la vasculatura del tumor, debido a que confina la localización del FS a los vasos sanguíneos. En cambio, un FS que se ilumina a tiempos largos luego de su administración sistémica puede inducir mayor daño en las células tumorales que las vasculares, ya que alcanza a distribuirse en los compartimentos de las primeras (Chen et al., 2006).

Chen et al. (2008) proponen que el mecanismo principal de daño fotodinámico es vascular. A pesar de que estudios in vitro demostraron muerte tumoral directa, se ha sugerido que la vasculatura tumoral sería una de las estructuras más dañadas en la TFD (Star et al., 1986; Gomer et al., 1988). La destrucción irreversible de la vasculatura del tumor se cree que es principalmente responsable de la efectividad de la TFD en tumores sólidos ya sea empleando Photofrin u otros FSs como el ALA, porfíricos, etc. Se considera que los FSs de alto peso molecular, que se localizan en el espacio intravascular, serían los más eficientes en este aspecto (Abels, 2004).

Las células tumorales sufren de por sí de una falta de nutrientes y aporte de oxígeno debido a la debilidad de su vasculatura, por lo que suelen ser más vulnerables al daño vascular que las células normales; éstas últimas se recuperarían más rápidamente del efecto fotodinámico. Sobre estas bases se comenzó la aplicación de la TFD a lesiones proliferativas vasculares tales como la neovascularización de la retina (Krummenauer et al., 2005). El proceso antiangiogénico post TFD como consecuencia del colapso de la vasculatura es fundamental en la respuesta final al tratamiento antitumoral (Gomer et al., 2006; Busch, 2006; Chen et al., 2006).

Sin embargo, existen evidencias acerca de un rol pro-angiogénico de la TFD. Por ejemplo, se ha reportado que la TFD basada en Photofrin (PII-TFD) induce la expresión de factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y que la combinación de la TFD con terapias antiangiogénicas aumentan la efectividad del tratamiento (Ferrario et al., 2000).

Además, empleando co-cultivos de células endoteliales y tumorales, se vio que estas últimas producen factores angiogénicos que inducen la proliferación de las células endoteliales, con un consecuente aumento en la sensibilidad a la TFD con ftalocianinas (Yang et al., 1994).

En este sentido, se ha visto que el consumo fotoquímico del oxígeno generado por la TFD limita la eficacia de esta modalidad terapéutica (Douglass et al., 1983) y que promueve la angiogénesis mediada por hipoxia a través de la participación del Factor Inducible por Hipoxia (HIF). Estudios recientes han señalado a la TFD como inductora del HIF en estudios in vitro (Ji et al., 2006, Mitra et al., 2006), probablemente debido al consumo fotoquímico de oxígeno y al estrés oxidativo generado (Ferrario et al., 2000, Ferrario et al., 2000). En este sentido, HIF actúa como mediador clave de los fenómenos promovidos por los cambios de oxigenación, donde intervienen todos los componentes del complejo microambiente tumoral: macrófagos y células estromales, tumorales y endoteliales, embebidos en una matriz extracelular. Se ha visto que los fibroblastos asociados al cáncer en muchos casos comprenden la población preponderante en el estroma tumoral y se han relacionado con un aumento en la progresión del tumor, angiogénesis y metástasis (Hanahan et al., 2011).

### **VI.1. ALA-TFD y vasculatura**

Se sabe que las células endoteliales pueden generar una cantidad significativa de PpIX a partir de ALA. Peng et al., demostró a principios de 1992 que las mitocondrias de las células tumorales y de células endoteliales, al igual que la lámina basal de las paredes vasculares debajo del endotelio del tejido tumoral, eran extensamente destruidas en una etapa temprana luego de la administración sistémica de ALA-TFD. A partir de estos focos dañados, se observó una severa necrosis de las células tumorales circundantes como producto del daño mitocondrial tumoral y vascular

Wyld et al. (1997) concluyeron que aunque las células tumorales generan más PpIX que las células vasculares luego de una administración sistémica, la ALA-TFD

puede ejercer algunos efectos sobre la microcirculación del tejido tratado, por toxicidad directa del endotelio y del músculo liso de las células vasculares y esta toxicidad puede incrementarse por el microambiente del tumor. Se observó también *in vitro* un efecto fotodinámico, de ALA-TFD en cultivos de células primarias de endotelio de vena umbilical humana (HUVEC) así como también en líneas celulares endoteliales inmortalizadas de la microvasculatura dérmica (HMEC-1) (He et al, 1995; He et al., 1996).

Sin embargo, se podrían presentar algunas diferencias en términos de respuesta a la fotosensibilización en las células endoteliales, dependiendo del FS empleado. Por ejemplo, células MEC de cultivos primarios de hemangiomas fueron más sensibles al tratamiento de TFD con PII que con PpIX generada a partir de ALA (Chang et al., 1999).

#### **IV.2. Tratamiento fotodinámico de lesiones no cancerosas vasculares**

La proliferación de las células del músculo liso es el principal componente de restenosis luego de una angioplastia. La selectividad de algunos FSs de uso en TFD por los tejidos en proliferación hizo factible la propuesta de usar el tratamiento fotodinámico en la profilaxis de restenosis inmediatamente luego de una angioplastia, sin efectos secundarios sistémicos del FS (Gonschior et al., 1991).

Por otra parte, las placas ateromatosas pueden ser tratadas con TFD usando diversos FSs, los cuales se acumulan selectivamente en tejidos ateroscleróticos (Tang et al., 1993; Hsiang et al., 1993; Dartsch et al., 1994; Saito et al., 1996). La incorporación preferencial del FS a las placas ateromatosas está favorecida por su asociación con las lipoproteínas plasmáticas (Allison et al., 1997).

Otro nuevo uso de la TFD a nivel vascular es el de la trombosis fotoquímica con el objetivo de ocluir la vasculatura del ojo en la zona de la retina o coroides con fines terapéuticos (Wilson et al., 1991).

Distintos FSs han sido empleados en la TFD de lesiones oftalmológicas tales como la NVC secundaria a la DMRE, lesiones NVC subfoveales ocultas, NVC por miopía patológica, por histoplasmosis ocular y por causas idiopáticas (Schmidt-Erfurth et al., 1999, Maddula et al., 2011, Matsuo et al., 2011)

La TFD se puede usar también en el tratamiento de las manchas de nacimiento llamadas mancha en vino de Oporto, ya que la misma puede actuar sobre las células

endoteliales y producir la muerte de vasos capilares anormales debajo de la epidermis (Zhao, 2011).

## REFERENCIAS

Abels C (2004) Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci.* 3: 765-771.

Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M (2001) The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 74: 656-669.

Alberts B (1996) *Biología Molecular de la Célula*; 3<sup>o</sup> Edición; Ediciones Omega S.A. Barcelona.

Alghisi G, Ruegg C (2006) Vascular integrins in tumor angiogenesis: mediators and therapeutic targets. *Endothelium.* 13: 113–135.

Allison B A, Crespo M T, Jain A K, Richter A M, Hsiang Y N, Levy J G (1997) Delivery of benzoporphyrin derivative, a photosensitizer, into atherosclerotic plaque of Watanabe Hyperlipidemic rabbits and balloon-injured New Zealand rabbits. *Photochem Photobiol.* 65(5):877-883.

Arnfield M, González S, Lea P (1986) Cylindrical irradiation fibre tip for photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 6: 150-154.

Askari J A, Buckley P A, Mould A P, Humphries M J (2009) Linking integrin conformation to function. *J. Cell Sci.* 122, 165-170.

Athar M, Elmets D, Bickers D, Mukhtar H (1989) A novel mechanism for generation of superoxide anions in hematoporphyrin derivative mediated cutaneous photosensitization: activation of xantine oxidase pathways. *J. Clin. Invest.* 83: 1137-1143.

Auler H, Banzer G (1942) Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwülstkranken Menschen und Tieren. *Z. Krebsforsch.* 53: 65-68.

Barbacid M (1987) Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 56:779-827.

Barbazetto I, Schmidt-Erfurth U (2000) Photodynamic therapy of choroidal hemangioma: two case reports. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 238(3):214-221.

Battle A, Wider E, Tigier H, Llambías E (1975) Porphyrin biosynthesis in soybean callus system XV. The effect of growth conditions. *Int J Biochem.* 6: 591- 606.

Belichenko I, Morishima N, Separovic D (2001) Caspase-resistant vimentin suppressed apoptosis after photodynamic treatment with a silicon phthalocyanine in Jurkat cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 57-63.

Ben-Hur E, Moor A, Margolis-Nunno H, Gottlieb P, Zuk MM, Lustigman S, Horowitz B, Brand A, Van Stevenick J, Dubbelman T (1996) The photodecontamination of cellular blood components: mechanisms and use of photosensitization in transfusion medicine. *Transfus. Med. Rev.* 10: 15-22.

Berenbaum M C, Akande S L, Bonnett R, Kaur H, Ioannou S, White R D, Winfield U J (1986) meso-Tetra(hydroxyphenyl)porphyrins, a new class of potent tumour photosensitisers with favourable selectivity. *Br J Cancer.* 54(5):717-725.

Berns M, Rettenmaier M, McCullough J (1984) Response of psoriasis to red laser light (630 nm) following systemic injection of hematoporphyrin derivative. *Lasers Surg. Med.* 4: 73-77.

Bertoloni G, Salvato B, Dall'Acqua M, Vazzoler M, Jori G (1984) Hematoporphyrin sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *Photochem. Photobiol.* 38: 811-816.

Brown S B, Brown E A, Walker I (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 5(8):497-508.

Buettner G, Need M (1985) Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by hematoporphyrin derivative, ascorbate and light. *Cancer Lett.* 25: 297-304.

Bugleski P, Porter C, Dougherty T (1981) Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in malignant and normal tissue of the mouse. *Cancer Res.* 41: 4606-4612.

Busch T M (2006) Local physiological changes during photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 38 494- 499.

Busetti A, Soncin M, Jori G, Rodgers M A (1999) High efficiency of benzoporphyrin derivative in the photodynamic therapy of pigmented malignant melanoma. *Br J Cancer.* 79(5-6):821-824.

Buytaert E, Matroule J Y, Durinck S, Close P, Kocanova S, Vandenhede J R, de Witte P A, Piette J, Agostinis P (2008) Molecular effectors and modulators of hypericin-mediated cell death in bladder cancer cells. *Oncogene.* 27, 1916-1929.

Calzavara-Pinton P G (1995) Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J Photochem Photobiol B.* 29(1):53-57.

Casas A, Perotti C, Ortel B, Di Venosa G, Saccoliti M, Batlle A, Hasan T (2006) Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol.* 29, 397-405.

Casas A, Di Venosa G, Vanzulli S, Perotti C, Mamome L, Rodriguez L, Simian M, Juarranz A, Pontiggia O, Hasan T, Batlle A (2008) Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 271, 342-351.

Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Batlle A (2011) Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem.* 18(16):2486-2515.

Casas A, Sanz-Rodriguez F, Di Venosa G, Rodriguez L, Mamone L, Blázquez A, Jaén P, Batlle A, Stockert J C, Juarranz A (2008) Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. *Cancer Lett.* 270, 56-65.

Chang C J, Sun C H, Liaw L H, Berns M W, Nelson S J (1999) In vitro and in vivo photosensitizing capabilities of 5-ALA versus photofrin in vascular endothelial cells. *Lasers Surg. Med.* 24,178-186.

Chapman J, Stobbe C, Arnfield M (1991) Oxygen dependency of cell killing in vitro by light-activated Photofrin II. *Radiat. Res.* 126: 73-79.

Chen B, Pogue B W, Hasan T (2005) Liposomal delivery of photosensitising agents. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 2: 477.

Chen B, Pogue B W, Hoopes P J, Hasan T (2006) Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Crit. Rev. Eukar. Gene Expression.* 16, 279–305.

Chen B, Chong P, de Witte P, Hooper P, Hassan T, Pogue B (2008) Advances in Photodynamic Therapy: Vascular Targeting in Photodynamic Therapy. Chapter 9.

Chou TM, Woodburn KW, Cheong WF, Lacy SA, Sudhir K, Adelman DC, Wahr D (2002) Photodynamic therapy: applications in atherosclerotic vascular disease with motexafin lutetium. *Catheter Cardiovasc Interv.* 57(3):387-394.

Chowdhary A, Malhotra VL, Deb M, Rai U (1998) Screening for chlamydial infections in women with pelvic inflammatory diseases. *J Commun Dis.* 30(3):163-166.

Cianfriglia M, Yassen A, Tombesi M, Samoggia P, Barca S, Caserta M (1991) Expression of lymphocyte homing receptor gene is lost in multi-drug-resistant variant of human lymphoblastoid CCRF-CEM cells. *Int. J. Cancer.* 49, 394–397.

Cordes N, Meineke V (2003) Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR): extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells in vitro. *Strahlenther Onkol.* 179, 337-344.

Cordes N (2004) Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity. *Cancer Res.* 64, 5683-5692.



Dai T, Huang YY, Hamblin MR (2009) Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* (3-4):170-188.

Dartsch P C, Wunderlich K, Ben-Hur E (1994) Aluminium phthalocyanines-induced photolysis of human vascular wall cells in culture and the effect of fluoride on photodynamic action. *Coron Artery Dis* 5(10): 851-855.

Davis N, Liu D, Jain AK, Jiang SY, Jiang F, Richter A, Levy JG (1993) Modified polyvinyl alcohol-benzoporphyrin derivative conjugates as phototoxic agents. *Photochem Photobiol.* 57(4):641-647.

de Duve C, de Barse T, Poole B, Trouet A, Tulkens P, Van Hoof F (1974) Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol.* 15; 23(18):2495-2531.

Dellinger M (1996) Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem. Photobiol.* 64: 182-187.

Demidova TN, Hamblin MR (2004) Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* (3):245-254.

Diamond I, Granelli S, McDonagh A, Nielsen S, Wilson C, Jaenicke R (1972) Photodynamic Therapy of malignant tumors. *Lancet.* 2: 1175-1177.

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

Dougherty T (1987) Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* 45: 879-889.

Dougherty T, Grindey G, Fiel R, Weishaupt K, Boyle D (1975) Photoradiation therapy II: cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.* 55: 115-121.

Douglass H O Jr, Nava H R, Weishaupt K R, Boyle D, Sugerman M G, Halpern E, Dougherty T J (1983) Intra-abdominal applications of hematoporphyrin photoradiation therapy. *Adv Exp Med Biol.*160: 15-21.

Downward J (2003) Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways? *Biochem J.* 15;376: 9-10.

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

Farr S, Kogoma T (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55: 561-585.

Ferrario A, Gomer C J (2006) Avastin enhances photodynamic therapy treatment of Kaposi's sarcoma in a mouse tumor model. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 25(1-2):251-259.

Ferrario A, von Tiehl K, Rucker N, Schwartz M, Gill P & Gomer C (2000) Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 60: 4066-4069.

Figge F, Weiland G, Manganiello L (1948) Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Roy. Soc. Exp. Biol. Med.* 68: 640-641.

Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. (2006) 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochem Photobiol.* 82(4):994-1015.

Foultier M, Vonarx-Coinsmann V, Cordel S, Combre A, Patrice T (1994) Modulation of colonic cancer cell adhesiveness by haematoporphyrin derivative photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* 23, 9-17.

Freitas I (1990) Lipid accumulation, the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissues. *J. Photochem. Photobiol.* 7: 359-361.

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

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

Galaz S, Espada J, Stockert J C, Pacheco M, Sanz-Rodriguez F, Arranz R, Rello S, Canete M, Villanueva A, Esteller M, Juarranz A (2005) Loss of E-cadherin mediated cell-cell adhesion as an early trigger of apoptosis induced by photodynamic treatment. *J. Cell. Physiol.* 205, 86-96.

Gaullier J, Berk K, Peng Q (1997) Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cell in culture. *Cancer Res.* 57(8):1481-1486.

Gilaberte Y, Serra C, De Las Heras M, Ruiz R, Fernández M, Benvenuto C, González S, Guiilen C (2006) Photodynamic therapy in dermatology. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 97(2): 83-102.

Girotti A (1990) Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.* 51: 497-509.

Goldmann W, Ingber D (2001) Intact vinculin protein is require for control of cell shape, cell mechanics, and racdependent lamellipodia formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 290: 749-755.

Gomer C (1989) Photodynamic therapy in the treatment of malignancies. *Semin. Hematol.* 26: 27-34.

Gomer C, Ryter S, Ferrario A, Rucker N, Wong S, Fisher A (1996) Photodynamic Therapy-mediated oxidative stress can induce the expression of heat shock proteins. *Cancer Res.* 56, 2355-2360.

Gomer C, Rucker N, Murphee (1988) A Differential cell photosensitivity following photodynamic therapy. *Cancer Res.* 48: 4539-4542.

Gomer C J, Ferrario A, Luna N, Rucker N, Wong S (2006) Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. *Lasers Surg. Med.* 38, 516–521.

Gonschior P, Erdemci A, Gerheuser F, Gonschior GM, Mack B, Kolbe T, Goetz AE, Hofling B (1991) Selective hematoporphyrin derivative (HMD) application in arterial vessels using a porous balloon catheter results in equivalent levels as compared to high-dose systemic administration. *Z Kardiol.* 80(12):738-745.

Gossner L, Stolte M, Sroka R, Rick K, May A, Hahn E, Ell C (1998) Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid. *Gastroenterol.* 114: 448-455.

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

Grebenova D, Cajthamlova H, Bartosova J, Marinov J, Klamova H, Fuchs O, Rca Z (1998) Selective destruction of leukaemic cells by photo-activation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin-IX. *J. Photochem. Photobiol.* 47: 74-81.

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-674.

Hashimoto M, Inoue S, Ogawa S, Conrad C, Muramatsu M, Shackelford D, Maliah E (1998) Rapid fragmentation of vimentin in human skin fibroblasts exposed to tamoxifen: a possible involvement of caspase-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 401-406.

Hayashi T, Saito T, Sato H, Kuroiwa Y, Aizawa K (1995) Direct visualization of atherosclerosis in small coronary arteries using the epifluorescence stereoscope. *Cardiovasc. Res.* 30: 775-780.

Hazlehurst L A, Dalton W S (2001) Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 20, 43-50.

He D, Behar S, Nomura N, Sassa S, Lim H W (1995) The effect of ALA and radiation on porphyrin/heme biosynthesis in endothelial cells. *J. Photochem. Photobiol.* 61, 656–661.

He D, Behar S, Roberts J E, Lim H W (1996) The effect of L-cysteine and Nacetylcysteine on porphyrin/heme biosynthetic pathway in cells treated with 5-aminolevulinic acid and exposed to radiation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 12, 194–199.

He X, Sikes R, Thomsen S, Chung L, Jacques S (1994) Photodynamic therapy with Photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem. Photobiol.* 59: 468-473.

Hehlgans S, Haase M, Cordes N (2007) Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1775, 163–180.

Henderson B, Miller A (1986) Effects of scavengers of reactive oxygen and radical species on cell survival following photodynamic treatment in vitro: comparison to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 108, 196-205.

Hsiang Y N, Crespo M T, Richter A M, Jain A K, Fragoso M, Levy J G (1993) In vitro and in vivo uptake of benzoporphyrin derivative into human and miniswine atherosclerotic plaque. *Photochem Photobiol.* 57(4): 670-674.

Ishihara R, Katayama Y, Watanabe T, Yoshino A, Fukushima T, Sakatani K (2007) Quantitative spectroscopic analysis of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence intensity in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 47:53-57.

Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight T N, Penttinen R (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 61,198-223.

Ji Z, Yang G, Shahzidi S, Tkacz-Stachowska K, Suo Z, Nesland JM, Peng Q (2006) Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 244(2):182-189.

Jichlinski P, Leisinger H (2001) Photodynamic therapy in superficial bladder cancer: past, present and future. *Urol Res.* 29:396-405.

Jones H A, Hahn S M, Bernhard E, McKenna W G (2001) Ras inhibitors and radiation therapy. *Semin Radiat Oncol.* 11(4):328-337.

Jori G (1990) Photosensitized processes in vivo: proposed phototherapeutic applications. *Photochem. Photobiol.* 52: 439-443.

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G (2006) Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* (5):468-481.

Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6(5):392-401.

Kelly C, Brown N, Reed M, Ackroyd R (2002) The use of 5-aminolevulinic acid as a photosensitizer in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* 1:158-168.

Kelly J, Snell M (1976) Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol.* 155: 150-151.

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

Kessel D, Spikes E (1984) Porphyrin accumulation by atheromatous plaques of the aorta. *Photochem. Photobiol.* 40: 59-63.

Kessel D, Arroyo A S (2007) Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 1290–1295.

Kessel D, Oleinick N L (2009) Initiation of autophagy by photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 453, 1-16.

Kessel D, Oleinick N L (2010) Photodynamic therapy and cell death pathways. *Methods Mol. Biol.*

Kostenich G A, Zhuravkin I N, Zhavrid E A (1994) Experimental grounds for using chlorin e6 in the photodynamic therapy of malignant tumors. *J Photochem Photobiol B.* 22(3):211-217.

Krummenauer F, Braun M & Dick H (2005) Clinical outcome and subjective quality of life after photodynamic therapy in patients with age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol.* 15: 74-80.

Ladner D, Steiner R, Allemann J, Haller U, Walt H (2001) Photodynamic diagnosis of breast tumours after oral application of aminolevulinic acid. *Photodynamic Diagnosis Information.* 84: 33-37.

Lazarides E (1982) Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem.* 51:219-250.

Lee C, Wu S, Chen L (1995) Photosensitization by 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide: specific disruption of microtubules and inactivation of organelle motility. *Cancer Res.* 55, 2063-2069.

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

Leong S, Chan A H, Levy J G, Hunt D W (1996) Transcutaneous photodynamic therapy alters the development of an adoptively transferred form of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Photochem Photobiol.* 64(5):751-757.

Lin L, Cook D, Wieseahn G (1997) Photochemical inactivation of viruses and bacterias in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long wavelength ultraviolet light. *Transfusion.* 37: 423-435.

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

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J (2008) *Biología Celular y Molecular.* 6° Edición. Editorial Médica Panamericana. Cap. 19. Integración de células en tejidos. 808-881.

Luna M, Gomer C (1991) Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.* 51, 4243-4249.

Maddula S, Davis D K, Maddula S, Burrow M K, Ambati B K (2011) Horizons in therapy for corneal angiogenesis. *Ophthalmology.* 118(3):591-599.

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

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

Mangeat P, Burridge K (1984) Actin-membrane interaction in fibroblasts: what proteins are involved in this association? *J Cell Biol.* 99: 95s-103s.

Mangeat PH (1988) Interaction of biological membranes with the cytoskeletal framework of living cells. *Biol Cell.* 64(3):261-281.



Margaron P, Sorrenti R, Levy J G (1997) Photodynamic therapy inhibits cell adhesion without altering integrin expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1359, 200-210.

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

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

Matsuo M, Honda S, Matsumiya W, Kusuhara S, Tsukahara Y, Negi A (2011) Comparison between anti-vascular endothelial growth factor therapy and photodynamic therapy for myopic choroidal neovascularization. *Eur J Ophthalmol.*

Mayhew S, Vernon D, Schofield J, Griffiths J, Brown S (2001) Investigation of cross-resistance to a range of photosensitizers, hyperthermia and UV light in two radiation-induced fibrosarcoma cell strains resistant to photodynamic therapy in vitro. *Photochem. Photobiol.* 73, 39-46.

McKenna W G, Muschel R J, Gupta A K, Hahn S M, Bernhard E J (2003) The RAS signal transduction pathway and its role in radiation sensitivity. *Oncogene.* 22(37):5866-5875.

Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G (1996) Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol.* 32: 153-157.

Mercurio A, Rabinovitz I (2001) Towards a mechanistic understanding of tumor invasion—lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Semin. Cancer Biol.* 11:129-141.

Merlin J L, Gautier H, Barberi-Heyob M, Teiten M H, Guillemin F (2003) The multidrug resistance modulator SDZ-PSC 833 potentiates the photodynamic activity of chlorin e6

independently of P-glycoprotein in multidrug resistant human breast adenocarcinoma cells. *Int J Oncol.* 22(4):733-739.

Meyer-Betz F (1913) Untersuchungen über die biologische (photodynamische). Wirkung des hematoporphyrins und andere Derivative des Bluts and Gallenfarbstoffs. *Arch. Dtsch. Klin. Med.* 112: 476-503.

Minnock A, Vernon D, Schofield J, Griffiths J, Parish J, Brown S (1996) Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol.* 32: 159-164.

Mitra S, Cassar S E, Niles D J, Puskas J A, Frelinger J G, Foster T H (2006) Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cancer Ther.* 5(12):3268-3274.

Miyamoto Y, Umebayashi Y, Nishisaka T (1999) Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* 53: 53-59.

Mizejewski G (1999) Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:124-138.

Moan J, Berg K (1992) Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem. Photobiol.* 55: 931-948.

Moan J, Berg K, Kvam E, Western A, Malik Z, Ruck A, Schneckenburger H (1989) Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Found Symp.* 146: 95-111.

Molpus K L, Kato D, Hamblin M R, Lilje L, Bamberg M, Hasan T (1996) Intraperitoneal therapy of human epithelial ovarian carcinomatosis in a xenograft murine model. *Cancer Res.* 56:1075-1082.

Momma T, Hamblin M, Wu H, Hasan T (1998) Photodynamic therapy of orthotopic prostate cancer with benzoporphyrin derivative: local control and distant metastasis. *Cancer Res.* 58: 5425-5431.

Muller P, Wilson B (1987) Photodynamic therapy of malignant brain tumors: clinical effects, post-operative ICP and light penetration of the brain. *Photochem. Photobiol.* 46: 929-935.

Nagafuchi A (2001) Molecular architecture of adherent junctions. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 600-603.

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

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

Navone N, Polo C, Frisardi A, Batlle A (1990) Mouse mammary carcinoma ALA-D. *Comp Biochem Physiol B.* 96:729-731.

Navone N, Polo C, Frisardi A, Batlle A (1990) Mouse mammary carcinoma PBGase and hydroxymethylbilane synthetase. *Comp Biochem Physiol B.* 98:67-71.

Nitzan Y, Shainberg B, Malik Z (1987) Effect of photoactivated hematoporphyrin on Gram-positive bacteria. *Curr. Microbiol.* 15: 251-258.

Noodt B, Berg K, Stoke T, Peng Q, Nesland J (1996) Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br. J. Cancer.* 74: 22-29.

Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J (2005) Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol.* 52(2):339-352.

Ormrod D, Jarvis B (2000) Topical aminolevulinic acid HCl photodynamic therapy. *Am. J. Clin. Dermatol.* 1: 133–139.

Overhaus M, Heckenkamp J, Kossodo S, Leszczynski D, La Muraglia G (2000) Photodynamic therapy generates a matrix barrier to invasive vascular cell migration. *Circ. Res.* 86, 334-340.

Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A (2004) Snail Mediates E-Cadherin Repression by the Recruitment of the Sin3A/Histone Deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 Complex. *Molecular and Cellular Biology.* 24(1):306–319.

Peng Q, Moan J, Warloe T, Nesland J M, Rimington C (1992) Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int. J. Cancer.* 52, 433–443.

Perry S V, Cotterill J (1965) Interaction of actin and myosin. *Nature.* 206(980):161-163.

Pottier J, Kennedy J (1990) The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J. Photochem. Photobiol.* 8: 1-16.

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

Prinsze C, Dubbelman T, Van Steveninck J (1990) Protein damage induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 1038: 152-157.

Raab O (1900) Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. *Z. Biol.* 39: 524-526.

Riedl C, Plas E, Pfluger H (1999) Fluorescence detection of bladder tumors with 5-aminolevulinic acid. *J. Endourol.* 13: 755-759.

Ris HB (2005) Photodynamic therapy as an adjunct to surgery for malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 49 Suppl 1:S65-68.

Rockson S G, Lorenz D P, Cheong W F, Woodburn K W (2000) Photoangioplasty: An emerging clinical cardiovascular role for photodynamic therapy. *Circulation*. 102(5):591-596.

Rousset N, Vonarx V, Eleouet S, Carre J, Kerninon E, Laja Y, Patrice T (1999) Effects of photodynamic therapy on adhesion molecules and metastasis. *J. Photochem. Photobiol. B*. 52, 65-73.

Rubino C, Rasetti L (1996) Porphyrin metabolism in human neoplastic tissues. *Panminerva Med*. 8: 290-292.

Ruhdorfer S, Sanovic R, Sander V, Krammer B, Verwanger T (2007) Gene expression profiling of the human carcinoma cell line A-431 after 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. *Int. J. Oncol*. 30, 1253-1262.

Runnels J M, Chen N, Ortel B, Kato D, Hasan T (1999) BPD-MA mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and beta1 integrin expression in ovarian cancer cells. *Br. J. Cancer*. 80, 946-953.

Saito T, Hayashi J, Sato H, Kawabe H, Aizawa K (1996) Scanning electron microscopic analysis of acute photodynamic therapy for atherosclerotic plaques of rabbit aorta by using a pheophorbide derivative. *J Clin Laser Med Surg*. 14(1): 1-6.

Sanovic R, Krammer B, Grumboeck S, Verwanger T (2009) Time-resolved gene expression profiling of human squamous cell carcinoma cells during the apoptosis process induced by photodynamic treatment with hypericin. *Int. J. Oncol*. 35, 921-939.

Santibañez J F, Hurtado C (2005) Ha-Ras sensitizes transformed mouse skin cells to Anisomycin-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 579(28):6459-6464.

Schmidmaier R, Baumann P (2008) Anti-adhesion evolves to a promising therapeutic concept in oncology. *Curr Med Chem.* 15: 978-990.

Schmidt-Erfurth U, Miller J W, Sickenberg M, Laqua H, Barbazetto I, Gragoudas E S, Zografos L, Piguet B, Pournaras C J, Donati G, Lane A M, Birngruber R, van den Berg H, Strong H A, Manjuris U, Gray T, Fsadni M, Bressler N M (1999) Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of retreatments in a phase 1 and 2 study. *Arch Ophthalmol.* 117(9):1177-1187.

Schoenfeld N, Epstein O, Lahav M, Mamet R, Shaklai M, Atsom A (1988) The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett.* 43: 43-48.

Senior K, Brophy S (1998) A light at the end of the tunnel for psoriasis sufferers? *Mol Med Today.* 4(10):416.

Shackley D C, Haylett A, Whitehurst C, Betts C D, O'Flynn K, Clarke N W, Moore J V (2002) Comparison of the cellular molecular stress responses after treatments used in bladder cancer. *BJU Int.* 90, 924-932.

Sieber F, O'Brien J M, Krueger G J, Schober S L, Burns W H, Sharkis S J, Sensenbrenner L L (1987) Antiviral activity of merocyanine 540. *Photochem Photobiol.* 46(5):707-711.

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

Singh G, Wilson B, Sharkey S, Browman G, Deschamps P (1991) Resistance to photodynamic therapy in radiation induced fibrosarcoma-1 and chinese hamster ovary-multi-drug resistant cells in vitro. *Photochem. Photobiol.* 54, 307-312.

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

Star W M, Marijnissen H P, van den Berg-Blok A E, Versteeg J A, Franken K A, Reinhold H S (1986) Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.* 46(5):2532-2540.

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

Stockert J, Juarranz A, Villanueva A (2004) Photodynamic therapy: selective uptake of photosensitizing drugs into tumor cells. *Curr. Topics Pharmacol.* 8: 185-217.

Subauste M, Pertz O, Adamson E, Turner C, Junger S, Hahn K (2004) Vinculin modulation of paxillin–FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *JBC.*165 (3):371-381.

Szeimies (2007) Methyl aminolevulinate-photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Dermatol. Clin.* 25(1): 89-94.

Szeimies R, Landthaler M (2002) Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis of skin cancers. *Recent Results Cancer Res.* 160: 240-245

Tang G, Hyman S, Schneider J H, Giannotta S L (1993) Application of photodynamic therapy to the treatment of atherosclerotic plaques. *Neurosurgery.* 32(3): 438-443.

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

Thompson E, Paik S, Brunner N, Sommers C, Zugmaier G, Clarke R, Shima T, Torri J, Donhaue S, Lippman M, Martin G, Dickson R (1992) Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.* 150, 534–544.

Tomio L, Calzavara F, Zorat P L, Corti L, Polico C, Reddi E, Jori G, Mandoliti G (1984) Photoradiation therapy for cutaneous and subcutaneous malignant tumors using hematoporphyrin. *Prog Clin Biol Res.* 170:829-840.

Tsipursky M S, Golchet P R, Jampol L M (2011) Photodynamic therapy of choroidal hemangioma in sturge-weber syndrome, with a review of treatments for diffuse and circumscribed choroidal hemangiomas. *Surv Ophthalmol.* 56(1):68-85.

Valenzeno D (1987) Photomodification of biological membranes with emphasis in singlet oxygen mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 46: 147-160.

van der Snoek E M, Robinson D J, van Hellemond J J, Neumann H A (2008) A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* (8):918-922.

Van Gemert J, Berebaum M, Gijssberts G (1985) Wavelength and light dose dependence in tumour phototherapy with hematoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer.* 52: 43-49.

Van Steveninck J, Tijssen K, Boegheim J, Van der Zee J, Dubbelman T (1986) Photodynamic generation of hydroxyl radicals by hematoporphyrin derivative and light. *Photochem. Photobiol.* 44: 711-716.

Vena F, Turchiello R, Laville I, Pigaglio S, Blais J, Tedesco A (2004) 5-Aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line. *Lasers in Medical Science.* 19: 119–126.

Vonarx V, Foultier M, de Brito X, Anasagasti L, Morlet L, Patrice T (1995) Photodynamic therapy decreases cancer colonic cell adhesiveness and metastatic potential. *Res. Exp. Med.* 195, 101-116.

Wainwright M, Phoenix D A, Marland J, Wareing D R, Bolton F J (1998) A comparison of the bactericidal and photobactericidal activities of aminoacridines and bis(aminoacridines). *Lett Appl Microbiol.* 26(6):404-406.



Wakabayashi Y, Mao J H, Brown K, Girardi M, Balmain A (2007) Promotion of Hras-induced squamous carcinomas by a polymorphic variant of the Patched gene in FVB mice. *Nature*. 445(7129):761-765.

Watt F (2002) Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J*. 21: 3919–3926.

Weishaupt K, Gomer C, Dougherty T (1976) Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoactivation of a murine tumour. *Cancer Res*. 36: 2326-2329.

Wilson B (1989) Photodynamic therapy: light delivery and dosage for second generation photosensitizers. *Ciba Found. Symp*. 146: 60-77.

Wilson B, Patterson M (1986) The physics of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol*. 31: 327-360.

Wilson C A, Hatchell D L (1991) Photodynamic retinal vascular thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 32(8):2357-2365.

Wilson J, Van Hillesberg R, Van der Berg J, Kort W, Terpstra O (1991) Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors. *Scand. J. Gastroenterol*. 188: 20-25.

Wilson L (1975) Microtubules as drug receptors: pharmacological properties of microtubule protein. *Ann N Y Acad Sci*. 253:213-231.

Wyld L, Burn J L, Reed M W, Brown N J (1997) Factors affecting aminolevulinic acid-induced generation of protoporphyrin IX. *Br. J. Cancer*. 76, 705–712.

Wyss P, Tadir Y, Tromberg B J, Liaw L, Krasieva T, Berns M W (1994) Benzoporphyrin derivative: a potent photosensitizer for photodynamic destruction of rabbit endometrium. *Obstet Gynecol*. 84(3):409-414.

Wolf P, Fink-Puches R, Cerroni L, Kerl H (1994) Photodynamic therapy for mycosis fungoides after topical photosensitization with 5-aminolevulinic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31: 678-680.

Yang J, Van Dijk-Smith J, Van Vugt D, Kennedy J, Reid R (1996) Fluorescence and photosensitization of experimental endometriosis in the rat after systemic 5-aminolevulinic acid administration: A potential new approach to the diagnosis and treatment of endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 154-160.

Yang Z, Lu X, Frazier D, Panjehpour M, Breider M (1994) Tumor cell-enhanced sensitivity of vascular endothelial cells to photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 15: 342-350.

Young L H, Howard M A, Hu L K, Kim R Y, Gragoudas E S (1996) Photodynamic therapy of pigmented choroidal melanomas using a liposomal preparation of benzoporphyrin derivative. *Arch Ophthalmol.* 114(2):186-192.

Zhao Y, Zhou Z, Zhou G, Tu P, Zheng Q, Tao J, Gu Y, Zhu X (2011) Efficacy and safety of hemoporphin in photodynamic therapy for port-wine stain: a multicenter and open-labeled phase IIa study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 27(1):17-23.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Mejorar la eficiencia de la Terapia Fotodinámica y ampliar el conocimiento sobre sus aplicaciones.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar la selectividad del pro-FS ALA por las células tumorales en un modelo de línea celular normal/tumoral (línea normal HB4a y su contrapartida tumoral transfectada con el oncogén Ras, HB4a-Ras).
- Estudiar la selectividad de un panel de FSs en el modelo de HB4a/HB4a-Ras comparando su acumulación y localización subcelular y establecer una correlación con la respuesta al daño fotodinámico.
- Elucidar los mecanismos de resistencia a la TFD en estas células que sobreexpresan Ras, con énfasis en el estudio de las proteínas de citoesqueleto, proteínas relacionadas con mecanismos de resistencia y la adhesión celular.
- Poder predecir si los tumores que expresan Ras serían respondedores a la TFD con diversos FSs.
- Estudiar las alteraciones sobre el citoesqueleto inducidas por el tratamiento fotodinámico en las células HB4a y HB4a-Ras.
- Estudiar el rol de la vasculatura en el tratamiento fotodinámico con el pro-FS ALA y otros FSs.
- Analizar la respuesta al tratamiento fotodinámico in vitro con ALA y con otros FSs en una línea de endotelio vascular.
- Comparar la respuesta a la fotosensibilización entre una línea de endotelio vascular y varias líneas tumorales y normales tales como queratinocitos y células de mama normal,

con el objeto de estudiar in vitro la selectividad del tratamiento fotodinámico por las distintas estructuras tisulares.

- Elucidar cuáles serían los FSs que serían más adecuados para la TFD de lesiones vasculares y cuáles para el tratamiento de lesiones tumorales.
- Estudiar cuál es el blanco preferencial (vascular o tumoral) de la TFD in vivo en un modelo de adenocarcinoma murino transplantado subcutáneamente.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **I. Fotosensibilizantes**

Se usaron Verteporfin liposomada (Conifarma, Argentina), Clorina e6 (Ce6) (Frontier Scientific Inc, Logan, USA) meta-tetrahidroxifenilclorina (m-THPC) Foscan® de Biolitec Pharma Ltd., Irlanda y Photofrin II® (PII) de QLT Therapeutics, USA. ALA, Merocianina 540 (MC540) y 3,6-Bis(dimetilamino) Acridina (naranja de acridina) (NA) de Sigma, UK.

Para los estudios in vivo los FSs se emplearon en sus respectivas dosis y vías de administración y se vehiculizaron en dextrosa como solvente.

Para estudios in vitro Ce6 se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO)-agua destilada, tal que la concentración final de DMSO en contacto con las células fue menor de 0,1%. El resto de los FSs se disolvieron en agua destilada.

### **II. Líneas celulares**

#### **II.1 LM2**

Es la línea que deriva de un adenocarcinoma mamario originado espontáneo en un ratón BALB/c (Galli et al., 2000). Las células se cultivaron en medio mínimo esencial Earle (MEM) suplementado con L-glutamina 40 µg/ml, gentamicina y 5% de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron para su crecimiento a 37 °C en atmósfera conteniendo 5% CO<sub>2</sub>. Se inyectaron 5.10<sup>5</sup> células en el flanco subcutáneo izquierdo de ratones BALB/c.

#### **II.2 HB4a y HB4a-Ras**

La línea celular HB4a es una línea clonal, no transformada ni tumorigénica y deriva de tejido epitelial luminal de mama normal, cuya inmortalización fue obtenida por transfección del antígeno LT del virus SV40 (Stamps et al., 1994).

Su derivada tumoral, HB4a-Ras, transfectada con el plásmido pEJ, contiene 6,6Kb del genoma del oncogén H-Ras (Val/12 Ras) (Harris et al., 1995).

Ambas líneas fueron provistas por el Profesor O'Hare del laboratorio de Cáncer de mama del University College London, UK.

Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 40 µg/ml, 10% de SFB, 5 µg/ml de hidrocortisona y 5 µg/ml de insulina. Se chequeó periódicamente la expresión del oncogén H-Ras por Westernblot empleando un anticuerpo primario anti H-Ras (259) sc-35 de Santa Cruz Biotechnology, Inc y un secundario anti-rata de Jackson Immuno-Research, USA.

### **II.3 HMEC-1**

Línea de endotelio microvascular de dermis humana cedida por el Dr. E. W. Ades del Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA). Estas células se immortalizaron por transfección con un plásmido que contiene la región codificante del antígeno largo T del virus SV40 (Ades et al., 1992). Las células crecieron en medio basal EBM-2 (Lonza, USA) suplementado con factores de crecimiento: hidrocortisona, 10% SFB, hEGF, VEGF, hFGFB, R3-IGF-1, ácido ascórbico, heparina y gentamicina (Lonza, USA), en estufa con CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. (Células cedidas por el Instituto Roffo)

### **II.4 PAM212**

Línea de queratinocitos murinos transformados espontáneamente cultivado en medio RPMI-1640 (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) con L-glutamina 2 mM y suplementado con 5% de SFB.

### **II.5 HaCat**

Línea de queratinocitos humanos transformados espontáneamente cultivado en medio RPMI-1640 (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) con L-glutamina 2 mM y suplementado con 5% de SFB.

### **II.6 MCF-7**

Línea de carcinoma mamario humano, cultivado en medio RPMI-1640 (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) con L-glutamina 2 mM y suplementado con 10% de SFB.

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

El número de células sembradas por pocillo y el número de células empleado en la relativización de los valores de fluorescencia intracelular se determinó por conteo de células viables, incubadas en presencia del colorante vital de exclusión azul Tripán.

### **IV. Cuantificación de porfirinas intracelulares sintetizadas a partir de ALA**

Las células se incubaron con ALA en medio sin suero. Las porfirinas intracelulares, se extrajeron con HCl 5%. Las porfirinas liberadas al medio, se cuantificaron por el agregado directo de 2 ml de HCl 5%. Estas condiciones resultaron ser óptimas para una extracción completa de porfirinas. Las mediciones se realizaron en un espectrofluorómetro Pekin Elmer LS55, utilizando una longitud de onda de excitación de 406 nm y de emisión de 604 nm, y empleando PpIX (Porphyrin Products, Logan, Utah, USA) como estándar de referencia.

### **V. Cuantificación de FS intracelular por extracción química**

Las células se incubaron con los distintos FSs en medio de cultivo sin suero. Los tiempos de exposición al FS se fijaron de manera tal de obtener una fluorescencia intracelular de al menos 3 veces mayor que los valores basales de autofluorescencia. Estos tiempos fueron entre 2 y 3 hs de incubación.

Las concentraciones máximas empleadas se determinaron en función de aquellas que no mostraron citotoxicidad en oscuridad, en ensayos de MTT.

Los FSs se extrajeron de las células por diferentes ácidos o solventes luego de 3 lavados con buffer fosfato salino (PBS). La fluorescencia obtenida se cuantificó en un fluorómetro Perkin Elmer LS55 empleando las longitudes de onda de luz de máxima excitación y emisión para cada FS (Tabla 1). Los solventes empleados se tomaron de la literatura (ver referencias en la Tabla 1).

**Tabla 1:** Condiciones de extracción de FS intracelular

	PII	Verteporfin	MC540	NA	m- THPC	Ce6
T de Incubación (hs)	2	3	2	2	3	3
Solvente	5% HCl	MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	EtOH: Ac. Acético:H <sub>2</sub> O (70:5:25)	MeOH: Ac. Acético:H <sub>2</sub> O (70:5:25)	MeOH:DMSO (4:1)	MeOH
λ de excitación [nm]	406	420	520	500	423	405
λ de emisión [nm]	604	690	580	592	657	570
Referencias	Casas et al. 2001	Casas et al. 2002	Rundquist et al. 1984	Rundquist et al. 1984	Cai et al. 1999	Hamblin et al. 2000

## VI. Tratamiento de TFD

Para llevar a cabo los tratamientos fotodinámicos, las células se sembraron en placas de 6 pocillos, y se expusieron en medio sin suero a los FSs al pro-FS ALA, durante los tiempos indicados en cada capítulo. Seguidamente las células se irradiaron durante distintos períodos de tiempo, desde abajo y a una distancia de 20 cm de la fuente lumínica. Luego de la irradiación el medio fue sustituido por medio con suero y sin FS. Las células se incubaron otras 19 hs a 37° C para permitir que ocurra el fotodaño, y se determinó la viabilidad por el ensayo del MTT (3-(4,5- dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromuro).

### VI.1 Fuente de luz

Se emplearon dos tubos fluorescentes (Osram L 36 W/10) que producen un espectro de luz entre 400 y 700 nm, con una radiación máxima a 600 nm. Las placas con las células se ubicaron sobre una lámina de vidrio a 20 cm de la fuente lumínica. La potencia de luz emitida se midió con un radiómetro Yellow Springs Kettering modelo 65 (Yellow Spring, HO, USA). Se utilizaron dosis de energía variables entre 0,2 y 120 mJ/cm<sup>2</sup> para FSs y hasta 1000 mJ/cm<sup>2</sup> para el pro-FSs ALA (dichas dosis se variaron modificando los tiempos de exposición a la luz) y la densidad de potencia fue de 0,5 mW/cm<sup>2</sup>.



## **VI.2 Ensayo de viabilidad de MTT**

La fototoxicidad y toxicidad en oscuridad de los FSs se determinó mediante el ensayo de MTT (Denzinot & Lang, 1986), método basado en la actividad de las dehidrogenasas mitocondriales, el cual se ha demostrado que se correlaciona bien con otros métodos de evaluación de toxicidad fotodinámica, tales como el ensayo de formación de colonias (Evans et al., 1997). Luego de los tratamientos, se agregó en cada pocillo, 0,5 mg/ml de MTT de Sigma-Aldrich (Poole, UK), y las placas se incubaron a 37° C durante 1 h. Como resultado se obtuvieron cristales de formazán, que se disolvieron en DMSO y la absorbancia de la solución obtenida se cuantificó a 560 nm en un lector de placas (Spectra Count, Packard USA).

## **VI.3 Dosis letal 50**

Se definió la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) como la dosis de luz expresada en mJ/cm<sup>2</sup> que produce el 50% de muerte celular.

## **VII. Experimentos de localización subcelular de los FSs**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos conteniendo cubreobjetos. Luego de 48 hs las células se incubaron en medio sin suero con los diferentes FSs, eligiendo los tiempos de incubación y concentraciones de acuerdo a los experimentos de acumulación intracelular de FS (descritos en el punto V de Materiales y Métodos).

Se realizaron 3 lavados con PBS, y se montaron en fresco los cubreobjetos con las células, sobre unas gotas de PBS. La emisión de fluorescencia emitida por los FSs se observó inmediatamente en un microscopio confocal (Nikon D-Eclipse C1, IByME, Fundación Sales) empleando excitaciones de 488 nm y 544 nm, usando filtros de emisión bandpass de 515/30 nm y longpass de 570 nm. Se observó la autofluorescencia de las células sin tratar con FSs.

Se confirmaron los sitios subcelulares de localización subcelular empleando los marcadores específicos para organelas: mitotrackers (marcadores mitocondriales), lisotrackers (marcadores lisosomales) y los esfingolípidos fluorescentes NBD y BODIPY (marcadores de aparato de Golgi), todos de Molecular Probes, USA.

## **VIII. Tinción con azul de Toluidina**

Para la observación de la morfología, luego de ser fijadas en metanol frío, las células se tiñeron con azul de Toluidina durante 30 segundos, y luego de dejar secar se montaron en DePeX y se observaron en microscopio óptico.

## **IX. Ensayos de inmunofluorescencia**

Para los ensayos de inmunofluorescencia las células cultivadas sobre cubreobjetos se fijaron en paraformaldehído 3% durante 15 minutos. Las muestras se rehidrataron en PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 1% durante 10 minutos. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h a 37°C. Se utilizaron los anticuerpos primarios anti E-cadherina, vinculina y  $\alpha$ -tubulina de ratón (Santa Cruz Biotechnology Inc) diluidos 1:50 ó 1: 100.

Seguidamente se lavaron las células con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón acoplados a compuestos fluorescentes (Alexa-488, de Molecular Probes) (1:500 en 0,1 % de seroalbumina bovina (BSA)). y finalmente se lavaron nuevamente con PBS. Se realizaron contratinciones nucleares con Hoechst 3325. Las muestras se montaron sobre Prolong para su observación.

Para la detección de F-actina, las células se incubaron con TRITC-Faloidina (1:500 de 1 mg/ml en 0,1 % BSA) durante 30 minutos a 37°C y luego se realizaron lavados con PBS. Los preparados fueron montados en los portaobjetos con Prolong.

La observación microscópica y fotográfica se realizó en un Microscopio de Fluorescencia Olympus BX61, equipado con una lámpara de Mercurio HBO 100 W y los correspondientes filtros para microscopía de fluorescencia: azul (450-490 nm, filtro de excitación BP 490) y verde (545 nm, filtro de excitación BP 545). Ocasionalmente se empleó un Microscopio Confocal (Nikon D-Eclipse C1, IByME, Fundación Sales) para ver detalles estructurales, empleando excitaciones de 488 nm y 544 nm, usando filtros de emisión bandpass de 515/30 nm y longpass de 570 nm.

## **X. Ensayos de Westernblot**

Las células fueron lisadas en buffer conteniendo 50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS, 1 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina, 5 µg/ml aprotinina, 1 mM ortovanadato de sodio y 25 mM NaF. El lisado se centrifugó a 12000 x g durante 30 minutos a 4°C y las proteínas retenidas en el sobrenadante fueron cuantificadas usando el kit comercial del ácido bicinonínico de Bio-Rad (Richmond, CA). Las proteínas se desnaturalizaron por hervor en buffer Laemli con β-mercaptoetanol 5% y se separaron por SDS-PAGE. Se transfirieron de los geles a membranas de PDVF Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA) y se bloquearon toda la noche a 4°C con leche descremada 5% en buffer Tris pH 7,6 conteniendo Tween 20 0,05%. Luego las membranas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios específicos anti E-cadherina (1:200), anti α-tubulina (1:1000) y anti vinculina (1:400) de ratón, anti survivina (1:300) de conejo, anti Ras de rata (1: 300), anti Integrina β1 de ratón (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti Integrina β3 de ratón (1:200) (Millipore) y anti MDR-1 de ratón (1:200) (Chemicon International Inc) y β-tubulina (1: 70.000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc), diluídos en buffer de bloqueo. Los anticuerpos secundarios anti ratón, conejo o rata fueron de Vector Laboratories, Burlingame, CA, diluidos en PBS-Tween 20 0,1% y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. La detección se llevó a cabo con un sistema de quimioluminiscencia (ECL Plus Healthcare UK limited, Buckinghamshire, UK). Las bandas se cuantificaron en un densitómetro luego de ser escaneadas.

## **XI. Ensayos de adhesión a proteínas de MEC**

Para este tipo de ensayo se usaron placas de 96 pocillos, las cuales se incubaron toda la noche a 4°C con las siguientes proteínas del MEC: fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno I y IV disueltos en PBS pH 8,8. Una hora antes del experimento, se descartaron los ligandos y se bloquearon los sitios de pegado inespecífico con una solución de 0,5% BSA. Como control negativo de adhesión inespecífica, se emplearon pocillos cubiertos con una solución de 40 µg ml<sup>-1</sup> de BSA en las condiciones descriptas previamente.

Las células (5 x 10<sup>5</sup>ml<sup>-1</sup>) se tripsinizaron y se sembraron en medio con BSA sobre los pocillos cubiertos con las proteínas de MEC y se incubaron durante 30 minutos a 37°C.

Las células se lavaron tres veces con PBS, seguidamente se fijaron con metanol frío durante 15 minutos y se tiñeron con cristal violeta 0,5%. Las células adherentes a MEC se cuantificaron por absorbancia a 560 nm después solubilización en SDS 2%. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

## **XII. Ensayo de TFD de células en suspensión**

Las células se sembraron en frascos de cultivo, y se expusieron a los FSs en las concentraciones y tiempos optimizados previamente. Seguidamente, las células se tripsinizaron, se centrifugaron, se sembraron en placas de 6 pocillos y se irradiaron en suspensión con distintas dosis de luz. Cada 3 min las células se agitaron para evitar su adhesión al plástico. Luego de finalizar la irradiación, se dejaron adherir en estufa hasta el día siguiente y se cuantificaron por el método del MTT.

## **XIII. Determinación de proteínas celulares**

Las células se lavaron 3 veces con PBS y se mantuvieron en presencia de NaOH 1N durante una noche. Luego se realizó el ensayo de Lowry (Urtreger et al., 1997), y se cuantificó la absorbancia a 750 nm. Las proteínas se calcularon a partir de una curva estándar realizada con BSA.

## **XIV. Crecimiento celular y tiempo de duplicación celular**

Se sembraron  $7.10^4$  cells/ml en placa de 24 pocillos por triplicado. Cada 2, 24, 48 y 72 hs, las células se contaron en cámara de Neubauer. El tiempo de duplicación celular se estimó en el punto medio de la fase exponencial de la curva de crecimiento.

## **XV. Tratamiento estadístico**

Los valores en las figuras y tablas correspondientes a los experimentos in vitro son expresados como la media  $\pm$  los desvíos estándar. Se realizaron al menos 3 experimentos por duplicado. Se utilizó el t-test de Student desapareado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

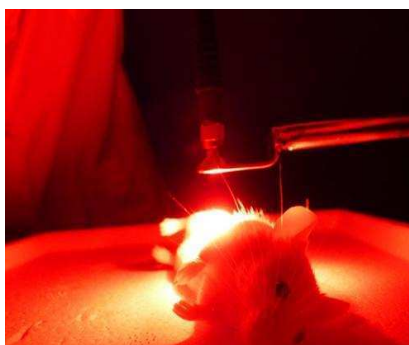
## **XVI. Experimentos in vivo**

### **XVI.1 Animales**

Se emplearon ratones machos y hembras de la cepa BALB/c de 2 meses de edad y de 25 a 30 g de peso. Se les suministró agua y comida ad libitum. Los ratones tratados portaban un adenocarcinoma **LM2** (Hospital Roffo) originado por inyección subcutánea de células LM2 entre 10 y 15 días antes de comenzar la TFD.

### **XVI.2 Procedimiento de Terapia Fotodinámica in vivo**

Los ratones se rasuraron en la zona tumoral y se anestesiaron con una mezcla de xilazina/ketamina. Se procedió a la irradiación de la zona tumoral haciendo incidir la fibra óptica del láser Lumiiia de 635 nm a una distancia de 3 cm del ratón, cubriendo un área de iluminación de 1 cm de diámetro. Se probaron distintas potencias y tiempos de iluminación, y se fijaron como óptimos, los tiempos de irradiación de 20 min con una potencia de 620 mW.



**Figura 1.** Procedimiento de iluminación

Los FSs inmediatamente de ser resuspendido en dextrosa, se administraron en las dosis y vías indicadas en la Tabla 2. Los tiempos de espera antes de proceder a la iluminación se tomaron de la literatura.

**Tabla 2:** Esquemas de fotosensibilización in vivo.

	<b>FS</b>	<b>Dosis</b>	<b>Solvente</b>	<b>Vía</b>	<b>Tiempo pre-iluminación</b>
1	Verteporfin	2 mg/ratón	dextrosa	i.v.	15 min (Chen et al., 2005)
2	Verteporfin	2 mg/ratón	dextrosa	i.p.	1 hora (Chen et al., 2005)
3	Verteporfin	2 mg/ratón	dextrosa	i.v.	3 horas (Chen et al., 2005)
4	Verteporfin	2 mg/ratón	dextrosa	i.p.	3 horas (Chen et al., 2005)
5	Foscan	5 µl/ratón	dextrosa	i.p.	72 horas (Ris et al., 1999)
6	Photofrin	0,75mg/ratón	dextrosa	i.p.	24 horas (Hajri et al., 2002)

i.v.: intravenoso; i.p.: intraperitoneal

### **XVI.2.1 Láser de 635 nm**

Para las irradiaciones in vivo se empleó un láser Lumia de fabricación nacional acoplado a una fibra óptica con difusor plano. La longitud de onda emitida es de 635 nm  $\pm$ 0.25% (rojo), con una potencia variable entre 10 a 2500 mW  $\pm$ 3% Resol. 10 mW, modo de exposición continuo, y apertura numérica 0,22.

### **XVI.3 Estudios histológicos luego de TFD in vivo**

Luego de 30 min, 3, 6, 24 ó 48 hs de la TFD, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los tumores junto a la piel circundante. Los tejidos se fijaron en formol, se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 10 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se analizó la presencia de necrosis tumoral y vascular, daño epidérmico y dérmico, infiltrados linfocíticos y zonas viables de tumor.

### **XVI.4 Seguimiento de crecimiento tumoral post-TFD in vivo**

Luego de la TFD se evaluó la regresión tumoral mediante medición con calibre digital. Se empleó la fórmula de volumen tumoral:  $0.52 \times abc$ , donde a, b, y c son 3

medidas ortogonales del tumor. Los ratones se sacrificaron a las 24 ó 48 hs y se procesaron los tumores para estudios histológicos. Algunos ratones se emplearon para observar regresión tumoral o recrecimiento durante 10 días luego de la TFD. Se sacrificaron cuando el volumen tumoral fue del 20% del peso inicial del ratón, de acuerdo con las normas de ética vigentes (UKCCCR, 1988).

## REFERENCIAS

- Ades E W, Candal F J, Swerlick R A, George V G, Summers S, Bosse D C, Lawley T J (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line, *J. Invest. Vasc. Endoth. Cell Line Dermatol.* 99 683– 690.
- Cai H, Wang Q, Luo J, Lim CK (1999) Study of temoporfin metabolism by HPLC and electrospray mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 13:354-359.
- Casas A, Batlle A (2002) Rational design of 5-aminolevulinic acid derivatives aimed at improving photodynamic therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2(4):465-475.
- Casas A, Perotti C, Fukuda H, Rogers L, Butler AR, Batlle A (2001) ALA and ALA hexyl ester-induced porphyrin synthesis in chemically induced skin tumours: the role of different vehicles on improving photosensitization. *Br J Cancer.* 85(11):1794-1800.
- Chen B, Pogue B W, Hasan T (2005) Liposomal delivery of photosensitising agents. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 2: 477.
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277
- Evans P, Whiteman M, Tredger M, Halliwell B (1997) Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids, *Free Rad. Biol. Med.* 23: 1002-1008.
- Galli S, Colombo L, Vanzuli S, Daroqui M, Vidal M, Jasnis A, Lustig E, Eiján A (2000) Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 17: 1259-1265.
- Hamblin M, Del Governatore M, Rizvi I, Hasan T (2000) Biodistribution of charged 17.1A photoimmunoconjugates in a murine model of hepatic metastasis of colorectal cancer. *Br J Cancer,* 83: 1544-1551.



Harris R, Eichholtz T, Hiles I, Page M, O'Hare M (1999) New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. *Int .J.Cancer*. 80: 477-484.

Hajri A, Wack S, Meyer C, Smith M K, Leberquier C, Kedinger M, Aprahamian M (2002) In Vitro and In Vivo Efficacy of PhotofrinT and Pheophorbide a, a Bacteriochlorin, in Photodynamic Therapy of Colonic Cancer Cells. *Photochemistry and Photobiology*. 75(2): 140–148

Ris H B, Krueger T, Giger A, Lim CK, Stewart J C, Althaus U, Altermatt H J (1999) Photodynamic therapy with mTHPC and polyethylene glycol-derived mTHPC: a comparative study on human tumour xenografts. *Br J Cancer*. 79(7-8):1061-1066.

Rundquist I, Olsson M, Brunk U(1984) Cytofluorometric quantitation of acridine orange uptake by cultured cells. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A*. 92(5):303-9.

Stamps A C, Davies S C, Burman J, O'Hare M J (1994) Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. *Int J Cancer*. 15;57(6):865-874.

UK-Coordinating Committee on Cancer Research (1988) UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia. London: UKCCCR.

Urtreger A, Ladeda V, Puricelli L, Rivelli A, Vidal M, Lustig E, Bal de Kier Joffe E (1997) Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumour cell lines. *Int. J. Oncology* 11: 489-496.

## RESULTADOS

### I. Resistencia de las células transfectadas con el oncogén Ras a la Terapia fotodinámica mediada por ALA

En la primera parte de esta Tesis decidimos estudiar la selectividad de la ALA-TFD por las células tumorales empleando el modelo del par celular normal/tumoral HB4a y HB4a-Ras. Sin embargo, nos encontramos con que las células tumorales transfectadas con Ras eran más resistentes a la TFD que su contrapartida normal, por lo cual decidimos investigar en los dos Capítulos siguientes las posibles razones para explicar este fenómeno de resistencia.

#### I. 1 Caracterización de las células HB4a y HB4a-Ras

En esta serie de experimentos que nos llevan a evaluar la síntesis de porfirinas a partir de ALA y su sensibilidad al tratamiento fotodinámico, como primer paso, hemos caracterizado al par de líneas en estudio, HB4a y HB4a-Ras.

La Tabla I.1 muestra que las células HB4a-Ras crecen más rápido que las parentales HB4a. El tiempo de duplicación celular para las células transfectadas con Ras es de  $32 \pm 2$  hs mientras que en la línea parental es de  $48 \pm 5$  hs. Además, tanto el MTT como también el contenido de proteínas es significativamente más alto en las líneas celulares transfectadas con Ras.

**Tabla I.1:** Características de las células HB4a y HB4a-Ras

	HB4a	HB4a-Ras
Tiempo de duplicación celular (hs)	$48 \pm 5$	$32 \pm 2$
Actividad del MTT (Abs <sub>560</sub> )/10 <sup>5</sup> cél	$0,183 \pm 0,012$	$0,274 \pm 0,025$
Contenido de proteínas (pg/cel)	$18,4 \pm 1,3$	$28,9 \pm 1,7$

Media  $\pm$  DS; n= 4

Teniendo en cuenta estas diferencias en el crecimiento celular, hemos decidido sembrar las células HB4a en una densidad más alta que las HB4a-Ras ( $8 \times 10^4$  HB4a cél/ml y  $5 \times 10^4$  HB4a-Ras cél/ml) para llevar a cabo los experimentos.

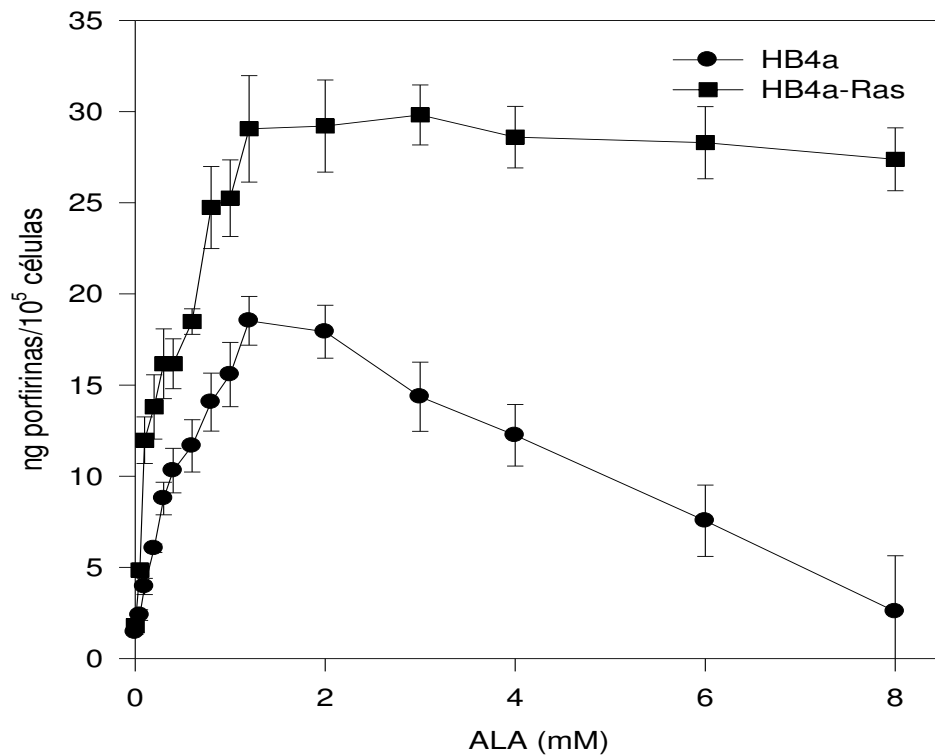
Las células se emplearon para la síntesis de porfirinas y para el estudio de ALA-TFD luego de 48 hs de la siembra, y bajo estas condiciones, la viabilidad determinada por el método del MTT se encuentra dentro de un rango de linealidad.

## **I.2 Síntesis de porfirinas a partir de ALA en células HB4a y HB4a-Ras**

La síntesis de porfirinas en las células HB4a-Ras alcanza el plateau con ALA 1 mM, mientras que las producidas por las HB4a alcanza un pico a 1 mM pero luego cae abruptamente a partir de 2 mM (Figura I.1) producto de la toxicidad del ALA en esta línea.

La máxima cantidad de porfirinas producida por las células HB4a es de 18,4 ng/ $10^5$  y 29,1 ng/ $10^5$  en las células HB4a-Ras.

Es decir, que las células transfectadas con Ras producen un 50% más de porfirinas que las células parentales.



**Figura I.1:** Producción de porfirinas en función de la concentración de ALA en las células HB4a y HB4a-Ras.

Se sembraron  $8 \times 10^4$  células HB4a /ml y  $5 \times 10^4$  células HB4a-Ras /ml. Luego de 48 h, se incubaron por 3 h en presencia de diferentes cantidades de ALA. Los niveles de porfirinas intracelulares se determinaron fluorométricamente y se normalizaron por el número de células presentes al principio del experimento

Se midió la viabilidad celular luego de 3 hs de exposición al ALA por el método del MTT. La Tabla I.2 muestra que en las células HB4a hay una notable toxicidad a concentraciones de ALA mayores a 4 mM, mientras que en células HB4a-Ras sólo a concentraciones de 8 mM se produce una leve toxicidad.

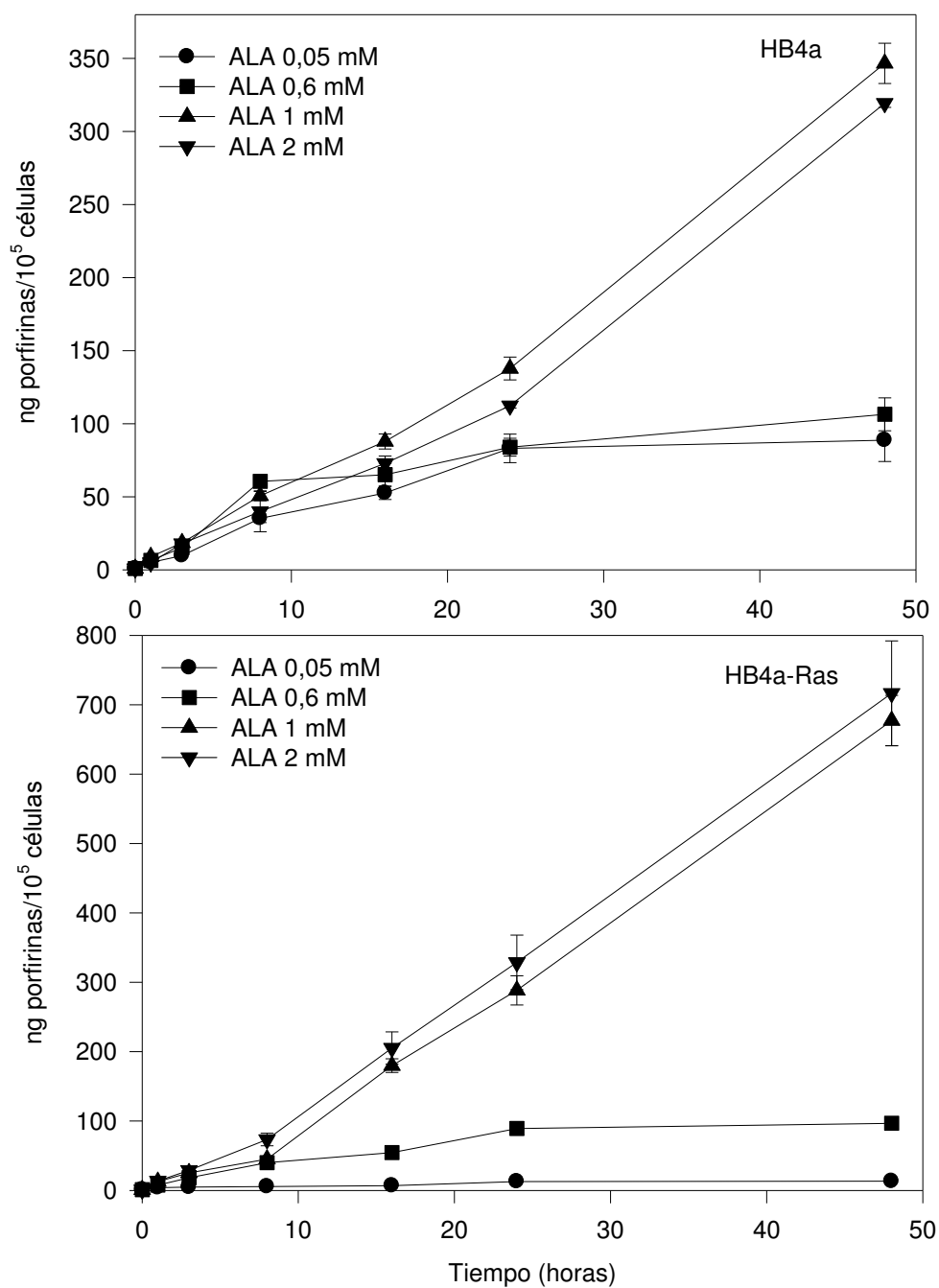
**Tabla I.2:** Toxicidad en oscuridad del ALA evaluada por MTT

	HB4a	HB4a-Ras
Control	100%	100%
ALA 1 mM	100%	100%
ALA 2 mM	98%	100%
ALA 4 mM	53%	100%
ALA 8 mM	27%	75%

Células HB4a y HB4a-Ras expuestas 3 hs a distintas concentraciones de ALA. La viabilidad se expresó como porcentaje del control sin ALA

Se analizó la síntesis de porfirinas en función del tiempo en ambos tipos celulares, en presencia de distintas concentraciones de ALA, para verificar las diferencias en la producción de PpIX en diversas condiciones experimentales.

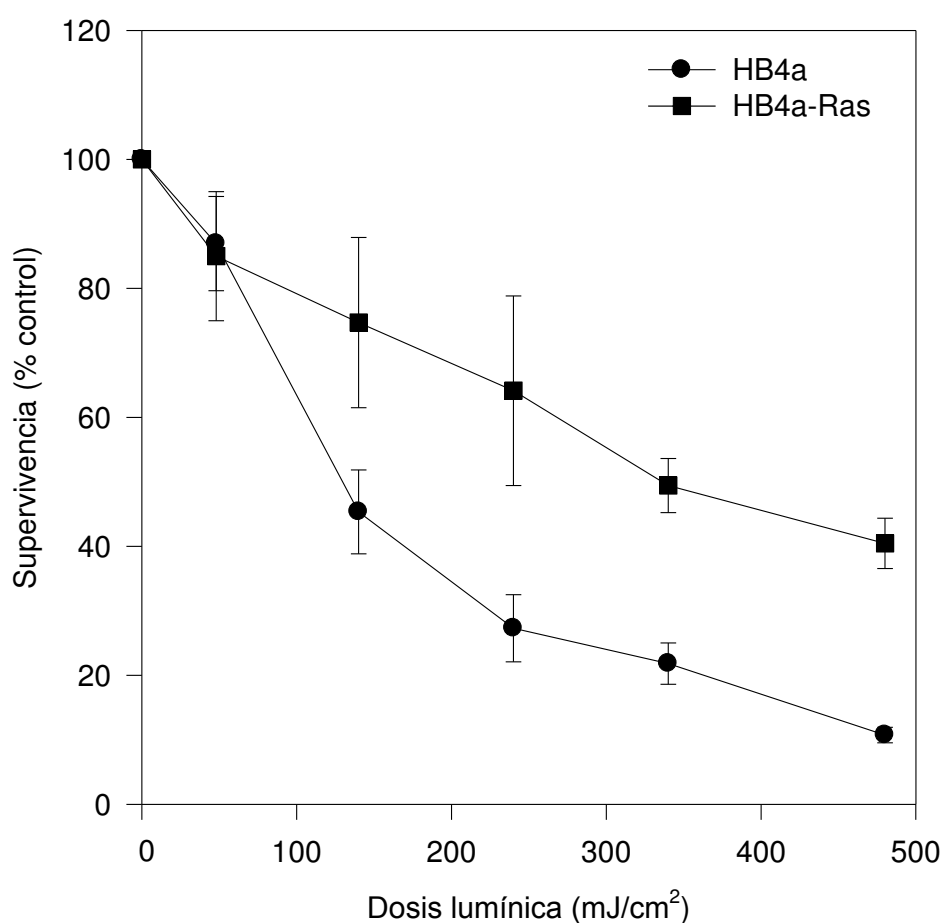
La producción de porfirinas en el tiempo a partir de ALA 1 y 2 mM es lineal para ambos tipos celulares a lo largo del tiempo estudiado (Figura I.2). Por el contrario, a las 8 hs se produce un plateau en la síntesis de porfirinas en el rango de concentración de ALA de 0,05- 0,6 mM en ambas líneas celulares. Se cree que esto se debe al agotamiento del sustrato a concentraciones menores a 1 mM. En general, no se observan diferencias en las formas de las curvas de concentración entre las dos líneas celulares, pero sí se sigue observando una mayor síntesis de porfirinas en HB4a-Ras en todo el rango de tiempo analizado.



**Figura I.2:** Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación en presencia de ALA. Se sembraron  $8 \times 10^4$  células HB4a /ml y  $5 \times 10^4$  células HB4a-Ras /ml. Luego de 48 hs, se incubaron durante diferentes períodos de tiempo en presencia de diversas concentraciones de ALA. Las porfirinas intracelulares se determinaron fluorométricamente y se normalizaron por el número de células presentes al principio del experimento..

### I.3 Tratamiento fotodinámico a partir de ALA en células HB4a y HB4a-Ras

La Figura I.3 muestra que a pesar de la alta producción de PpIX, las células HB4a-Ras son más resistentes al tratamiento con TFD empleando 1 mM ALA como pro-fotosensibilizante. La dosis letal lumínica 50 (DL<sub>50</sub>) fue de 340 mJ/cm<sup>2</sup> para HB4a-Ras y 140 mJ/cm<sup>2</sup> para HB4a.



**Figure I.3:** Supervivencia celular luego de ALA-TFD con diferentes dosis de luz.

Se sembraron  $8 \times 10^4$  células HB4a /ml y  $5 \times 10^4$  células HB4a-Ras /ml. Luego de 48 hs, se incubaron durante 3 horas en presencia de ALA 1 mM y se irradiaron con diferentes dosis de luz. Después de 19 hs se realizó el ensayo de MTT. La supervivencia celular se expresó como el porcentaje del control no irradiado incubado con ALA.

Los experimentos descritos anteriormente se han llevado a cabo sembrando concentraciones celulares diferentes para ambos tipos de líneas, por lo que se quiso averiguar si la respuesta a la ALA-TFD dependía en alguna forma de la densidad celular. Se encontró que 48 hs luego de sembrar un rango de  $1 \times 10^4$  cél/ml a  $1 \times 10^5$  cél/ml de ambas líneas, ni la respuesta a la ALA-TFD, ni la producción de porfirinas normalizada por el número de células fue afectada por la densidad celular (datos no mostrados).

#### **I. 4 Discusión**

Las células HB4a-Ras crecen 1,5 veces más en comparación con las células HB4a. Sumado a esto, el contenido proteico por célula y actividad de MTT es 1,5 veces mayor en las células transfectadas con Ras. Este incremento metabólico tiene un correlato con el aumento en la síntesis de porfirinas en comparación con la parental, de manera que el número de moléculas de PpIX sintetizado relativizado por la cantidad de proteína, es igual para ambas líneas.

Esta alta producción de porfirinas se observa a tiempos diferentes de sembrado, incluyendo la fase lag, exponencial y estacionaria del crecimiento celular.

De manera similar Li et al. (1999) determinaron que las células murinas 3T3 producen menos fluorescencia inducida por ALA que las células transfectadas con V-K-Ras. En dicho trabajo, la cantidad de PpIX se cuantificó por fluorescencia directa de la monocapa celular y por citometría de flujo. Sin embargo, no se llevaron a cabo estudios de fotosensibilización.

No sólo la máxima síntesis de porfirinas es considerablemente más alta en las células HB4a-Ras, sino que el perfil de la curva de producción de porfirinas también es diferente. Sin embargo, la caída en la síntesis porfirinas para las células HB4a se correlaciona con la toxicidad en oscuridad del ALA.

O bien el consumo de ALA en HB4a-Ras lleva a las células a sobreponerse de la toxicidad causada por el compuesto en oscuridad, o por el contrario, la toxicidad intrínseca del ALA sobre las células HB4a, lleva a la disminución de la síntesis de porfirinas respecto a la línea transfectada.

La alta acumulación de PpIX en células HB4a-Ras no se correlaciona con la mayor resistencia (2,5 veces) al tratamiento de ALA-TFD. Muy probablemente la resistencia



pueda deberse a las señales de supervivencia que se inducen en las células por la inserción del oncogén Ras.

Se ha demostrado que Ras se asocia con fosfatidilinositol-3-OH quinasa (PI3K) e induce la activación de Akt en respuesta al estrés oxidativo y así se estimulan respuestas de supervivencia celular.

La resistencia a la TFD en líneas celulares que sobreexpresan oncogenes había sido observada con el FS Photofrin. Tong et al. (2000) estudió la respuesta a TFD con Photofrin en fibroblastos humanos normales que expresan el fenotipo salvaje de la proteína supresora de tumor p53 y de células inmortalizadas de síndrome Li-Fraumeni (LFS) que expresan una mutante de p53. Las células LFS presentaron mayor resistencia a TFD en comparación a los fibroblastos humanos normales. Aunque la captación de Photofrin por célula es 1,6 veces mayor en los fibroblastos humanos normales, el tratamiento fotodinámico a niveles intracelulares equivalentes de Photofrin también induce una mayor resistencia en las células LFS. Además la transfección de la proteína p53 wild type en células LFS induce un incremento en la sensibilidad a la TFD pero sin cambios en los niveles intracelulares de Photofrin por célula.

Mientras que el ALA ha resultado ser selectivo en la localización tumoral y el tratamiento fotodinámico en humanos (Zaak et al., 2001; Friesen et al., 2002; Piotrowski et al., 2004; Baas et al., 2006) y en modelos de animales (Peng et al., 1992; Casas et al., 1999; Moan et al., 2001) esta localización selectiva es controvertida in vitro.

Por una parte, algunos autores demostraron que la fluorescencia de PpIX a partir de ALA no fue selectiva en un modelo de tumor experimental hepático (Svanberg et al., 1996). Por otra parte, Ji et al. (2006), estudiaron el modelo de localización subcelular de PpIX a partir de ALA en las líneas celulares de carcinoma humano de esófago KYSE-450 y KYSE-70 y en la línea celular normal Het-1A. Dichos autores no encontraron ninguna diferencia en la localización de PpIX. Además, mientras que una de las líneas tumorales (KYSE-70) mostró una respuesta similar a la TFD-ALA comparada a la línea normal, la otra línea tumoral (KYSE-450) resultó más resistente a la terapia.

También in vitro, Lang et al. (2001) compararon la biosíntesis de PpIX en células normales de queratinocitos de piel HaCaT, y en las células de melanoma Bro, SKMel-23 y SKMel-28. Los niveles de porfirinas varían entre las distintas líneas de 10 a 80 veces (SKMel-28 > HaCaT > SKMel-23 >> Bro), demostrando así que las células metastásicas de melanoma (SKMel-23, SKMel-28) acumulan mucha más PpIX que las células de melanoma primario (Bro), pero no comparadas con las células normales HaCaT.

Por otra parte, en el área de ALA-TFD aplicada al tratamiento de leucemia, se ha visto que las células de linfoma y también los linfocitos activos, presentan una mayor acumulación de PpIX a partir de ALA en las células malignas en comparación a los linfocitos normales (Rittenhouse-Diakun et al., 1995; Grebenova et al., 1998; Casas et al., 2002), probablemente debido al hecho de que las células activadas se dividen más rápidamente, usando reservas intracelulares de hierro para los citocromos y la síntesis de ADN y de esta manera se acumula una mayor cantidad de PpIX, al no acomplejarse con hierro para la síntesis de hemo (Hryhorenko et al., 1999).

Además, el ALA induce una mayor concentración de PpIX en células de fibrosarcoma, y en fibroblastos transfectados con el oncogén c-myc inmortalizado, el receptor IGF-1, IGF-1 y su receptor, v-fos, v-raf, v-K-ras, o v-abl en comparación con los cultivos primarios de fibroblastos normales y con líneas celulares de fibroblastos inmortalizados (Li et al., 1999)

Sin embargo, se puede ver que es difícil predecir la respuesta a la TFD-ALA a partir del modelo de acumulación de PpIX, por lo que un contenido alto de porfirinas no mostraría necesariamente una correlación con la respuesta al tratamiento fotodinámico, como se demostró en este capítulo.

## **I.5 Conclusión**

En conclusión, la línea celular tumoral obtenida por transfección del oncogén Ras sintetiza altas cantidades de PpIX a partir de ALA, pero es más resistente a ALA-TFD que la línea no tumoral parental. El mecanismo subyacente de esta respuesta no se relaciona con la acumulación del FS, pero probablemente sí esté relacionado con la activación de señales de supervivencia celular que provoca la inserción del oncogén Ras.

## **II. Resistencia de las células transfectadas con el oncogén Ras a la Terapia fotodinámica con diversos FSs y su relación con la adhesión celular**

En este capítulo decidimos estudiar si la resistencia al tratamiento fotodinámico en la línea HB4a-Ras se limitaba a la TFD a partir de las porfirinas formadas endógenamente por el ALA o si se trataba de una resistencia general a otros FSs y elucidar los mecanismos subyacentes a dicha resistencia.

### **II. 1 Toxicidad en oscuridad de los FSs**

Para definir el rango de concentraciones a emplear, primero se testeó la toxicidad en oscuridad de los FSs en las células HB4a y HB4a-Ras. Concentraciones mayores a 100  $\mu\text{M}$  PII, 1,2  $\mu\text{M}$  Verteporfin, 30  $\mu\text{M}$  MC540, 110  $\mu\text{M}$  NA, 7  $\mu\text{M}$  m-THPC y 10  $\mu\text{M}$  Ce6 fueron significativamente tóxicos (datos no mostrados). En los subsecuentes experimentos de cuantificación de los FSs, se emplearon concentraciones no tóxicas.

### **II. 2 Cuantificación de FSs y Terapia Fotodinámica**

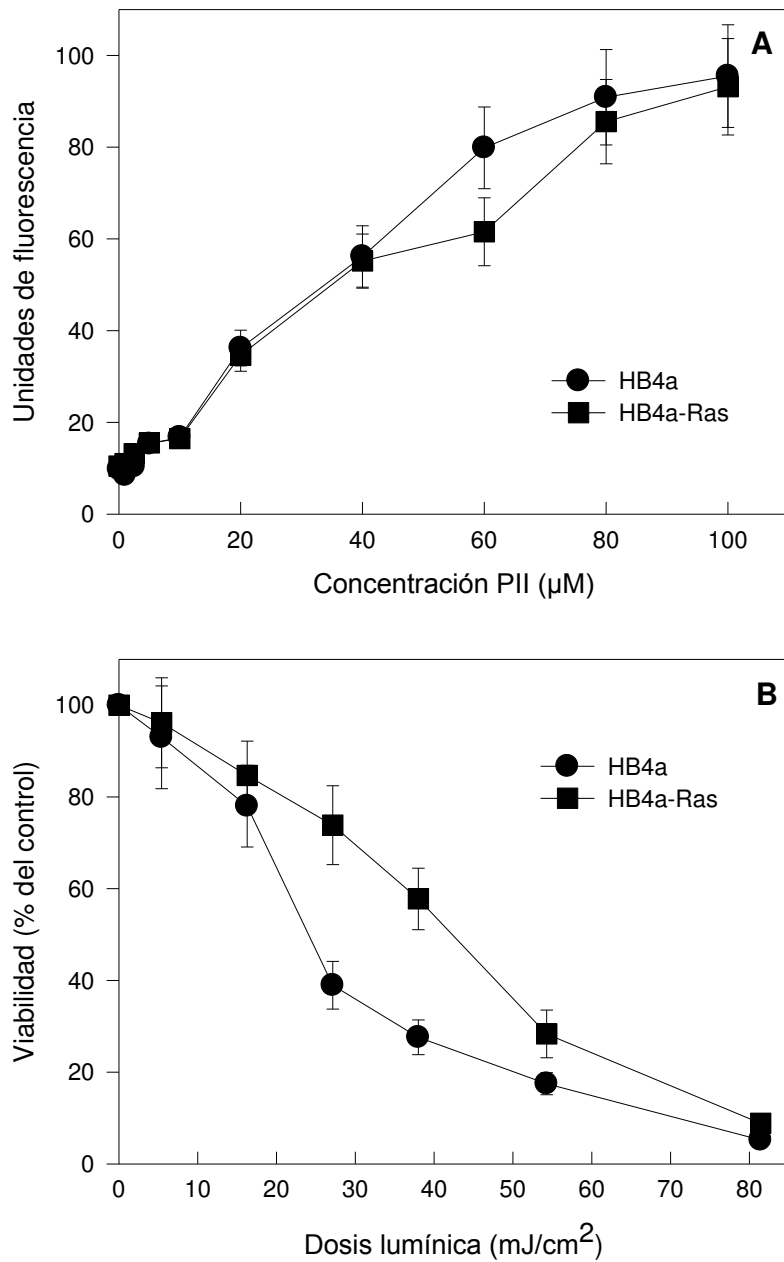
Se comparó la eficiencia de acumulación de los FSs cuantificados por fluorimetría empleando las longitudes de onda máximas de emisión y excitación respectivamente, incubando con PII, Verteporfin, NA, Ce6, PII, MC540 y m-THPC (Tabla 1 de Materiales y Métodos). Seguidamente, se pusieron a punto las condiciones óptimas de tiempos de incubación para luego realizar los experimentos de TFD.

El criterio de selección de las concentraciones de los FSs y tiempos para realizar los experimentos de TFD fue tal que a) se induzca igual concentración de FS en ambas líneas celulares, b) que se alcance una concentración intracelular de más de 3 veces sobre los valores de autofluorescencia del control, y c) que la dosis de luz requerida para fotosensibilizar el 50 % de las células no sea más alta que 120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para evitar tiempos de iluminación excesivamente prolongados ni menor a 0,2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para evitar tiempos excesivamente cortos.

## II. 2.1 Photofrin II

La Figura II.1A muestra que prácticamente se acumula la misma cantidad de PII en las células normales HB4a y tumorales HB4a-Ras en todo el rango de concentraciones empleado. Además, la acumulación intracelular de PII en ambas líneas celulares aumentó con la concentración, alcanzando el plateau en los valores de fluorescencia de PII 100  $\mu\text{M}$ . Basándonos en estudios anteriores (Casas et al., 2006), escogimos la concentración de 10  $\mu\text{M}$  para realizar los experimentos de TFD. Esta concentración induce una acumulación intracelular 3 veces más alta que los niveles basales y es una concentración fotoactiva en otras líneas celulares (Casas et al., 2006) y requiere tiempos de iluminación adecuados.

En la Figura II.1B se muestra la viabilidad de las células luego de 2 hs de incubación con PII y recibir el tratamiento con laTFD. La  $DL_{50}$  para las células HB4a es de 23  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  y para las HB4a-Ras es de 41  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Las células transfectadas con Ras muestran 2 veces mayor resistencia al tratamiento con PII.



**Figura II.1:** Acumulación intracelular de PII y respuesta a la TFD-PII en las células HB4a y HB4a-Ras.

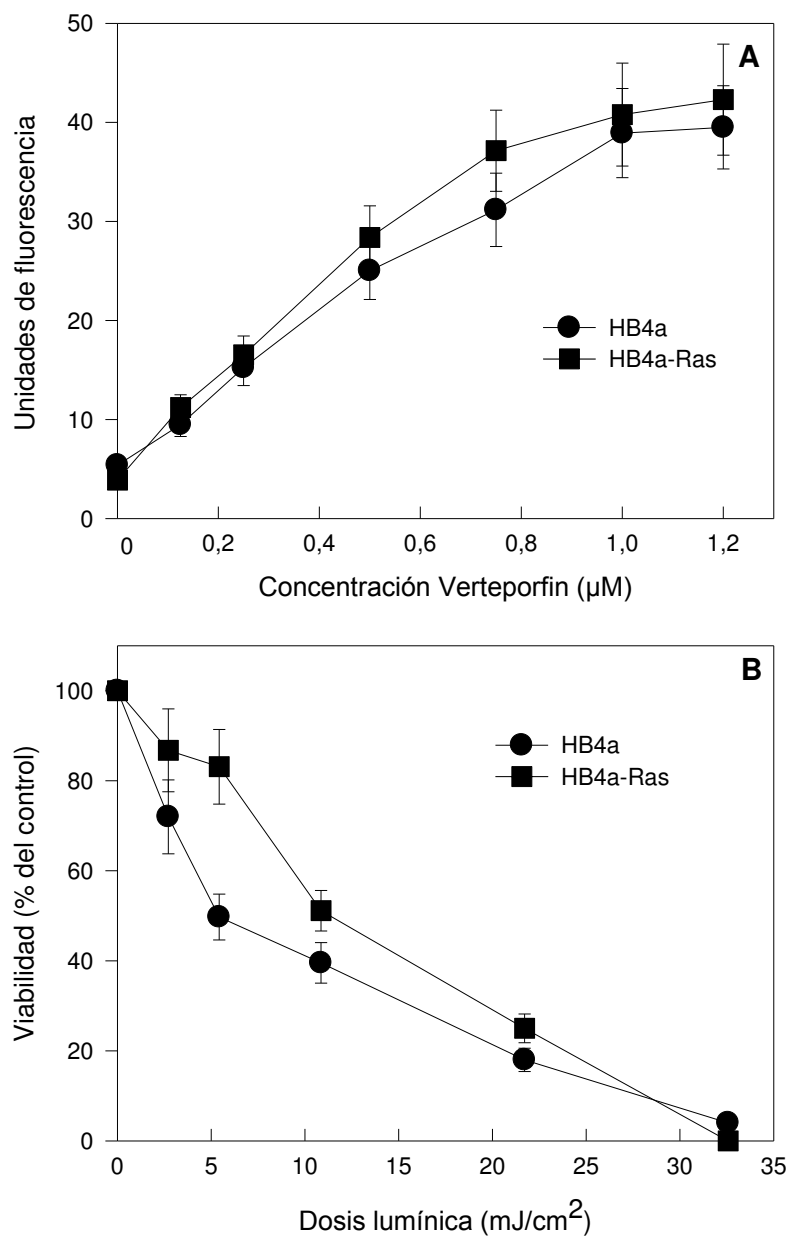
La Figura II.1A muestra la acumulación de PII luego de 2 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HB4a y HB4a-Ras. Las unidades de fluorescencia corresponden a  $10^5$  células.

La Figura II.1B muestra la TDF-PII luego de 2 hs de exposición a  $10 \mu\text{M}$  de PII y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con PII no irradiado.

## II. 2.2 Verteporfin

La Figura II.2A muestra que se acumuló la misma cantidad de Verteporfin tanto en las células normales como transfectadas en todo el rango de concentraciones empleado. La acumulación intracelular de Verteporfin aumentó también con la concentración a lo largo del rango analizado. El valor de plateau se observó aproximadamente con 1  $\mu\text{M}$  de Verteporfin en ambas células. La concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  se eligió para los experimentos de TFD porque induce una acumulación intracelular 5 veces más alta que los niveles basales, pero no alcanza los valores del plateau.

En consecuencia, las células se incubaron 3 horas con 0,5  $\mu\text{M}$  de Verteporfin antes de la TFD. La Figura II.2B muestra la viabilidad de las células después de la TFD. La  $DL_{50}$  fue 6,2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las células HB4a y 12,2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las HB4a-Ras. La línea celular HB4a-Ras fue 2 veces más resistente al tratamiento de TFD con Verteporfin.



**Figura II.2:** Acumulación intracelular de Verteporfin y respuesta a la TFD-Verteporfin en las células HB4a y HB4a-Ras.

La Figura II.2A muestra la acumulación de Verteporfin luego de 3 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HB4a y HB4a-Ras. Las unidades de fluorescencia corresponden a  $10^5$  células.

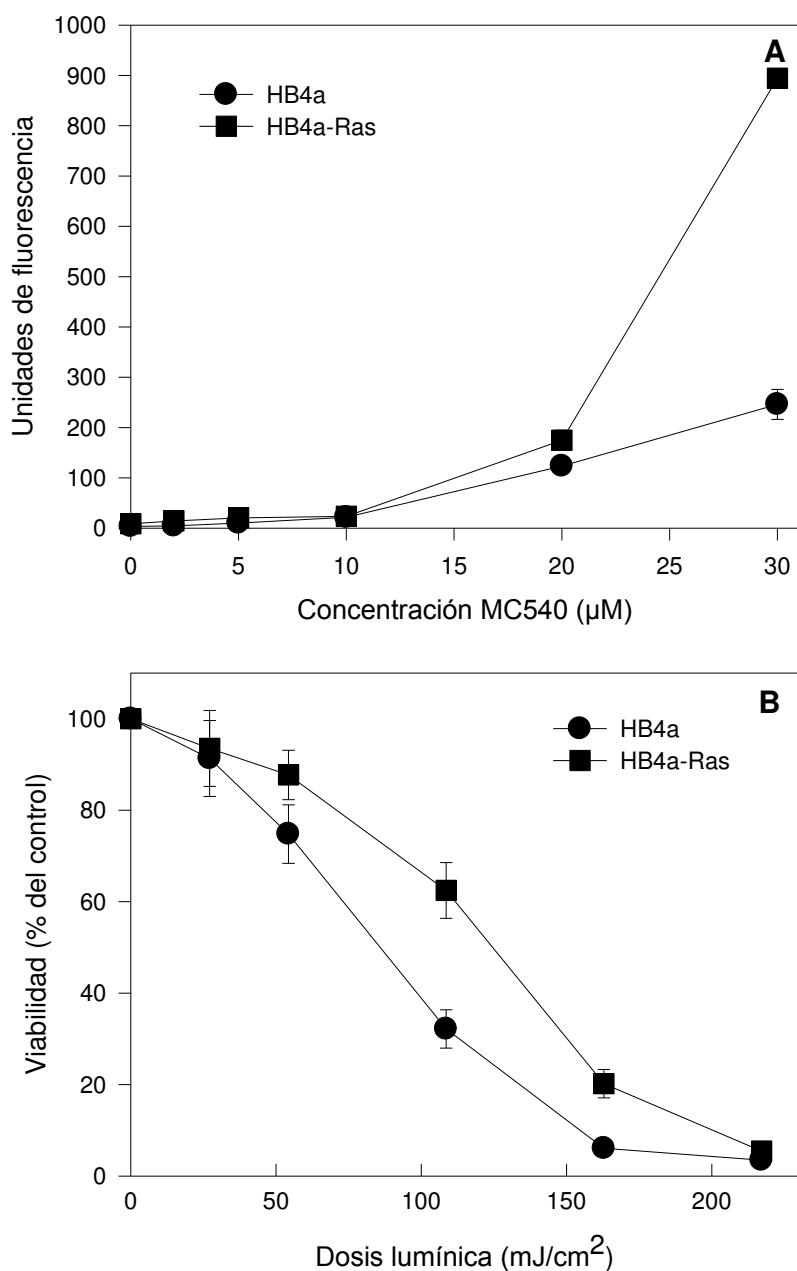
La Figura II.2B muestra la TDF-Verteporfin luego de 3 hs de exposición a  $0,5 \mu\text{M}$  de FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con Verteporfin no irradiado.

## II. 2.3 Merocianina 540

La Figura II.3A muestra que hasta una concentración de 20  $\mu\text{M}$  se acumula similar cantidad de MC540 en ambas líneas celulares. A concentraciones más altas del FS, la acumulación intracelular en las células transfectadas con el oncogén Ras fue de hasta más de tres veces mayor que en las células normales. Se eligió una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de MC540 para realizar los experimentos de TFD.

La Figura II.3B muestra la viabilidad de las células después de la TFD. La  $DL_{50}$  fue de 73  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las células HB4a y 120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para HB4a-Ras. La línea celular HB4a-Ras fue 1,6 veces más resistente al tratamiento de TFD con MC540.





**Figura II.3:** Acumulación intracelular de MC540 y respuesta a la TFD-MC540 en las células HB4a y HB4a-Ras.

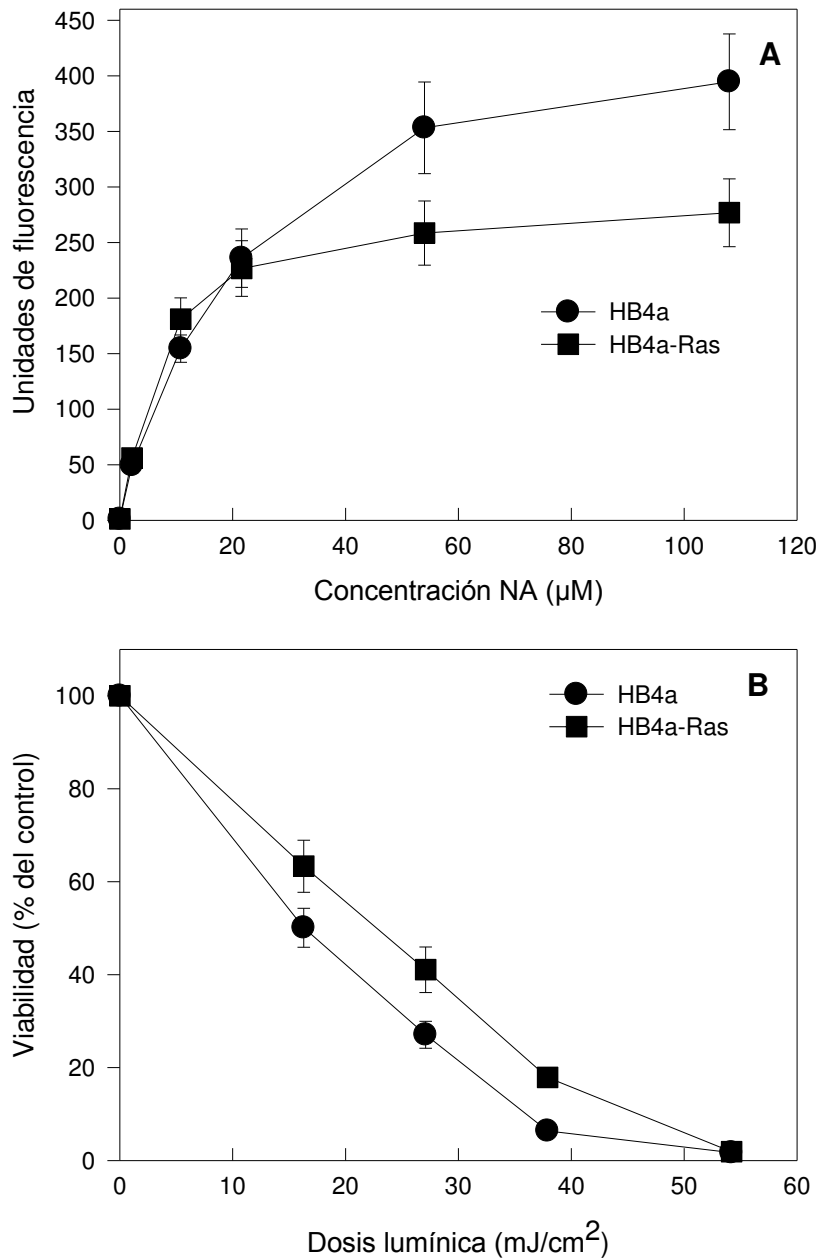
La Figura II.3A muestra la acumulación de MC540 luego de 2 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HB4a y HB4a-Ras. Las unidades de fluorescencia corresponden a  $10^5$  células.

La Figura II.3B muestra la TDF-MC540 luego de 2 hs de exposición a  $20 \mu\text{M}$  del FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con MC540 no irradiado.

## II. 2.4. Naranja de Acridina

La Figura II.4A muestra que hasta la concentración de 20  $\mu\text{M}$ , la cantidad de NA acumulada en ambas líneas celulares aumenta linealmente y sin diferencias significativas entre ambas. A concentraciones mayores que 20  $\mu\text{M}$ , la acumulación de NA en las células transfectadas con el oncogén Ras alcanza la saturación, mientras que en las células normales lo hace a valores más altos, alcanzando el plateau con 50  $\mu\text{M}$ . Para realizar los experimentos de TFD se empleó 20  $\mu\text{M}$ , concentración a la cual se induce igual acumulación de NA en ambas líneas celulares sin llegar al plateau.

La Figura II.4B muestra la viabilidad de las células después de la TFD con NA. La  $\text{DL}_{50}$  fue de 17  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las células HB4a y 22  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para HB4a-Ras. La línea celular HB4a-Ras fue 1,3 veces más resistente al tratamiento de TFD con NA.



**Figura II.4:** Acumulación intracelular de NA y respuesta a la TFD-NA en las células HB4a y HB4a-Ras.

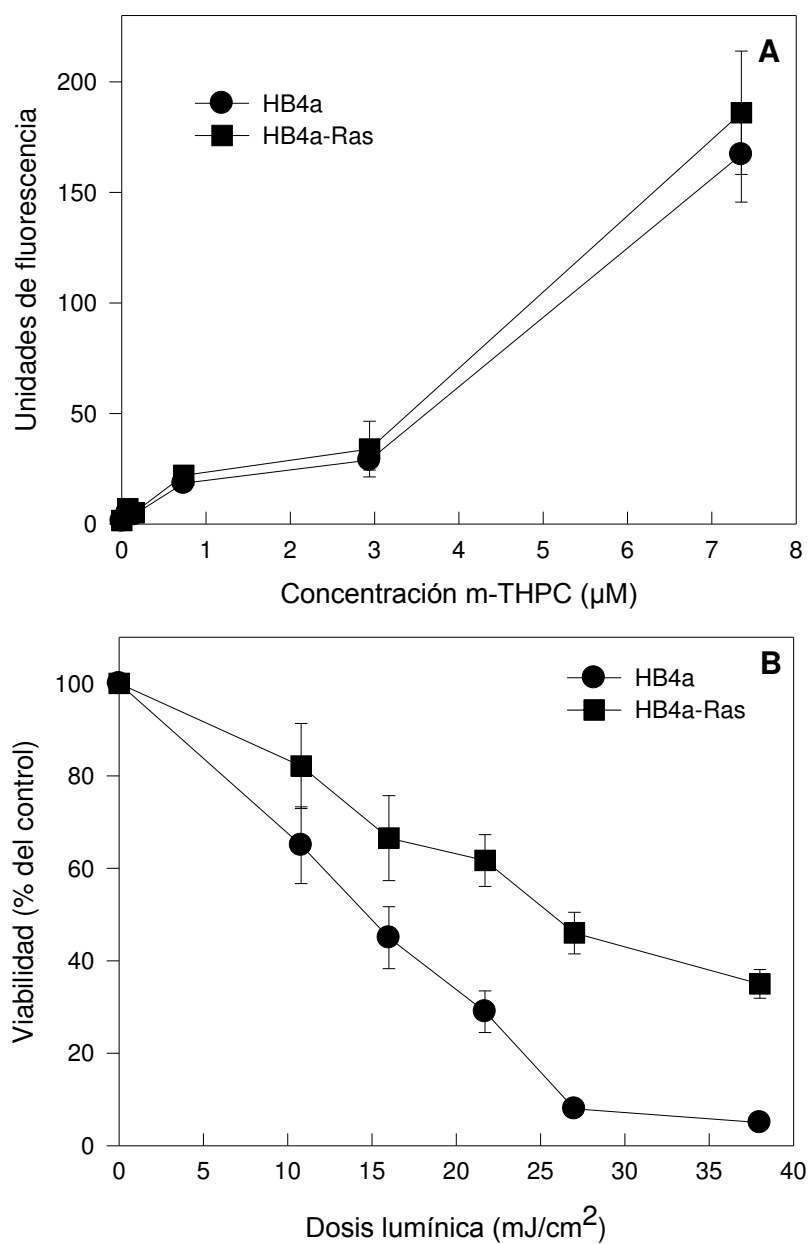
La Figura II. 4A muestra la acumulación de NA luego de 2 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HB4a y HB4a-Ras. Las unidades de fluorescencia corresponden a  $10^5$  células.

La Figura II.4B muestra la TDF-NA luego de 2 hs de exposición a  $20 \mu\text{M}$  del FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con NA no irradiado.

## II. 2.5 m-THPC

La Figura II.5A muestra que la misma cantidad de m-THPC es acumulada en ambos tipos celulares en todo el rango de concentraciones analizado. La concentración elegida para llevar a cabo la TFD es de  $0,7 \mu\text{M}$ , ya que debido a la alta eficiencia fotosensibilizante de m-THPC, concentraciones mayores requerían tiempos muy cortos de iluminación.

La Figura II.5B muestra la viabilidad de las células después de los experimentos de TFD. La  $DL_{50}$  fue de  $15 \text{ mJ/cm}^2$  para las células HB4a y  $27 \text{ mJ/cm}^2$  para HB4a-Ras. La línea celular HB4a-Ras fue 1,8 veces más resistente al tratamiento de TFD con m-THPC.



**Figura II.5:** Acumulación intracelular de m-THPC y respuesta a la TFD-m-THPC en las células HB4a y HB4a-Ras.

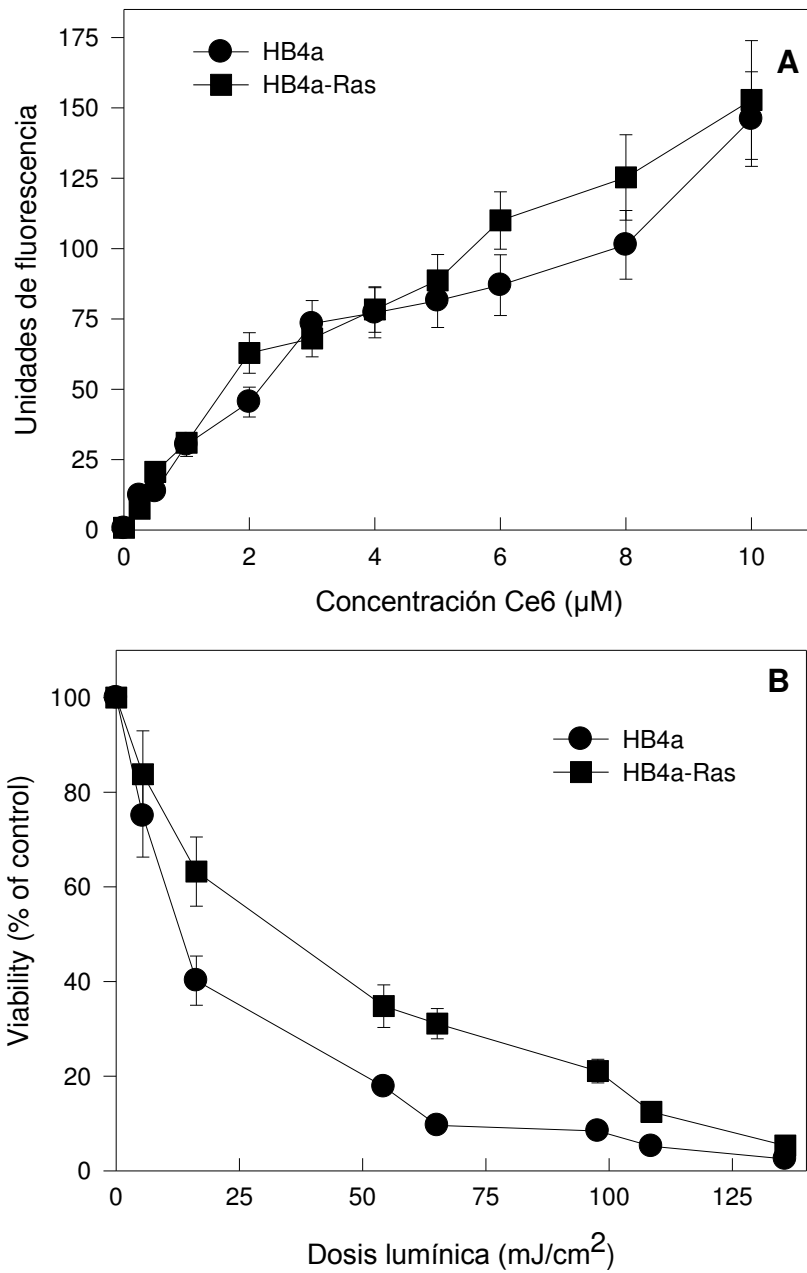
La Figura II.5A muestra la acumulación de m-THPC luego de 3 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HB4a y HB4a-Ras. Las unidades de fluorescencia corresponden a  $10^5$  células.

La Figura II.5B muestra la TDF-m-THPC luego de 3 hs de exposición a  $0,7 \mu\text{M}$  del FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con m-THPC no irradiado.

## II. 2.6 Clorina e6

La Figura II.6A muestra que en todo el rango de concentraciones probado se acumula en ambos tipos celulares la misma cantidad de Ce6. La concentración de  $0,5 \mu\text{M}$  es la que se eligió para realizar los experimentos de TFD, porque a esta concentración de FS se necesitan dosis de luz dentro del rango de  $0,2$  a  $120 \text{ mJ/cm}^2$  para matar el 50% de las células.

La Figura II.6B muestra la viabilidad de las células después de los experimentos de TFD. La  $DL_{50}$  fue de  $12,5 \text{ mJ/cm}^2$  para las células HB4a y  $32 \text{ mJ/cm}^2$  para HB4a-Ras. La línea celular HB4a-Ras fue 2,5 veces más resistente al tratamiento de TFD con Ce6.



**Figura II.6:** Acumulación intracelular de Ce6 y respuesta a la TFD- Ce6 en las células HB4a y HB4a-Ras.

La Figura II.6A muestra la acumulación de Ce6 luego de 3 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HB4a y HB4a-Ras. Las unidades de fluorescencia corresponden a  $10^5$  células.

La Figura II.6B muestra la TDF-Ce6 luego de 3 hs de exposición a  $0,5 \mu\text{M}$  del FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con Ce6 no irradiado.

Estos resultados demostraron que las células transfectadas con Ras aumentan significativamente su resistencia al tratamiento fotodinámico. Se observa una correlación con resultados previos realizados en nuestro laboratorio que mostraban que las células HB4a-Ras son más resistentes a antineoplásicos tales como Metotrexato, 5-Fluoruracilo, Ciclofosfamida, Mitomicina C y Doxorrubicina (datos no mostrados).

### **II. 3. Experimentos de localización subcelular de FSs**

Con el objetivo de elucidar los mecanismos de resistencia a la TFD, se realizaron experimentos de localización subcelular de los distintos FSs en microscopía confocal de fluorescencia. No se observaron diferencias en la localización subcelular de los FSs entre la línea normal y la tumoral que puedan explicar la diferencia en la respuesta a la TFD entre ambas líneas celulares (Figura II. 7 A y B).

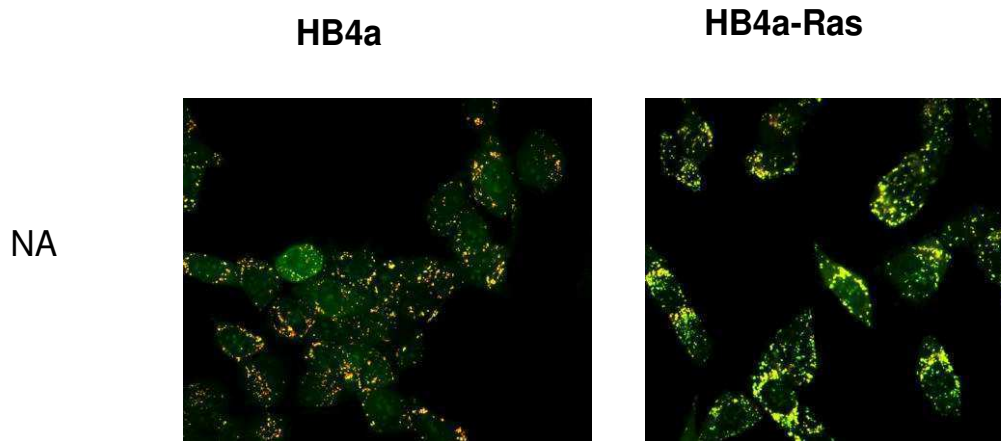
PII, Verteporfin y m-THPC mostraron en ambas líneas celulares localización a nivel mitocondrial, retículo endoplasmático y citoplasmática difusa.

Por otro lado Ce6 presentó una localización marcadamente golgiana, y NA un patrón de localización lisosomal.

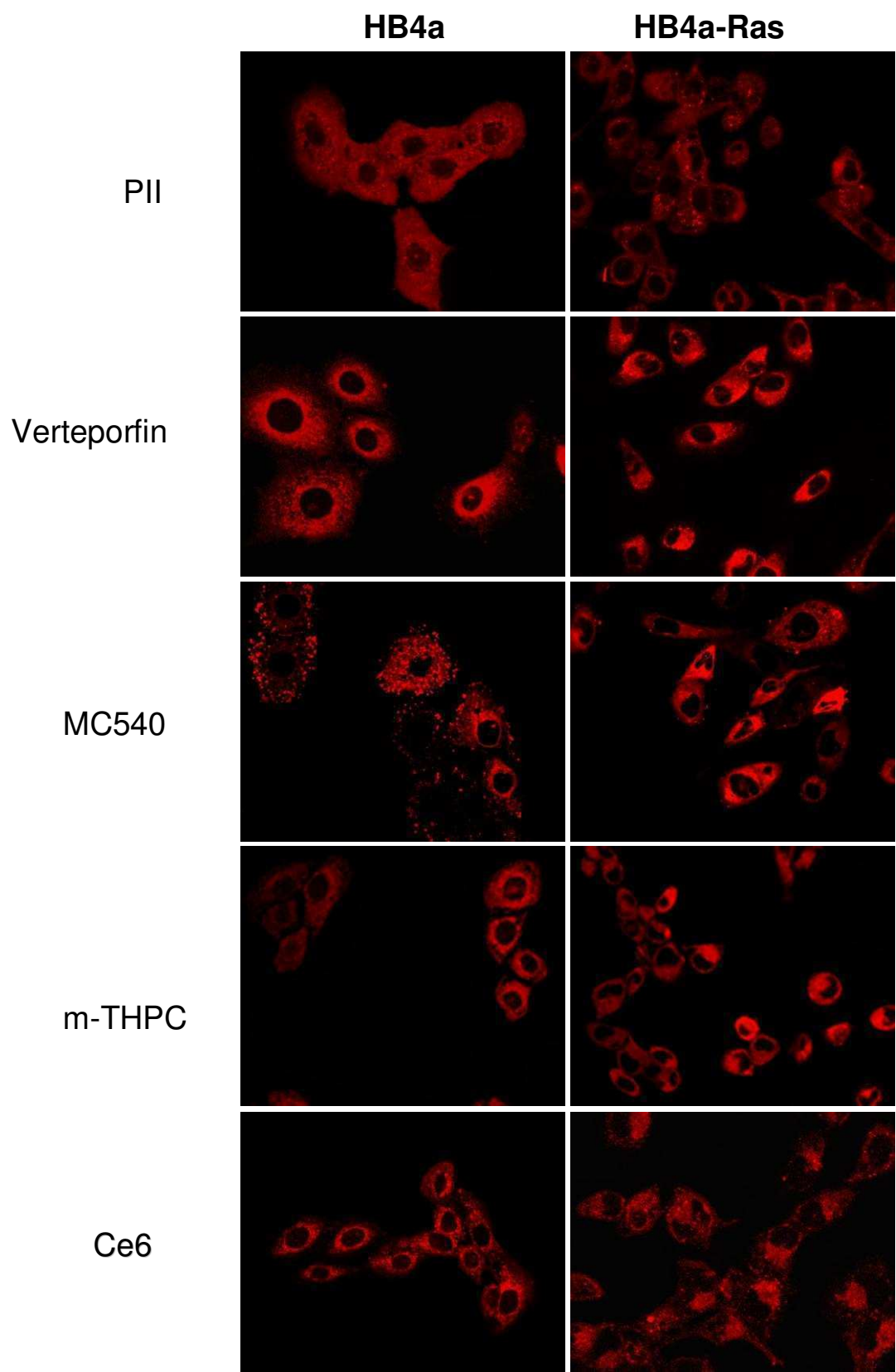
MC540 se localizó en ambas líneas tanto en el aparato de Golgi, como en mitocondrias y en retículo endoplasmático. En cambio, se observaron vesículas de evaginación e invaginación de membranas con contenido citoplasmático sólo en la línea HB4a.

Estos sitios de localización subcelular para cada FS se confirmaron realizando ensayos de co-localización con marcadores específicos para organelas tales como mitotracker, lisotracker y NBD- BODIPY.





**Figura II.7 A:** Localización intracelular de NA por microscopía confocal de fluorescencia  
Aumento 60x.

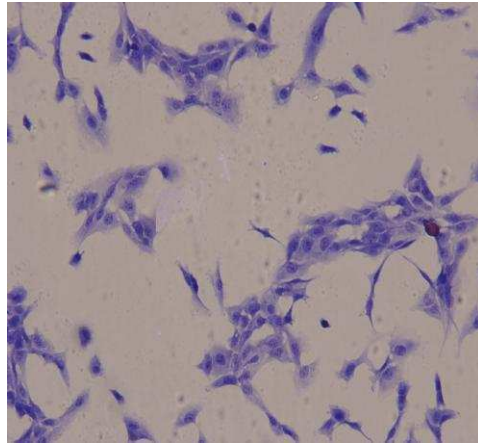


**Figura II.7B:** Localización intracelular de PII, Verteporfin, MC540, m-THPC y Ce6 por microscopía confocal de fluorescencia. Aumento 60X.

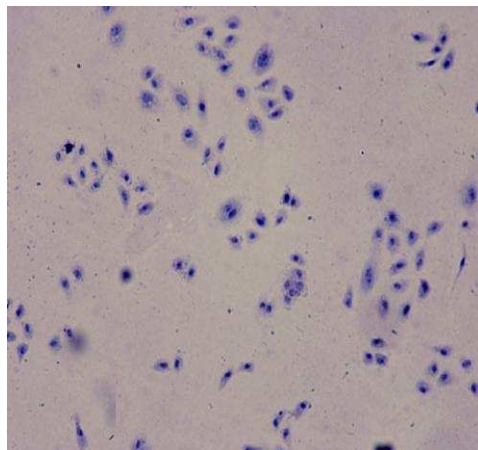
## II. 4 Morfología celular

En la Figura II.8 se observa que las células HB4a presentan una morfología diferente a las HB4a-Ras. Las primeras muestran una forma más plana, mientras que las HB4a-Ras son más redondeadas. Sin embargo, los volúmenes de las células en suspensión son similares para ambos tipos, demostrando de esta manera que no existen diferencias de tamaño entre ambas células que puedan explicar el mecanismo general de resistencia a TFD. Las diferencias morfológicas provienen simplemente una estructura del citoesqueleto y de proteínas de adhesión diferente.

**HB4a**



**HB4a-Ras**



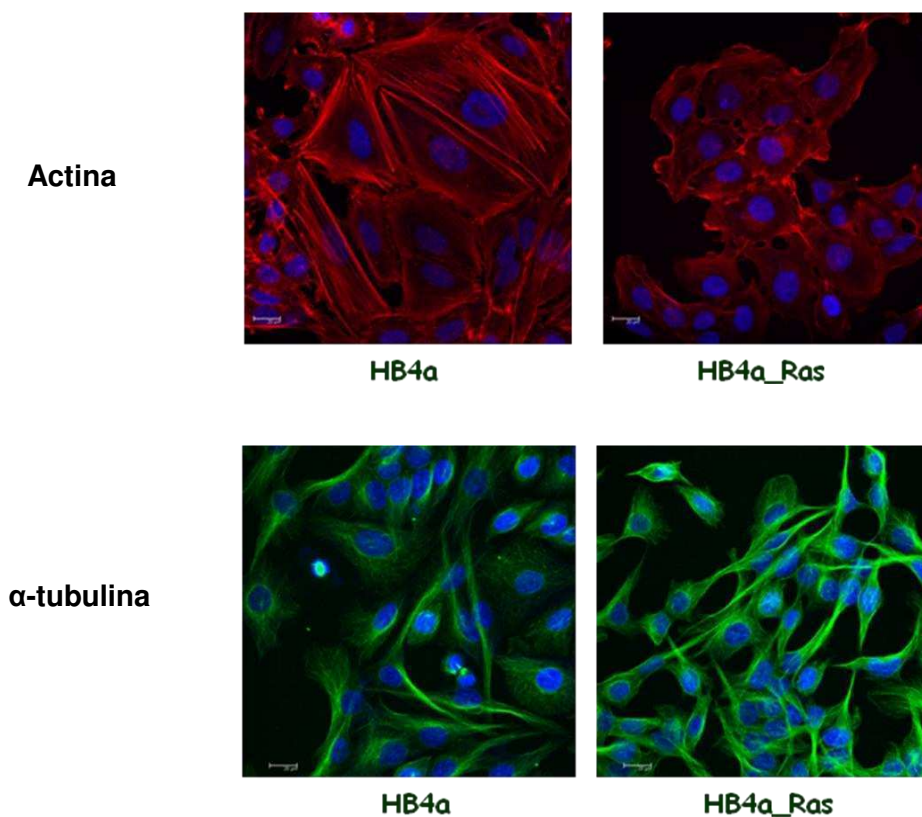
**Figura II.8:** Morfología de células HB4a y HB4a-Ras. Tinción con azul de toluidina. Aumento 20X.

## II. 5. Ensayos de inmunofluorescencia

Dado que ambas líneas celulares presentan una morfología bien diferenciada, se realizaron una serie de ensayos para evaluar la expresión de moléculas del citoesqueleto, microtúbulos y de adhesión celular y así encontrar un correlato con los mecanismos de supervivencia a TFD.

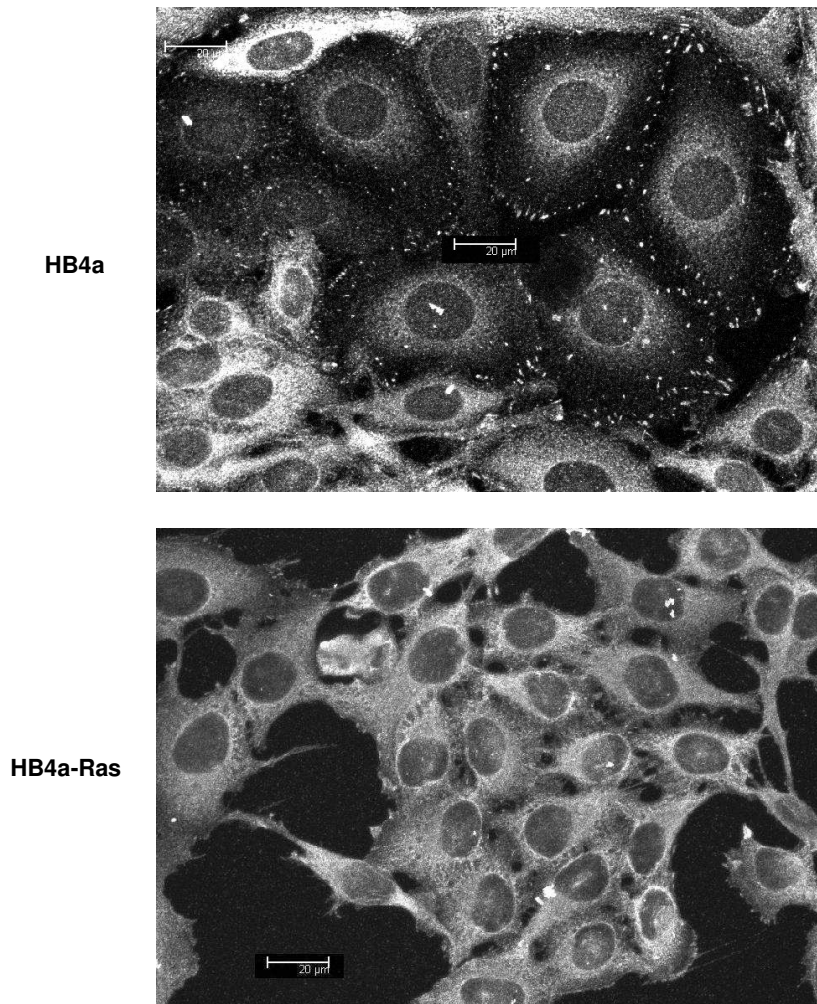
En cuanto a la expresión de proteínas de citoesqueleto, las células HB4a expresan extensas fibras de estrés que atraviesan la superficie celular, mientras que las células HB4a-Ras expresan un grueso anillo de actina cortical del cual salen estructuras en forma de agujas que protruyen desde la zona de actina cortical hacia el exterior, y además en forma de una fina malla en toda la célula. En estas últimas no se observaron fibras de estrés que atraviesen todo el citoplasma celular.

Por otro lado no se observaron diferencias significativas en la expresión de los microtúbulos presentes en ambos tipos celulares cuando se realizó la inmunofluorescencia de  $\alpha$ -tubulina (Figura II.9).



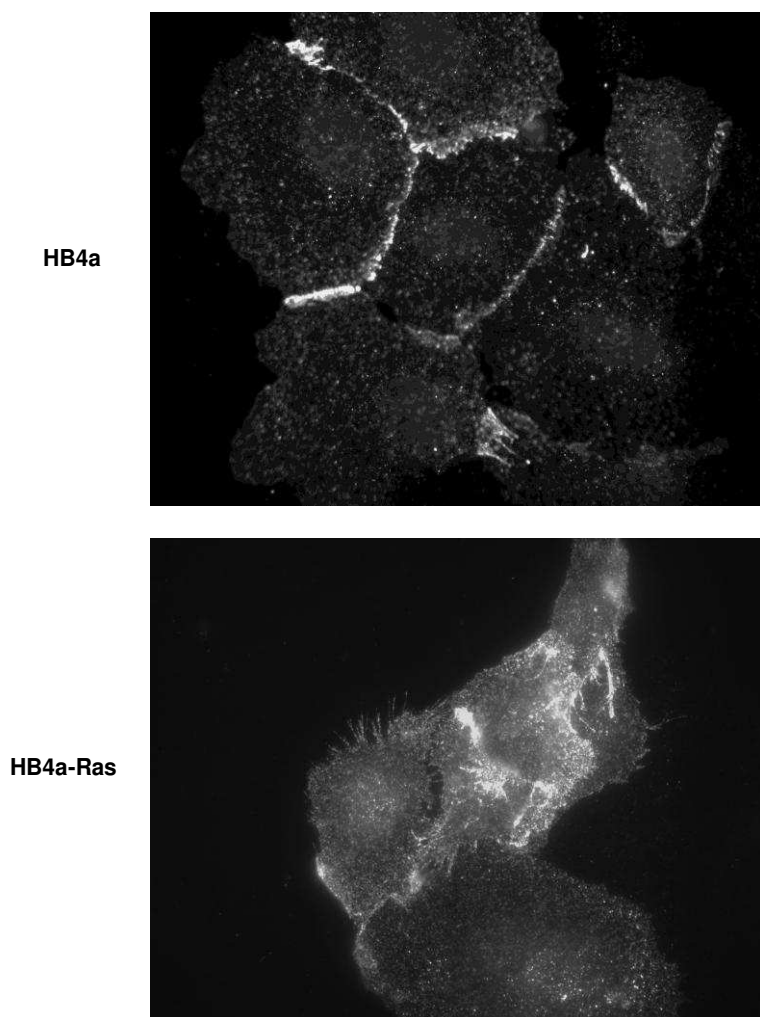
**Figura II.9:** Microfotografías de fluorescencia mostrando la distribución de *F-actina* y  $\alpha$ -tubulina en células HB4a y HB4a-Ras. Contratinción con Hoechst. Aumento 40X.

La inmunofluorescencia de vinculina revela que la distribución de dicha proteína de adhesión focal se encuentra confinada a la zona de los contactos focales en el caso de las células HB4a mientras que por el contrario, las HB4a-Ras muestran fluorescencia citoplasmática inespecífica (Figura II.10).



**Figura II.10:** Microfotografías de fluorescencia mostrando la distribución de vinculina en células HB4a y HB4a-Ras. Escala: 20μ. Aumento 60x.

En el caso de E-cadherina, en las células transfectadas con Ras, la expresión se encuentra en los sitios de contacto célula-célula pero los mismos no se encuentran definidos como en las células HB4a, sino que se trata de un patrón difuso y ramificado en los sitios de contacto intercelular (Figura II.11).

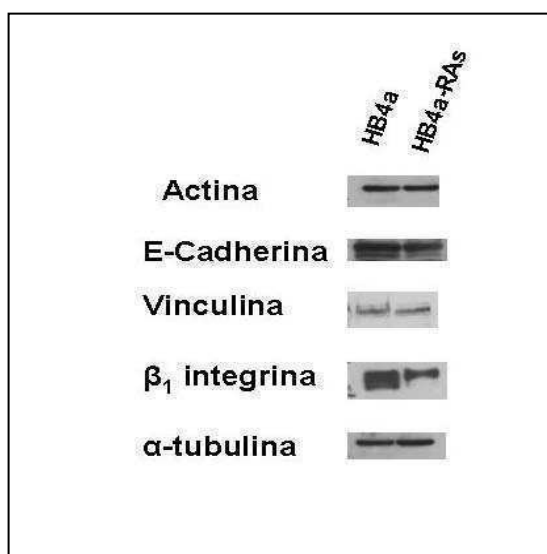


**Figura II.11:** Microfotografías de fluorescencia mostrando la distribución de E-cadherina en células HB4a y HB4a-Ras. Aumento 60x.

## **II. 6. Expresión por Westernblot de E-cadherina, vinculina, actina, $\beta 1$ y $\beta 3$ integrina, MDR y survivina en células HB4a y HB4a-Ras**

En la Figura II.12 se observa que la expresión de E-cadherina, actina total y de vinculina es similar en ambos tipos celulares, mientras que la molécula de unión a sustrato  $\beta 1$  integrina se encuentra menos expresada en las células HB4a-Ras. La proteína  $\alpha$ -tubulina se empleó como control de carga. Los resultados fueron confirmados por el análisis densitométrico de las bandas.

Las moléculas relacionadas con los procesos de supervivencia MDR-1 y survivina, no fueron detectadas ni en las células HB4a ni en su contrapartida transfectada con Ras. Asimismo no se observó expresión de la  $\beta 3$  integrina, molécula involucrada en la unión a vitronectina.



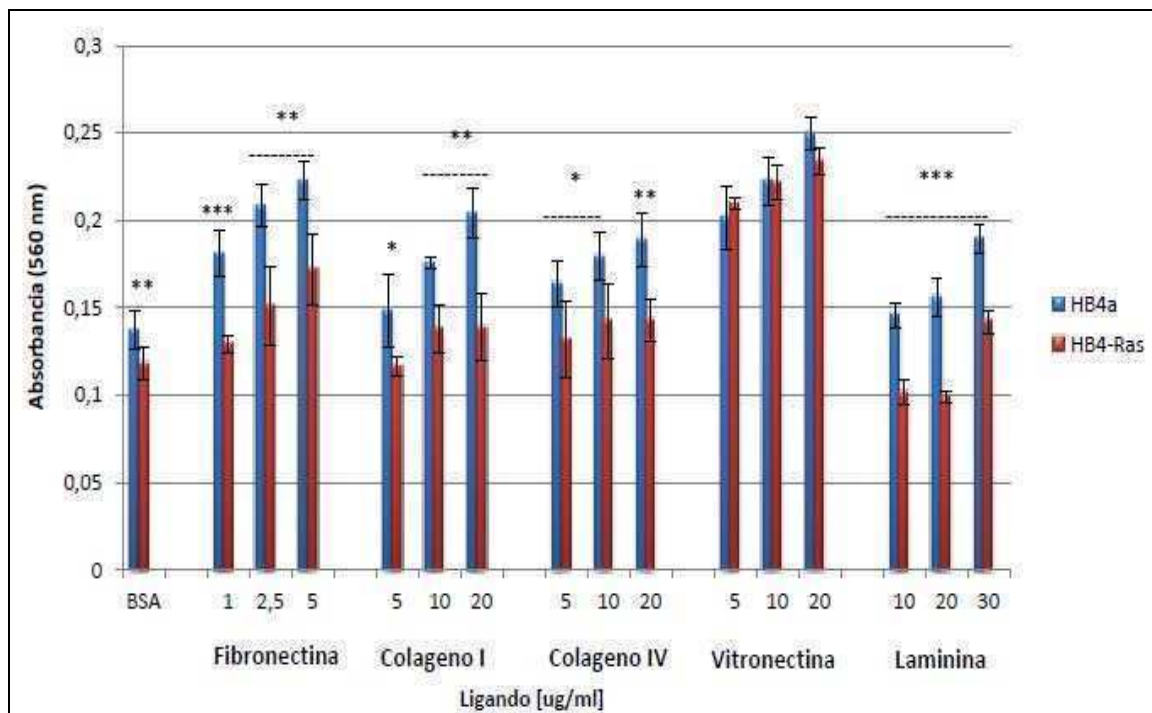
**Figura II.12:** Westernblots de actina, E-cadherina, vinculina,  $\beta 1$  y  $\beta 3$  integrina, MDR y survivina

Se emplearon extractos totales de proteínas provenientes de monocapas celulares subconfluentes. Se empleó  $\alpha$ -tubulina como control de carga de proteínas. La Figura es representativa de al menos 3 experimentos.

## II. 7 Ensayo de adhesión celular a proteínas de MEC

Se realizó el ensayo de adhesión en el rango de concentraciones óptimas para cada sustrato y pudo observarse que para los ligandos de MEC fibronectina, colágeno I y IV y laminina y de la proteína inespecífica BSA, las células HB4a-Ras presentaron significativamente una menor adhesión que las HB4a. Solamente el pegado a vitronectina fue igual en ambos tipos celulares (Figura II.13).

Mientras que las células HB4a se adhieren a las 5 proteínas de MEC de manera dependiente de la concentración de ligando, las células HB4a-Ras presentan sólo claramente esta característica con las proteínas de MEC fibronectina y vitronectina.



**Figura II.13:** Adhesión de las células HB4a y HB4a-Ras a proteínas de MEC

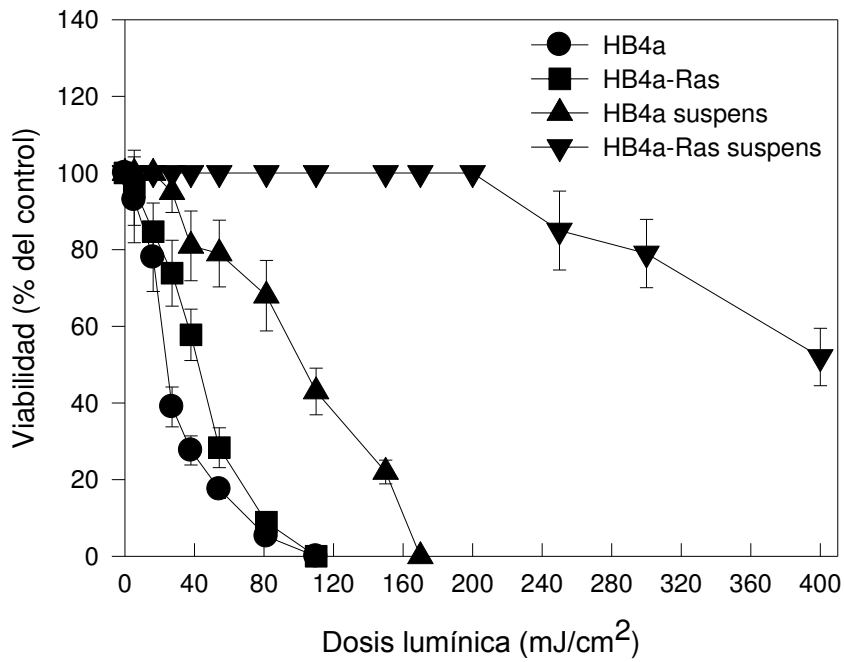
Se realizó el ensayo de adhesión a los ligandos fibronectina, colágeno I y IV, vitronectina y laminina a un tiempo de 40 min. Se cuantificó la absorbancia a 560 nm luego de tinción con cristal violeta y solubilización con SDS. Diferencias significativas entre HB4a y HB4a-Ras para cada ligando: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$

## II. 9 Ensayos de TFD con células en suspensión

Para demostrar la correlación directa entre adhesión y resistencia al tratamiento fotodinámico, se realizó la TFD de células en suspensión, previamente expuestas al fotosensibilizante PII. Se observó que tanto para las células HB4a como para las HB4a-Ras, las  $DL_{50}$  aumentaron con respecto a la TFD en células adheridas (Figura II.14). La  $DL_{50}$  aumentó casi 5 veces en las HB4a (de  $23 \text{ mJ/cm}^2$  a  $110 \text{ mJ/cm}^2$ ) y 10 veces en las HB4a-Ras (de  $41 \text{ mJ/cm}^2$  a  $400 \text{ mJ/cm}^2$ ). Resultados similares se observaron para el resto de los FSs.



Esto demuestra que la adhesión es un factor fundamental en la resistencia al tratamiento fotodinámico, y que las células que sobreexpresan Ras, que de por sí son menos adherentes, la desagregación celular influye en mayor manera que en las células parentales.



**Figura II.14:** Ensayo de TFD en suspensión

Las células adheridas a sustrato se expusieron 2 hs a 10  $\mu$ M de PII, y se realizó la TFD en suspensión.

El porcentaje de células viables se determinó por MTT al día siguiente.

## II. 10 Discusión

En el presente trabajo hemos encontrado que las células HB4a transfectadas con el oncogén Ras presentan resistencia al tratamiento fotodinámico con varios FSs de muy diferente estructura química. Esto nos sugirió en principio que la resistencia se debería a algún mecanismo de defensa celular general, inducido a partir de la generación de radicales libres producto de la TFD. Sin embargo, encontramos resistencia cruzada con los antineoplásicos Metotrexato, 5-Fluorouracilo, Ciclofosfamida, Mitomicina C y Doxorubicina, que no ejercen su acción a través de la generación de especies reactivas de oxígeno.

El grado de resistencia obtenido respecto a las células parentales varió entre 1,3 y 2,5 veces dependiendo del FS. Los FSs que indujeron más resistencia fueron Ce6, PII, Verteporfin y m-THPC, mientras que los que indujeron menor resistencia fueron los compuestos no tetrapirrólicos NA y MC540. Si bien se usaron FSs con distintas eficiencias de fotosensibilización (Nowak-Sliwinska et al., 2006), no se encontró una correlación entre eficiencia y resistencia al tratamiento.

PII, m-THPC, Verteporfin y Ce6 inducen en HB4a y HB4a-Ras igual acumulación de FSs en todo el rango de concentraciones analizado. Por otro lado, los FSs no tetrapirrólicos NA y MC540 inducen igual acumulación de FS a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones las células HB4a acumulan mayor cantidad de NA y HB4a-Ras de MC540.

Sin embargo, hemos llevado a cabo la TFD en condiciones de igual concentración intracelular de FS en ambas líneas, con lo cual demostramos que el mecanismo de resistencia encontrado no se relaciona con una menor acumulación de FS.

Espada et al. (2009) encontró que la activación oncogénica de H-Ras en la línea celular PAM212 de queratinocitos murinos puede prevenir el daño fotodinámico mediado por disrupción de la adhesión de E-cadherina. En este trabajo, la TFD se había efectuado con el FS ftalocianina de Zn, el cual tiene como uno de sus blancos de acción, los complejos de adhesión de E-cadherina. En las células transfectadas con Ras este blanco celular no había sido afectado, y esto se debe, según se ha demostrado en el citado trabajo, a las vías de señalización PI3K/Akt inducidas por el oncogén Ras.

Sin embargo, la resistencia a TFD no es un mecanismo general en todas las células transfectadas con Ras. Pazos et al. (2007) no encontró resistencia al tratamiento de TFD

empleando ftalocianina de Aluminio, en células endoteliales de aorta de conejo transfectadas con el oncogén EJ-Ras. Sin embargo, se trata de células no tumorales y de otro tipo de oncogén Ras.

La mitocondria y secundariamente el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi son los sitios preferenciales de acumulación de FSs tetrapirrólicos (Runnels et al., 1999; Yow et al., 2000, Merlin, 2003, Teiten et al., 2003, Hsieh et al., 2003). Sin embargo, se ha demostrado que en algunos casos la localización es un proceso dinámico. Por ejemplo, PII se localiza *in vitro* a tiempos cortos en la membrana plasmática, y cuando los períodos de incubación son largos se localiza en membranas intracelulares tales como la mitocondrial, (Morgan et al., 2000). Por otra parte, NA se acumula en lisosomas o ácidos nucleicos (de Duve et al., 1974) dependiendo de su estructura (Hiruma et al., 2007, Tatsuta et al., 1988). La localización de MC540 por el contrario, ha sido descrita como intracitoplasmática, pero con gran acumulación en la membrana plasmática (Diwu & Lown, 1994).

En el presente trabajo hemos encontrado localizaciones subcelulares en las células HB4a y HB4a-Ras similares a las encontradas en la literatura, y en general no hubo diferencias en la localización entre ambas líneas. Solamente se encontraron vesículas de evaginación e invaginación de membranas con contenido citoplasmático sólo en las células HB4a.

Las células parentales muestran un mayor "spreading", con lo cual se presentan más planas y con mayor número de contactos focales comparadas con las transfectadas con Ras, que son más redondeadas y presentan menor adhesión al sustrato. Esto da una apariencia de una mayor fluorescencia de los FS en las células HB4a-Ras, que sin embargo, se debe a la forma celular.

La forma celular se encuentra claramente modificada en las células HB4a-Ras. La morfología de una célula está determinada *in vivo* por la MEC en la cual las células descansan e *in vitro* por el sustrato en el cual las células crecen. El sustrato a su vez induce la producción celular de material extracelular y proteínas específicas que controlan la morfología celular (Gospodarowicz, 1978). La morfología celular es un factor importante en la regulación de la sensibilidad celular a los mitógenos, especialmente en las células cuya tasa de proliferación es dependiente del sustrato (Dodson, 1974).

Los cambios en la morfología celular, ya sean relacionados con la adhesión o con el citoesqueleto, promueven la formación de cuerpos apoptóticos y contribuyen a la depuración de los mismos por parte del sistema inmune. Un caso especial es la 'anoikis', o sea la apoptosis inducida por el desprendimiento del sustrato de MEC de células

adherentes (Ruoslahti, 1999). Se ha observado que la transformación maligna por inserción de oncogenes como H o K-Ras induce resistencia a la anoikis (Frisch and Francis, 1994; Rak et al., 1995).

Se ha observado que el daño fotodinámico está fuertemente ligado a los procesos de adhesión celular. Cuando diferentes líneas celulares se sometieron a TFD, se encontró una asociación entre respuesta al tratamiento y eficiencia de plaqueo (Perry et al., 1990). Por otra parte, células resistentes a TFD mostraron una reducción en la eficiencia de plaqueo y un aumento del número de células requerido para el desarrollo de tumores in vivo (Casas et al., 2008a, Luna & Gomer, 1991). Estos hallazgos sugieren que podría existir una correlación entre una menor adhesión a sustrato y la resistencia a la TFD.

En el presente trabajo se encontró que algunos parámetros de adhesión se encuentran alterados en las células transfectadas con el oncogén Ras. La distribución de la proteína de adhesión a sustrato vinculina y de la de adhesión célula-célula E-cadherina se encuentra alterada en las células HB4a-Ras, si bien se vio una expresión similar por Westernblot. De manera similar, la proteína de citoesqueleto F-actina se encuentra reorganizada en las células que sobrepresan Ras, lo cual demuestra la existencia de alteraciones de citoesqueleto inducidas por la activación oncogénica. En consecuencia, la reubicación de estas moléculas dentro de la célula modifica su función. Por Westernblot, asimismo se observó una menor expresión de  $\beta 1$  integrina en HB4a-Ras.

E-cadherina es una molécula de adhesión presente en la membrana plasmática de la mayoría de las células epiteliales. De hecho, E-cadherina actúa como un supresor tumoral inhibiendo los procesos de invasión y metástasis, y frecuentemente se encuentra inhibida o degradada durante la transformación maligna. Algunos tumores como los de mama en los que se encuentra sobrepresado el oncogén Ras, frecuentemente poseen una regulación negativa o localización anómala de E-cadherina (Li & Mattingly, 2008, Nam, 2002). Más aún, la inhibición de las vías de señalización de Ras puede restaurar la expresión de E-cadherina en una variedad de tumores humanos (Nam, 2002).

La reducción de los contactos célula-célula y célula-sustrato asociados a los procesos tumorales están íntimamente relacionados con los rearrreglos de las proteínas de citoesqueleto, especialmente actina y vinculina (Geiger et al. 1980; Schliwa et al., 1984), además de la pérdida de proteínas de MEC tales como fibronectina. Estos rearrreglos se ha visto que pueden ser inducidos por la activación de oncogenes tales como H-Ras (Feramisco et al., 1984).

Los componentes de los complejos focales tales como vinculina y talina, cuando no se encuentran acomplejados con integrinas, se encuentran libres en el citosol, y se cree que proteínas de la familia de Ras serían responsables de la regulación de su ensamblaje dentro de los complejos de adhesión (Hall, 1992).

De manera similar, la remodelación de actina con la consecuente pérdida de fibras de estrés suele ser consecuencia de la activación oncogénica de las vías de señalización de actina producida por Ras y Src (Rao et al., 2004; Takahashi et al., 1986).

En trabajos previos de nuestro grupo, habíamos encontrado una redistribución de actina, E-cadherina y vinculina en células con resistencia a TFD adquirida por múltiples exposiciones al tratamiento, confirmando una vez más la relación entre la alteración de estos parámetros y la resistencia a TFD (Casas et al., 2008b).

Asimismo, la adhesión a proteínas de MEC de las células HB4a-Ras se encuentra disminuida respecto a las parentales, excepto en el caso de vitronectina. También está reducida la adhesión inespecífica a BSA. Mientras que las células HB4a se adhieren a las 5 proteínas de MEC estudiadas, de manera dependiente de la concentración de ligando, las células HB4a-Ras presentan sólo claramente esta característica con las proteínas de MEC fibronectina y vitronectina. Esto demuestra el patrón de alteración de adhesión en las células transfectadas con el oncogén Ras. La única proteína de MEC cuya adhesión se encuentra conservada en las HB4a-Ras es la vitronectina. Vitronectina se une al sustrato principalmente a través de las subunidades  $\beta_3$  o  $\beta_5$  de integrina, a diferencia del resto de los ligandos, que se unen mayormente a través de la subunidad  $\beta_1$ . Debido a que la integrina  $\beta_1$  se encuentra downregulada por la inserción de Ras, proponemos la hipótesis de que esta integrina estaría modificando la unión a los distintos ligandos, y que estaría jugando un rol en la resistencia al tratamiento fotodinámico. En cambio,  $\beta_3$  integrina no se expresa ni en las células parentales ni luego de la inserción oncogénica. Sin embargo, la adhesión dependiente de la concentración de vitronectina en ambas células, sugiere que alguna otra integrina podría estar involucrada en dicha unión.

Creemos que el conjunto de modificaciones que induce Ras sobre proteínas de citoesqueleto e integrinas da el conjunto de características observadas, que se traducen en una menor adhesión a sustrato y a otras células, además de una morfología celular diferente.

Hughes et al. (1997) encontraron que el oncogén H-Ras puede suprimir la activación de integrinas en células de ovario CHO. Si bien se cree que H-Ras no interactúa directamente con las integrinas, dicho oncogén podría afectar la activación de las

moléculas de integrina por medio de señales intracelulares que no impliquen la interacción directa. Empleando células osteoblásticas humanas, Tanaka et al. (2002) encontraron que H-Ras reduce la adhesión de los mismos a proteínas de MEC mediada por integrinas  $\beta 1$ . Además se encontró que H-Ras suprime la activación de integrinas en fibroblastos (Huges, 2002; Kashiwagi 1997) pero por el contrario, promueve su activación en otros tipos celulares tales como células hematopoyéticas (Liu, 1999; Fujimoto, 2001). Esta acción dual de H-Ras sobre la activación de integrinas es fuertemente dependiente del tipo celular. Cabe destacar que las células CHO, al igual que las HB4a, son de origen epitelial.

El conjunto de resultados nos llevan a elaborar la hipótesis de que alteraciones en la adhesión de las células transfectadas con Ras podrían ser las responsables de la resistencia a TFD. Esta hipótesis está respaldada por los trabajos de Espada et al. (2009) quienes describieron que las células de queratinocitos murinos PAM212 transfectadas con H-Ras no responden a la TFD mediada por el fotosensibilizante Zn-ftalocianina, el cual ataca entre otros blancos celulares, a los complejos de adhesión de E-cadherina. Tanto la activación constitutiva de Ras como de PI3K ejercen el efecto fotoprotector. Dicha resistencia se correlacionó con un menor desprendimiento del sustrato luego del tratamiento fotodinámico.

Para demostrar la correlación directa entre adhesión y resistencia al tratamiento fotodinámico, se realizó la TFD de células en suspensión, previamente expuestas a los FSs, y encontramos que en ambas líneas celulares aumentó la resistencia a la TFD, pero mucho más marcadamente en las células HB4a-Ras. Esto demuestra que la adhesión celular es un factor fundamental en la resistencia al tratamiento fotodinámico, y que en las células que sobreexpresan Ras, que de por sí son menos adherentes, la desagregación celular influye en mayor manera que en las células parentales.

## **II.11 Conclusión**

En el presente trabajo hemos encontrado que la inserción del oncogén Ras en células normales lleva a un cambio de fenotipo relacionado con una menor adhesión a sustrato y célula-célula y a alteraciones en el citoesqueleto. Creemos que estas alteraciones podrían estar relacionadas con la resistencia al tratamiento fotodinámico inducida por la expresión del oncogén. Por otra parte, sabemos que la resistencia adquirida no se relaciona con el contenido ni con la distribución intracelular de cada FS, ni con la expresión de moléculas relacionadas con los procesos de supervivencia tales como MDR y survivina.

En relación al mecanismo CAM-DR, descrito para la resistencia a antineoplásicos, parece contraponerse con el mecanismo hallado de resistencia a TFD, ya que en el primero, la adhesión protege a las células de los efectos letales inducidos por la quimioterapia, mientras que en el segundo ocurre lo contrario. En futuros ensayos estudiaremos si la resistencia a los antineoplásicos conferida por Ras, también se incrementa en células en suspensión. De encontrarse que la resistencia a TFD actúa de manera opuesta a la resistencia a antineoplásicos, se abre una perspectiva importante en la combinación de ambas modalidades terapéuticas, como así también en la manera de tratar las resistencias a ambas terapias.

### **III. Cambios en la distribución de actina y E-cadherina inducidos por la TFD a partir de ALA**

En el capítulo anterior se encontraron diferencias de distribución en la proteína de citoesqueleto, actina y en la proteína de contacto célula-célula, E-cadherina, entre las células HB4a y HB4a-Ras. En el presente capítulo estudiaremos el impacto de la TFD mediada por ALA sobre la distribución diferencial de actina y E-cadherina en ambos tipos celulares, tratando de elucidar los detalles del posible rol de estas proteínas en los mecanismos de resistencia.

#### **III.1 Morfología celular luego de distintos tiempos de ALA-TFD en células HB4a y HB4a-Ras**

En estas experiencias se ha empleado una única dosis de luz, que fue de 230 mJ/cm<sup>2</sup>, la cual induce aproximadamente un 70% de muerte celular en las células HB4a y un 30% en las transfectadas con Ras luego de 19 hs post ALA-TFD (Capítulo I).

Luego de 10 minutos del tratamiento con ALA-TFD, alrededor del 13 a 15 % de las células HB4a y HB4a-Ras comienzan a ser dañadas (Tabla III.1). El fotodaño progresa de igual manera en ambas líneas celulares hasta una 1 hora de iniciado el tratamiento, induciendo aproximadamente el 77% de viabilidad celular en ambas líneas. Sin embargo, a partir de las 3 hs, la citotoxicidad progresa más rápidamente en las células HB4a que en las células transfectadas con el oncogén Ras ( $44 \pm 3\%$  vs  $68 \pm 7\%$  respectivamente luego de 6 hs), como una consecuencia intrínseca de la resistencia al tratamiento. Mientras que en las células HB4a-Ras, la viabilidad se recupera completamente luego de 48 hs de tratamiento con ALA-TFD, en las células HB4a el daño producido impide que las células se dividan y recuperen el número inicial.



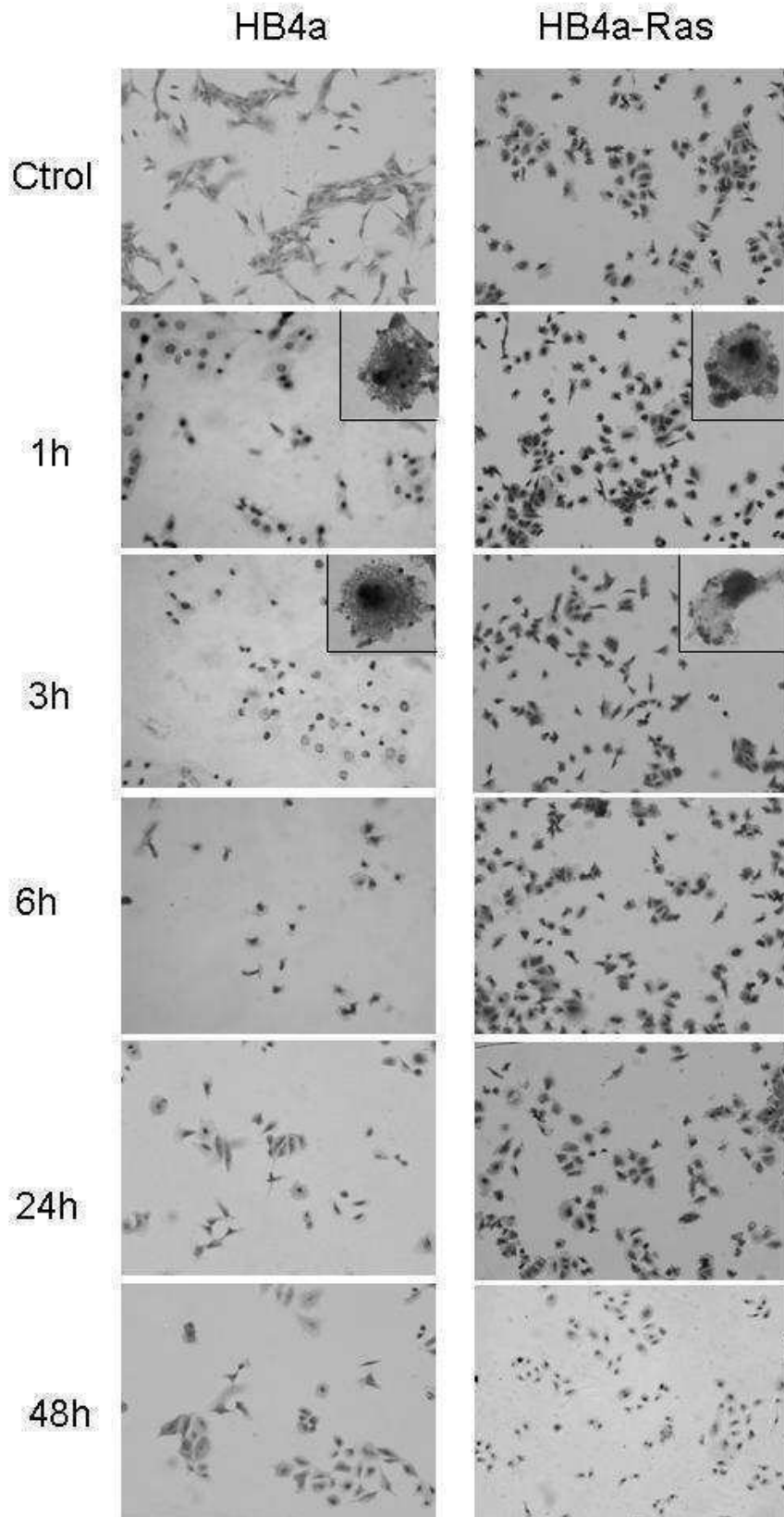
**Tabla III.1:** Determinación de la fototoxicidad por ensayo de MTT a diferentes tiempos luego de ALA-TFD.

Tiempos luego de la TFD	HB4a	HB4a-Ras
10 min	85 ± 9	87 ± 7
20 min	83 ± 7	84 ± 6
30 min	80 ± 5	82 ± 8
1 h	77 ± 8	77 ± 9
3 hs	56 ± 4	70 ± 6
6 hs	44 ± 3	68 ± 7
24 hs	36 ± 3	73 ± 6
48 hs	38 ± 2	100 ± 9

Las células fueron tratadas 3 hs con ALA 1 mM y con dosis de luz de 230 mJ/cm<sup>2</sup>, y se realizó el ensayo de MTT luego de 19 hs. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad respecto al control sin tratamiento.

La Figura III.1 muestra la tinción de las células con azul de Toluidina a diferentes tiempos luego del tratamiento con ALA-TFD con 230 mJ/cm<sup>2</sup>. Como ya hemos visto en el Capítulo I, la inserción de Ras induce cambios per se en la morfología celular. Mientras que las células HB4a se extienden más sobre el sustrato, las transfectadas con Ras son más redondeadas, con menos contactos de adhesión.

La morfología celular cambia en ambas líneas celulares en función al tiempo post ALA-TFD. Luego de 1 h del tratamiento con ALA-TFD, los núcleos de HB4a y HB4a-Ras se observan condensados, aunque el grado de daño es mayor para las células HB4a. Muchas de las células HB4a ya se desprenden tan pronto como a la hora de comenzado el tratamiento. Luego de 1 h y 3 hs post ALA-TFD, las células HB4a-Ras muestran la presencia de vesículas picnóticas en torno a la membrana celular, las cuales son características de necrosis (Juarranz et al., 2001) (Figura III.1 inserto). Por otro lado, el desprendimiento celular es característico de las células HB4a y además encontramos otra señal de necrosis, que es la vacuolarización citoplasmática, que también es más marcada en las células HB4a (Ver insertos de Figura III.1). Ambas líneas celulares comienzan a reponerse del daño a partir de las 6 horas luego del tratamiento y la recuperación morfológica es completa luego de las 24 hs, aunque algunas células HB4a sobrevivientes han adquirido rasgos de las HB4a-Ras.



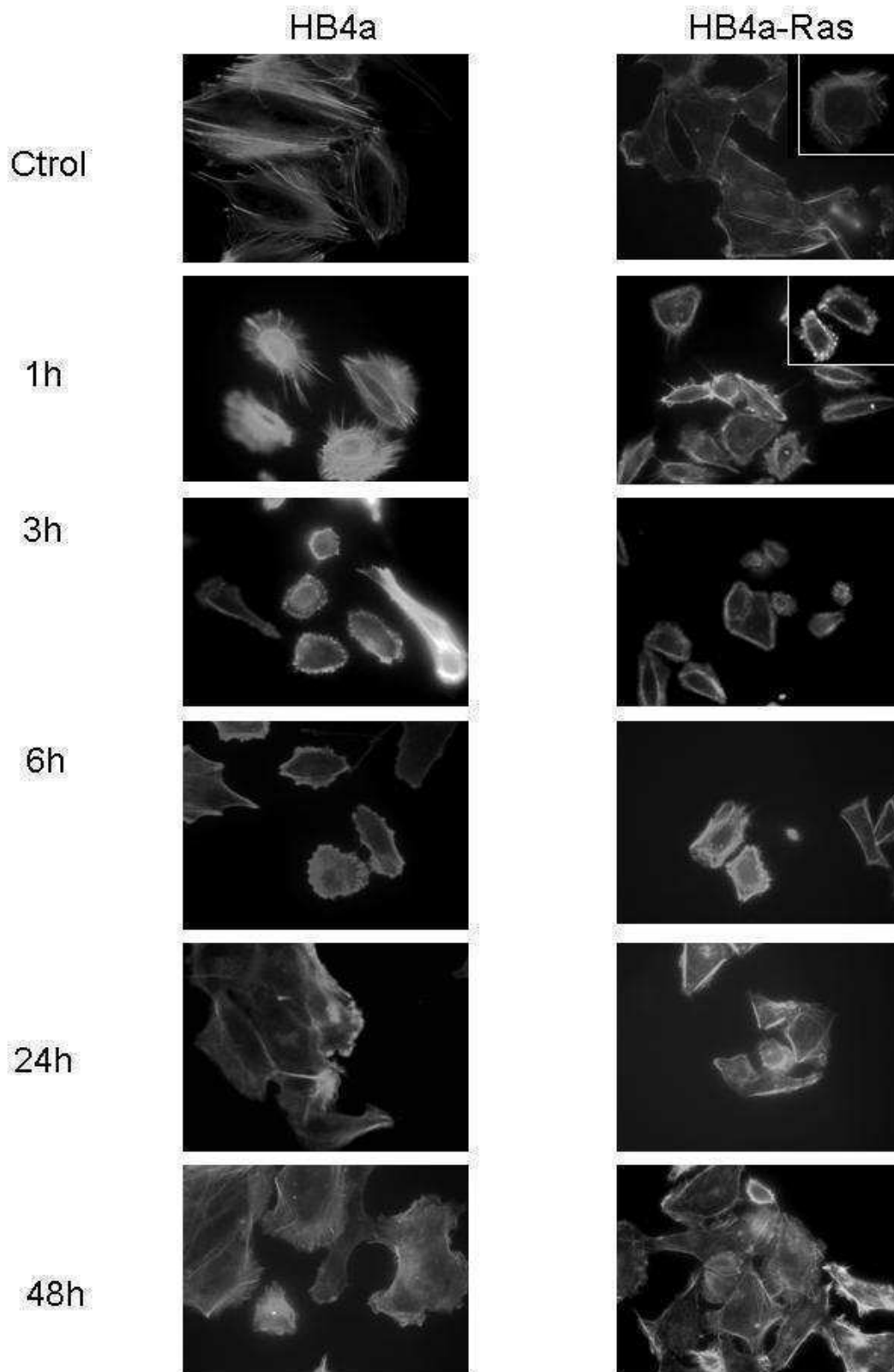
**Figura III.1: Morfología** de las células HB4a y HB4a-Ras luego del tratamiento con ALA-TFD. Células fijadas y teñidas con azul de Toluidina a diferentes tiempos post-TFD. Aumento 20X. Insertos: En HB4a-Ras 1 h y 3 hs, y HB4a 3hs se observan detalles de vesículas picnóticas. En HB4a 1 h y 3 hs se observan células vacuolizadas (100X).

### **III.2 Cambios en la distribución de actina inducidos por ALA-TFD**

La Figura III.2 muestra la distribución de F-actina en las células HB4a y HB4a-Ras luego de diferentes tiempos post-ALA-TFD. En las células HB4a control, podemos observar largas fibras de estrés extendidas a lo largo del citoplasma. En las células HB4a-Ras control se observa la presencia de un anillo de actina cortical grueso, además de una fina malla de actina intracelular, y gran cantidad de fibras de estrés en la periferia celular, organizadas en forma de púas que protruyen desde la célula hacia el exterior (Ver Figura III.2. Inserto HB4a-Ras control).

El tratamiento con ALA-TFD induce sobre las células HB4a una gran desorganización de las fibras de estrés, y una formación de micropúas de actina y en muchas células, la aparición de cinturones de actina perinucleares (1 hora luego del daño). Luego de 3 hs de fotodaño, comienzan a aparecer protuberancias de actina sobre la superficie de la membrana, en correlación con lo observado en el ítem III.1. Hacia las 6 hs luego de la TFD, se comienza a evidenciar un anillo de actina cortical, similar al que presentan las células HB4a-Ras control. A las 24 hs luego del fotodaño, las células HB4a comienzan a recuperarse. Sin embargo, luego de las 48 hs, muchos de los rasgos de desorganización de actina permanecen presentes en las células sobrevivientes de HB4a, conservando características similares a las células HB4a-Ras control.

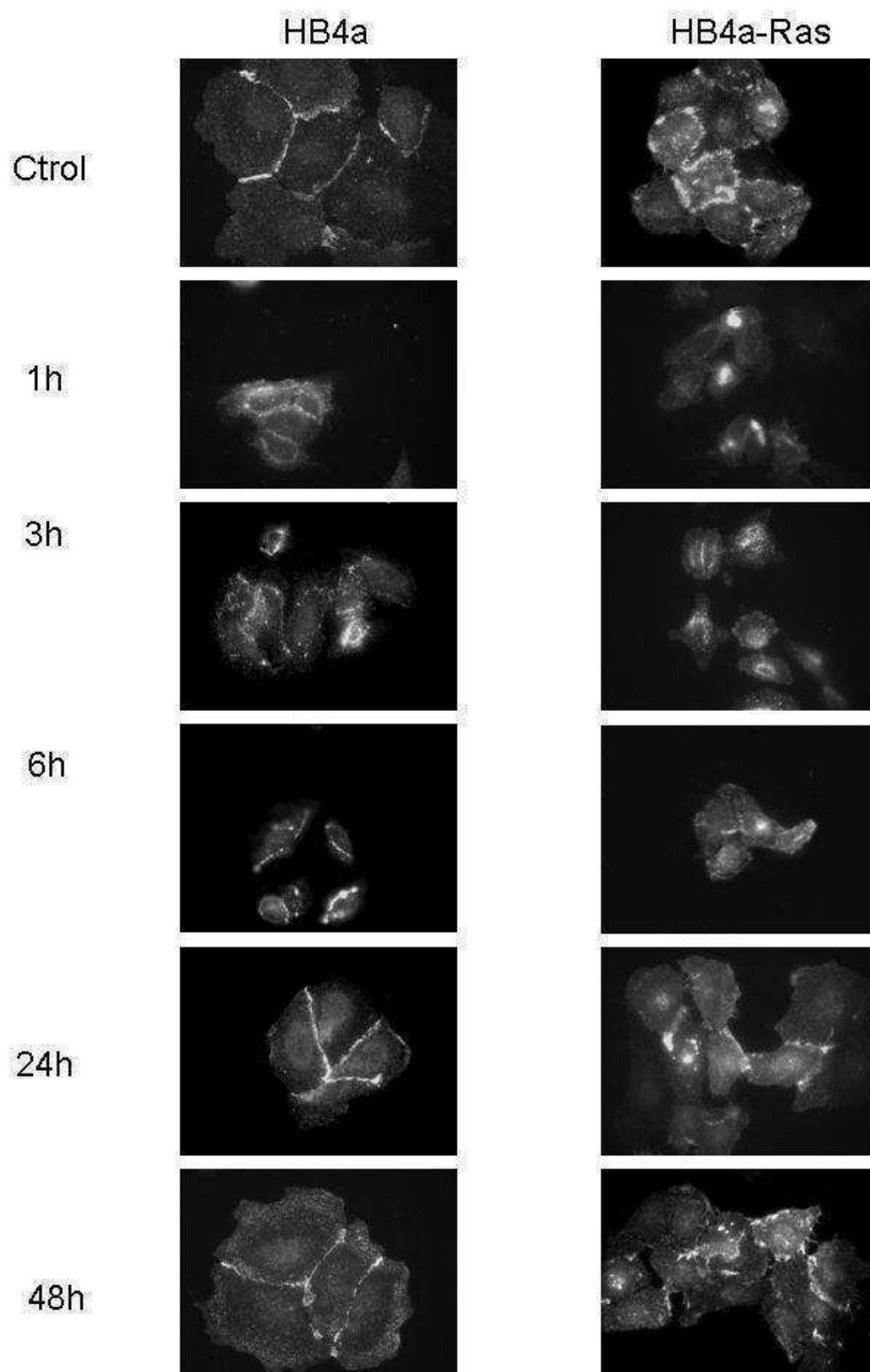
En las células HB4a-Ras, la distribución de F-actina exhibe señales de daño luego de 1 h post ALA-TFD. Aparecen protuberancias en la superficie de la membrana en muchas células dañadas y además, el borde cortical se hace más grueso, debido probablemente a la contracción celular. El patrón de distribución de actina comienza a recuperarse entre las 6 y 24 hs después del tratamiento, y la recuperación es completa a las 48 hs, en términos de porcentaje de células dañadas y de distribución de actina.



**Figura III.2:** Fotografías de los microfilamentos de las células de HB4a y HB4a-Ras luego de ALA-TFD. Monocapas fijadas y teñidas con F-actina a diferentes tiempos post-TFD. Insertos: Se muestra en el control de las células HB4a-Ras un ejemplo de la localización periférica celular de las fibras de estrés y luego de 1 h post-tratamiento, se muestran las protuberancias superficiales membranosas (40X).

### **III.3 Cambios en la distribución de E-cadherina inducidos por ALA-TFD**

La Figura III.3 muestra que mientras las células HB4a exhiben una distribución normal de E-cadherina en los contactos célula-célula, la distribución de las células transfectadas con Ras se encuentra alterada. Sin embargo, el tratamiento de TFD no induce cambios particulares en la distribución de E-cadherina en ambas líneas celulares, aunque induce desprendimiento celular. Aún así, no se vio que la desorganización de E-cadherina favoreciera el desprendimiento célula-célula en las células HB4a-Ras, ya que estas células son las que menos se desprenden del sustrato como respuesta al fotodaño. A las 24 hs posteriores al tratamiento, la distribución de E-cadherina se recupera en ambas líneas celulares.



**Figura III.3:** Inmunofluorescencia de E-Cadherina en las células HB4a y HB4a-Ras luego de ALA-TFD. Las monocapas se fijaron y se inmunotñeron con E-cadherina a diferentes tiempos post-TFD. Aumento 40X.

### III.4 Discusión

En el Capítulo I se demostró que las células HB4a transfectadas con Ras eran resistentes a ALA-TFD. Las células HB4a-Ras comienzan a ser afectadas por la TFD a tiempos cortos posteriores del tratamiento. Sin embargo, el daño no progresa con el tiempo como consecuencia intrínseca de la resistencia y, por el contrario, las células se recuperan luego de las 24 hs de ser irradiadas. En las células parentales HB4a, el daño progresa desde un 77% de viabilidad luego de 1 h post TFD hasta un 36% luego de 24 hs post-tratamiento.

La inserción de Ras induce cambios per se en la distribución del patrón de actina. Las células HB4a-Ras exhiben una desorganización de las fibras de estrés, organización en forma de micropúas de actina y una fina malla a lo largo del citoplasma. En otros trabajos se encontró también que fibroblastos transformados con Ras exhiben una morfología más pequeña y retráctil con micropúas de actina (Fischer et al., 1998).

Luego del tratamiento con ALA-TFD, la actina de las células HB4a se vuelve desorganizada y adquiere un patrón parecido a las HB4a-Ras, con la presencia de micropúas de actina. Luego de esta primera etapa de desorganización, se producen daños mayores de F-actina. Se pierden completamente las estructuras de actina y se evidencian las protuberancias en la superficie de las membranas. Estas protuberancias de la superficie de la membrana también se observan en las células HB4a-Ras dañadas, y además, se engrosa el anillo cortical, probablemente debido al efecto de la contracción citoplasmática. Este patrón de protuberancias se correlaciona con la observación morfológica luego de tinción de azul de Toluidina. Además, se encuentran signos de necrosis masiva tales como la vacuolización celular, que especialmente se observan en las células HB4a fotodañadas, como consecuencia de un daño severo. En ambos tipos celulares se observa retraimiento celular y nuclear como consecuencia del fotodaño.

En otros trabajos se han observado protuberancias de actina inmediatamente luego de la TFD de cultivos celulares con varios FSs (Cañete et al., 1983, Juarranz et al., 1995; Rück et al., 1996) y estas estructuras se consideran una manifestación morfológica del daño de la membrana relacionado con las alteraciones del citoesqueleto (Jacobson et al., 1983).

Se puede observar que luego de 48 hs de tratamiento, algunos rasgos de desorganización de actina permanecen en las células HB4a sobrevivientes al ALA-TFD,

que las asemejan a las células transfectadas con Ras, sugiriéndose que un cierto grado de daño en los microfilamentos persiste luego del fotodaño.

Los efectos de la TFD en los microfilamentos parecen depender de la línea celular. Uzdensky et al. (2005) encontraron que dosis subletales de ALA-TFD sobre células WiDr de adenocarcinoma, las cuales crecen en colonias, estimulan la formación de un anillo de actina cortical, e inducen un aumento del número de fibras de estrés en muchas de las células. Por el contrario, el tratamiento con ALA-TFD en células D54Mg de glioblastoma, que crecen separadas y se comunican por protusiones, induce la pérdida de F-actina en los conos de crecimiento, la retracción de las protusiones y aparición de protuberancias en la superficie de la membrana. Los autores sugirieron la hipótesis de que el aumento en la cantidad de fibras de estrés en las células WiDr tratadas con TFD posiblemente indica un fortalecimiento de los contactos célula-sustrato. Esto probablemente se relacione con la fotoinhibición del desprendimiento celular, reforzando nuestra hipótesis planteada en el Capítulo II de un rol fundamental de la adhesión celular al sustrato en la respuesta a la TFD. Los autores proponen que esta profunda reorganización del citoesqueleto de actina, podría ser producto de un proceso de transducción de señales más que una acción directa de la TFD sobre los contactos focales.

Otros autores también han encontrado alteraciones en la distribución de actina luego de la TFD. You et al. (2011) encontraron que la TFD empleando FSs extraídos de la planta *Hedyotis corymbosa* inducen una reducción en la concentración de los microfilamentos de actina. Etminan et al. (2011) reportaron que la morfología de los esferoides de células de glioblastoma tratados con ALA-TFD, evolucionan hacia la forma poligonal epitelial, lo cual se encuentra asociado a las alteraciones en el citoesqueleto de actina. Además, la TFD en células de próstata LNCaP, resulta en la disrupción rápida de los microfilamentos de actina (Liu et al., 2010).

La TFD utilizando Zinc(II)-ftalocianina (Zn-Pc) induce cambios en los componentes del citoesqueleto de las células HeLa (Juarranz et al., 2001). Estos cambios parecen estar relacionados con las diferentes dosis de luz empleadas. Las células tratadas con TFD se encuentran retraídas, y la mayor parte de F-actina se colapsa en la zona perinuclear y se pierde la organización en fibras de estrés. En dicho trabajo, se vio que en las células sobrevivientes a TFD, la reversión del daño de actina es evidente luego de 24 o 48 hs, dependiendo de la dosis de luz empleada. Estas alteraciones se evidencian entre las 8 a 24 hs de la fotosensibilización, dependiendo de las condiciones subletales empleadas. En el mencionado trabajo, el fotodaño resultó transitorio para aquellas células que



finalmente fueron resistentes al proceso de fotosensibilización, recuperando la distribución morfológica y la expresión de las proteínas de las estructuras del citoesqueleto luego de 24 a 48 hs de la fotosensibilización.

En nuestro trabajo la transfección con Ras induce per se la disrupción de la distribución de E-cadherina entre los contactos célula-célula. Sin embargo, el tratamiento con TFD no produjo cambios particulares en su distribución. Además no se observó que la desorganización de E-cadherina favorezca el desprendimiento entre célula-célula luego del tratamiento con TFD de las células HB4a-Ras. Luego de 24 hs post-tratamiento, la distribución de E-cadherina se recuperó en ambas líneas celulares. De manera similar, Uzdensky et al. (2004) no encontraron cambios en la distribución de E-cadherina en las células WiDr luego de ALA-TFD. Por otro lado, Galaz et al. (2005) demostraron una fuerte correlación entre la adhesión célula-célula mediada por E-cadherina y la supervivencia a la ZnPc-TFD en células de queratinocitos murinos. Bajo condiciones apoptóticas, la ZnPc-TFD indujo una rápida desorganización de la E-cadherina que media la adhesión célula-célula, lo cual precede el desprendimiento las células del sustrato, vía integrina  $\beta$ -1 y la inducción de apoptosis. Además, el bloqueo de la función de E-cadherina con un anticuerpo específico, indujo apoptosis en este sistema celular, sugiriendo que el complejo de adhesión de E-cadherina puede ser el principal blanco de la TFD con Zn-Pc. Espada et al. (2009) estudiaron que la activación del oncogén H-Ras en queratinocitos murinos puede prevenir la muerte celular inducida por TFD mediante disrupción de la adhesión de E-cadherina. Bhuvaneswari et al. (2008) demostraron que la Hipericina-TFD induce disminución en la expresión de E-cadherina.

### **III. 5 Conclusión**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este capítulo y la literatura analizada, se puede concluir que la actina pero no la E-cadherina constituye un blanco importante en la TFD. El hecho de que algunos rasgos de desorganización de los microfilamentos permanezcan presentes en las células HB4a y no en las células transfectadas, sugiere que estructuras del citoesqueleto tales como la F-actina pueden estar implicadas en los mecanismos de resistencia de la TFD.

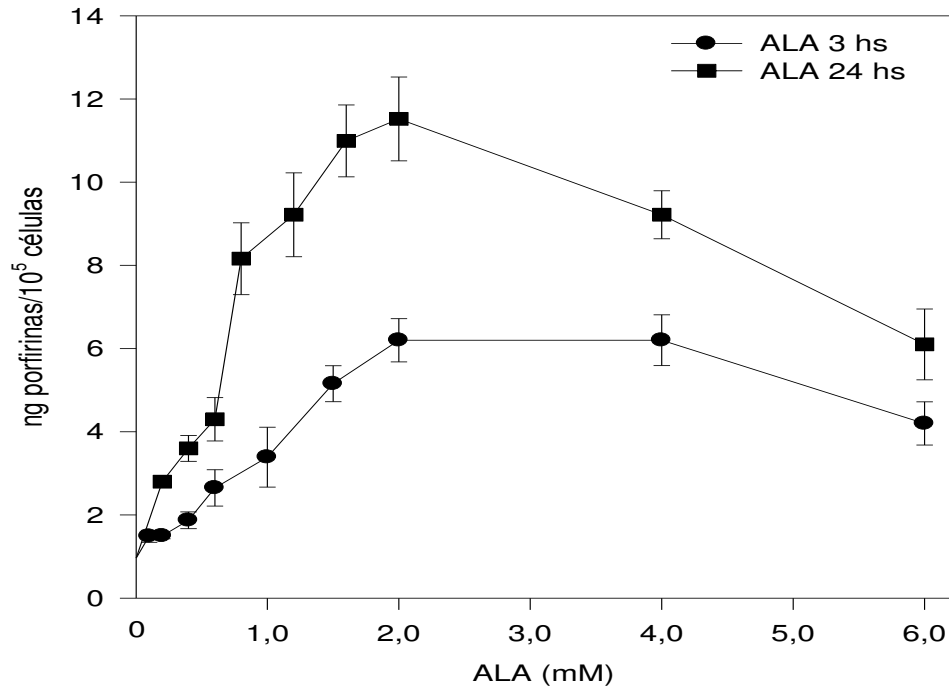
#### **IV. Terapia Fotodinámica mediada por ALA en las células HMEC-1**

En el presente capítulo estudiaremos el rol de la vasculatura en la TFD in vitro empleando ALA como Pro-FS y analizando la síntesis de porfirinas y respuesta al tratamiento fotodinámico en las células endoteliales humanas inmortalizadas HMEC-1.

##### **IV.1. Síntesis de porfirinas a partir de ALA en células HMEC-1**

Se estudió la síntesis de porfirinas en las células HMEC-1 luego de ser incubadas durante 3 hs y 24 hs con diferentes concentraciones de ALA (Figura IV.1). A las 3 hs se observó que la producción de porfirinas es lineal hasta una concentración de ALA de 2 mM, mientras que entre 2 y 4 mM ( $6,2 \pm 0,5$  ng porfirinas/ $10^5$  células) se estableció un plateau en la síntesis. Concentraciones de ALA mayores a 4 mM inducen una leve disminución en la producción de porfirinas debido a la toxicidad del compuesto en oscuridad (datos no mostrados determinados por el método del MTT).

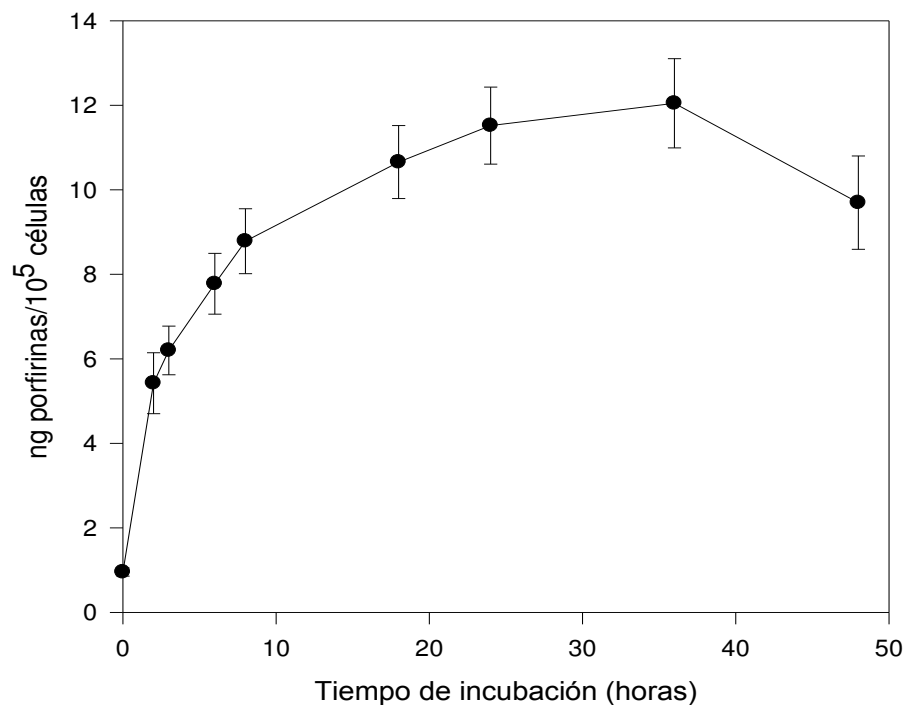
Además, se eligió un tiempo de 24 hs para evaluar la producción de porfirinas a partir de ALA en períodos de incubación largos. Luego de 24 hs de incubación con ALA en las células HMEC-1 se pudo observar un pico en la producción de porfirinas a una concentración de ALA de 2 mM ( $10,9 \pm 0,8$  ng porfirinas/ $10^5$  células).



**Figura IV.1:** Producción de porfirinas en función de la concentración de ALA

Las células se incubaron durante 3 y 24 hs en presencia de diferentes concentraciones de ALA. Los niveles intracelulares de porfirinas se determinaron fluorométricamente y se normalizaron por el número de células presentes al principio del experimento

La Figura IV.2 representa la síntesis de porfirinas de las células HMEC-1 en función del tiempo, luego de la incubación con ALA 2 mM. Se observó un aumento en la síntesis de las mismas hasta 36 hs de incubación ( $12,04 \pm 1,05$  porfirinas/ $10^5$  células). A mayores tiempos de incubación ocurre una disminución de la síntesis, nuevamente debido a la toxicidad del ALA en la oscuridad.

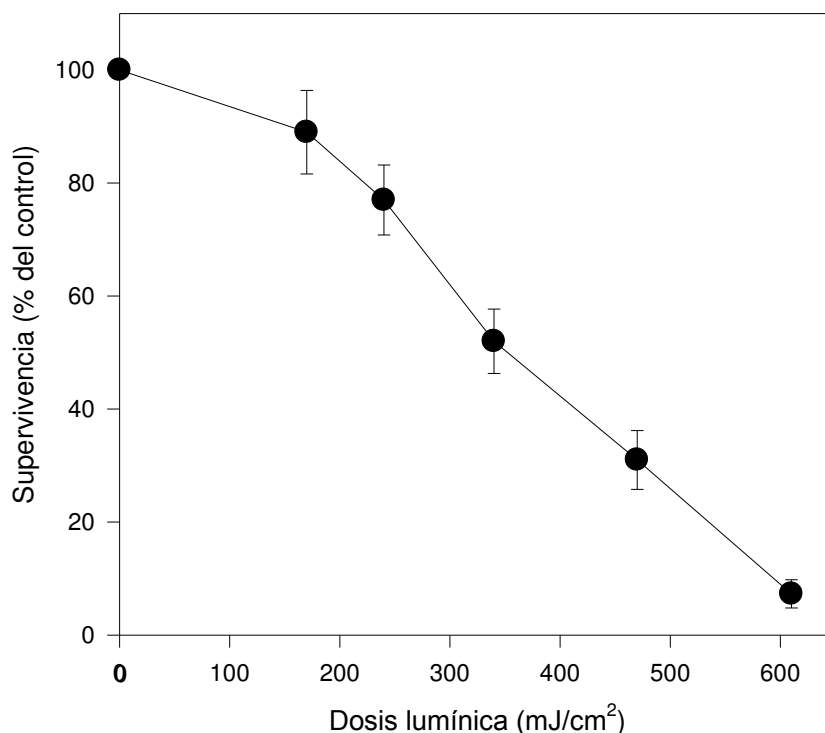


**Figura IV.2:** Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación en presencia de ALA 2 mM

Las células se incubaron durante diferentes períodos de tiempo en presencia de ALA 2 mM. Las porfirinas intracelulares se determinaron fluorométricamente y se normalizaron por el número de células presentes al principio del experimento.

#### **IV. 2. Tratamiento fotodinámico a partir de ALA en células HMEC-1**

Se eligió una concentración de ALA de 2 mM, para incubar las células HMEC-1 durante 3 hs y luego llevar a cabo la TFD. Bajo estas condiciones la  $DL_{50}$  es de 340  $mJ/cm^2$  (Figura IV.3).



**Figura IV.3:** Supervivencia celular luego de TFD con diferentes dosis de luz

Las células se incubaron durante 3 hs en presencia de ALA 2 mM y se irradiaron con diferentes dosis de luz. Después de 19 hs se realizó el ensayo del MTT. La supervivencia celular se expresó como el porcentaje del control no irradiado incubado con ALA.

### IV.3. Comparación de síntesis de porfirinas y respuesta a ALA-TFD en células HMEC-1 y un panel de distintas líneas celulares

En la Tabla IV.1 se muestra una comparación de la síntesis de porfirinas y respuesta a la TFD entre las células HMEC-1, la línea de queratinocitos murinos PAM212 y humanos HaCaT, la línea celular de carcinoma mamario murino LM3 previamente estudiada en nuestro laboratorio (Casas et al, 2006), la de carcinoma mamario humano MCF-7 y el par de células humanas mamario normal/tumoral HB4a y HB4a-Ras. Se observó el siguiente orden decreciente en la cantidad de porfirinas sintetizadas por célula: LM3>HB4a-Ras>HB4a>HaCat>PAM212=MCF-7=HMEC-1.

Sin embargo, al normalizar la cantidad de porfirinas por  $\mu\text{g}$  de proteína, se observan valores similares entre HMEC-1 y el resto de las líneas celulares analizadas, con

excepción de la línea PAM212 y MCF-7 que aún normalizada produce una cantidad menor de porfirinas.

El orden decreciente de resistencia a la ALA-TFD resultó el siguiente:  
PAM212>HMEC-1=HB4a-Ras>MCF-7>LM3>HB4a>HaCaT.

**Tabla IV.1** Comparación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA y las DL<sub>50</sub> en diferentes líneas celulares

Lineas celulares	ng porfirinas /10 <sup>5</sup> cél <sup>b</sup>	ng porfirinas /μg proteínas <sup>b</sup>	DL <sub>50</sub> <sup>c</sup> (mJ/cm <sup>2</sup> )
HMEC-1 (endotelial)	6,2 ± 0,5	18,4 ± 3,7	340
LM3 (mamaria murina) <sup>a</sup>	40 ± 16	17,6 ± 6,8	170
HB4a (mamaria humana normal inmortalizada)	18,4 ± 2,1	16,3 ± 2,4	140
HB4a-Ras (mamaria humana transfectada H-Ras)	29,1 ± 3,4	18,7 ± 3,6	340
PAM 212 (queratinocitos murinos)	7,4 ± 0,8	3,7 ± 0,2	510
HaCaT (queratinocitos humanos)	9,5 ± 1,1	13,5 ± 1,5	75
MCF-7 (mamaria tumoral)	6,7 ± 0,8	5,7 ± 0,7	218

<sup>a</sup> Tomados de (Casas et al., 2006).

<sup>b</sup> Los datos de síntesis de porfirinas corresponden a 3h de incubación con ALA en condiciones saturantes, es decir, HMEC-1: 2 mM, LM3: 0,6 mM; HaCaT, HB4a y HB4a-Ras: 1 mM; PAM212 y MCF-7: 2 mM.

<sup>c</sup> DL<sub>50</sub> se calculó luego de la TFD en las condiciones descriptas en <sup>b</sup>.

### III.4. Discusión

El pro-FS ALA indujo en la línea celular microvascular endotelial HMEC-1, una cantidad de porfirinas que aumenta con el tiempo de exposición y con la concentración, alcanzando un valor de plateau en 2 mM después de 3 hs de incubación. Estas características son similares a las observadas en estudios de cinética de producción de PpIX y dependencia de la concentración de ALA en otras líneas celulares (Tunstall et al., 2002; Casas et al., 2006; Rodriguez et al., 2007; Egli et al., 2007). Esto indica que las células endoteliales se comportan de manera similar a otras líneas celulares de diferente origen, teniendo la misma posibilidad de ser fotosensibilizadas con PpIX en comparación con otras líneas.

En varios trabajos se han observado para distintas líneas celulares, diferentes formas de la curva de producción de PpIX en función de la concentración de ALA. Estas diferencias pueden ser atribuidas a los distintos mecanismos de transporte de ALA a la célula, tal como ha sido extensivamente estudiado por nuestro grupo (Casas & Batlle, 2002).

La cantidad de porfirinas total sintetizada por las células HMEC-1 es considerablemente más baja que la obtenida en las líneas celulares de origen mamario LM3, HB4a y HB4a-Ras, pero similar a la de los queratinocitos PAM212 y HaCat y a la línea celular MCF-7, que se caracteriza por su baja tasa de replicación. Sin embargo, debido a las diferencias en contenido proteico, cuando se normalizan los valores de porfirinas por la cantidad de proteínas no se observan diferencias significativas con el resto de las líneas, pero sí con las PAM212 y MCF-7 que sintetizan una cantidad mucho menor de PpIX.

Por otra parte, no hemos encontrado una correlación directa entre el contenido de PpIX y respuesta a la TFD para todos los tipos celulares. Si bien las células HMEC-1, PAM212 y MCF-7, que presentan los menores valores de porfirinas por célula, muestran valores altos de  $DL_{50}$ , por otro lado observamos que la línea de queratinocitos humanos HaCaT induce una escasa síntesis de porfirinas pero es la más sensible a la TFD. Esta falta de correlación entre cantidad de PpIX sintetizada a partir de ALA y eficiencia de fotosensibilización para algunos tipos celulares ha sido descrita previamente por Inuma et al. (1994).

En trabajos previos de nuestro laboratorio se había demostrado que líneas celulares tumorales con baja producción de porfirinas y un pequeño tamaño celular unido a un escaso contenido proteico, presentan una alta sensibilidad a la TFD (Casas et al., 2006).

Sin embargo, en este capítulo hemos encontrado similares valores de porfirinas y similar grado de resistencia en las células endoteliales HMEC-1, que son las de tamaño más pequeño de todas, y en las MCF-7 que son las de mayor tamaño.

Por otro lado, las HMEC-1 son igualmente sensibles a la ALA-TFD que las tumorales HB4a-Ras, las cuales son resistentes a la ALA-TFD (Capítulo I). Esto sugiere que otros factores particulares de las líneas celulares, tales como los factores de supervivencia (Jones et al., 2001; Schäfer et al., 2007), pueden afectar la eficiencia final de la fotosensibilización.

Los queratinocitos murinos PAM212 resultaron más resistentes al tratamiento fotodinámico que las células HMEC-1 pero lo mismo no ocurre con los queratinocitos humanos HaCaT, en los que se vio un alto contenido de PpIX unido a una gran sensibilidad al tratamiento fotodinámico, de lo cual podemos deducir que la línea celular y/o el origen murino o humano también puede estar influyendo en la resistencia al tratamiento.



Por otra parte, factores tales como la tasa de proliferación también podrían ser responsables de las diferentes susceptibilidades a la TFD. Creemos, que en general, factores propios del tipo celular y de los tejidos serían los responsables de estas grandes variaciones en la respuesta a la TFD, tal como ha sido sugerido por Iinuma et al. (1994).

En dos trabajos tomados de la literatura se ha cuantificado el contenido de PpIX en distintas células endoteliales en comparación con otros tipos celulares de diferente origen. Steinbach et al. (1995) analizaron la capacidad de acumular PpIX en líneas celulares uroteliales, fibroblastos normales y células endoteliales, y encontraron que las células de cultivo primario de endotelio umbilical HUVEC poseen menos fluorescencia de PpIX en comparación con las células uroteliales y fibroblastos. De manera similar, Spörri et al. (2001) vieron que células HUVEC tratadas con ALA-TFD no respondieron al tratamiento, mientras que sí lo hicieron las células de tumor ovárico humano TEC, debido a una acumulación intracelular de PpIX 500 veces mayor que la de las endoteliales (Lim et al., 1994).

Estos resultados sugieren que los cultivos primarios de células de endotelio pueden ser más refractarios a la TFD-ALA debido a una baja síntesis de PpIX endógena y esto podría estar relacionado con la proliferación o quiescencia de las mismas. Wyld et al. (1997) han encontrado que las células HUVEC son sensibles a la TFD y acumulan entre 1,5 y 4 veces más PpIX durante su proliferación, comparadas con el estado de quiescencia.

Debido a que las células HMEC-1 tienen un origen dermal, es interesante compararlas con las células de queratinocitos humanos transformados HaCaT. En este capítulo se vio que se requieren dosis mucho más bajas para fotosensibilizar a los queratinocitos, lo cual en este caso se correlaciona con la cantidad de porfirinas producida. Esto sugiere un probable daño severo de la ALA-TFD superficial sobre la capa más externa de la de la piel. Esto concuerda con el hecho de que el ALA TFD da muy buen resultado en el tratamiento de lesiones superficiales como queratosis actínicas (Smits et al., 2009).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la distribución espacial de los precursores de PpIX en los tejidos, la capacidad de cruzar el estrato córneo y alcanzar la vasculatura de la piel podría influir en la disponibilidad in vivo luego de una aplicación tópica de ALA.

Respecto a otros FSs administrados exógenamente, algunos autores han demostrado que las células endoteliales de la vasculatura incorporan más PpIX y son más sensibles a la TFD que las células malignas y normales (West et al., 1990; Gomer et al.,

1998). Esto determina la destrucción no sólo de los vasos tumorales sino de los vasos de los tejidos normales (Reed et al., 1989). En los próximos capítulos de esta tesis, estudiaremos el efecto in vitro e in vivo de la vasculatura sobre la fotosensibilización con diversos FSs exógenos.

#### **IV.5 Conclusión**

Las células vasculares HMEC-1 son susceptibles de ser tratadas fotodinámicamente con el precursor ALA. En este sentido, son igualmente sensibles que las células tumorales HB4a-Ras y MCF-7 y más sensibles que los queratinocitos murinos PAM212, pero menos sensibles que las tumorales LM3 y las células de mama normal HB4a y queratinocitos HaCaT.

Como conclusión general de este capítulo, y teniendo en cuenta los diversos resultados encontrados en la bibliografía, podemos decir que el daño fotodinámico a partir del pro-fotosensibilizante ALA, puede ser selectivamente vascular o tumoral, dependiendo del tipo celular. Asimismo, el daño sobre las células circundantes no tumorales tales como los queratinocitos de la piel, podría ser severo, aunque finalmente el estudio de un modelo in vivo nos proporcionará información más exacta en este punto.

En el siguiente capítulo nos enfocaremos a estudiar en detalle la captación de diversos FSs porfirínicos y no porfirínicos en las células HMEC-1 y su respuesta a la TFD en comparación con la línea de queratinocitos humana HaCat.

## **V. Terapia Fotodinámica con diversos FSs en células vasculares y no vasculares**

En este capítulo describiremos la capacidad de captación de diversos FS en las células HMEC-1 y los queratinocitos HaCaT y su respuesta al tratamiento fotodinámico. Además, introduciremos la comparación con los resultados obtenidos para las líneas de mama tumorales HB4a-Ras y MCF-7. De esta manera tendremos un estudio de los componentes principales de un tumor superficial: células tumorales, células vasculares y células de la piel.

### **V.1 Toxicidad en oscuridad de los FSs**

Se determinó la toxicidad en oscuridad de los distintos FSs por el método del MTT. En los subsecuentes experimentos de cuantificación de los FSs y de TFD, se emplearon concentraciones no tóxicas de los mismos.

### **V.2 Cuantificación de FS intracelular acumulado en células HMEC-1 y HaCaT y eficiencia de la TFD**

Se comparó la acumulación de los FSs: PII, Verteporfin, NA, Ce6, PII, MC540 y m-THPC en células HMEC-1 y HaCaT, cuantificada por fluorometría y empleando las longitudes de onda máximas de emisión y excitación respectivamente y los tiempos de incubación puestos a punto en el Capítulo II (Tabla 1 de Materiales y Métodos).

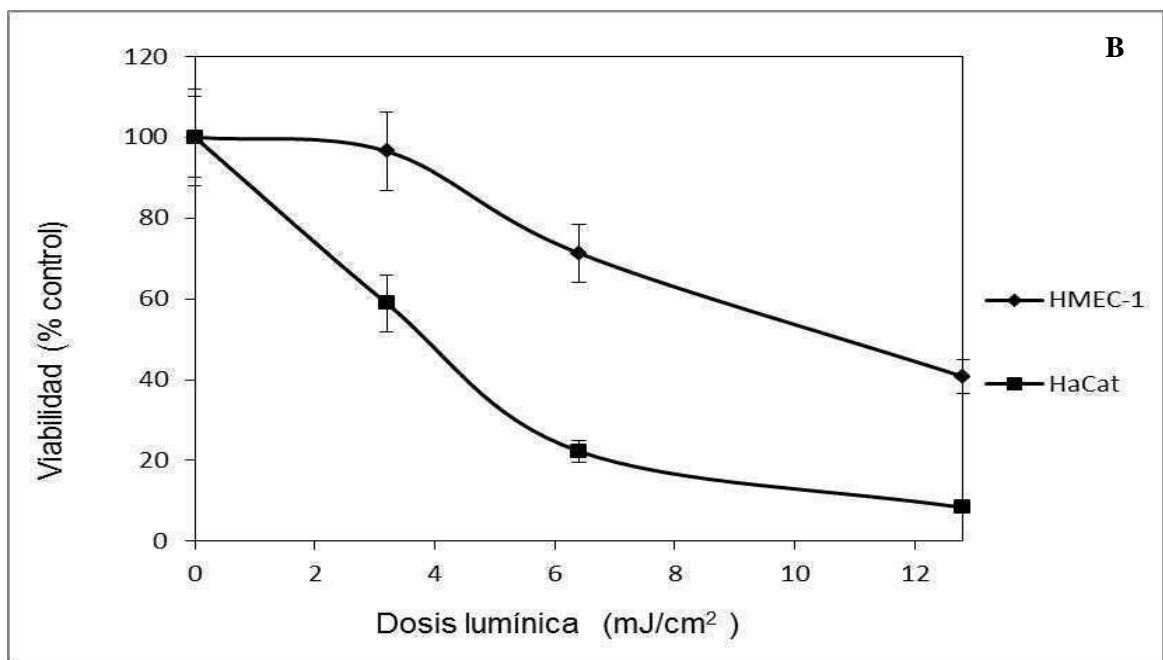
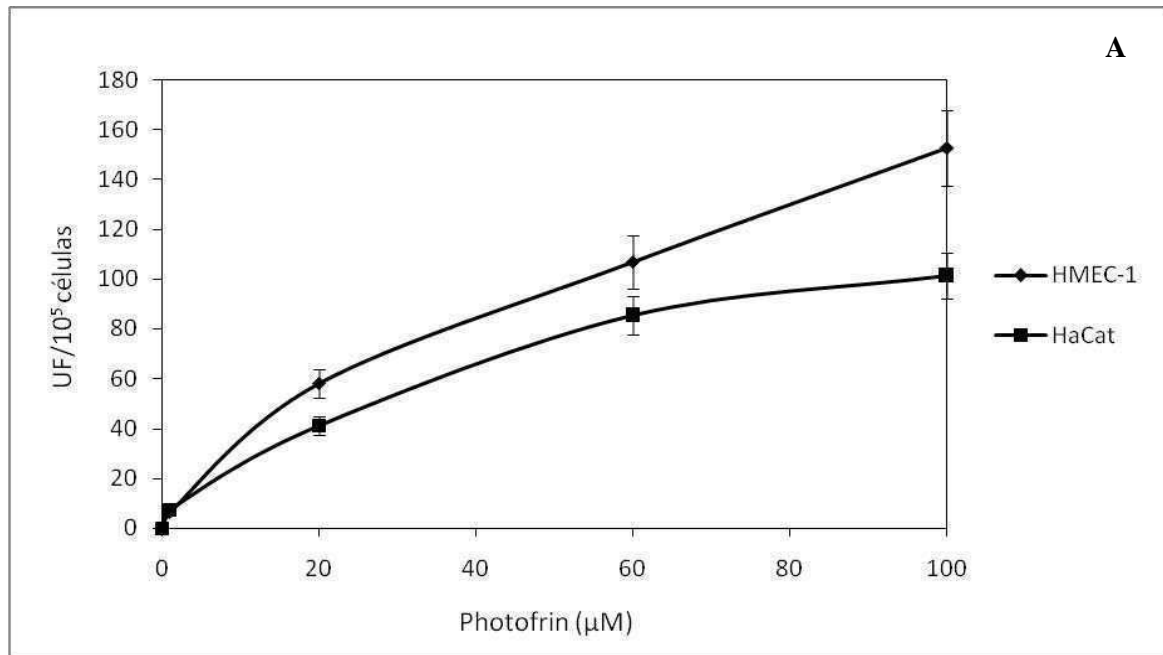
Para los ensayos de TFD se emplearon concentraciones que induzcan igual cantidad de acumulación de FS en ambas líneas celulares, tratando de que sean lo más cercanas posibles a las utilizadas en el Capítulo II para la línea celular HB4a-Ras, y que la dosis de luz requerida para fotosensibilizar el 50 % de las células sea menor que 120 mJ/cm<sup>2</sup> y mayor que 0,2 mJ/cm<sup>2</sup>.

#### **V. 2.1 Photofrin II**

La Figura V.1A muestra que a concentraciones mayores a 5 µM se acumula una cantidad ligeramente mayor de PII en las células HMEC-1. El aumento es lineal en las células HMEC-1, mientras que en HaCaT se alcanza un plateau con PII 100 µM. Se escogió la concentración de 5 µM para realizar los experimentos de TFD. Esta

concentración induce una acumulación intracelular 3 veces más alta que los niveles basales y con la cual se obtienen iguales niveles intracelulares del FS.

En la Figura V.1B se muestra la viabilidad de las células luego de 2 hs de incubación con PII y tratamiento con TFD. La  $DL_{50}$  para las células HMEC-1 es de 11  $mJ/cm^2$  y para las HaCaT es de 3,71  $mJ/cm^2$ . Las células HMEC-1 son 3 veces más resistentes a la PII-TFD que las HaCaT.



**Figura V.1:** Acumulación intracelular de PII y respuesta a la TFD-PII en las células HMEC-1 y HaCaT.

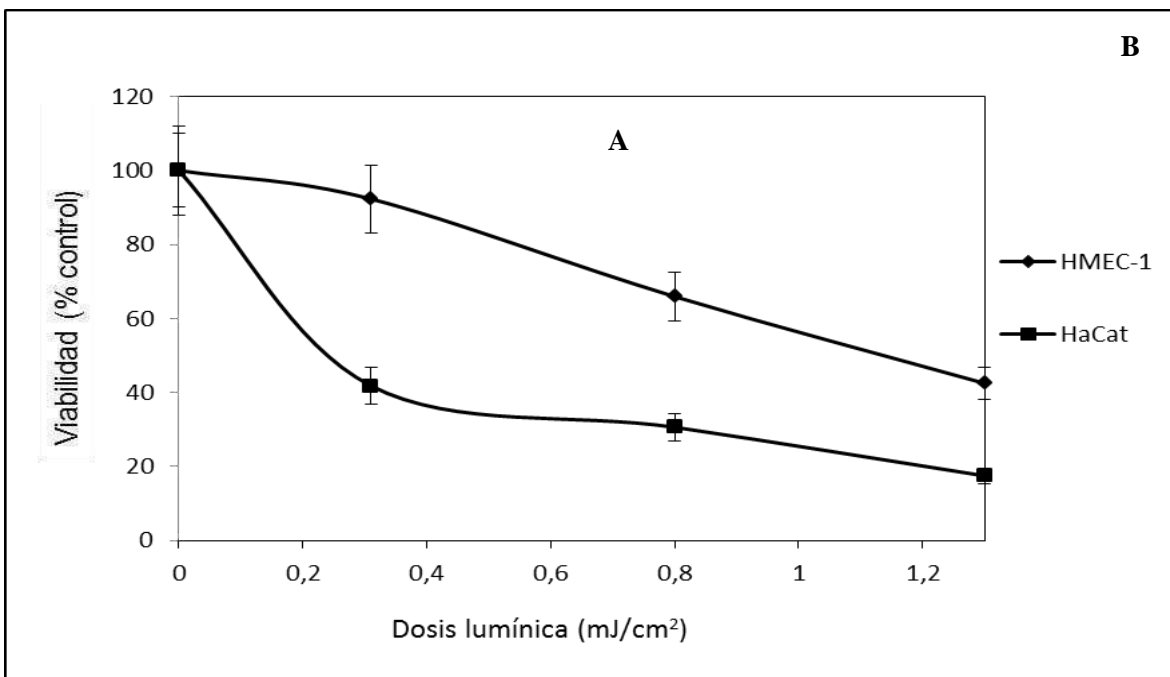
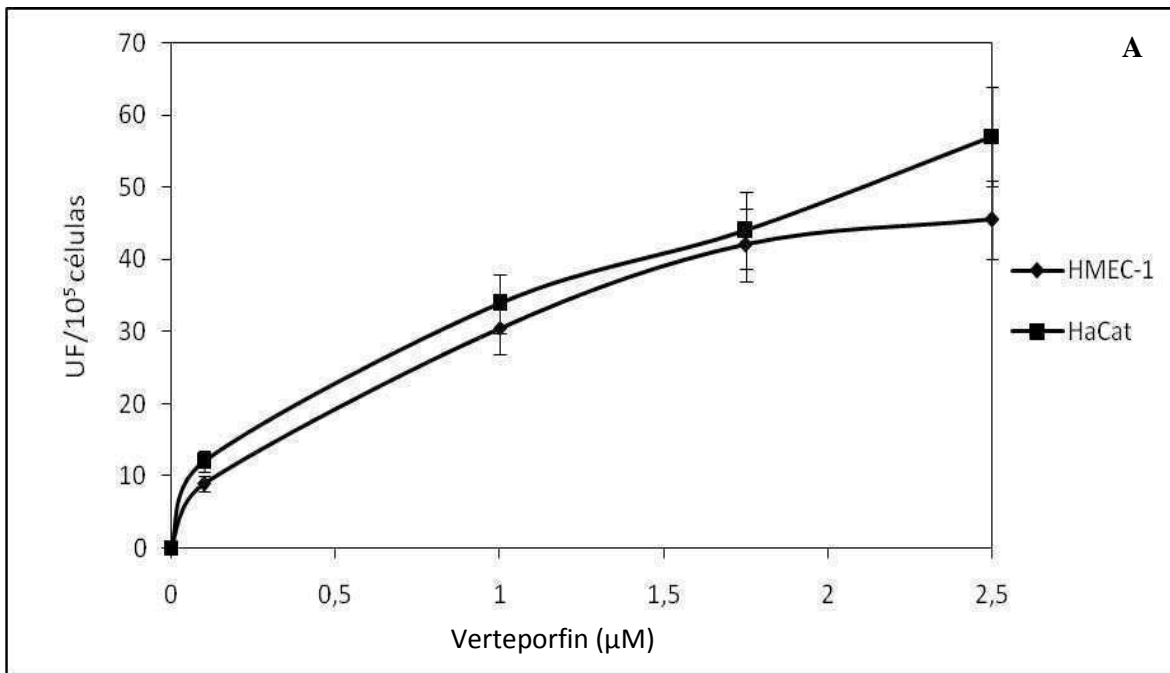
La Figura V.1A muestra la acumulación de PII luego de 2 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HMEC-1 y HaCaT.

La Figura V.1B muestra la TFD-PII luego de 2 hs de exposición a  $5 \mu\text{M}$  de PII y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con PII no irradiado.

## V. 2.2 Verteporfin

La Figura V.2A muestra que la acumulación intracelular de Verteporfin aumenta con la concentración a lo largo del rango analizado en ambas líneas celulares. El aumento es lineal en las células HaCaT, mientras que en HMEC-1 se alcanza un plateau con Verteporfin 1,75  $\mu\text{M}$ . Se eligió una concentración de 1,75  $\mu\text{M}$  para los experimentos de TFD porque con esta concentración se requieren dosis mayores a 0,2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para inducir una  $\text{DL}_{50}$ .

En consecuencia, las células se incubaron 3 horas con Verteporfin 1,75  $\mu\text{M}$  antes de la TFD. La Figura V.2B muestra la viabilidad de las células después de la TFD. La  $\text{DL}_{50}$  fue 0,96  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las células HMEC-1 y 0,24  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las HaCaT. Las células HMEC-1 son 4 veces más resistentes a la Verteporfin-TFD que las HaCaT.



**Figura V.2:** Acumulación intracelular de Verteporfin y respuesta a la TFD-Verteporfin en las células HMEC-1 y HaCaT.

La Figura V.2A muestra la acumulación de Verteporfin luego de 3 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HMEC-1 y HaCaT.

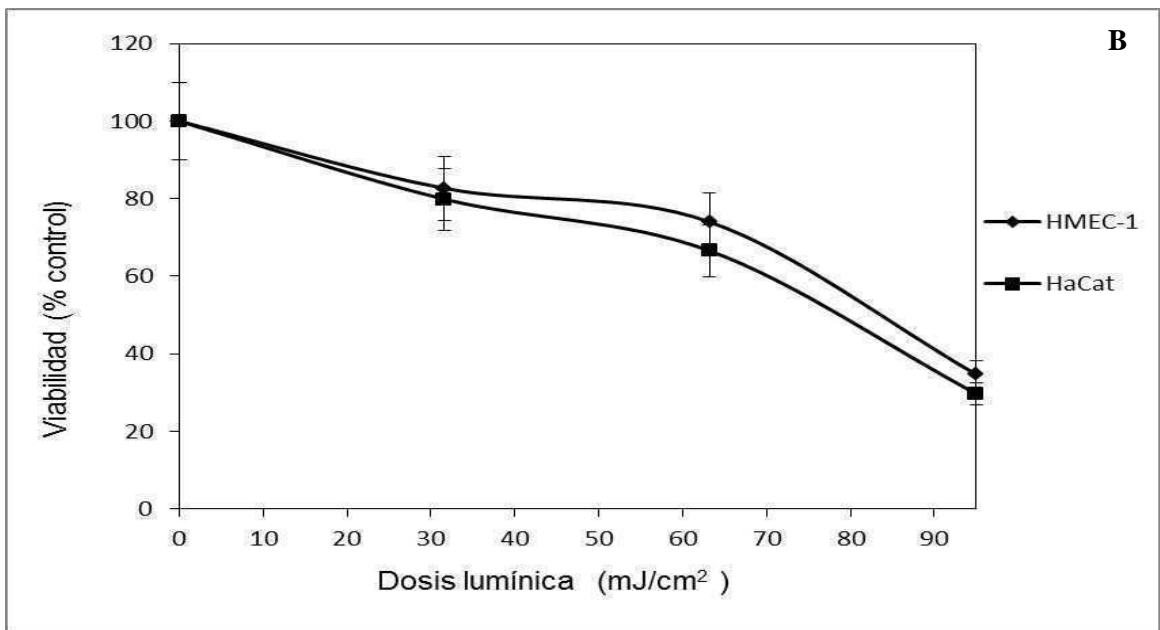
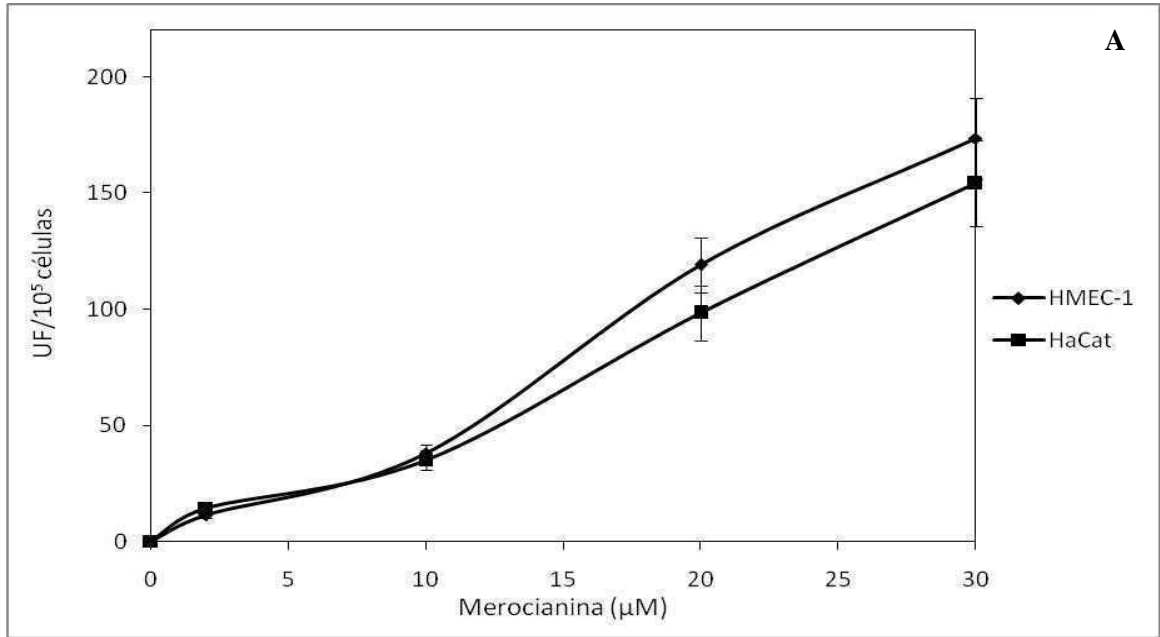
La Figura V.2B muestra la TFD-Verteporfin luego de 3 hs de exposición a  $1,75 \mu\text{M}$  de FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con Verteporfin no irradiado.

#### **IV. 2.3 Merocianina 540**

La Figura V.3A muestra que se acumula similar cantidad de MC540 en ambas líneas celulares. El aumento de la fluorescencia en función de la concentración del FS es lineal. Se eligió una concentración de  $10\ \mu\text{M}$  de MC540 para realizar los experimentos de TFD.

La Figura V.3B muestra la viabilidad de las células después de la TFD. La  $DL_{50}$  fue de  $83\ \text{mJ}/\text{cm}^2$  para las células HMEC-1 y  $78\ \text{mJ}/\text{cm}^2$  para HaCaT. Las células HMEC-1 responden a la MC540-TFD de manera similar que las HaCaT.





**Figura V.3:** Acumulación intracelular de MC540 y respuesta a la TFD-MC540 en las células HMEC-1 y HaCaT.

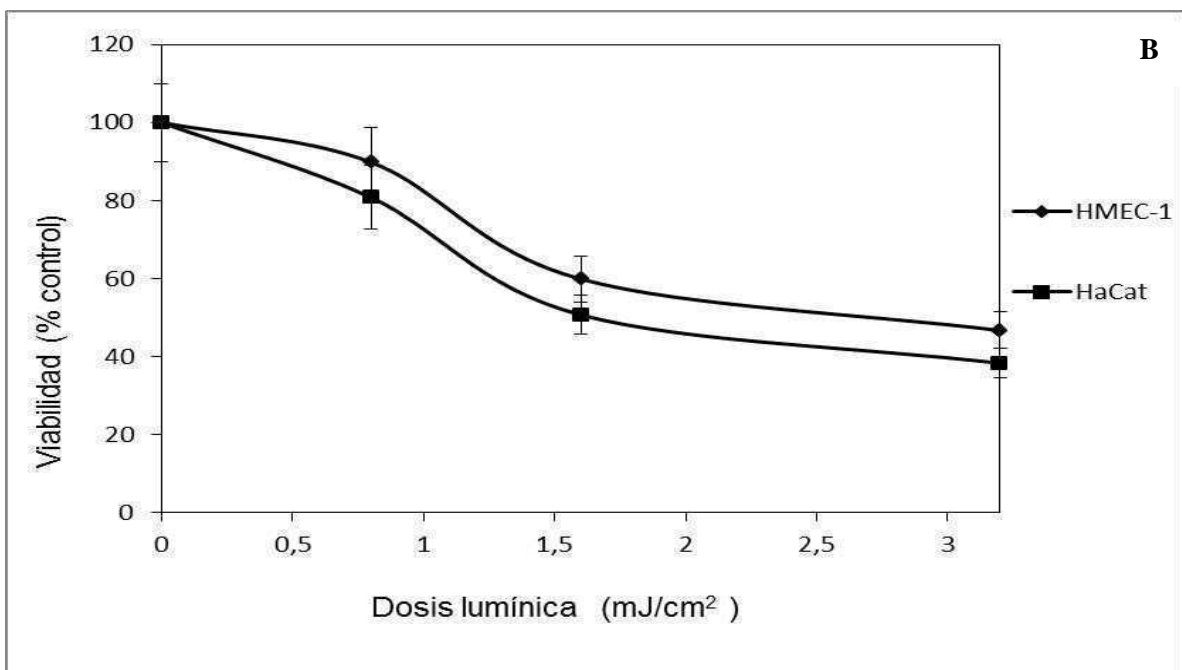
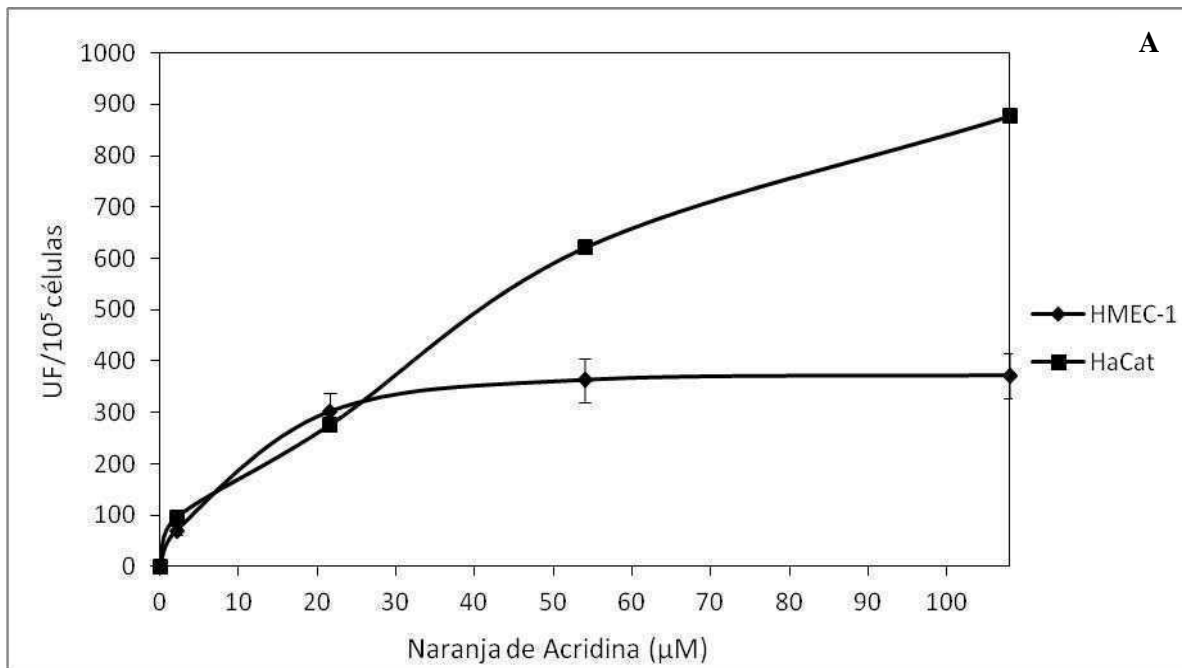
La Figura V.3A muestra la acumulación de MC540 luego de 2 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HMEC-1 y HaCaT.

La Figura V.3B muestra la TFD-MC540 luego de 2 hs de exposición a 10  $\mu\text{M}$  del FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con MC540 no irradiado.

#### **V. 2.4. Naranja de Acridina**

La Figura V.4.A muestra que hasta una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de NA ambas líneas acumulan igual cantidad de FS, pero a partir de esa concentración las HMEC-1 alcanzan un plateau mientras que las HaCaT continúan con un aumento lineal en la acumulación de NA. Para realizar los experimentos de TFD se empleó 10  $\mu\text{M}$  de NA.

La Figura V.4B muestra la viabilidad de las células después de la TFD con NA. La  $DL_{50}$  fue de 2,2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las células HMEC-1 y 1,74  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para HaCaT, por lo que se concluye que las células HMEC y HaCaT son igualmente resistentes a la TFD con NA.



**Figura V.4:** Acumulación intracelular de NA y respuesta a la TFD-NA en las células HMEC-1 y HaCaT.

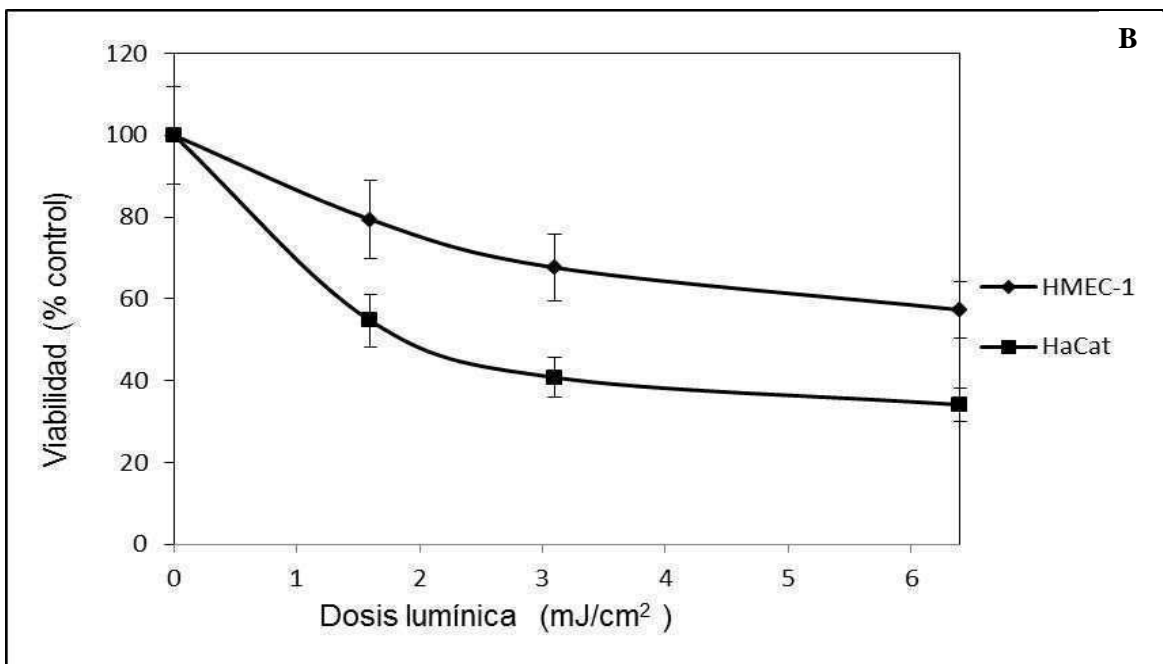
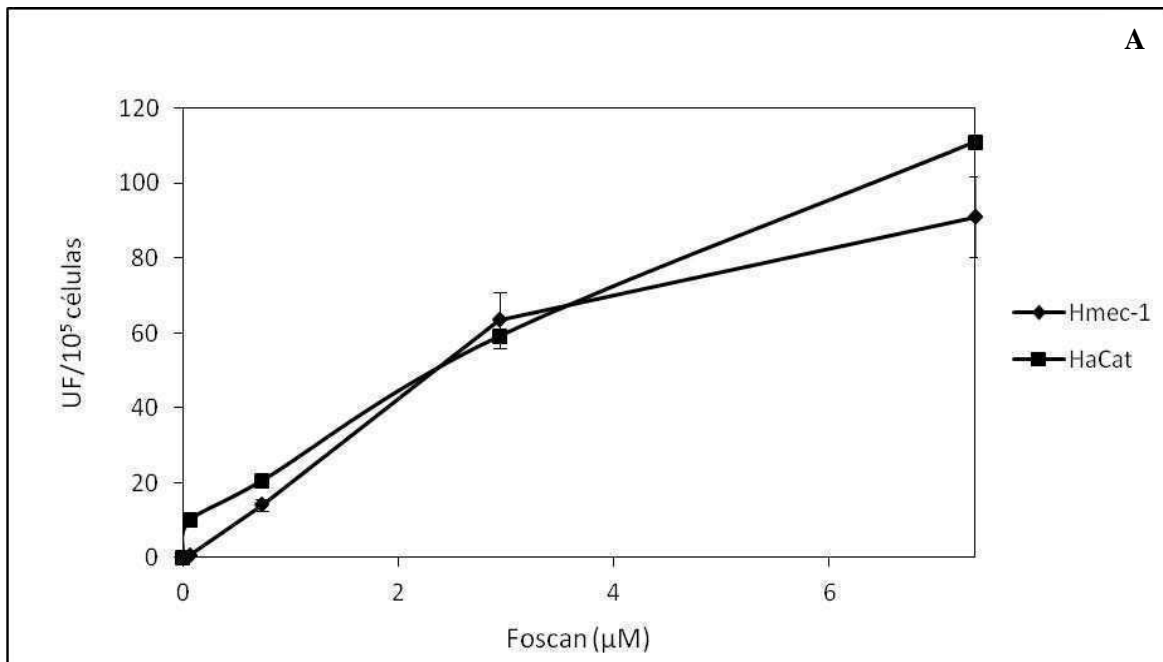
La Figura V. 4A muestra la acumulación de NA luego de 2 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HMEC-1 y HaCaT

La Figura V.4B muestra la TFD-NA luego de 2 hs de exposición a 10  $\mu\text{M}$  del FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con NA no irradiado.

## V. 2.5 m-THPC

La Figura V.5A muestra que la misma cantidad de m-THPC es acumulada en ambos tipos celulares en todo el rango de concentraciones analizado. La concentración elegida para llevar a cabo la TFD fue de 1,5  $\mu\text{M}$ .

La Figura V.5B muestra la viabilidad de las células después de los experimentos de TFD. La  $DL_{50}$  fue de 7,2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las células HMEC-1 y 1,87  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para HaCaT. Las células HMEC-1 son 4 veces más resistentes al tratamiento fotodinámico con m-THPC.



**Figura V.5:** Acumulación intracelular de m-THPC y respuesta a la TFD-m-THPC en las células HMEC-1 y HaCaT.

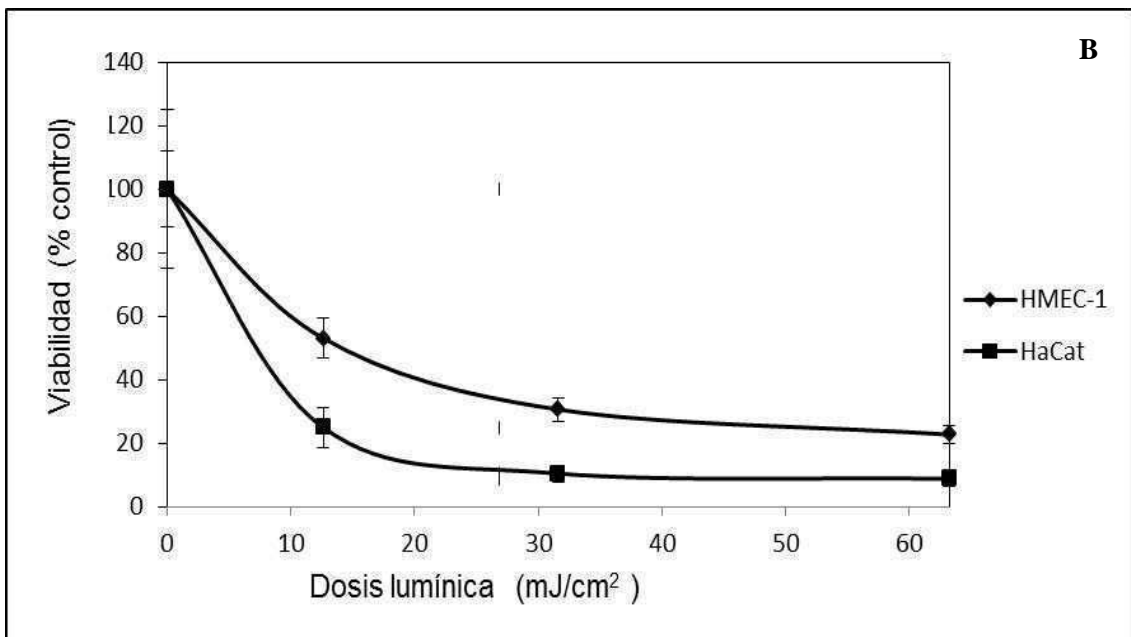
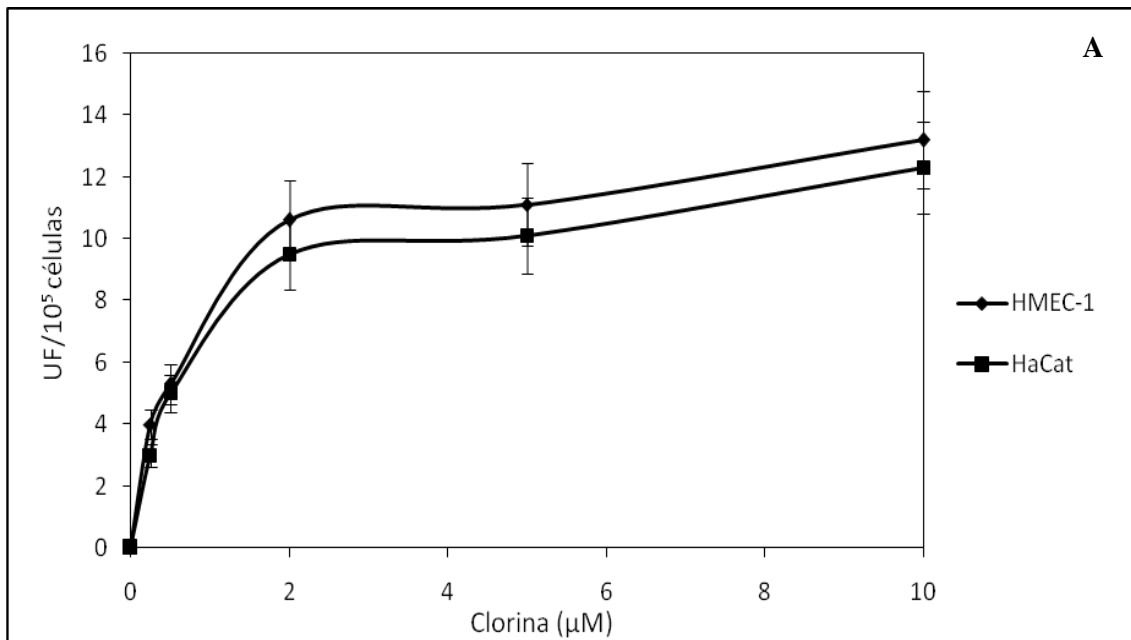
La Figura V.5A muestra la acumulación de m-THPC luego de 3 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HMEC-1 y HaCaT

La Figura V.5B muestra la TFD m-THPC luego de 3 hs de exposición a 1,5  $\mu\text{M}$  del FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con m-THPC no irradiado.

## V. 2.6 Clorina e6

La Figura V.6A muestra que en las células HaCaT la concentración intracelular de Ce6 es igual en todo el rango de concentraciones analizado. La concentración de 0,25  $\mu\text{M}$  es la que se eligió, para llevar a cabo la TFD.

La Figura V.6B muestra la viabilidad de las células después de los experimentos de TFD. La  $DL_{50}$  fue de 15,3  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para las células HMEC-1 y 7,6  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para HaCaT. Las células HMEC-1 son 2 veces más resistentes a la Ce6-TFD.



**Figura V.6:** Acumulación intracelular de Ce6 y respuesta a la TFD- Ce6 en las células HMEC-1 y HaCatT

La Figura V.6A muestra la acumulación de Ce6 luego de 3 hs de incubación con diferentes concentraciones del FS en las células HMEC-1 y HaCaT

La Figura V.6B muestra la TFD-Ce6 luego de 3 hs de exposición a 0,25 μM del FS y a diferentes dosis de luz. Los porcentajes se expresan respecto al control con Ce6 no irradiado.

### **V.3 Comparación de la acumulación intracelular de FS en células HMEC-1, HaCaT, MCF-7 y HB4a-Ras y su relación con la eficiencia de la TFD**

En la Tabla V.1 se puede ver que si bien la acumulación de todos los FS es similar en las células HMEC-1 y HaCaT en las condiciones empleadas para la TFD, cuando se relativiza por la cantidad de proteínas, la acumulación en HMEC-1 es de aproximadamente el doble que en HaCaT, incluso en los FSs NA y MC540 que inducen igual respuesta a la TFD.

Además introducimos los valores de acumulación de FS y  $DL_{50}$  obtenidas para las mismas concentraciones de FS en las células tumorales humanas MCF-7 y las HB4a-Ras.

En esta comparación podemos observar que si bien salvo excepciones, la cantidad de FS acumulada por célula es similar en los 4 tipos celulares estudiados, al relativizar por contenido proteico, se ve que la acumulación creciente de FS sigue el siguiente orden: HMEC-1>HaCaT>MCF-7>HB4a-Ras.

En el análisis de las  $DL_{50}$ , observamos que la línea HB4a-Ras es la más resistente de todas las analizadas, independientemente del FS empleado, excepto en el caso de MC540, en el cual la línea MCF-7 es la más resistente.

Del resto de las líneas celulares podemos concluir que la HMEC-1 es más resistente que la tumoral MCF-7 y la de queratinocitos HaCaT, siendo por lo general estas dos últimas, de una sensibilidad similar al tratamiento fotodinámico.



**Tabla V.1:** Comparación de FS acumulado en las líneas HMEC-1, HaCat, MCF-7 y HB4a-Ras y sus DL<sub>50</sub>

HMEC-1

FS	UF/10 <sup>5</sup> células	UF/ µg de proteínas	DL <sub>50</sub>
PII	27	80,3	11
Verteporfin	40	125,3	0,96
MC450	35	104,1	83
NA	175	477,1	2,2
m-THPC	30	89,2	7,2
Ce6	4	11,9	15,3

HaCaT

FS	UF/10 <sup>5</sup> células	UF/ µg de proteínas	DL <sub>50</sub>
PII	25	35,6	3,71
Verteporfin	42	62,8	0,24
MC450	35	50,2	78
NA	160	248,5	1,74
m-THPC	32	45,7	1,87
Ce6	3	4,3	7,6

MCF-7

FS	UF/10 <sup>5</sup> células	UF/ µg de proteínas	DL <sub>50</sub>
PII	21	18,1	5,71
Verteporfin	34	29,3	0,47
MC450	38	32,7	167
NA	162	139,6	2,75
m-THPC	35	30,1	1,85
Ce6	3	2,5	7,8

HB4a-Ras

FS	UF/10 <sup>5</sup> células	UF/ µg de proteínas	DL <sub>50</sub>
PII	18	10,9	44
Verteporfin	42	25,4	3,3
MC450	30	18,1	138
NA	156	94,3	35
m-THPC	29	17,5	15,4
Ce6	7	4,2	39

FS acumulado intracelularmente (expresado como UF) en las condiciones de tiempo y concentración empleadas en los experimentos de fotosensibilización (PII 5 µM, Verteporfin 1,75 µM, MC540 10 µM, NA 10 µM, m-THPC 1,5 µM, Ce6 0,25 µM) relativizado por el número de células y por la cantidad de proteínas.

## V.4 Discusión

En este capítulo hemos tratado de comparar fundamentalmente la respuesta al tratamiento fotodinámico de las células endoteliales HMEC-1 con los queratinocitos HaCaT, equiparando concentraciones que lleven a igual acumulación intracelular de FS en ambas líneas. Por otra parte, hemos incluido los resultados de acumulación intracelular de FS y  $DL_{50}$  de una línea tumoral humana (MCF-7) y una línea que ha adquirido su tumorigenicidad por inserción del oncogén Ras y que es resistente a la TFD (HB4a-Ras). Sin embargo, para estas dos últimas, cabe destacar que en algunos casos no se ha logrado igual acumulación intracelular de FS empleando las concentraciones elegidas para HMEC-1 y HaCaT.

Bajo estas condiciones de igual acumulación intracelular del FS, hemos encontrado que las células HMEC-1, presentan mayor resistencia al tratamiento fotodinámico con varios fotosensibilizantes en comparación con los queratinocitos inmortalizados HaCaT. Estos FSs son PII, Verteporfin, m-THPC y Ce6, o sea que se trata de tetrapirroles, ya sea de estructura de porfirina o de clorina. Por otra parte, FSs de distintas estructuras químicas como los colorantes NA y MC540 sensibilizan de igual manera a ambos tipos celulares.

La distinta respuesta a la TFD podría relacionarse con la localización subcelular, ya que los FSs que se acumulan en lisosomas (NA) y en membrana (MC540) no inducen en las células HMEC-1 una resistencia a la TFD de la manera que lo hacen los FS tetrapirrólicos, que se acumulan en mitocondria.

La línea celular HMEC-1 posee un bajo contenido de proteínas (3,3 pg proteínas/célula) a diferencia de la HaCaT, que posee el doble de cantidad de proteínas (7 pg proteínas/célula). Sin embargo, a pesar de que el contenido de FS relativizado por cantidad de proteínas es del doble en las células endoteliales, esto no impacta en el grado de sensibilidad a la TFD, tal como sí habíamos visto para otros tipos celulares en trabajos de nuestro laboratorio (Casas et al., 2008).

Además el tamaño de las células HMEC-1 es menor que el de las HaCaT (resultados no mostrados). Esto indica que la resistencia de las células endoteliales al daño fotodinámico no se debe a la relación molécula de FS/proteína, o bien a la relación FS/tamaño celular. Por ello deducimos que deben estar actuando mecanismos propios de la estirpe celular, por lo cual in vitro las células endoteliales HMEC-1 son más resistentes que otros tipos celulares.

Estos resultados se asemejan a los ya expuestos en el Capítulo IV para la TFD a partir del precursor ALA, donde las HMEC-1 son más resistentes que las HaCaT, y esta resistencia no se ha encontrado que se relacione ni con el contenido de FS, ni de proteína ni con el tamaño celular, sino que se trata de mecanismos de supervivencia a la TFD propios de cada estirpe celular.

Cuando se realizó una comparación con similares concentraciones de FS/célula en las 4 líneas estudiadas, al relativizar por contenido proteico, se ve que para todos los compuestos empleados, la acumulación creciente de FS sigue este orden: HMEC-1>HaCaT>MCF-7>HB4a-Ras.

En la comparación de la respuesta a la TFD de las 4 líneas celulares, surge que la línea HB4a-Ras es la más resistente de todas las analizadas, independientemente del FS empleado, excepto en el caso de MC540, en el cual la línea MCF-7 es la más resistente.

Del resto de las líneas celulares, la HMEC-1 es más resistente que la tumoral MCF-7 y la de queratinocitos HaCaT, siendo por lo general estas dos últimas, de sensibilidad similar al tratamiento fotodinámico.

Las células HB4a-Ras, son más resistentes a la TFD que las HMEC-1, donde el grado de resistencia varía de 2 a 8 veces, mientras que en el caso de MC540 no se observa este patrón de mayor resistencia. A pesar del mayor contenido proteico de las células HB4a-Ras, por el cual la relación FS/proteína es muy baja, existe una resistencia intrínseca debida a señales de supervivencia disparadas por el oncogén Ras. Y como ya se ha discutido extensamente en el Capítulo II, diversos mecanismos actúan en la resistencia a la TFD de las células transfectadas con Ras.

En el caso particular de la MC540, como ya hemos expuesto en el Capítulo II, es un FS que se une preferentemente a las membranas celulares, Golgi y RE, sin embargo, la acumulación por número de célula es bastante similar entre las 4 líneas estudiadas, a pesar de las diferencias de tamaños celulares. La  $DL_{50}$  para MC540 es del doble en la línea MCF-7 respecto a HMEC-1 y HaCaT, y esto puede deberse al gran tamaño de dichas células, y su menor contenido de MC540 acumulada por unidad de membrana celular.

En el caso de NA, que se acumula preferentemente en lisosomas, la TFD es igualmente efectiva en HMEC-1, HaCaT y MCF-7, pero bastante menos efectiva en HB4a-Ras, a pesar de una acumulación similar en los 4 tipos celulares.

La falta de resistencia de las células endoteliales a los colorantes NA y MC540, sugiere que estos podrían ser buenos FSs para el tratamiento con TFD de patologías vasculares.

Además de lo ya discutido por nosotros (Capítulo IV) y otros autores acerca de la fotosensibilidad de las células vasculares a la TFD in vitro con el PpIX a partir de ALA, también otros autores han encontrado fotosensibilización de células vasculares empleando FSs exógenos tales como Ftalocianina de Aluminio (Andreeva et al., 2010), Ce6 (Wawrzyńska et al., 2010), ATX-S10 (Na) y Verteporfin (Huang et al. 2004), entre otros.

Hemos encontrado en la bibliografía resultados diversos en cuanto a las diferencias de sensibilidad a la TFD de las células endoteliales respecto a células de otro origen. Algunos autores (Spörri et al., 2001) sostienen que células endoteliales tales como las HUVEC presentan mayor resistencia a la TFD que las células de tumor ovárico humano TEC, empleando PpIX a partir de ALA. Asimismo, Wawrzyńska et al. (2010) encontraron que las células TG/HA-VSMCs de músculo liso de endotelio vascular responden en menor medida a la TFD mediada por Ce6, respecto a los fibroblastos NIH3T3 que son más sensibles a la Terapia.

Por otro lado, otros autores tales como Huang et al. (2004) observaron que células como las humanas epiteliales de la retina HRPE son más resistentes que las células humanas de la microvasculatura endotelial HMVEC empleando los FSs ATX-S10(Na) y Verteporfin.

Sin embargo, no podemos atribuir a la estructura del FS las diferencias encontradas entre los mencionados trabajos. En este capítulo hemos visto que FSs de estructura tetrapirrólica de acumulación preferencial mitocondrial, inducen cierto grado de resistencia a la TFD de la vasculatura, pero lo mismo no ocurre con FSs de distinta localización subcelular. Por lo tanto, consideramos que las diferencias encontradas entre distintos trabajos se deben a los distintos tipos celulares involucrados.

## **V. 5 Conclusiones**

En este capítulo hemos visto que in vitro, las células endoteliales HMEC-1 son más resistentes a la TFD con fotosensibilizantes tetrapirrólicos que la línea celular de queratinocitos HaCaT y que las células tumorales MCF-7, pero no que la línea HB4a-Ras intrínsecamente resistente a TFD. Sin embargo, esta resistencia no se observa para los FSs NA y MC540 que poseen una localización celular no mitocondrial. Estas diferencias de selectividad encontradas para los distintos FSs podrían ser explotadas para su uso en el tratamiento de patologías específicas, dependiendo del tipo celular más fuertemente afectado por la TFD para ese FS en particular. Por ejemplo, NA y MC540 podrían ser buenos FSs para el tratamiento fotodinámico de patologías vasculares.

En el próximo Capítulo evaluaremos el efecto de la TFD con distintos FSs in vivo sobre la vasculatura y las estructuras tumorales, en un modelo de tumor transplantado subcutáneamente en ratón.

## **VI. Regresión tumoral inducida por TFD con varios fotosensibilizantes y el rol de la vasculatura en la eficiencia de la TFD in vivo**

En este capítulo hemos estudiado el rol de la TFD en el daño al tejido y vasculatura tumoral luego de la fotosensibilización en un modelo in vivo de ratones portadores de tumor, inyectado subcutáneamente. Para ello se utilizaron tres FS aprobados para su uso en pacientes: PII, m-THPC y Verteporfin.

### **VI.1 Regresión tumoral inducida por la TFD con Photofrin. Verteporfin y m-THPC**

Se emplearon ratones portadores de tumor LM2 inyectado subcutáneamente. Para el tratamiento fotodinámico se empleó un láser de 635 nm y tres FSs aprobados para su uso en pacientes: PII, m-THPC y Verteporfin. No se emplearon los FSs colorantes NA y MC540 debido a la escasa bibliografía al respecto, eran necesarios estudios previos para determinar su toxicidad en animales.

Se eligió la vía i.p. para la administración de los FSs, excepto en el caso de Verteporfin, en el cual se comparó esa vía con la i.v., debido a los conocidos efectos de dicho FS sobre la vasculatura (Chen et al., 2006). En la Tabla 2 de Materiales y Métodos se describen los distintos esquemas de los tratamientos efectuados. Los intervalos de tiempo entre la administración del FS y la aplicación del láser se tomaron de la literatura.

En la Tabla VI.1 se observa que en ratones controles, que no recibieron luz ni FS, los tumores incrementan su volumen en promedio un 36% a las 24 hs y en un 46% a las 48 hs respecto al volumen determinado al inicio del experimento. Por otra parte, en todos los casos, los ratones tratados con TFD con los distintos FSs crecieron menos que los controles.

Los tres FSs empleados fueron efectivos en la reducción tumoral. Sin embargo, hubo mucha variación entre vías y tiempos de TFD post administración de Verteporfin, el esquema de inyección iv. con aplicación de luz 15 min. post- inyección fue el más efectivo.

En general, los FSs y vías más efectivos en la reducción tumoral fueron Verteporfin i.v., Foscan i.p. y Photofrin i.p.

Considerando como un 100% a los volúmenes iniciales de cada animal, Verteporfin-TFD i.v. 15 min. indujo una disminución al 44,6% y 37,6% del volumen inicial, a las 24 y 48 hs respectivamente. En forma similar, TFD-Foscan i.p. disminuyó el tumor al 63,3% y 50,9% a las 24 hs y 48 hs respectivamente. En cuanto a Photofrin i.p., el volumen fue del 60,1 % y 42,6 % a las 24 hs y 48 hs respectivamente, siempre respecto al volumen inicial.

Teniendo en cuenta el crecimiento de los ratones controles sin tratar, vemos que la regresión a las 48 hs comparada con un crecimiento típico tumoral fueron para Verteporfin i.v. 15 min.: 108,7%; para Foscan i.p.: 95,4% y para Photofrin i.p.: 103,7%.

Los esquemas de Verteporfin i.p. con aplicación de luz luego de 1 y 3 hs, (78,6 y 63,4% de regresión respectivamente) al igual que Verteporfin i.v. con aplicación de luz a las 3 hs fueron los menos efectivos (13,7% de regresión).. Esto da cuenta de la importancia de los tiempos de aplicación de la luz en el caso de este FS que puede tener como blanco la vasculatura tumoral o el tumor mismo.

Se sabe que el blanco de Verteporfin por vía i.v. es la vasculatura si la TFD se realiza a los 15 min de administración, y lo es el tejido tumoral si se realiza a las 3 hs. Teniendo en cuenta las distintas vías y tiempos de Verteporfin, observamos que para lograr la máxima eficiencia de la Terapia empleando este FS, el blanco debería ser la vasculatura tumoral.

**Tabla VI.1:** Regresión tumoral en ratones tratados con TFD con distintos FSs

	24 hs	48 hs	Regresión a las 48 hs <sup>c</sup>
Control <sup>a*</sup>	136,4 ± 15,1%	146,3 ± 25,3 %	-
Verteporfin iv 15 min <sup>b***</sup>	44,6 ± 5,7 %	37,6 ± 5,6 %	108,7%
Verteporfin i,v, 3 hs <sup>b</sup>	86,8 ± 6,7 %	132,6 ± 21,3 %	13,7%
Verteporfin i,p, 1 h <sup>b</sup>	99,0 ± 8,9 %	67,7 ± 5,7 %	78,6%
Verteporfin i,p, 3 hs <sup>b</sup>	98,9 ± 10,1 %	82,9 ± 6,8 %	63,4%
Foscan i,p, 72 hs <sup>a****</sup>	63,3 ± 5,8 %	50,9 ± 7,8 %	95,4%
Photofrin i,p, 24 hs <sup>a**</sup>	60,1 ± 14,7 %	42,6 ± 4,7 %	103,7%

Los valores se expresan en porcentaje del volumen tumoral a las 24 y 48 hs luego de la TFD, respecto al volumen al inicio del experimento en cada animal.

<sup>a</sup> n:3

<sup>b</sup> n:2

<sup>c</sup> Corresponde al porcentaje de regresión tomando en cuenta el volumen tumoral a las 48 hs de los ratones tratados, respecto al promedio del volumen tumoral de ratones control.

\* Corresponde a la fotografía de la Figura VI.1

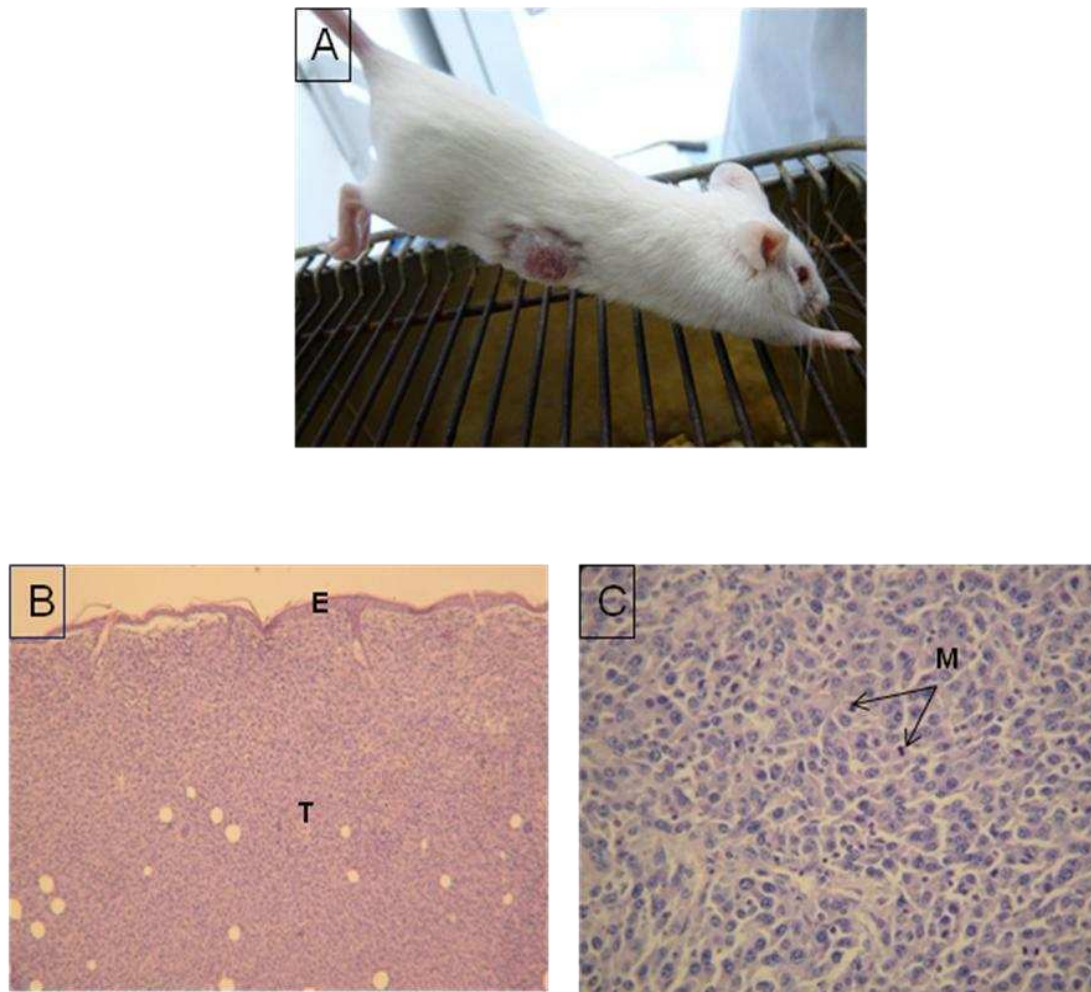
\*\* Corresponde a la fotografía de la Figura VI.2

\*\*\* Corresponde a la fotografía de la Figura VI.3

\*\*\*\* Corresponde a la fotografía de la Figura VI.4

## VI.2 Análisis histológicos de los tumores tratados con TFD: daño vascular y tumoral

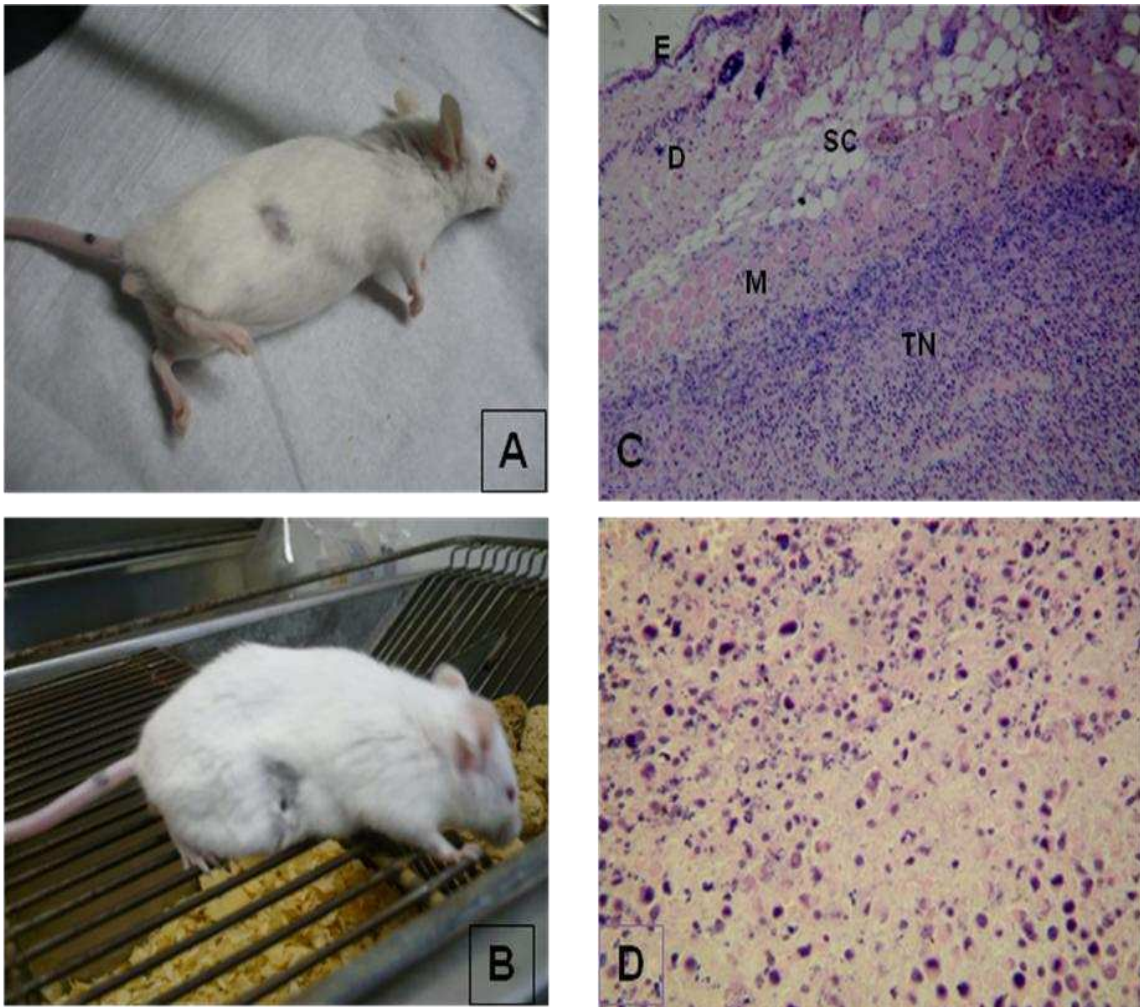
En la Figura VI.1 B se muestra la histopatología de un tumor en crecimiento subcutáneo con compromiso de la dermis y cubierto por epidermis íntegra. A mayor aumento puede observarse un tumor maligno poco diferenciado con células viables y elevada actividad mitótica (ver flechas en la Figura VI.1 C).



**Figura VI.1:** Fotografía de un ratón con tumor sin tratar (control) (A). Histopatología 5X (B). Detalle de la histopatología 40X (C). E: epidermis; T: tumor; M: células en mitosis.



En la Figura VI.2.C se observa un leve daño epidérmico, con necrosis tumoral muy extensa casi total (aproximadamente el 90%), que llega a la zona más profunda del tumor (Figura VI.2.D). Se distinguen infiltrados leucocitarios rodeando áreas de necrosis isquémica. Se destaca que a pesar de la ubicación más profunda del tumor en el subcutáneo, el daño tumoral llegó hasta la zona más profunda del tumor.



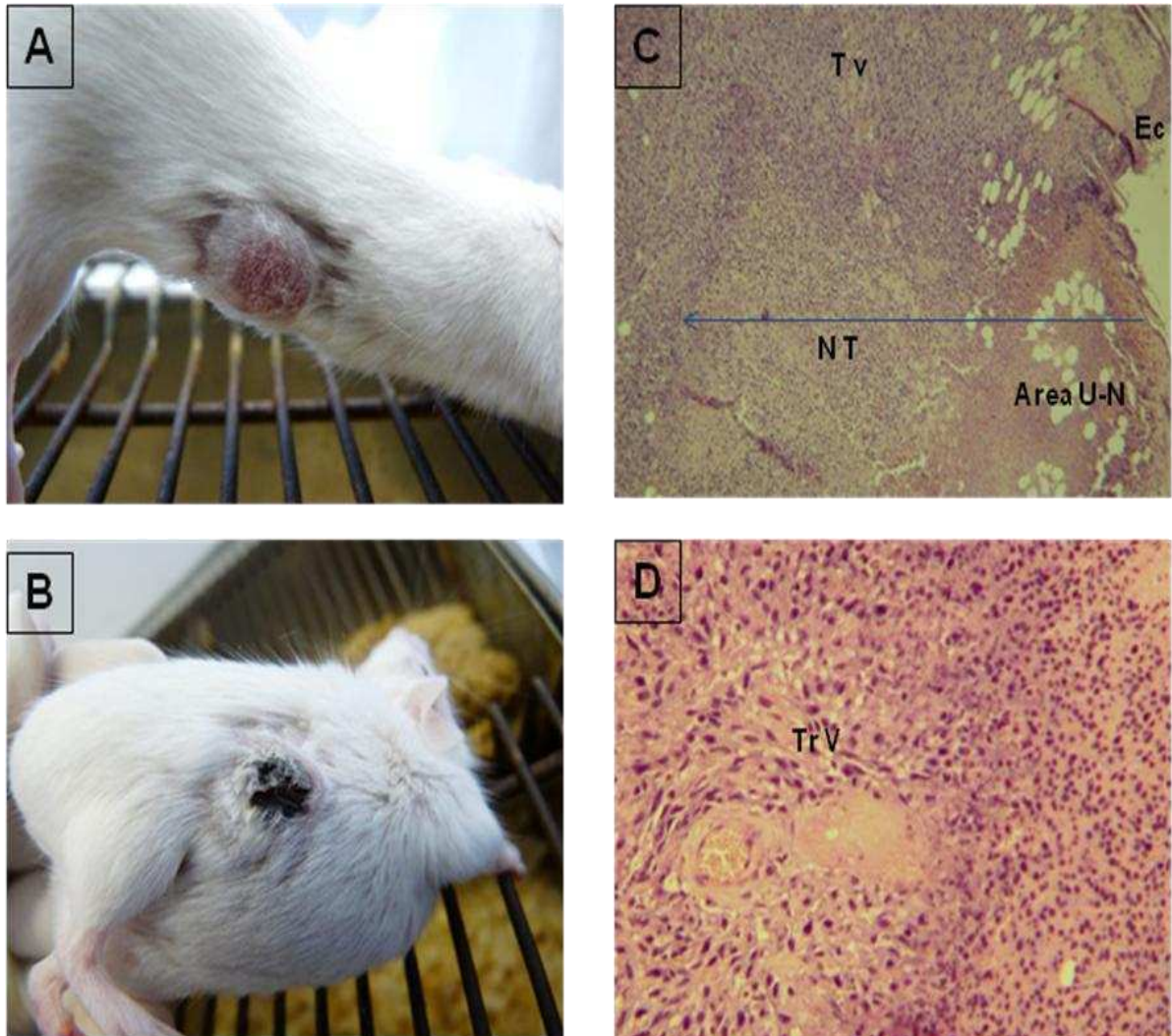
**Figura VI.2:** Fotografía del tumor de un ratón que se sometió a TFD con Photofrin i.p. (A) antes y 48 hs después (B) de la TFD. Histopatología 5X del tumor tratado (C). Detalle de la histopatología 40X (D).

E:epidermis; D: dermis; SC: subcutáneo; M: tejido muscular; TN: Tumor Necrótico.

En la Figura VI.3.C se observa una necrosis dermo-epidérmica con ulceración cubierta por una costra hemática y leucocitaria, y por debajo se encuentran zonas de necrosis tumoral que se extienden hasta una profundidad de 5 mm desde la superficie (señalada por una flecha en la Figura). En zonas más profundas aún se observan células viables, como así también en la zona adyacente a la necrótica, donde el láser no llegó a incidir.

En la Figura VI.3.D se muestra el detalle del daño vascular con un vaso derecho mostrando un trombo asociado a necrosis por TFD, y un vaso izquierdo viable, que marca una zona de transición con las células tumorales viables.

En ratones tratados con Verteporfin por vía intraperitoneal se distinguen patrones similares, con menor grado de daño vascular (ilustración no mostrada).

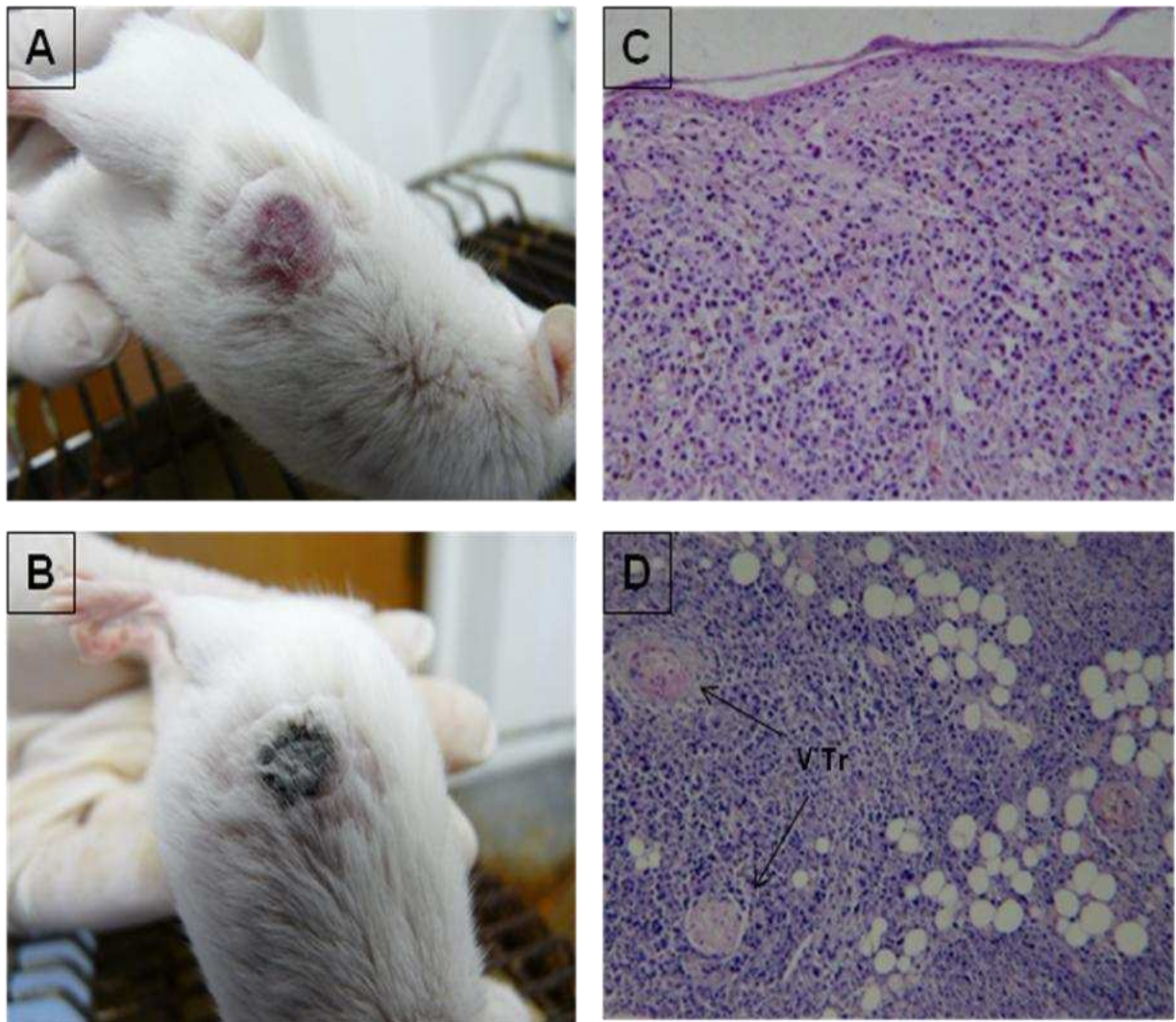


**Figura VI.3:** Fotografía del tumor del ratón tratado con TFD-Verteporfin i.v. (A) antes y 48 hs después (B) de la TFD. Histopatología del tumor tratado 5X (C). Detalle de la histopatología 40X (D).

Tv: tumor viable; Ec epidermis conservada; NT: necrosis tumoral; Area U-N: Area úlcero-necrótica; Tr V: Trombo vascular.

En la Figura VI.4.C la histología muestra en la superficie un desprendimiento córneo con daño fotodinámico epidérmico severo y necrosis en el tumor subyacente. El daño necrótico compromete el 80% de la masa tumoral y alcanza los 5 mm de profundidad (señalado con flecha en la misma Figura VI.4.C).

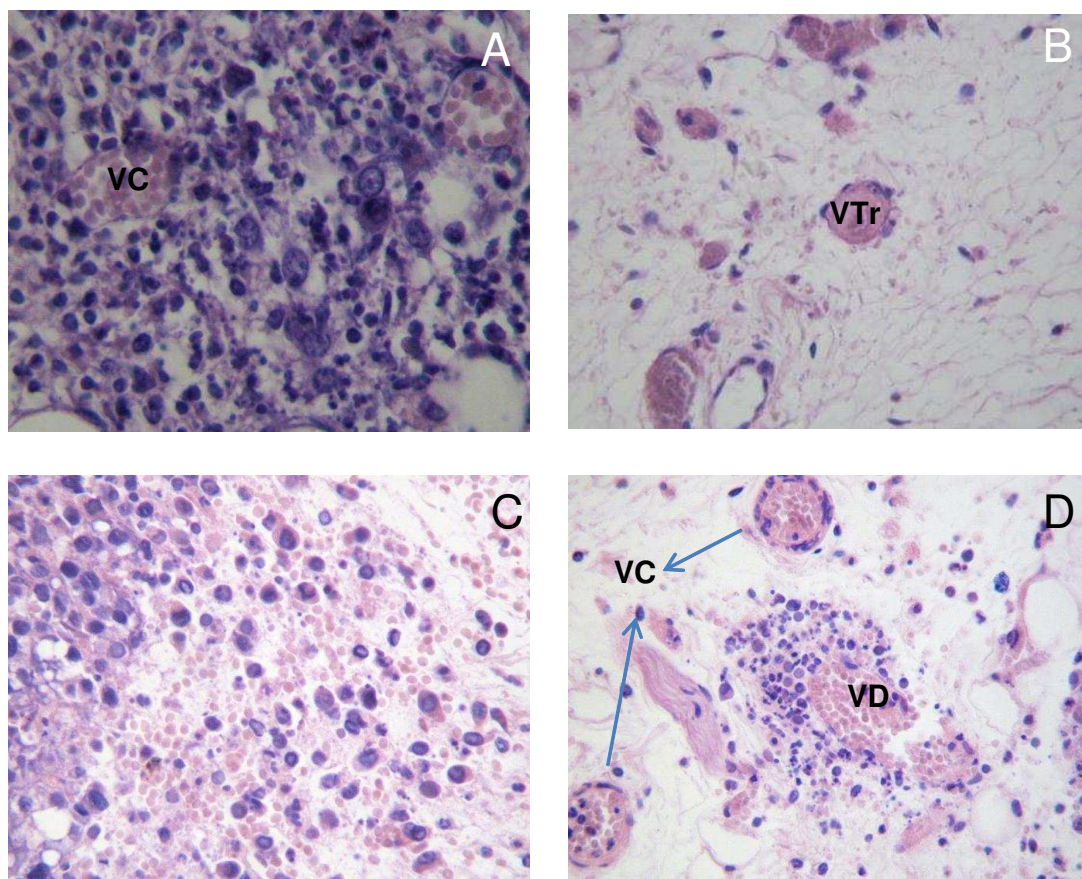
En la Figura VI.4.D se distingue en la profundidad del tumor un gran daño necrótico asociado a vasos dañados y trombosados.



**Figura VI.4:** Fotografía del tumor tratado con TFD-Foscan i.p. antes (A) y 48 hs después (B) de la TFD. Histopatología 10X del ratón tumor tratado (C). Detalle de la histopatología 40X (D).

VTr: Vaso trombosado.

La Figura VI.5 muestra que en una serie realizada con Foscan i.p. tomada a tiempos cortos luego de la iluminación, se vio que luego de 30 min, ya se evidencian signos de daño vascular, además de imágenes de células tumorales en apoptosis, que no se observan a tiempos más largos post-tratamiento. A las 3 hs luego de la TFD, el daño vascular progresa, y ya se observan muy pocas células en apoptosis pero predominan las imágenes de células tumorales necróticas.

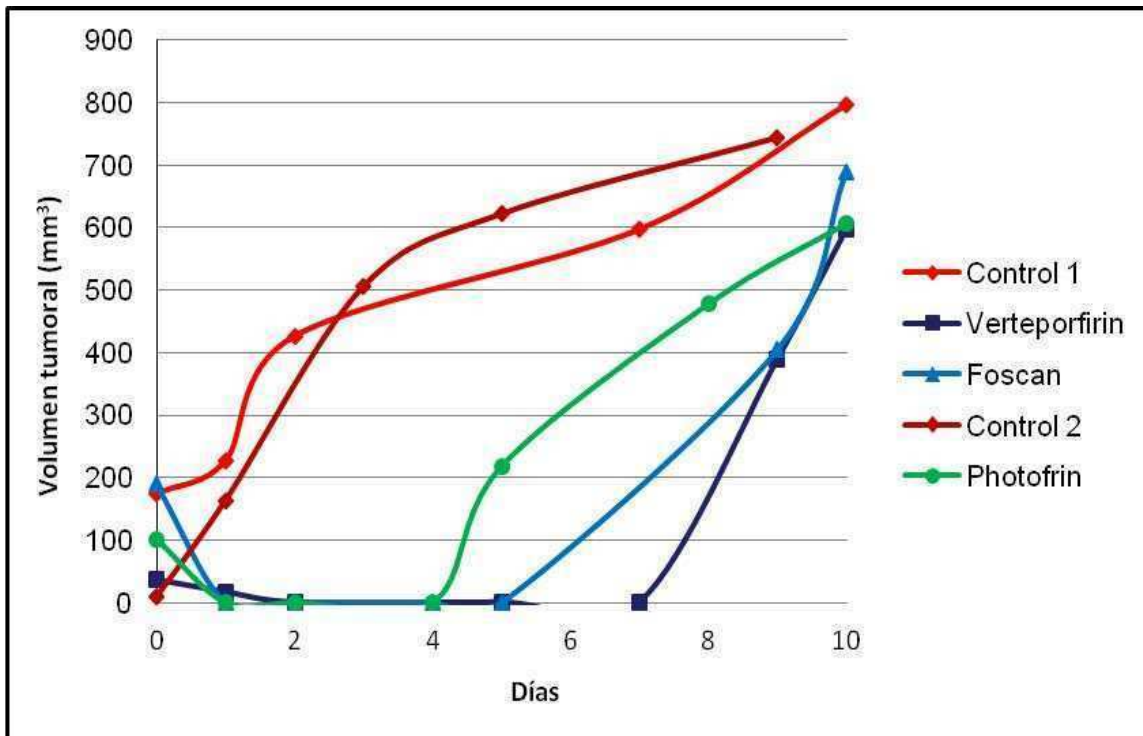


**Figura VI.5:** Fotografía de un tumor tratado con TFD-Foscan i.p., luego de 30 min (A y B) y 3 hs (C y D) Histopatología 40X del tumor tratado (A y C). Detalle de los daños vasculares 20X (B y D).

VTr: Vaso trombosado, VD: vaso dañado, VC: vaso congestivo.

Se representan dos curvas de crecimiento típico de tumores controles sin tratamiento. Además se muestran curvas de crecimiento de remisiones completas de tumores tratados con TFD con Foscan, Verteporfin y Photofrin (Figura VI.6).

En el caso de Foscan, el período libre de enfermedad fue de 4 días, en el de Verteporfin fue de 6 días, y el ratón tratado con Photofrin-TFD permaneció 3 días libre de enfermedad.



**Figura VI.6:** Curvas de crecimiento tumoral en ratones portadores de tumor LM2 y sometidos con los distintos esquemas de tratamientos (detallados en la Tabla 2 de Materiales y Métodos). Verteporfin i.v. 15 min.; Foscan i.p. 72 hs; Photofrin i.p. 24 hs.

## VI.2 Discusión

Se lograron resultados muy promisorios empleando 3 FSs aprobados por la ANMAT, tales como Photofrin, Verteporfin y Foscan. Las reducciones tumorales obtenidas fueron en el rango del 70 al 100% respecto al volumen que deberían haber alcanzado los tumores teniendo en cuenta el crecimiento típico de un tumor LM2.

Si bien hasta el momento tenemos pocos animales analizados, podemos ver que el FS Verteporfin es más efectivo cuando se aplica por vía i.v. 15 min previamente a la TFD.

Como ya se ha mencionado previamente, la TFD usada con intervalos cortos de exposición al FS tiene como blanco la vasculatura del tumor, debido a que confina la localización del FS a los vasos sanguíneos. En cambio, un FS que se ilumina a tiempos largos luego de su administración sistémica puede inducir mayor daño en las células tumorales que las vasculares, ya que alcanza a distribuirse en los compartimientos de las primeras (Chen et al., 2006).

Abels et al. (2004) han señalado que los FSs de alto peso molecular, que se localizan en el espacio intravascular, serían los más eficientes en el daño a la vasculatura tumoral y por ende, provocarían un mayor daño tumoral. Los FS empleados en este trabajo son de alto peso molecular, por lo cual creemos que se puedan estar cumpliendo la hipótesis propuesta por Abels, y esto podría estar explicando en parte las diferencias encontradas respecto a la falta de respuesta a la TFD de las células vasculares in vitro.

De los ratones analizados, obtuvimos regresiones parciales empleando los tres FSs. El período libre de enfermedad fue de 6 días para Verteporfin i.v., 4 días para Foscan i.p. y 3 días para Photofrin i.p. Consideramos que los volúmenes tumorales tomados para estos experimentos fueron excesivamente grandes como para lograr remisiones completas, debido a la penetración de la luz en el tumor hasta una distancia de 5 mm de la superficie, pero consideramos que tumores de no más de esa profundidad deberían regresar completamente con los esquemas de tratamiento administrados.

La histología evidencia que el daño fotodinámico llegó a una profundidad de 5 mm en todos los casos, y esto se debe a la limitación de penetración de la luz en el tejido (Karrer 2001; Berr 2004). Más allá de esta distancia, se empezaron a ver focos de células viables, por lo cual se concluye que bajo las presentes condiciones, se podrían tratar exitosamente lesiones pequeñas y ubicadas superficialmente.

Los daños observados son fundamentalmente de naturaleza necrótica, con daño vascular profundo, variable dependiendo del FS y vía de administración. El daño a nivel epidérmico y dérmico fue bastante severo, pero dependiente del grado de invasión tumoral.

Excepto para el PS Photofrin, el daño de la piel fue severo, y esto se encuentra en concordancia con lo encontrado en el Capítulo V sobre el daño de diversos FS sobre los queratinocitos humanos HaCaT. Sin, embargo, creemos que la ubicación del tumor, y su captación selectiva de FS sería crítica en el proceso de fotosensibilización cutánea en este modelo de implantación subcutánea. La Figura VI.2 ejemplifica el caso de un tumor donde la ubicación fue más profunda dentro del tejido subcutáneo, y el daño a la epidermis fue muy leve. Esto habla de la gran selectividad por las células tumorales, del FS aplicado por vía sistémica, y explica el daño epidérmico en el resto de los casos donde la ubicación de la implantación tumoral fue más superficial, con una mayor probabilidad del FS de alcanzar la zona más superficial de la piel.

Se observaron signos de daño inducidos por todos los FSs, tales como la presencia de trombos, hemorragia, necrosis vascular, estasis vascular, etc. Sin embargo, en este

Capítulo no hemos observado que la necrosis endotelial preceda a la necrosis tumoral. En ratones estudiados luego de 30 min, 1 h y 6 hs luego del tratamiento fotodinámico, no se observó que el daño vascular preceda al daño tumoral, pero sí se observó daño vascular a tiempos cortos, e imágenes de células tumorales apoptóticas, mientras que a tiempos largos se observó predominio de imágenes necróticas.

Tal como hemos observado en los Capítulos anteriores, el grado de fotodaño depende fuertemente del tipo celular, y del estado proliferativo de la célula (West et al., 1988).

Se han encontrado diferencias en la bibliografía en cuanto a la correlación entre los modelos in vitro e in vivo, pudiendo esto deberse en parte a la baja tasa de proliferación de las células endoteliales, la cual afecta la respuesta a la TFD, pero sin embargo se ha encontrado también que factores liberados por las células tumorales inducen la proliferación de las células vasculares (Yang et al., 1994). Estos autores han encontrado que tanto el sobrenadante como los lisados de células de carcinoma de células escamosas y células de carcinoma de colon, contienen factores angiogénicos relacionados con factores de crecimiento fibroblástico, que finalmente impactan en la mayor proliferación de las células endoteliales HUVEC y aumentarían su sensibilidad a la TFD in vivo. Esto podría estar explicando las diferencias que se observan respecto al patrón de relativa resistencia in vitro de las células endoteliales al tratamiento fotodinámico.

Por otra parte, debido a que se conoce recientemente la importancia del estroma tumoral en el desarrollo del cáncer (Kalluri et al., 2006), no descartamos que otros tipos celulares tales como los fibroblastos del microambiente tumoral podrían estar involucrados en la respuesta a la TFD.

### **VI. 3 Conclusión**

La conclusión general de este capítulo es que tanto el daño tumoral directo por vía necrótica como el daño vascular son fundamentales en el tratamiento fotodinámico. Sin embargo, cuando el blanco tisular es preferentemente vascular, como es el caso de Verteporfín a tiempos cortos, la regresión tumoral es mayor. Es de destacar que independientemente del FS y vía de administración, la profundidad de daño no supera los 5 mm. En las presentes condiciones, se podrían tratar exitosamente lesiones pequeñas y ubicadas superficialmente.



## REFERENCIAS

Abels C (2004) Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci.* 3: 765-771.

Ades E W, Candal F J, Swerlick R A, George V G, Summers S, Bosse D C, Lawley T J (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Vasc. Endoth. Cell Line Dermatol.* 99;683– 690.

Andreeva E R, Udartseva O O, Vozovikov I N, Kuzmin S G, Tararak E M (2010) Effects of photodynamic exposure on endothelial cells in vitro. *Bull Exp Biol Med.* 149(2):262-264.

Baas P, Triesscheijn M, Burgers S, van Pel P, Stewart F, Aalders M (2006) Fluorescence detection of pleural malignancies using 5-aminolaevulinic acid. *Chest.*129, 718-724.

Bhuvaneswari R, Gan Y, Lucky S, Chin W, Ali S, Soo K, M. Olivo (2008) Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol. Cancer* 7: 56.

Cañete M, Villanueva A, Domínguez V, Polo S, Juarranz A, Stockert J (1998) Meso-tetraphenylporphyrin: photosensitizing properties and cytotoxic effects on cultured tumor cells. *Int. J. Oncol.* 13: 497–504.

Casas A, Batlle A (2002) Rational design of 5-aminolevulinic acid derivatives aimed at improving photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 2; 465–475.

Casas A, Batlle A (2006) Aminolevulinic acid derivatives and liposome delivery as strategies for improving 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Curr Med Chem.*13(10):1157-1168. Review.

Casas A, Di Venosa G, Vanzulli S, Perotti C, Mamome L, Rodriguez L, Simian M, Juarranz A, Pontiggia O, Hasan T, Batlle (2008a) A Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 271(2):342-351.

Casas A, Fukuda H, Batlle A M (1999) Tissue distribution and kinetics of endogenous porphyrins synthesized after topical application of ALA in different vehicles. *Br. J. Cancer.* 81: 13-18.

Casas A, Perotti C, Fukuda H, Batlle A M (2002) Photodynamic therapy of activated and resting lymphocytes and its antioxidant adaptive response, *Lasers Med. Sci.* 17: 42-50.

Casas A, Perotti C, Ortel B, Di Venosa G, Saccoliti M, Batlle A, Hasan T (2006) Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int. J. Oncol.* 29; 397–405.

Casas A, Sanz-Rodriguez F, Di Venosa G, Rodriguez L, Mamone L, Blázquez A, Jaén P, Batlle A, Stockert JC, Juarranz A (2008b) Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. *Cancer Lett.* 270(1):56-65.

Chen B, Pogue B W, Hoopes P J, Hasan T (2006). Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 16(4):279-305.

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Method.* 89:271–277.

Deora A, Win T, Vanhaesebroeck B, Lander H M (1998) A redox-triggered ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 39-kinase to Ras by redox stress. *J. Biol. Chem.* 273, 29923–29928.

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

Dodson J W, Hay E D (1974) Secretion of Collagen by Corneal Epithelium. II. Effect of the Underlying Substratum on Secretion and Polymerisational Epithelial Cell Products. *J. Exptl. Zool.* 789: 51-72.

de Duve C, de Barse T, Poole B, Trouet A, Tulkens P, Van Hoof F (1974) Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol.* 23(18):2495-531.

Egli R, Schober M, Hempfing A, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M (2007) Sensitivity of osteoblasts, fibroblasts, bone marrow cells, and dendritic cells to 5- aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* 89; 70–77.

Espada J, Galaz S, Sanz-Rodríguez F, Blázquez-Castro A, Stockert J C, Bagazgoitia L, Jaén P, González S, Cano A, Juarranz A (2009) Oncogenic H-Ras and PI3K signaling can inhibit E-cadherin-dependent apoptosis and promote cell survival after photodynamic therapy in mouse keratinocytes. *J Cell Physiol.* 219:84-93.

Etminan N, Peters C, Ficnar J, Anlasik S, Bünemann E, Slotty P J, Hänggi D, Steiger H J, Sorg R V, Stummer W (2011) Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. *J. Neurosurg.* 115(2): 281-288.

Feramisco J R, Gross M, Kamata T, Rosenberg M, Sweet R W (1984) Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell.* 38: 109-117.

Friesen S A, Hjortland G O, Madsen S J, Hirschberg H, Engebraten O, Nesland J M, Peng Q (2002) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (review). *Int. J. Oncol.* 21, 577-582.

Frisch S M, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell–matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124:619–626.

Fischer R S, Zheng G, Quinlan M (1998) Rac1 and extracellularly regulated kinase activation are sufficient for E1A-dependent cooperative transformation of primary epithelial cells, but progression can only be modulated by E1A or Rac1. *Cell Growth Differ.* 9(3): 209-221.

Fujimoto H, Tanaka Y, Liu Z J, Yagita H, Okumura K, Kosugi A, Morinobu A, Umehara H, Yamamura H, Minami Y (2001) Down-regulation of  $\alpha 6$  integrin, an antioncogene product, by functional cooperation of H-Ras and c-Myc. *Genes Cells.* 6: 337–343.

Galaz S, Espada J, Stockert J C, Pacheco M, Sanz-Rodríguez F, Arranz R, Rello S, Cañete M, Villanueva A, Esteller M, Juaranz A (2005) Loss of E-cadherin mediated cell-cell adhesion as an early trigger of apoptosis induced by photodynamic treatment. *J. Cell Physiol.* 205(1): 86-96.

Geiger B, Tokuyasu K T, Dutton A H, Singer S J (1980) Vinculin, an intercellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 77: 4127-4131.

Gomer C J, Rucker N, Murphee L (1988) Differential cell photosensitivity following porphyrin photodynamic therapy. *Cancer Res.* 48; 4539–4552.

Gospodarowicz D, Greenburg G, Birdwell CR (1978) Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* 38(11 Pt 2):4155-4171.

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

Hall A (1993) Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* 3(5):475-479.

Hiruma H, Katakura T, Takenami T, Igawa S, Kanoh M, Fujimura T, Kawakami T (2006) Vesicle disruption, plasma membrane bleb formation, and acute cell death caused by

illumination with blue light in acridine orange-loaded malignant melanoma cells. *J Photochem Photobiol B.* 86(1):1-8.

Hryhorenko E, Oseroff A, Morgan J, Rittenhouse-Diakun K (1999) Deletion of alloantigen-activated cells by aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 69, 560-565.

Hsieh J J, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer S J (2003) Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol.* 23(1):186-194.

Huang Y, Obana A, Gohto Y, Nakajima S (2004) Comparative study of the phototoxicity of two type photosensitizers, ATX-S10(Na) and verteporfin, on vascular endothelial and retinal pigment epithelial cells. *Lasers Surg Med.* 34(3):216-226.

Hughes P E, Oertli B, Hansen M, Chou FL, Willumsen BM, Ginsberg MH (2002) Suppression of integrin activation by activated Ras or Raf does not correlate with bulk activation of ERK MAP kinase. *Mol. Biol. Cell* 13. 2256–2265.

Hughes P E, Renshaw MW, Pfaff M, Forsyth J, Keivens VM, Schwartz MA, Ginsberg MH. (1997) Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell.* 88, 521–530.

Iinuma S, Farshi S S, Ortel B, Hasan T (1994) A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br J Cancer.* 70(1): 21-28.

Jacobson B S (1983) Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton: an overview. *Tissue Cell.* 15: 829–852.

Ji Z, Yang G, Vasovic V, Cunderlikova B, Suo Z, Nesland J, Peng Q (2006) Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic

efficiency of human carcinoma and normal cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B.* 84, 213-220.

Jones H A, Hahn S M, Bernhard E, McKenna W G (2001) Ras inhibitors and radiation Therapy. *Semin. Radiat. Oncol.* 11; 328–337.

Juarranz A, Espada J, Stockert J C, Villanueva A, Polo S, Domínguez V, Cañete M (2001) Photodamage induced by Zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, alphaactinin and keratin of HeLa cells. *Photochem. Photobiol.* 73(3): 283-289.

Juarranz A, Villanueva A, Díaz V, Cañete M (1995) Photodynamic effects of the cationic porphyrin, mesotetra(4 N-methylpyridyl) porphine, on microtubules of HeLa cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 27: 47–53.

Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6:392-401.

Kashiwagi H, Schwartz MA, Eigenthaler M, Davis KA, Ginsberg MH, Shattil SJ (1997) Affinity modulation of platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  by  $\beta\text{3}$ -endonexin, a selective binding partner of the  $\beta\text{3}$  integrin cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* 137, 1433–1443.

Lang K, Bolsen K, Stahl W, Ruzicka T, Sies H, Lehmann P, Fritsch C (2001) The 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin biosynthesis in benign and malignant cells of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B.1,* 65, 29-34.

Li G, Szewczuk M, Raptis L, Johnson J, Weagle G, Pottier R, Kennedy J (1999) Rodent fibroblast model for studies of response of malignant cells to exogenous 5-aminolevulinic acid. *Br. J. Cancer,* 80, 676-684.

Li Q, Mattingly R R (2008) Restoration of E-cadherin cell-cell junctions requires both expression of E-cadherin and suppression of ERK MAP kinase activation in Ras-transformed breast epithelial cells. *Neoplasia.* 10:1444-1458.

Lim H , Behar S, He D (1994) Effect of porphyrin and irradiation on heme biosynthetic pathway in endothelial cells. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*10; 17–21.

Liu T, Wu L, Berkman C (2010) Prostate-specific membrane antigen-targeted photodynamic therapy induces rapid cytoskeletal disruption. *Cancer Lett.* 296(1): 106-112.

Liu Z J, Tanaka Y, Fujimoto H, Mine S, Morinobu A, Yagita H, Okumura K, Oishi I, Udagawa J, Yamamura H, Minami Y (1999) A novel role for H-Ras in the regulation of very late antigen-4 integrin and VCAM-1 via c-Myc-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol.* 163, 4901–4908.

Luna M, Gomer C (1991) Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.* 51: 4243-4249.

Merlin J L, Gautier H, Barberi-Heyob M, Teiten M H, Guillemin F (2003) The multidrug resistance modulator SDZ-PSC 833 potentiates the photodynamic activity of chlorin e6 independently of P-glycoprotein in multidrug resistant human breast adenocarcinoma cells. *Int J Oncol.* 22(4):733-739.

Moan J, Ma L W, Iani V (2001) On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *Int. J. Cancer.* 92, 139-143.

Morgan J, Potter WR, Oseroff AR (2000) Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative. *Photochem Photobiol.* 71(6):747-757.

Nam JS, Ino Y, Sakamoto M, Hirohashi S (2002) Ras farnesylation inhibitor FTI-277 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Jpn J Cancer Res.* 93(9):1020-1028.

Nowak-Sliwinska P, Karocki A, Elas M, Pawlak A, Stochel G, Urbanska K (2006) Verteporfin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 349(2):549-555.

Pazos M de C, Ricci R, Simioni A R, Lopes C C, Tedesco A C, Nader H B (2007) Putative role of heparan sulfate proteoglycan expression and shedding on the proliferation and survival of cells after photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(6):1130-1141.

Peng Q, Moan J, Warloe T, Nesland J M, Rimington C (1992) Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int. J. Cancer.* 52, 433-443.

Piotrowski W J, Marczak J, Nawrocka A, Antczak A Gorski P (2004) Inhalations of 5-ALA in photodynamic diagnosis of bronchial cancer, *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 61, 86-93.

Rak J, Mitsuhashi Y, Erdos V, Huang S N, Filmus J, Kerbel R S (1995) Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant C-H-ras oncogene. *J. Cell Biol.* 131:1587–1598.

Rao J, Li N (2004) Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets.* 4: 345-354.

Reed M W R, Wieman T J, Schuschke D A, Tseng M T, Miller F N (1989) A comparison of the effects of photodynamic therapy on normal and tumor blood vessels in the rat microcirculation. *Radiat. Res.* 119; 542–552.

Rittenhouse-Diakun K, Van Leengoed H, Morgan J, Hryhorenko E, Paszkiewicz G J, Whitaker J E, Oseroff A R (1995) The role of transferrin receptor (CD71) in photodynamic therapy of activated and malignant lymphocytes using the heme precursor delta-aminolevulinic acid (ALA). *Photochem. Photobiol.* 61, 523-528.



Rodriguez L, Divenosa G, Batlle A, Mac Robert S, Casas A (2007) Response to ALA-based PDT in an immortalised normal breast cell line and its counterpart transformed with the Ras oncogene. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6; 1306–1310.

Rück A, Beck G, Bachor R, Akgun N, Gschwend M H, Steiner R (1996) Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy in vivo and in vitro of hydrophilic Al (III) phthalocyanine tetrasulphonate and lipophilic Zn (II) phthalocyanine administered in liposomes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 36: 127–133.

Runnels J, Chen N, Kato D, Hasan T (1999) BPD-MA-mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and  $\beta$ 1 integrin expression in ovarian cancer cells. *Br. J. Cancer.* 80: 946-953.

Ruoslahti E. (1999) Fibronectin and its integrin receptors in cancer (Review). *Adv Cancer Res* 76: 1-20.

Schäfer R, Schramme A, Tchernitsa O I, Sers C (2007) . Oncogenic signaling pathways and deregulated target genes. *Recent Res. Cancer Res.* 176; 7–24.

Schliwa M , Nakamura T, Porter K R, Euteneuer U (1984) A tumor promoter induces rapid and coordinate reorganization of actin and vinculin in cultured cells. *J. Cell Biol.* 99: 1045-1059.

Smits T, Moor A C (2009) New aspects in photodynamic therapy of actinic keratoses. *J Photochem Photobiol B.* 96(3):159-69.

Spörri S, Chopra V, Egger N, Hawkins H K, Motamedi M, Dreher E, Schneider H (2001) Effects of 5-aminolaevulinic acid on human ovarian cancer cells and human vascular endothelial cells in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B.* 64; 8–20.

Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstädter F, Knüchel R (1995) Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *J. Photochem. Photobiol.* 62; 887–895.

Svanberg K, Liu D L, Wang I, Andersson-Engels S, Stenram U, Svanberg S (1996) Photodynamic therapy using intravenous delta-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX sensitisation in experimental hepatic tumours in rats. *Br. J. Cancer.* 74, 1526-1533.

Takahashi K, Heine U I, Junker J L, Colburn N H, Rice J M (1986) Role of cytoskeleton changes and expression of the H-ras oncogene during promotion of neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cells. *Cancer Res.* 46: 5923-5932.

Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y (2002) H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J Biol Chem.* 14, 277: 21446-21452.

Tatsuta M, Iishi H, Yamamura H, Yamamoto R, Okuda S (1988) Comparison of photodynamic inactivation of experimental stomach tumors sensitized by acridine orange or hematoporphyrin derivatives. *Oncology.* 45(1):35-40.

Teiten MH, Bezdetnaya L, Morlière P, Santus R, Guillemin F (2003) Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer.* 88(1):146-152.

Tong Z, Singh G, Rainbow AJ (2000) The role of the p53 tumor suppressor in the response of human cells to photofrin-mediated photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.* 71, 201-210.

Tunstall R G, Barnett A A, Schofield J, Griffiths J, Vernon D I, Brown S B, Roberts D J (2002) Porphyrin accumulation induced by 5-aminolaevulinic acid esters in tumour cells growing in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer.* 87; 246–250.

Uzdensky A, Juzeniene A, Ma L W, Moan J (2004) Photodynamic inhibition of enzymatic detachment of human cancer cells from a substratum. *Biochim. Biophys. Acta,* 1670: 1–11.

Uzdensky A, Kolpakova E, Juzeniene A, Juzenas P, Moan J (2005) The effect of sublethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1722(1): 43-50.

Wawrzyńska M, Kałas W, Biały D, Ziolo E, Arkowski J, Mazurek W, Strzadała L (2010) In vitro photodynamic therapy with chlorin e6 leads to apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 58(1):67-75.

West C M L, West D C, Kumar S, Moore J V (1990) A comparison of the sensitivity of photodynamic treatment of endothelial cells and tumour cells in different proliferative states. *Int. J. Radiol. Biol.* 58; 145–156.

Wyld L, Burn J L, Reed M W, Brown N J (1997) Factors affecting aminolevulinic acid-induced generation of protoporphyrin IX. *Br. J. Cancer*. 76; 705–712.

Yang Z, Lu X, Frazier D L, Panjehpour M, Breider M A (1994) Tumor cell-enhanced sensitivity of vascular endothelial cells to photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 15(4):342-350.

You B J, Wu Y C, Wu C Y, Bao B Y, Chen M Y, Chang Y H, Lee H Z (2011) Proteomics displays cytoskeletal proteins and chaperones involvement in Hedyotis corymbosa-induced photokilling in skin cancer cells. *Exp. Dermatol.* 20(8): 653- 658.

Yow CM, Chen JY, Mak NK, Cheung NH, Leung AW (2000) Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett.* 157(2):123-131.

Zaak D, Kriegmair M, Stepp H, Stepp H, Baumgartner R, Oberneder R, Schneede P, Corvin S, Frimberger D, Knuchel R, Hofstetter A (2001) Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies. *Urology*. 57, 690-694.

## CONCLUSIONES GENERALES

- La línea celular tumoral obtenida a partir de HB4a por transfección del oncogén Ras sintetiza altas cantidades del fotosensibilizante Protoporfirina IX a partir de ALA, pero sin embargo, es más resistente a ALA-TFD que la línea no tumoral parental de mama HB4a. Por otra parte, en condiciones de igual acumulación intracelular de diversos FSs de distinta localización subcelular tales como naranja de Acridina, Clorina e6, Photofrin, Verteporfin, Foscan y Merocianina 540, la resistencia al tratamiento fotodinámico se sigue conservando.

- La inserción del oncogén Ras en células normales lleva a un cambio de fenotipo relacionado con una menor adhesión a sustrato y célula-célula y a alteraciones en el citoesqueleto. Creemos que estas alteraciones podrían estar relacionadas con la resistencia al tratamiento fotodinámico inducida por la expresión del oncogén. Por otra parte, sabemos que la resistencia adquirida no se relaciona con el contenido ni con la distribución intracelular de cada FS, ni con la expresión de moléculas relacionadas con los procesos de supervivencia tales como MDR y survivina.

- Las células HB4a-Ras resultan menos adherentes al sustrato y a proteínas de matriz extracelular que las HB4a parentales. Por el contrario, en el mecanismo de resistencia a drogas mediada por adhesión celular (CAM-DR), descrito para la resistencia a antineoplásicos, la adhesión protege a las células de los efectos letales inducidos por la quimioterapia, por lo cual no se trataría de un mecanismo de resistencia a la TFD clásico CAM-DR. En futuros ensayos estudiaremos si la resistencia a los antineoplásicos conferida por Ras, también se incrementa en células en suspensión. De encontrarse que la resistencia a TFD actúa de manera opuesta a la resistencia a antineoplásicos, se abre una perspectiva importante en la combinación de ambas modalidades terapéuticas, como así también en la manera de tratar las resistencias a ambas terapias.

- En este trabajo de Tesis Doctoral, en la búsqueda de los mecanismos subyacentes a la selectividad del daño fotodinámico, hemos finalmente encontrado que la inserción del oncogén Ras en células normales induce la resistencia a la Terapia Fotodinámica. Estos hallazgos revisten importancia a la hora de predecir qué tumores son susceptibles de ser tratados con TFD.

- In vitro, las células vasculares HMEC-1 responden al tratamiento fotodinámico con Protoporfirina IX a partir de ALA, y con otros FSs de distinta

localización subcelular tales como naranja de Acridina, Clorina e6, Photofrin, Verteporfin, Foscan y Merocianina 540.

- Por otra parte, hemos estudiado in vitro e in vivo el rol de la vasculatura en el daño fotodinámico, concluyendo que si bien in vitro las células vasculares tratadas con FSs tetrapirrólicos son relativamente resistentes a la TFD, in vivo ambos blancos tumoral y vascular exhiben similar grado de susceptibilidad al tratamiento. Las células endoteliales HMEC-1 son más resistentes a la TFD que las líneas celulares de queratinocitos humanos y tumores mamarios.

- Las diferencias de selectividad por las células endoteliales encontradas para los distintos FSs podrían ser explotadas para su uso en el tratamiento de patologías específicas, dependiendo del tipo celular más fuertemente afectado por la TFD para ese FS en particular. Por ejemplo, NA y MC540 podrían ser buenos FSs para el tratamiento fotodinámico de patologías vasculares. Por otra parte, por su alta acción fotodinámica sobre los queratinocitos humanos, los FS tetrapirrólicos serían indicados para patologías tales como las queratosis actínicas, y lesiones donde sea de importancia la preservación de las estructuras vasculares.

- Estudios de TFD in vivo aplicada sobre ratones portadores de tumor, indican que tanto el daño tumoral directo por vía necrótica como el daño vascular son fundamentales en el tratamiento fotodinámico. Sin embargo, cuando el blanco tisular es preferentemente vascular, la regresión tumoral es mayor. Es de destacar que independientemente del FS y la vía de administración, la profundidad de daño no supera los 5 mm, y esto se debe a la limitación de penetración de la luz en el tejido.

- Como conclusión general de esta tesis, podemos decir que la selectividad de la TFD varía fuertemente con la estirpe celular dañada, y que la estructura del FS es esencial en dichos procesos. Asimismo, el tipo tumoral y la expresión de oncogenes en los tumores sería un factor determinante en la efectividad del tratamiento.