

Tesis Doctoral

# Mecanismos de muerte y supervivencia celular por terapia fotodinámica basada en ácido 5-aminolevúlico

Teijo, María Julieta

2012

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

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

Cita tipo APA:

Teijo, María Julieta. (2012). Mecanismos de muerte y supervivencia celular por terapia fotodinámica basada en ácido 5-aminolevúlico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Teijo, María Julieta. "Mecanismos de muerte y supervivencia celular por terapia fotodinámica basada en ácido 5-aminolevúlico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Mecanismos de muerte y supervivencia celular por terapia  
fotodinámica basada en ácido 5-aminolevúlico**

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

**María Julieta Teijo**

Director de tesis: Dra. Haydée Fukuda

Consejero de estudios: Dra. Adalí Pecci

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

Buenos Aires, 2012

## **Mecanismos de muerte y supervivencia celular en terapia fotodinámica basada en ácido 5-aminolevúlico**

La Terapia Fotodinámica (TFD) es utilizada para el tratamiento del cáncer y otras patologías no malignas. Se basa en la administración un compuesto fotosensibilizante (FS) que se acumula selectivamente en el tejido maligno y al recibir luz de longitud de onda adecuada, éste interactúa con el O<sub>2</sub> produciendo especies reactivas del oxígeno (ROS), que son altamente tóxicas y desencadenan la muerte celular. La administración exógena del ácido 5-aminolevúlico (ALA), precursor biológico de la síntesis de los tetrapirroles, induce la acumulación de protoporfirina IX (PpIX), el único FS endógeno. En la erradicación de tumores mediante TFD intervienen diferentes procesos de muerte celular, los que incluyen apoptosis, necrosis, y autofagia.

En el presente trabajo se estudiaron los mecanismos que llevan a la muerte celular por TFD basada en ALA en células de adenocarcinoma de pulmón humanas (A549) cultivadas de modo convencional -en monocapa- o en esferoides multicelulares (EMCs, agregados celulares compactos que desarrollan gradientes de nutrientes y oxígeno), y en una variante resistente derivada mediante sucesivos ciclos de tratamiento fotodinámico y recuperación.

La acumulación de PpIX a partir de ALA aumentó con el tiempo de incubación y la concentración de ALA hasta alcanzar un plateau con 1 mM tanto en monocapas como en EMCs. Estudios de microscopía confocal indicaron que las mitocondrias son el principal sitio de localización de PpIX endógena pero no de PpIX administrada exógenamente, la cual se localiza en la membrana plasmática. Los EMCs presentaron una capacidad de síntesis de PpIX similar a las células en monocapa, mientras que en células resistentes se observaron niveles menores de acumulación. La TFD-ALA reduce significativamente la supervivencia celular de manera dosis lumínica dependiente aunque en menor medida tanto en células resistentes como en EMCs.

La TFD-ALA induce en las células la generación de ROS tales como <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y peróxidos, en células en monocapa pero no en EMCs; y esa producción puede ser modulada por agentes antioxidantes de alto grado de protección como el ascorbato y el

trolox, con un consecuente aumento en la viabilidad celular. Se observaron eventos asociados a apoptosis 1 h luego de la TFD: reducción del tamaño celular, irregularidades en la membrana plasmática, condensación de la cromatina, despolarización de la membrana mitocondrial, liberación de citocromo c al citoplasma, externalización de fosfatidilserina y activación de caspasa-3. En cambio, tanto en EMCs como en células resistentes se observó una reducción notable en la producción de ROS y en los parámetros de apoptosis. Por otro lado, en todos los casos se hallaron indicios de un proceso autofágico, caracterizado por la formación de vacuolas de doble membrana y la detección de LC3-II, así como la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

La activación del factor nuclear NFκB únicamente se halló en células tratadas con dosis bajas de TFD, mientras que las células resistentes mostraron presencia de este factor en el núcleo en todos los tiempos de irradiación, de manera creciente.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten determinar que los mecanismos de muerte celular post-TFD ocurren principalmente por la vía apoptótica intrínseca, pueden ser modulados por agentes antioxidantes, y coexisten con procesos autofágicos.

Por otro lado, el modelo de EMCs es más adecuado para el estudio de los efectos de la TFD-ALA respecto de la monocapa, ya que simula la estructura de microtumores avasculares y refleja características histológicas como la secreción de mucopolisacáridos y la expresión del factor inducido por hipoxia (HIF1-α). La autofagia es el mecanismo principal de respuesta a TFD en células resistentes, las cuales a su vez incrementan mecanismos de supervivencia como la activación de NFκB. Estos son factores condicionantes de la eficacia del tratamiento a considerar al aplicar TFD repetidamente en el tratamiento de tumores y al emplear agentes antioxidantes para minimizar el fotodaño a tejidos no tumorales.

**Palabras claves:** Terapia fotodinámica, ROS, muerte celular, supervivencia celular, esferoides.

## **Mechanisms of cell death and survival after photodynamic therapy with aminolevulinic acid**

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment for malignant and non malignant pathologies. It consists on the administration of a photosensitizing drug (PS) which selectively accumulates in tumor cells and upon irradiation with appropriate wavelength light reacts with O<sub>2</sub> and produces reactive oxygen species (ROS) leading to cell death. Exogenous administration of 5-aminolevulinic acid (ALA) induces the accumulation of the endogenous PS, protoporphyrin IX (PpIX). Different cell death pathways develop after PDT, such as apoptosis, necrosis, and autophagy.

Mechanisms of cell death after ALA-PDT were evaluated in a human adenocarcinoma cell line (A549) cultured in conventional monolayers, or as multicellular spheroids (MCSs, compact cell aggregates which generate nutrient and oxygen gradients) and in a derived PDT-resistant cell culture obtained after repetitive PDT-recovery cycles.

PpIX accumulation from exogenous ALA increased with incubation time and ALA concentration reaching a plateau at 1 mM, both in monolayers and MCSs. Confocal microscopy images showed that endogenously generated PpIX localized in mitochondria, and exogenous PpIX in the plasma membrane. Similar PpIX accumulation rates were found in MCSs with respect to monolayers, whereas derived resistant cells showed lower levels.

ALA-PDT significantly reduced cell survival in a light-dose dependent manner, but to a lesser extent in resistant cells and MCSs.

Cells subjected to ALA-PDT in monolayers produce ROS like <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and peroxides, but not in MCSs. They can be modulated by high protection grade antioxidants such as ascorbate or trolox, with the consequent increase in cell viability. Several apoptosis related features were observed after PDT: cell shrinking, membrane blebbing, chromatin condensation, mitochondrial membrane depolarization, cytochrome c release to the cytoplasm, phosphatidylserine externalization and caspase-3 activation. MCSs and resistant cells showed a marked reduction in ROS production and apoptotic features; as well as autophagic signs including double membrane vacuoles and LC3-II detection, in addition to antiapoptotic protein Bcl-2 expression.

Nuclear factor NF $\kappa$ B was detected only after low dose PDT, but in resistant cells all irradiation times showed presence of NF $\kappa$ B in the nucleus, increasing with irradiation time.

Results presented in this work indicate that cell death mechanisms induced by ALA-PDT occur mainly by the apoptotic intrinsic pathway, which can be modulated by antioxidant agents, and coexist with autophagic processes. In addition, MCSs are an appropriate model for the study of ALA-PDT because they mimic avascular microtumors and present histological features like mucopolysaccharides secretion and hypoxia-inducible factor expression (HIF1- $\alpha$ ). Autophagy is the principal cell death pathway occurring in resistant cells in which increased survival mechanisms, like NF $\kappa$ B activation, were found. Factors conditioning PDT efficacy should be considered when applying repetitive PDT for tumor treatment together with the use of antioxidants to minimize photodamage to non malignant tissue.

**Key words:** Photodynamic therapy, ROS, cell death, cell survival, spheroids.

## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco a la Dra. Haydée Fukuda por su acompañamiento y dirección en la realización de este trabajo, a la Dra. Alcira Batlle y a la Dra. María Victoria Rossetti por su apoyo en el desarrollo de este trabajo como directoras del instituto y a la Dra. Victoria Parera por iniciarme en la investigación.

Agradezco a Berenice Diez por su incondicional acompañamiento, apoyo y amistad; a mis compañeros de trabajo Gabriela Di Venosa, Lorena Rodríguez y Leandro Mamone por la gran ayuda que me brindaron en el inicio de mi trabajo y acompañarme cada día con alegría.

Agradezco a mis compañeros del instituto por estar siempre dispuestos a ayudarme y compartir conocimientos, experiencias, materiales, reactivos, charlas y risas.

Agradezco al Dr. Roberto Meiss por sus trabajos de histología, su buena predisposición y consejos; a la Lic. Julieta Roldán por su capacitación en el cultivo de esferoides.

Agradezco a la Agencia de Promoción Científica y Técnica, al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires por las becas y los subsidios que permitieron financiar este trabajo.

Agradezco a Santiago Langellotti, por la comprensión, el acompañamiento y el compromiso con mi trabajo; a mis padres y hermanos que vivieron conmigo los años de mi carrera y me apoyaron en el desarrollo de este trabajo.

*DEDICATORIAS*

---

Dedico esta tesis a Santiago, que me acompañó y me apoyó en todo momento, incondicionalmente.



## ABREVIATURAS

---

2D: bidimensional

3D: tridimensional

ALA: Ácido 5-aminolevúlico

ALA-D: ALA dehidrasa

ALA-S: ALA sintetasa

An: Annexina V-FITC

Asc: Ascorbato

BE: Bromuro de etidio

COPROgen: Coproporfirinógeno III

CPGasa: Coproporfirinógeno oxidasa

DiOC6 : Ioduro de dihexilcarbocianida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EMC: Esferoide multicelular

EMCs: Esferoides multicelulares

FECH: Ferroquelatasa

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FS: Fotosensibilizante

FSs: Fotosensibilizantes

FSC: Forward side scatter

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GSH: Glutati3n reducido

h: hora

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

HE: Hidroetidina

Hp: Hematoporfirina

HpD: Derivado de hematoporfirina

IP: Ioduro de propidio

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

Man: Manitol

min: minutos

MME: Membrana mitocondrial externa

MMI: Membrana mitocondrial interna

m-THPC: tetrahidroxifenil clorina

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

M&M: Materiales y métodos

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

NA: Naranja de acridina

• OH: Radical hidroxilo

$^1\text{O}_2$ : Oxígeno singulete

$\text{O}_2^-$ : Anión superóxido

PA: Pepstatina A

PAS: PgP: Glicoproteína P

$\Phi_m$ : Potencial de la membrana mitocondrial

PBG: Porfobilinógeno

PBGasa: Porfobilinógeno deaminasa

PBR: Receptor periférico de benzodiazepinas

PBS: Buffer fosfato de sodio

PPGasa: Protoporfirinógeno oxidasa

PpIX: Protoporfirina IX

PROTOgen IX: Protoporfirinógeno IX

PT: Poro de transición

RE: Retículo endoplasmático

Rh 123: Rhodamina 123

RM: Receptor de muerte

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI 1640: Medio Roswell Memorial Park Institute

SD: Error standard

seg: segundos

SFB: Suero fetal bovino

SSC: Side Scatter

TFD: Terapia fotodinámica

TFD-ALA: Terapia fotodinámica basada en ALA

Trp: Triptófano

URO-D: Uroporfirinógeno decarboxilasa

UROgen III: Uroporfirinógeno III

UROgen III-S: Uroporfirinógeno III-isomerasa

URO-I-S: Uroporfirinógeno I-sintetasa

Vp:Verteporfirina

## **INTRODUCCIÓN**

<b>I. PORFIRINAS Y METABOLISMO DEL HEMO.....</b>	<b>1</b>
I.1. Porfirinas.....	1
I.2. Biosíntesis del hemo.....	2
I.3. Catabolismo del hemo.....	6
I.4. Regulación de la síntesis de hemo.....	7
I.5. Porfirias.....	8
I.5.1. Clasificación.....	8
I.6. Propiedades y Aplicaciones de las porfirinas.....	9
Referencias.....	11
<b>II. BIOLOGÍA TUMORAL.....</b>	<b>14</b>
II.1. Definiciones básicas y nomenclatura.....	14
II.2. Características generales de la célula tumoral.....	16
II.3. Bases moleculares del cáncer.....	22
II.3.1. Proto-oncogenes y oncogenes.....	22
II.3.2. Genes supresores de tumores.....	23
II.3.3. Defectos en la reparación del ADN.....	23
II.4. Epidemiología del cáncer.....	24
II.5. Cáncer de Pulmón.....	26
II.5.1. Clasificación.....	26
II.5.2. Patogénesis.....	28
II.5.3. Tratamientos.....	29
Referencias.....	33
<b>III. TERAPIA FOTODINÁMICA.....</b>	<b>36</b>
III. 1. Generalidades.....	36
III. 1.1. Fotosensibilizantes.....	38
III.1.2. Fuentes de luz.....	40
III. 1.3. Daño oxidativo.....	41
III.2. Antecedentes.....	41

III.3. Aplicaciones médicas.....	43
III.3.1. Aplicaciones oncológicas.....	43
III.3.2. Aplicaciones no oncológicas.....	46
III.4. TFD basada en ALA.....	48
III.4.1. Selectividad.....	48
III.4.2. Incorporación de ALA y fotosensibilización por PpIX.....	48
III.4.3. Ventajas.....	50
Referencias.....	51
<b>IV. EVENTOS POST TFD.....</b>	<b>57</b>
IV.1. Eventos tempranos post-TFD.....	57
IV.1.1. Reacciones fotoquímicas.....	57
IV.1.2. Especies reactivas de oxígeno.....	60
IV.1.3. Antioxidantes y TFD.....	62
IV.2. Mecanismos de muerte celular.....	64
IV.2.1. Apoptosis.....	65
IV.2.1.1. Vías apoptóticas clásicas.....	66
IV.2.1.2. Vías apoptóticas lisosomales.....	68
IV.2.1.3. Apoptosis y TFD.....	69
IV.2.2. Necrosis.....	70
IV.2.2.1. Necrosis y TFD.....	71
IV.2.3. Autofagia.....	72
IV.2.3.1. Autofagia y TFD.....	73
IV.3. Supervivencia y resistencia a TFD.....	74
IV.3.1. Factores de supervivencia.....	74
IV.3.2. Mecanismos de resistencia.....	76
Referencias.....	78

<b>V. CULTIVOS TRIDIMENSIONALES Y TFD.....</b>	<b>87</b>
V.1. Cultivos tridimensionales.....	87
V.1.1. Generalidades.....	87
V.1.2. Esferoides multicelulares.....	88
V.2. Aplicaciones en TFD.....	90
Referencias.....	93
 <b>OBJETIVOS.....</b>	 <b>95</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	 <b>96</b>
 <b>I. DROGAS Y REACTIVOS.....</b>	 <b>96</b>
I.1. Reactivos.....	96
I.2. Fotosensibilizantes .....	96
I.3. Moduladores de la síntesis de porfirinas.....	97
I.4. Antioxidantes.....	97
 <b>II. CULTIVOS CELULARES.....</b>	 <b>98</b>
II.1. Líneas celulares.....	98
II.2. Determinación del número de células.....	98
II.3. Cultivos bidimensionales.....	98
II.4. Cultivos tridimensionales.....	99
 <b>III. DETERMINACIÓN DE PORFIRINAS.....</b>	 <b>100</b>
III.1. Extracción de porfirinas intracelulares.....	100
III.2. Medición de porfirinas intra y extracelulares.....	100
 <b>IV. TERAPIA FOTODINÁMICA.....</b>	 <b>102</b>
IV.1. Fotosensibilización.....	102
IV.2. Irradiación.....	102
IV.3. Viabilidad celular.....	102

<b>V. MICROSCOPIA.....</b>	<b>103</b>
V.1. Microscopía Convencional.....	103
V.1.1. Tinción morfológica en monocapa: Azul de toluidina. ....	103
V.1.2. Tinciones histológicas en esferoides.....	103
V.2. Microscopía de epifluorescencia.....	104
V.2.1. Hoechst.....	104
V.2.2. Naranja de Acridina y Bromuro de etidio.....	104
V.2.3. Sondas específicas para mitocondrias y lisosomas.....	105
V.2.4. Monodansilcadaverina.....	106
V.3. Microscopía confocal.....	106
V.4. Microscopía electrónica de transmisión.....	107
<b>VI. CITOMETRÍA DE FLUJO.....</b>	<b>108</b>
VI.1. Marcado con Anexina e Ioduro de propidio.....	108
VI.2. Marcado con sondas específicas para ROS.....	109
VI.2.1. Oxígeno singulete.....	109
VI.2.2. Anión superóxido.....	109
VI.2.3. Peróxidos.....	109
VI.3. Marcado con sondas indicadoras de despolarización mitocondrial.....	110
VI.4. Software.....	110
<b>VII. WESTERN BLOT.....</b>	<b>110</b>
VII.1. Tratamientos.....	110
VII.2. Extractos.....	110
VII.3. Determinación de proteínas.....	111
VII.4. Electroforesis.....	111
VII.5. Transferencia.....	112
VII.6. Revelado.....	112
VII.7. Software.....	113
<b>VIII. ESTADÍSTICA.....</b>	<b>113</b>
Referencias.....	114

<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	115
---------------------------------------	-----

**PRIMERA PARTE: Cultivos Bidimensionales**

<b>I. TFD A PARTIR DE PORFIRINAS ENDÓGENAS Y EXÓGENAS</b> .....	115
I.1. TFD con porfirinas endógenas a partir de ácido 5-aminolevúlico (ALA).....	116
I.1.1. Toxicidad del ALA en oscuridad.....	116
I.1.2. Curva de concentración.....	117
I.1.3. Curva de tiempo de incubación.....	118
I.1.4. Determinación de dosis lumínica 50.....	119
I.1.5. Localización subcelular de PpIX endógena.....	120
I.1.6. Modulación de la síntesis de porfirinas.....	122
I.2. TFD con porfirinas exógenas a partir de Protoporfirina IX (PpIX).....	123
I.2.1. Toxicidad de PpIX en oscuridad.....	124
I.2.2. Curva de concentración.....	125
I.2.3. Curva de tiempo de incubación.....	126
I.2.4. Determinación de dosis lumínica 50.....	127
I.2.5. Localización subcelular de PpIX exógena.....	129
I.3. TFD con porfirinas exógenas a partir de Verteporfirina (Vp).....	131
I.3.1. Toxicidad de Vp en oscuridad.....	132
I.3.2. Curva de concentración.....	132
I.3.3. Curva de tiempo de incubación.....	133
I.3.4. Determinación de dosis lumínica 50.....	134
I.3.5. Localización subcelular de Vp exógena.....	135
Conclusiones.....	137
Referencias.....	138

<b>II. MUERTE CELULAR POR TFD A PARTIR DE ALA.....</b>	<b>139</b>
II.1. Morfología celular post TFD.....	139
II.1.1. Morfología general.....	139
II.1.2. Morfología nuclear.....	143
II.2. Apoptosis y Necrosis post TFD.....	145
II.2.1. Tinción diferencial para apoptosis y necrosis.....	145
II.2.2. Externalización de fosfatidilserina.....	147
II.2.3. Integridad mitocondrial.....	149
II.2.4. Expresión de caspasas.....	153
II.2.5. Expresión Bcl-2.....	154
II.2.6. Participación lisosomal en la apoptosis.....	155
II.3. Autofagia post TFD.....	157
II.3.1. Vacuolas autofágicas.....	157
II.3.2. Detección de LC3-II.....	159
Conclusiones.....	161
Referencias.....	163
<b>III. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....</b>	<b>165</b>
III.1. Producción de especies reactivas de oxígeno post TFD.....	165
III.1.1. Oxígeno singulete.....	165
III.1.2. Peróxidos.....	167
III.1.3. Anión superóxido.....	168
III.2. Modulación de muerte celular post TFD.....	170
III.2.1. Grados de protección de antioxidantes.....	170
III.2.2. Efecto de antioxidantes en la muerte celular post TFD.....	178
III.2.3. Efecto de antioxidantes en la producción de ROS .....	183



Conclusiones.....	191
Referencias.....	193

#### **IV. VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR POST TFD-ALA..... 195**

IV.1. Células resistentes a TFD- ALA.....	195
IV.1.1. TFD con porfirinas endógenas a partir de ALA.....	195
IV.1.2. TFD con porfirinas exógenas a partir de PpIX.....	198
IV.1.3. TFD con porfirinas exógenas a partir de Vp.....	200
IV.2. Caracterización de células resistentes a ALA-TFD.....	201
IV.2.1. Morfología celular y subcelular.....	201
IV.2.2. Migración celular.....	205
IV.3. Muerte y supervivencia celular.....	207
IV.3.1. Externalización de fosfatidilserina.....	207
IV.3.2. Integridad mitocondrial.....	209
IV.3.3. Expresión de factores asociados a apoptosis y autofagia.....	210
IV.3.4. Expresión de factores asociados a supervivencia.....	212
Conclusiones.....	213
Referencias.....	216

## ***SEGUNDA PARTE: Cultivos Tridimensionales***

<b>V. CULTIVO EN ESFEROIDES.....</b>	<b>218</b>
V.1.Obtención de esferoides.....	219
V.2.Curva de crecimiento.....	221
Conclusiones.....	223
Referencias.....	224
<b>VI. TFD CON PORFIRINAS ENDÓGENAS A PARTIR DE ALA EN EMCS.....</b>	<b>225</b>
VI.1. Síntesis de porfirinas a partir de ácido 5-aminolevúlico (ALA).....	225
VI.1.1. Curva de concentración.....	225
VI.1.2. Curva de tiempo de incubación.....	227
VI.1.3. Determinación de dosis lumínica 50.....	228
VI.1.4. Distribución celular de PpIX endógena en EMCs.....	230
Conclusiones.....	232
Referencias.....	233
<b>VII. MUERTE CELULAR POR TFD A PARTIR DE ALA EN EMCS.....</b>	<b>234</b>
VII.1. Morfología e histología post TFD -ALA.....	234
VII.1.1. Tinción diferencial para Apoptosis y Necrosis en EMCs intactos.....	234
VII.1.2. Morfología nuclear en EMCs intactos .....	234
VII.1.3. Tinción con hematoxilina-eosina.....	236
VII.1.4. Tinción del ácido periódico de Schiff (PAS).....	238
VII.1.5. Inmunodetección de Ki67.....	238
VII.1.6. Inmunodetección del factor inducido por hipoxia (HIF1- $\alpha$ ).....	240

VII.2. Apoptosis y Necrosis post TFD.....	243
VII.2.1. Tinción diferencial para apoptosis y necrosis en EMCs disgregados.....	243
VII.2.2. Externalización de fosfatidilserina.....	245
VII.2.3. Integridad mitocondrial.....	247
VII.2.4. Expresión de caspasas.....	248
VII.2.5. Expresión de Bcl-2.....	249
VII.2.6. Detección de LC3-II.....	250
VII.3. Producción de especies reactivas de oxígeno post TFD en EMCs.....	251
VII.3.1. Producción de oxígeno singulete.....	251
VII.3.2. Producción de peróxidos.....	251
VII.3.3. Producción de anión superóxido.....	250
VII.3.4. Efecto de antioxidante en la muerte celular post TFD.....	256
Conclusiones.....	257
Referencias.....	260
<b><i>ANEXO</i></b> .....	262
<b><i>CONCLUSIONES GENERALES</i></b> .....	263
Referencias.....	266

# *Introducción*

---

## CAPÍTULO I

### PORFIRINAS Y METABOLISMO DEL HEMO

Procesos biológicos tan antiguos como evolutivamente significativos, implican la participación de moléculas relacionadas con las porfirinas. La fotosíntesis, la respiración celular, la defensa antioxidante, son pasos evolutivos que condicionaron el éxito de la vida celular.

Conocer las propiedades y el camino sintético de estos compuestos ha permitido el diagnóstico certero de enfermedades hereditarias, las Porfirias, y el tratamiento de numerosas patologías mediante nuevas combinaciones y herramientas que al día de hoy se siguen investigando.

#### *1.1.- Porfirinas*

El hemo es un grupo prostético presente en una gran diversidad de moléculas de importancia biológica. Entre ellas se destacan la hemoglobina, la mioglobina, citocromos y peroxidasas; implicadas en el transporte de oxígeno, transporte de electrones y la catálisis de peróxidos respectivamente.

Al igual que el hemo, también las clorofilas corresponden a un conjunto de moléculas denominadas porfirinas. Las porfirinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y juegan un rol central en los sistemas vivientes, debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Son compuestos macrocíclicos, planos y rígidos, formados por cuatro anillos pirrólicos (A, B, C, D, E), unidos por puentes metileno ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), con dobles ligaduras lo cual en la mayoría de los casos les confiere color o la capacidad de fluorescer por excitación con luz de longitud de onda adecuada (Fig 1).

En los carbonos  $\beta$  de cada tetrapirrol pueden unirse distintos sustituyentes, confiriendo distinta naturaleza química a cada porfirina. Dado su gran tamaño y las características antes mencionadas, su estructura es hidrofóbica, aunque los sustituyentes que presenten pueden revertir esa condición. A su vez, las porfirinas tienen la capacidad de coordinar un átomo de metal en su región central. En el caso de las clorofilas se coordina un átomo de magnesio y en el caso del hemo, un átomo de hierro. Estos grupos

prostéticos son los responsables del color verde de la clorofila y del color rojo de la sangre (Fukuda et al, 2005).

Por lo tanto, las porfirinas son requerimientos básicos en metabolismos aeróbicos y anaeróbicos, y pueden ser acertadamente consideradas como los pigmentos de la vida (Batlle, 1986).

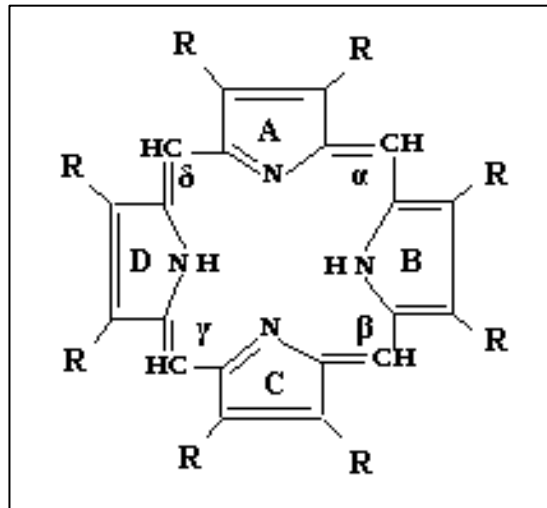


Fig. 1. Estructura general de las porfirinas. R: sustituyentes

### 1.2.- Biosíntesis del hemo

La síntesis de porfirinas es un camino metabólico complejo, que involucra ocho enzimas. La primera y las tres últimas se localizan en la mitocondria, mientras que las cuatro restantes se localizan en el citosol.

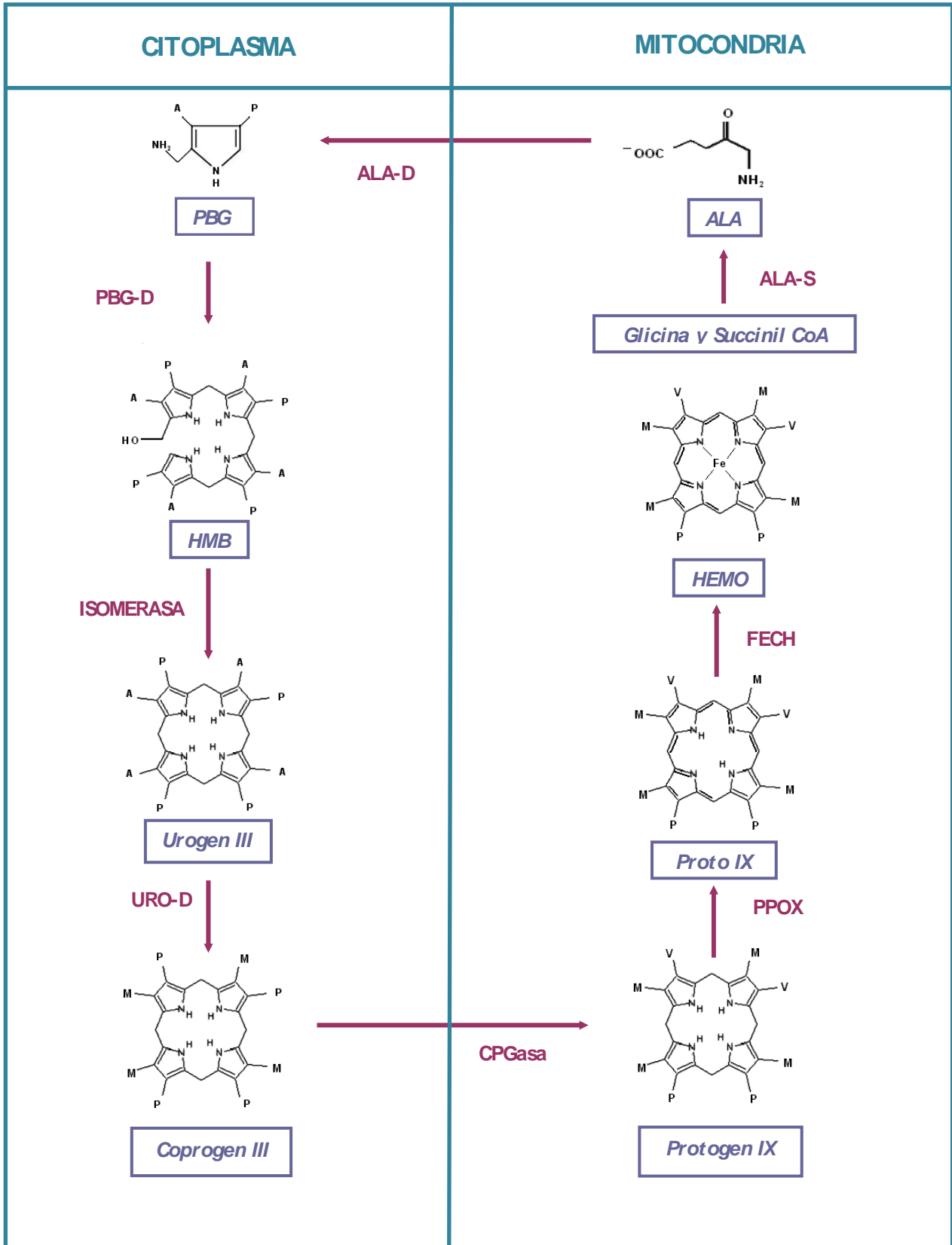
Los precursores químicos de la síntesis de porfirinas son moléculas relativamente sencillas: el *ácido 5-δ-aminolevúlico* (ALA) y el *porfobilinógeno* (PBG), cuya naturaleza química es altamente hidrofóbica, por lo cual se excretan fácilmente en orina (Batlle, 1997).

La síntesis del hemo se inicia a partir de moléculas pequeñas como la *glicina* y la *Succinil CoA*, (Fig. 2) derivados del ciclo de los ácidos tricarbónicos, que por acción de la  $\delta$ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S) producen una molécula de ALA. La actividad de la ALA-S constituye el paso limitante de la síntesis y sufre un control por retroinhibición por producto final, es decir el hemo. El siguiente paso es la formación

del monopirrol cíclico insaturado, *PBG* por acción de la ALA-Dehidrasa (ALA-D) que condensa dos moléculas de ALA.

A continuación tiene lugar la unión de cuatro moléculas de *PBG* para formar el *Uroporfirinógeno de la serie III* (Urogen III) por acción combinada de la *PBG* Deaminasa (*PBG-D*) o hidroximetilbilano sintetasa (*HMB-S*), y la Isomerasa o uroporfirinógeno III sintetasa (*UROgen III sintetasa*). La primera de estas dos enzimas une las moléculas de *PBG* extremo con extremo, formando un tetrapirrol abierto llamado *Hidroximetilbilano* (*HMB*) en el cual los sustituyentes  $\beta$  se ordenan de manera simétrica. En ausencia de la enzima el bilano tiende a ciclarse espontáneamente, generando *Uroporfirinógeno I* (Urogen I) pero en presencia de la Isomerasa se rota el anillo pirrólico D del hidroximetilbilano, obteniéndose así una disposición asimétrica de los sustituyentes. Finalmente se cicla generando el *Uroporfirinógeno III* (Urogen III) que será utilizado como sustrato en la siguiente etapa.

El Urogen I no es fisiológico y el porfirinógeno normalmente encontrado en la célula es el *Uroporfirinógeno III* (urogen III). La enzima encargada de catalizar este paso es citoplasmática y se encuentra en exceso respecto de la enzima *PBG-D*, asegurando que haya más síntesis del intermediario fisiológico (Urogen III) que del ciclado espontáneamente (Urogen I).



**Fig. 2.** Representación de las enzimas y los intermediarios de la biosíntesis del hemo. A: ácido acético (-CH<sub>2</sub>-COOH), M: metilo (-CH<sub>3</sub>), P: ácido propiónico (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), V: vinilo (-CH=CH<sub>2</sub>).



El paso siguiente consiste en la decarboxilación progresiva de los cuatro sustituyentes de ácido acético (-CH<sub>2</sub>-COOH) del Urogen III por acción de la Uroporfirinógeno III decarboxilasa (URO-D), para obtener *Coproporfirinógeno III* (Coprogen III). La URO-D puede utilizar como sustrato también al Urogen I para formar finalmente Coprogen I. La reacción ocurre con una velocidad mayor en el caso de los isómeros de la serie III que los de la serie I, asegurando esto que no se acumulen en la célula porfirinógenos no fisiológicos. Sin embargo, aunque se pueden encontrar porfirinógenos con 8 a 4 carboxilos de la serie I, solo el Coprogen III se decarboxila oxidativamente a protoporfirinógeno IX (Protogen IX) en la mitocondria por medio de la Coproporfirinógeno oxidasa (CPGasa). Por lo tanto, en el caso en que se formen isómeros de la serie I serán excretados en las etapas entre Urogen I y Coprogen I. La CPGasa es la encargada de realizar la decarboxilación oxidativa del Coprogen III, para dar como producto *Protoporfirinógeno IX* (Protogen IX).

La Protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) elimina luego seis átomos de hidrógeno del Protogen IX para formar la *Protoporfirina IX*. La última etapa de la secuencia implica la inserción del hierro en el anillo porfirínico por la acción de la Ferroquelatasa (FECH) para finalmente formar el *Hemo* (Batlle, 1997).

### 1.3.- Catabolismo del hemo

El catabolismo del hemo es de gran importancia por sus implicaciones clínicas, como la síntesis de pigmentos biliares y, en las plantas, por dar lugar a fotocromos y fitocianinas. En mamíferos, el hemo se cataboliza a biliverdina, CO e hierro por la acción de la hemooxigenasa microsomal (HO) (Maines, 1988). Es la primer enzima y además, limitante de la velocidad de degradación del hemo, que requiere la actividad concertada de NADPH y citocromo P450 reductasa microsomal (Docherty et al, 1984; Kutty et al, 1988).

La HO se une al hemo formando un complejo hexacoordinado hemo-enzima (Takahashi et al, 1994). Luego el hierro es reducido a estado ferroso por acción de la NADPH-citocromo P450 reductasa, seguido de la unión del oxígeno molecular al complejo atacando el carbono  $\alpha$ -meso del anillo de la PROTO IX para formar  $\alpha$ -meso-hidroxiemo (Davydov et al., 1999) y a continuación el verdohemo, que se degrada a biliverdina férrica. Sólo la isoforma verdohemo IX $\alpha$  puede ser convertida a biliverdina IX $\alpha$  (Zhang *et al.*, 2003). La reacción continúa con la reducción del hierro férrico a la forma ferrosa por la acción de una reductasa, seguida de la liberación del metal de la biliverdina, la que es convertida rápidamente en bilirrubina por la enzima citosólica biliverdina reductasa, con consumo de NADPH (Montellano, 2000). La bilirrubina formada es insoluble en agua, por lo tanto para poder ser eliminada a través del líquido biliar, se glucuroniza en el hepatocito mediante el sistema enzimático glucuroniltransferasa.

La etapa terminal del catabolismo de hemo, es la transformación de la bilirrubina conjugada en urobilinoídes, grupo constituido por D-Urobilinógeno, estercorbilina y urobilina. Las bacterias intestinales son las encargadas de esta desconjugación de la bilirrubina. Una pequeña cantidad del urobilinógeno fecal es absorbido por el intestino para ser casi totalmente re-excretado por el hígado (Billing, 1982).

#### 1.4.- Regulación de la síntesis de hemo

Los niveles celulares de hemo están regulados por un fino balance entre su síntesis y su catabolismo. Los requerimientos de hemo varían significativamente entre las distintas células y tejidos. La máxima producción de hemo ocurre en los eritrocitos en desarrollo, allí se sintetiza aproximadamente el 85% del hemo total. El segundo órgano en importancia es el hígado, con una diferencia entre ambos, de aproximadamente un orden en la velocidad de síntesis. Consecuentemente, la hemoglobina provee la mayor parte del hemo que se cataboliza principalmente en macrófagos, aunque todas las células pueden degradarlo, con excepción de los eritrocitos maduros y algunas otras células altamente diferenciadas.

La regulación de la síntesis de hemo es específica del tejido. Diferencias en el metabolismo de hierro y en los genes de ALA-S, la primera enzima de la biosíntesis de hemo, son responsables de las diferencias en la regulación y velocidad de síntesis en células eritroides y no eritroides. La unión del hemo a una secuencia de binding en el ALA-S bloquea la importación a la mitocondria del precursor de esa enzima, representando un punto post-traducciona l de inhibición por producto final, existiendo también una inhibición por hemo a nivel transcripcional (Roberts & Elder, 2001; Munakata *et al.*, 2004).

En eritrocitos, el hemo inhibe el suministro de hierro desde la transferrina (Ponka, 1997), entonces en células eritroides, la disponibilidad de hierro antes que la producción de ALA, es el paso limitante de la velocidad de la síntesis de hemo. Además, en esas células, los niveles de PROTO IX están acoplados a la disponibilidad de hierro como resultado de la inducción traduccional del ALA-S2 por el hierro. Por otra parte, se observó que si se suministra un flujo continuo de hierro a la mitocondria, se inhibe significativamente la síntesis de Fe-Quel (Richardson *et al.*, 1996). Se ha propuesto, que una vez que el hierro es liberado por la transferrina a un endosoma en la mitocondria, éste se transfiere directamente a la Fe-Quel por medio de transportadores unidos a la membrana. En los hepatocitos existe un pool de hemo libre que ejerce una regulación por retroalimentación negativa sobre la transcripción, traducción y actividad del ALA-S (Bonkowsky, 1991).

Sassa y Kappas (1981) calcularon que en condiciones normales 65% del ALA-S se utiliza para producir citocromo-P450, 15% para catalasa peroxosomal, 6% para citocromos mitocondriales y 8% para citocromo b<sub>5</sub>. Por inducción de la síntesis del ARNm de apoproteínas, el pool de hemo libre puede regular la biosíntesis de hemoglobina, de citocromos mitocondriales y microsomales y de enzimas que contienen hemo (Bottomley & Muller-Eberhard, 1988).

### 1.5.- Porfirias

La deficiencia en la actividad de alguna de las enzimas del camino metabólico del hemo (excepto la ALA-S) conlleva a un desorden metabólico que deriva en la acumulación y excreción de precursores, porfirinógenos y/o porfirinas, lo que da lugar a las enfermedades conocidas como *Porfirias*. Las porfirias humanas son entonces desórdenes metabólicos que pueden ser hereditarios o adquiridos, Existen 8 tipos de porfirias, y en cada una de ellas, como consecuencia de la deficiencia enzimática específica, se produce un patrón característico de incremento y acumulación de precursores de hemo y/o de porfirinas en sangre, orina y heces, que provoca síntomas particulares que permiten realizar un diagnóstico preciso (Batlle, 1997).

El primer caso de porfiria documentado del que se tiene registro es el del rey Jorge III de Inglaterra. En 1811 se lo describía sufriendo de dolor abdominal, taquicardia, orina de color anormal y "locura". Vivió desde entonces afectado por estos síntomas hasta su muerte en 1820. Entre 1911 y 1983, todos los tipos de porfiria conocidos hoy ya habían sido descritos (Batlle, 1997).

#### 1.5.1.- Clasificación

Las porfirias pueden clasificarse según dos criterios principales:

- Según el sitio donde más se manifiesta la deficiencia: En *Hepáticas*, *Eritropoyéticas* y *Hepatoeritropoyéticas*. Es decir, que el mayor sitio de acumulación de precursores o porfirinógenos puede ser el hígado, los eritrocitos o ambos.
- Según la sintomatología: En *Cutáneas* o *Agudas*. Es decir, con síntomas de fotosensibilidad y fragilidad en la piel debido a la acumulación de porfirinas en este

tejido ó en el caso de las agudas, con ataques de variada índole como convulsiones dolores abdominales muy fuertes (síntoma neuroabdominal), entre otros.

La fuerte fotosensibilidad y las lesiones que caracterizan a las porfirias cutáneas da cuenta del poder fotoquímico de las porfirinas que se acumulan en estas patologías.

<i>Agudas</i>	<i>Gen y Locus</i>	<i>Herencia</i>	<i>Aspectos importantes</i>
<i>Porfiria Aguda Intermitente (PAI)</i>	Porfobilinógeno deaminasa 11q24.1-q24.2	Autosómica dominante	Porfiria aguda más común. <i>Hepática</i> . Sin sintomatología cutánea. Dolor abdominal, manifestaciones neurológicas.
<i>Porfiria Variegata (PV)</i>	Protoporfirinógeno oxidasa 1q22-23	Autosómica dominante	<i>Hepática</i> . Sintomatología cutánea y aguda. Síntomas neuroabdominales. Expresión variada.
<i>Coproporfiria Hereditaria (CPH)</i>	Coproporfirinógeno oxidasa 3q12	Autosómica dominante	Rara. <i>Hepática</i> mixta. Fragilidad cutánea
<i>Nueva Porfiria Aguda (NPA)</i>	ALA dehidrasa ; 9q34	Autosómica recesiva	Muy rara. <i>Hepática</i> . Síntomas neuroabdominales.

**Tabla 1.** Características principales de las porfirias agudas.

<i>Cutáneas no Agudas</i>	<i>Gen y Locus</i>	<i>Herencia</i>	<i>Aspectos importantes</i>
<i>Porfiria Cutánea Tardía (PCT)</i>	Uroporfirinógeno Decarboxilasa 1p34	Autosómica dominante	Porfiria más frecuente. <i>Hepática</i> . <i>Cutánea</i> . Formas hereditarias y adquiridas. Fragilidad cutánea. Problemas hepáticos.
<i>Protoporfiria Eritropoyética (PPE)</i>	Ferroquelatasa 18q21.3	Autosómica dominante	<i>Eritropoyética</i> . <i>Cutánea</i> . En el 5% de los casos daño hepático severo.
<i>Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE)</i>	Uroporfirinógeno III Sintetasa 10q25.3-q26.3	Autosómica recesiva	<i>Eritropoyética</i> . <i>Cutánea</i> . Cuadro severo de mutilación, anemia hemolítica deposición de porfirinas en dientes y huesos.
<i>Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE)</i>	Uroporfirinógeno Decarboxilasa 1p34	Autosómica recesiva	<i>Hepatoeritropoyética</i> . <i>Cutánea</i> . Variante homocigota de la PCT. Fotosensibilidad aumentada.

**Tabla 2.** Características principales de las porfirias cutáneas

### *1.6.- Propiedades y Aplicaciones de las porfirinas*

Últimamente, las propiedades de las porfirinas, sus derivados o sus precursores, han sido intensivamente estudiadas en busca de aplicaciones prometedoras en el campo de la biomédica, la biotecnología y el diagnóstico.

El más extendido ejemplo es el uso de porfirinas derivatizadas o incluso el precursor ALA en la Terapia Fotodinámica (TFD) Consiste en la administración de un fotosensibilizante que es selectivamente retenido por lesiones malignas o patológicas. La irradiación con luz de longitud de onda adecuada, activa al fotosensibilizante (FS), generando una serie de reacciones fotoquímicas que llevan eventualmente a la muerte celular. Aún más, la fluorescencia de los agentes cromóforos ha sido empleada también para la visualización, diagnóstico y resección guiada de lesiones tumorales (Dabrowski , 2003).

Continuamente se sintetizan e investigan FS más efectivos, más lipofílicos, o acoplados a vehículos que mejoren la penetración del compuesto, y por lo tanto, la efectividad del procedimiento.

El ALA ha sido también empleado como herbicida biodegradable, insecticida y regulador del crecimiento y el estrés en plantas (Balestrasse et al, 2010). Dado que las porfirinas absorben en longitudes de onda de la región UV visible cercano del espectro de emisión solar, se optimiza la eficiencia de su fotoinactivación en ambientes abiertos y se evita su acumulación a largo plazo en el ambiente.

## REFERENCIAS

- Battle A. (1993). Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy--a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 20 (1): 5-22.
- Battle, A. (1997) Porfirias y Porfirinas. Aspectos Clínicos, Bioquímicos y Biología Molecular. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Supl 3, Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, ISSN 0325-2957
- Battle A & Stella AM. (1978). Delta aminolaevulinate dehydratase: its mechanism of action. *Int. J. Biochem.*, 9(12): 861-4.
- Battle A, Fukuda H, Parera VE, Wider EA, Stella A.M. (1987) In inherited porphyrias, lead intoxication is a toxogenetic disorder. *Int. J. Biochem.*, 19: 717-20
- Bevan DR, Bodlaender P, Shemin D. (1980). Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn<sup>2+</sup> for enzyme activity, *J. Biol. Chem.* 255 (5): 2030–2035.
- Billing BA.(1982). Bilirubin metabolism. En *Disease of the liver*. Schill, ER. Schiff (eds.). 11: 349-378
- Bonkowsky HL. (1991). Key relationships of hepatic heme and iron metabolism: new insights into functions of two old molecules. *Viewpoints on Digestive Diseases*; 23:N°4, Boston, Massachusetts, USA.
- Bottomley S, Muller-Eberhard U. (1988). Pathophysiology of heme synthesis. *Seminars in Hematology* 1988; 25:282-302.
- Chen JJ, London IM. (1981). Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell* 26: 117–122.
- Dabrowski Z, Kwaśny M, Kamiński J, et al.(2003). The synthesis and applications of 5-aminolevulinic acid (ALA) derivatives in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Acta Pol Pharm.*, 60 (3):219-24.
- Davydov RM, Yoshida T, Ikeda-Saito M, Hoffman BM. (1999). Hydroperoxy-heme oxygenase generated by cryoreduction catalyzes the formation of a-meso-hydroxyheme as detected by EPR and ENDOR. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 10656–10657.
- Dent AJ, Beyersmann D, Block C, Hasnain SS. (1990). Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. *Biochemistry* 29 (34): 7822–8.
- Docherty JC, Firneisz GD, Schacter BA. (1984). Methene bridge carbon atom elimination in oxidative heme degradation catalyzed by heme oxygenase and NADPH–cytochrome P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 657–664.
- Erskine PT, Norton E, Cooper JB, L, et al. (1999). X-ray structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* complexed with the inhibitor levulinic acid at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 38 (14): 4266–76.
- Folmer V, Soares J, Gabriel D, Rocha J. (2003). A high fat diet inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*), *J Nutr*, 133: 2165–70.

- Fukuda H, Casas A, Batlle A. (2005). Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(2):272-6.
- Fukuda H, Paredes SR, Batlle A. (1988). Active site histidine in pig liver ALA-D modified by DEP and protected by Zn ions. *Comp Biochem Physiol*, 91B: 285-9
- Gidari AS, Levere RD. (1977). Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis. *Semin Hematol*, 14:145–68.
- Jaffe EK. (1995). Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J Bioenerg Biomembr* 27(2):169-79
- Maines MD. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*. 2: 2557–2568.
- Montellano PR. (2000). The mechanism of heme oxygenase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 221–227.
- Munakata H, Sun JY, Yoshida K, et al. (2004). Role of the heme regulatory motif in the heme mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinate synthase. *J Biochem (Tokyo)* 136 (2):233–8.
- Phillips JD, Whitby FG, Warby CA, Labbe P, et al. (2004). Crystal structure of the oxygen-dependant coproporphyrinogen oxidase (Hem13p) of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279 (37): 38960–8.
- Ponka P. (1997). Tissue-specific regulation of heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 89: 1–25.
- Ponka P. (1999). Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 318: 241–56.
- Richardson DR, Ponka P, Vyoral D. (1996). Distribution of iron in reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone. Examination of cytoplasmic and mitochondrial intermediates involved in iron metabolism. *Blood*, 87: 3477–88.
- Roberts AG, Elder GH. (2001). Alternative splicing and tissue-specific transcription of human and rodent ubiquitous 5-aminolevulinate synthase (ALAS1) genes. *Biochim Biophys Acta*, 1518 (1–2): 95–105.
- Sassa S, Kappas A. (1981). Genetic metabolic and biochemical aspects of the porphyrias. En: *Advances in human genetics II*. Harris H, Hirshhom K, eds. Plenum Press, New York, NY, USA.:121-231
- Seed MP, Willoughby DA. (1997). COX-2, HO NO Cyclooxygenase-2, heme oxygenase and nitric oxide synthase: their role and interactions in inflammation. *BIRAs Symposium, Saint Bartholomew's Hospital, London, Inflamm. Res.* 46: 279–81.
- Takahashi S, Wang J, Rousseau DL, Ishikawa, et al. (1994) Heme-heme oxygenase complex. Structure of the catalytic site and its implication for oxygen activation. *J. Biol. Chem.* 269: 1010–1014.
- Thunell S. (2000) Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. *Scand J Clin Lab Invest* 60(7): 509-40.



Verger C, Sassa S, Kappas A. (1983). Growth-promoting effects of iron- and cobalt-protoporphyrin on cultured embryonic cells. *J Cell Phys* 116:135–41.

Wu CK, Dailey HA, Rose JP, Burden A, Sellers VM, Wang BC. (2001). The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat Struct Biol* 8 (2): 156–60.

Takahashi S, Wang J, Rousseau DL, et al. (1994) Heme-heme oxygenase complex. Structure of the catalytic site and its implication for oxygen activation. *J. Biol. Chem.* 269: 1010–1014.

---

## CAPÍTULO II BIOLOGÍA TUMORAL

### *II.1. Definiciones básicas y nomenclatura*

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

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

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

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

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

- Tumores benignos: se designan agregando el sufijo –oma al tipo celular del que se origina el tumor. Según su origen pueden ser: fibroma (tejido conjuntivo fibroso), mixoma (tejido conjuntivo laxo), lipoma (tejido adiposo), condroma (tejido cartilaginoso), osteoma (tejido óseo), hemangioma o angioma (tejido vascular), linfangioma (tejido linfático), meningioma (meninges), tumor glómico (tejido nervioso de sostén), leiomioma (tejido muscular liso), rabiomioma (tejido muscular estriado), papiloma (tejido epitelial formando papilas), adenoma (tejido glandular), teratoma (células totipotenciales), nevus (melanocitos). Algunos de los tumores benignos

derivados de tejido epitelial terminan con el sufijo “adenoma”, aunque se debe tener en cuenta que existen múltiples excepciones a las normas de nomenclatura tumoral.

Por ejemplo, las neoplasias benignas de melanocitos se denominan nevus y su forma maligna melanoma.

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

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

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

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

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

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

Uno de los criterios empleados para determinar la clasificación de un tumor es el grado de diferenciación celular. La diferenciación se refiere a la similitud que presentan las células neoplásicas con respecto a las normales equivalentes, tanto a nivel morfológico como funcional. La falta de diferenciación se denomina anaplasia. Por lo general los tumores benignos están bien diferenciados, mientras que las neoplasias malignas pueden ser diferenciadas o indiferenciadas (anaplasia).

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

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

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

## *II.2. Características generales de la célula tumoral*

Un amplio número de eventos genéticos y epigenéticos son los que se requieren para convertir una célula normal en maligna. Hanahan y Weinberg describieron muy acertadamente en su trabajo *Hallmarks of Cancer* (Hanahan y Weinberg, 2000, Fig. 3), los hitos clásicos que se adquieren en la progresión tumoral: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a factores antagonistas de la proliferación celular, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis continua, invasión tisular y metástasis. Sin dejar de lado otros como inestabilidad genética, evasión de la

senescencia, alteraciones epigenéticas de genes asociados al cáncer, cambios en el metabolismo de glucosa y glutamina, factores estromales y del microambiente tumoral, cambios en la presentación antigénica entre muchos otros que se suman a la lista constantemente, como por ejemplo una nueva dimensión de complejidad en la que los tumores presentan un conjunto de células claramente normales que contribuyen a crear el microambiente tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011).



**Fig. 3.** Principales eventos condicionantes de la progresión tumoral según Hanahan y Weinberg (2000)

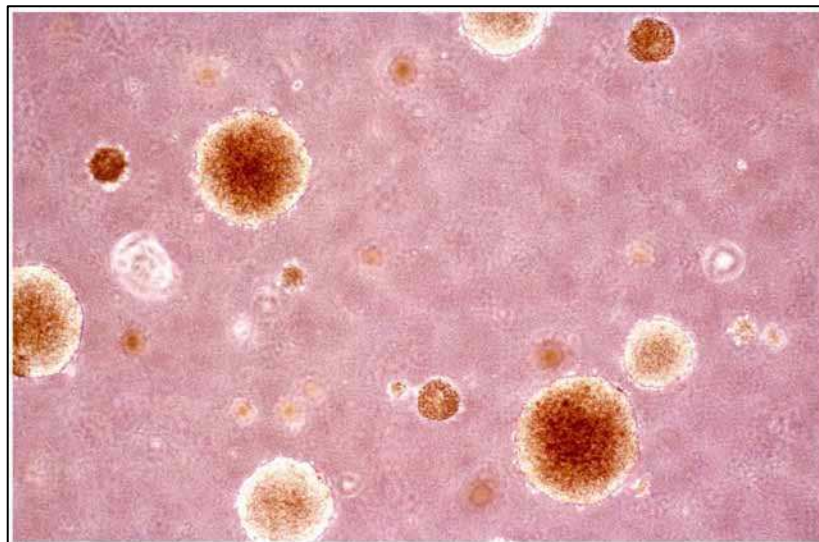
El cáncer se caracteriza por una alteración en la respuesta a los factores de crecimiento. En algunos casos las células presentan una hipersensibilidad a los mismos, mientras que en otros casos se vuelven independientes de su presencia. Cualquiera de estas respuestas promueve la autonomía de crecimiento que caracteriza al cáncer.

El cáncer es una enfermedad compleja caracterizada por la proliferación de células anormales con la capacidad de invadir y colonizar territorios que normalmente son reservados para otras células. Estos cambios pueden implicar mutaciones en uno o más genes, anormalidades cromosómicas graves o anomalías en la transcripción genética que conducen a la desdiferenciación y alteración de las propiedades de

crecimiento de la célula. Sin embargo, estas alteraciones en una célula no son suficientes para el desarrollo del cáncer, sino que se requieren cambios genéticos posteriores en su progenie, fenómeno conocido como progresión tumoral (Ellisen y Haber, 2010).

Los efectos del cáncer se evidencian por un conjunto de signos y síntomas de pronóstico y tratamiento diferentes, dependiendo de diversos factores. Debido a la gran complejidad de esta enfermedad resulta difícil encontrar características generales que definan a la malignidad celular; sin embargo, se han descrito algunas propiedades compartidas por todos los tipos de células cancerígenas (Hanahan y Weinberg, 2000; Schultz, 2005):

- Proliferación celular aumentada: por un lado las células cancerígenas presentan una mayor sensibilidad a las señales que estimulan el crecimiento y por otra parte presentan una mínima o nula respuesta a las señales inhibitorias del crecimiento. Como consecuencia, estas respuestas alteradas producen un crecimiento celular incrementado y autónomo. No sólo es característica la pérdida de inhibición del crecimiento por contacto célula-célula, sino también el crecimiento independiente de sustrato (Fig. 4).



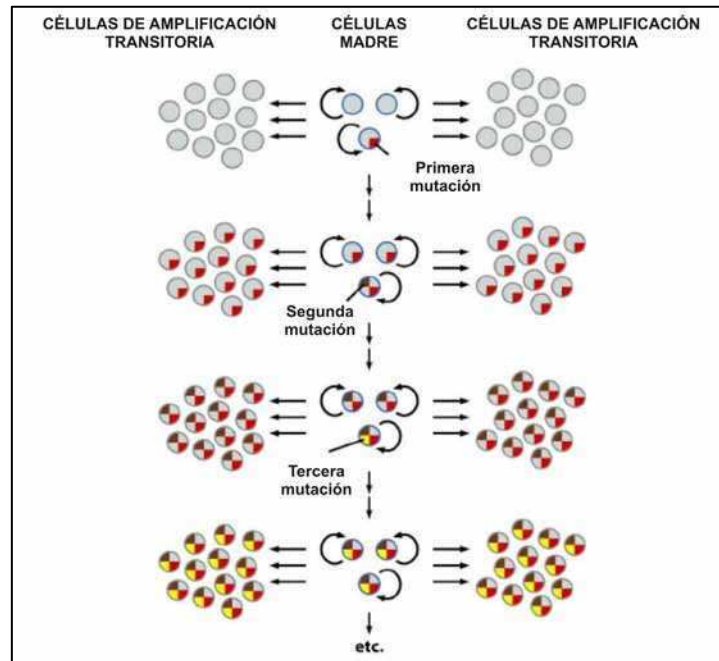
**Fig. 4.** Células tumorales en cultivo sin sustrato adherente. *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)

- Apoptosis insuficiente: la proliferación celular en el cáncer depende del balance entre tres factores: el aumento en la proporción de células con mayor tasa de crecimiento, el descenso en la tasa de muerte celular debido a una disminución de la apoptosis y la falta de diferenciación celular, que también se asocia a un aumento en la proliferación celular, ya que las células diferenciadas presentan tasas de crecimiento menores que las indiferenciadas. Estos tres factores intervienen en distinta medida según el tipo de cáncer.

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

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

- Inestabilidad genómica: las células cancerígenas en general presentan múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas tales como la poliploidía, aneuploidía, mutaciones puntuales o alteraciones en los patrones de metilación del ADN y a medida que el cáncer progresa, el número de alteraciones tiende a incrementarse. El cáncer consiste en clones de células que difieren muy poco en sus características genéticas. Las variantes de clones se encuentran sometidas a un proceso selectivo continuo en el cual el clon mejor adaptado al medio es el que sobrevive (Fig. 5).



**Fig. 5.** Diversificación clonal en las células tumorales debido a altas tasas de mutación. Una única mutación no es suficiente para iniciar el proceso de la progresión tumoral. Aquellas mutaciones que aportan una ventaja permanecerán en la población de células en proliferación, acumulando de este modo, sucesivas mutaciones que contribuyen a la inestabilidad genética propia de los tumores.  
*The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)

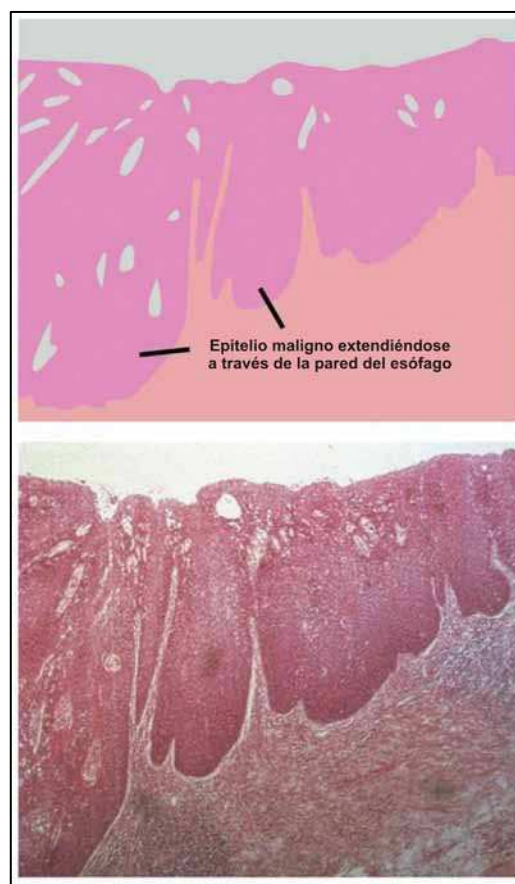
- **Inmortalización:** las células tumorales poseen diferencias en la expresión de la telomerasa con respecto a las células normales, lo cual les confiere el potencial de dividirse infinitas veces, de la misma manera que las células madre y las células de la línea germinal.

- **Invasión y metástasis:** esta propiedad constituye el principal criterio que determina la malignidad celular y la letalidad del cáncer. Durante la invasión las células cancerígenas se desprenden de su sitio de origen y se dispersan en distintos sitios del mismo tejido, eventualmente creciendo por encima del mismo e incluso en tejidos adyacentes (Fig. 6). Esta etapa normalmente va acompañada de inflamación y neoangiogénesis, que consiste en la formación de nuevos capilares o reconstrucción de vasos sanguíneos preexistentes, con el fin de proveer de oxígeno y nutrientes al nuevo tejido tumoral.



Durante la metástasis las células tumorales se separan del tejido de origen o tumor primario y migran a través de los vasos sanguíneos o linfáticos a otros órganos,

donde pueden formar nuevos tumores. Existen puntos que limitan la metástasis como la capacidad de las células para atravesar los capilares (extravasación), o la capacidad de sobrevivir y proliferar en un nuevo microambiente. En general, los órganos más susceptibles de metástasis suelen ser los que presentan una alta irrigación, como el hígado, pulmón y hueso; sin embargo cada tipo de cáncer presenta patrones metastásicos diferentes.



**Fig. 6.** Invasión de epitelio maligno de esófago a través de la membrana basal. *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)

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

El daño genético no letal es el responsable de la carcinogénesis. Este daño generalmente se produce en los genes que regulan la proliferación, la diferenciación y la muerte celular.

Las alteraciones pueden heredarse en la línea germinal, o bien pueden adquirirse por agentes ambientales, radiación o virus. Sin embargo algunas mutaciones no están inducidas por el ambiente, y se producen en forma espontánea y estocástica (Cotran y Kumar, 2005). La mayoría de los cánceres son producidos por mutaciones en células somáticas, mientras que sólo una pequeña proporción se deben a mutaciones en la línea germinal, y éstos son principalmente los cánceres que se desarrollan en la niñez (Schultz, 2005).

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

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

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

aproximadamente el 25% de los cánceres humanos, incluyendo cáncer de páncreas, de pulmón y de colon.

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

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

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

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

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

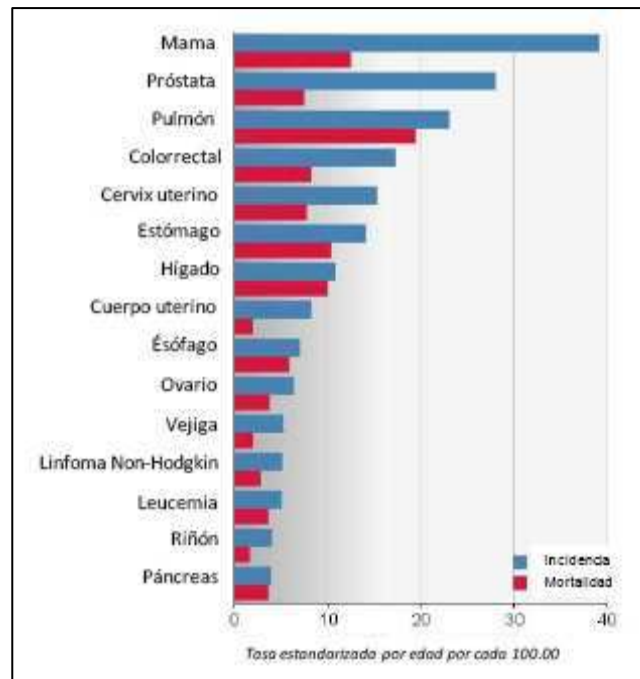
#### *II.4. Epidemiología del cáncer*

Si bien año a año crece el conocimiento sobre la prevención y el tratamiento del cáncer, cada año también aumenta el número de personas que lo padecen. Si la tendencia continúa como hasta ahora, en el año 2020 se reportarán 16 millones de nuevos casos, de los cuales dos tercios vivirán en países en desarrollo o en países de industrialización reciente. El cáncer actualmente es la segunda causa de muerte en los países desarrollados y en los países en desarrollo figura entre las tres principales causas de muerte de los adultos. Un 12.5% del total de causas de muerte se atribuye al cáncer, porcentaje que supera al total de muertes debidas al SIDA, la tuberculosis y la malaria consideradas conjuntamente.

El cáncer es un problema de salud pública en todo el mundo y afecta a personas de todas las edades y condiciones (Acción Mundial Contra el Cáncer, 2005). Durante el año 2008 se reportaron en todo el mundo cerca de 12,7 millones de nuevos casos de cáncer y 7,6 millones de muertes debidas a esta enfermedad. Algunos tipos de cáncer están asociados con una alta sobrevida en los países desarrollados (próstata, mama y cáncer colorrectal), mientras que otros con peor pronóstico (hígado, estómago y de esófago) son más comunes en regiones de menor desarrollo (GLOBOCAN, IARC, 2008).

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

La IARC ha estimado que durante el año 2008 en la Argentina se produjeron 104.859 nuevos casos de tumores malignos (excluyendo aquellos localizados en piel y con histología distinta al melanoma). Esta estimación corresponde para ambos sexos a una incidencia de 206 casos nuevos por año cada 100.000 individuos. Según esta publicación, el cáncer de mayor incidencia en mujeres sería el de mama con una tasa de 74 casos por cada 100.000 mujeres, seguido por los cánceres masculinos de próstata (58,4 x 100.000 hombres) y pulmón (33,7 x 100.000 hombres) (Fig. 7).



**Fig. 7.** Tasa de incidencia y mortalidad en ambos sexos (estandarizada por edad) cada 100.000 habitantes, para distintos tipos de cáncer en todo el mundo. *GLOBOCAN (IARC), 2008.*

Al medir el impacto de esta enfermedad sin discriminar por sexos, se evidencia que el cáncer de pulmón fue responsable del 15,4% de las muertes con 8.916 defunciones, lo que representa el 86,6% de los casos nuevos que se estiman por año. Luego siguen el cáncer de colon y recto y el cáncer de mama, con letalidades estimadas del 59,7% y 27,8% respectivamente (Tabla 3)

La tasa de mortalidad específica ajustada por edad para 2008, tomando como referencia a la población mundial, fue de 108.7 defunciones por 100.000 habitantes (hombres: 133,4 y mujeres: 88,0). El cáncer de pulmón fue la causa principal de muerte por esta enfermedad (Tabla 3). Sin embargo, se observan diferencias importantes según sexo ya que el 73% de las muertes por este cáncer se produjeron en hombres (INC, 2010).

Localización	Mortalidad	
	Defunciones	Porcentaje
<b>Pulmón</b>	<b>8.916</b>	<b>15.4</b>
<b>Colón-recto</b>	<b>6.596</b>	<b>11.4</b>
Mama	5.202	9.0
Próstata	3.854	6.6
Páncreas	3.770	6.5
T. Hematológicos	3.106	5.4
Estómago	2.850	4.9
Sistema Nervioso Central*	2.043	3.5
Cuello de útero**	1.868	3.2
Esófago	1.801	3.1
Resto de tumores	18.006	31.0
<b>TOTAL</b>	<b>58.012</b>	<b>100.0</b>

**Tabla 3.** Mortalidad e incidencia por cáncer en ambos sexos - distribución absoluta y relativa de las principales localizaciones. INC según datos de GLOBOCAN para Argentina, 2008

## II.5. Cáncer de Pulmón

Según lo hasta aquí expuesto se evidencia que las patologías oncológicas representan tanto a nivel mundial como regional un factor sumamente relevante respecto de la salud pública. Y entre estas patologías, el cáncer de pulmón se perfila estadísticamente como el tipo de cáncer más extendido, independientemente de la distinción por sexos. Y es uno de los tipos tumorales cuyos factores de riesgo abundan entre la población y su entorno, como ser el uso activo o pasivo de humo de tabaco y la contaminación ambiental.

### II.5.1. Clasificación

Los tumores de pulmón se clasifican según su tipo histológico. Esta clasificación reviste gran importancia para el manejo de la clínica y la prognosis de la enfermedad. La gran mayoría de los tumores de pulmón son carcinomas, es decir, células malignas que se originan en células epiteliales. Los carcinomas de pulmón se categorizan según el tamaño y la apariencia de las células malignas mediante un análisis morfológico por

microscopía. Las dos grandes clases de carcinomas son: Carcinomas de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés: small cell lung cancer) y carcinomas de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés: non-small cell lung cáncer) (Lu et al, 2010; Maitra et al, 2007)

Las células de los carcinomas SCLC contienen abundantes gránulos neurosecretorios que asocian este tipo de tumores con síndromes endócrinos-paraneoplásicos. Por lo general se encuentran en las grandes vías aéreas bronquiales y un 60 a 70% de los casos presenta capacidad metastásica. Este tipo de cáncer está estrechamente asociado al tabaquismo (Rosti et al, 2006).

Los tumores de tipo NSCLC agrupan tres subtipos principales de carcinomas: adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes.

Cerca de un 20% de los tumores de pulmón son adenocarcinomas. Este tipo de cáncer por lo general se origina en el tejido periférico del pulmón. Si bien el adenocarcinoma de pulmón es más frecuente entre personas fumadoras, es también el subtipo más común en personas no fumadoras (Subramanian et al, 2007).

Los carcinomas de células escamosas dan cuenta de aproximadamente el 15% de los tumores de pulmón. Típicamente se encuentran en las grandes vías aéreas con un centro necrótico hueco (Lu et al, 2010).

Alrededor del 9% de los tumores de pulmón corresponden a carcinomas de células grandes, las cuales presentan abundante citoplasma y núcleos grandes con nucléolos conspicuos (Lu et al, 2010).

Tipo Histológico	Incidencia ( cada 100.000 casos por año)
Todos	66.9
Adenocarcinoma	22.1
Carcinoma de células escamosas	14.4
Carcinoma de células pequeñas	9.8

**Tabla 4.** Incidencia de cancer de pulmón según tipo histológico ajustado por edad. (Tomado de Alberg y Samet, 2010)

### II.5.2. Patogénesis

Al igual que en muchos otros tipos de cáncer, el cáncer de pulmón es iniciado por mutaciones en protooncogenes o inactivación de genes supresores de tumores. Mutaciones en el gen K-ras son responsables de entre un 10% y un 30% (Salgia y Skarin, 1998; Herbst, 2008) de los adenocarcinomas de pulmón. Mientras que mutaciones y amplificaciones del gen EGFR están comúnmente asociadas a los tumores de tipo NSCLC. Este receptor está implicado en vías de señalización que regulan la proliferación celular, la invasión y la angiogénesis. Daños cromosómicos que lleven a la pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 3p, 5q, 13q, y 17p pueden causar inactivación de genes supresores de tumores, lo cual es frecuente en tumores de tipo SCLC. Es el caso de alteraciones del gen p53, localizado en el cromosoma 17, afectado en el 60% a 75% de los casos (Aviel-Ronen et al, 2006). Otros genes asociados a la patogénesis del cáncer de pulmón al estar mutados o amplificados son c-MET, NKX2-1, LKB1, PIK3CA, y BRAF (Devereux, 1996).

Si bien el factor genético, ya sea hereditario o adquirido es crucial en la patogénesis del cáncer de pulmón, es también notable la contribución de factores externos en la predisposición al desarrollo de tumores.

El consumo de tabaco es uno de los grandes factores de riesgo en cáncer de pulmón. El humo de cigarrillo contiene más de 60 compuestos carcinógenos incluyendo nitrosamina y benzopireno, sumado al efecto depresor del sistema inmune que ejerce la nicotina en los tejidos expuestos a dichas sustancias. En todo el mundo, el 91% de las muertes debidas a cáncer de pulmón en hombres durante el año 2000 y el 71% en mujeres fueron atribuidas al consumo de cigarrillos (Peto et al, 2006). Existe también evidencia de que la inhalación pasiva de humo de cigarrillo es una de las causas de cáncer de pulmón en personas no fumadoras (Taylor et al, 2007).



### II.5.3. Tratamientos

El tratamiento del cáncer de pulmón depende del tipo celular específico (NSCLC: 85% de los casos, SCLC: 14% de los casos. Según Siegel, 2012 - USA), el grado de diseminación, y el estado general del paciente. Las terapias más comunes por lo general consisten en cirugía, quimioterapia y radioterapia.

En el caso de NSCLC, en estadios tempranos, la resección quirúrgica puede practicarse extrayendo el tumor, (si sus límites son claros y definidos y no se ha diseminado) o extrayendo parte o todo un lóbulo del pulmón y en pocos casos, removiendo el pulmón entero (Kaiser, 2008). Sin embargo, la cirugía está desaconsejada para casos de SCLC excepto en estadios tempranos (Goldstein, 2011).

La radioterapia consiste en la utilización de radiación ionizante con el objetivo de alterar la proliferación de las células tumorales. Frecuentemente se utiliza como un tratamiento adyuvante o complementario de la cirugía o la quimioterapia. Si el tumor se encuentra obstruyendo las vías bronquiales puede emplearse una variante, la braquiterapia, en la cual la radiación se dirige hacia la zona obstruida reduciendo la dosis y minimizando los riesgos para el paciente y el personal (Cardona, 2008).

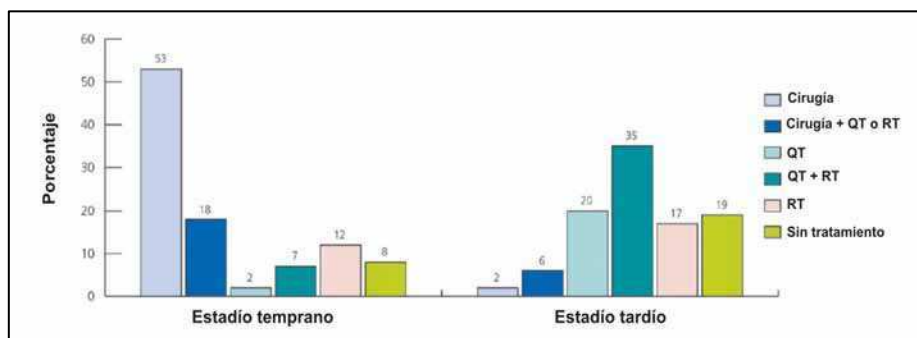
Desde un punto de vista oncológico el término “quimioterapia” involucra la administración de drogas citotóxicas, habitualmente con efectos secundarios no deseados, como tratamiento a pacientes con enfermedades malignas. El sitio de acción de las drogas citotóxicas tradicionales es el ADN o procesos asociados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

Otros agentes citotóxicos pueden afectar los microtúbulos que organizan los cromosomas durante la mitosis (Ej.: alcaloides de la vinca, taxanos) (Camidge y Jodrel, 2005).

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

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

Los pacientes con NSCLC en estadios tempranos mayoritariamente se someten a cirugía o combinación de cirugía con quimio o radioterapia. Mientras que en estadios avanzados es preferible la aplicación de quimio y/o radioterapia (Fig. 8).



**Fig. 8.** Patrones de tratamiento para NSCLC según estadio. Tomado de Siegel 2012 según datos de 2008.

Es importante el desarrollo de un plan de tratamiento multidisciplinario que permita alcanzar o maximizar el grado de control del crecimiento del tumor e incrementar la tasa de remisión total, mejorar la calidad de vida del paciente y prolongar la supervivencia combinando cirugía, quimioterapia y radioterapia así como terapia

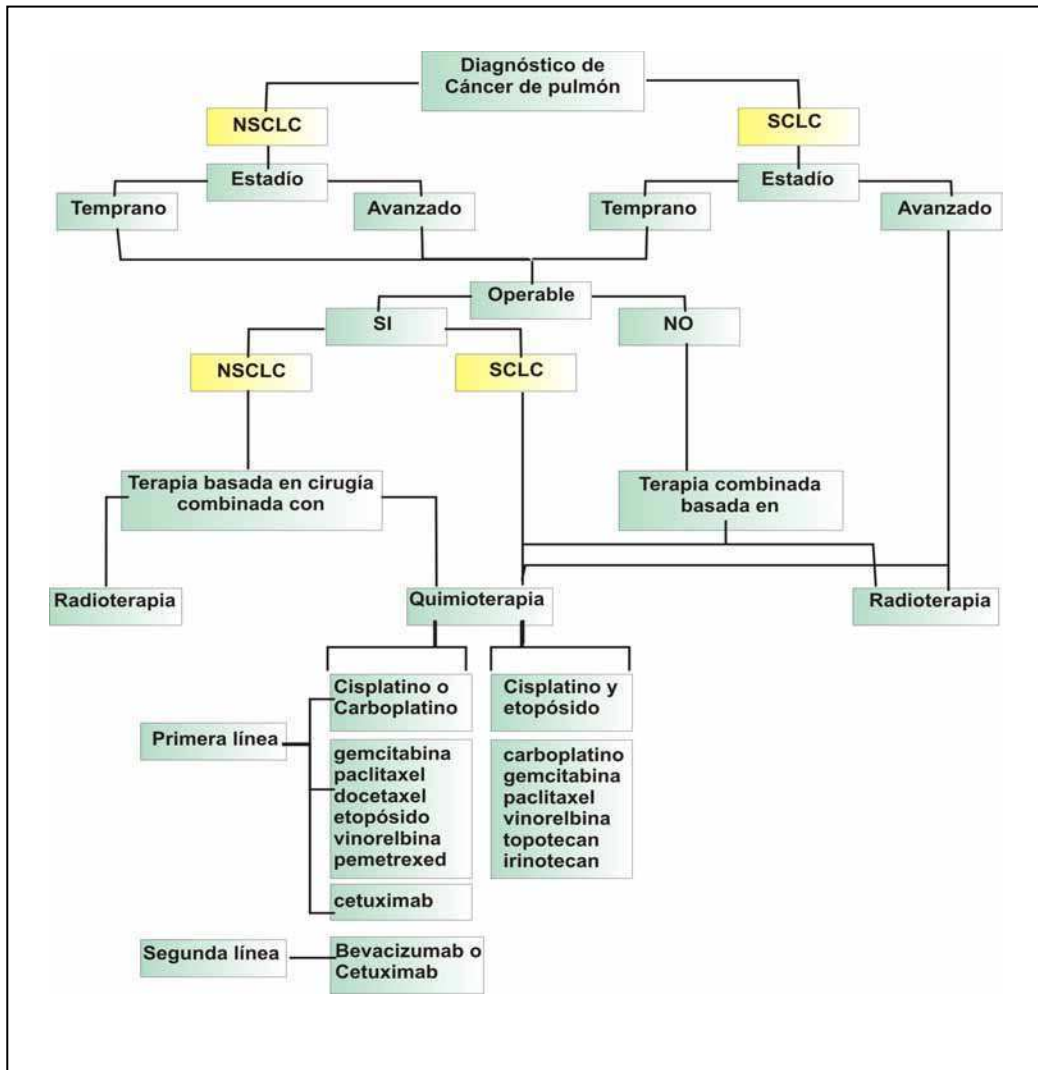
biológica dirigida según la variabilidad propia de cada paciente. Estos son los pilares actuales para el tratamiento del cáncer de pulmón (Zhi et al, 2012).

El esquema de tratamiento actual (Fig. 9) propone una serie de criterios que permitan optimizar y a la vez generalizar las decisiones adecuadas para cada paciente. Por lo general, si el tumor no es operable, se opta por una combinación de y radio y quimioterapia. Ésta última, puede presentar innumerables variantes que continuamente se ponen a prueba en diferentes ensayos clínicos. Sin embargo en líneas generales, se utiliza un derivado de platino (cisplatino, carboplatino) y otra droga con diferente mecanismo de acción (Tabla 5).

Al igual que en todas la patologías oncológicas, se presenta la dualidad de la generalización y la personalización del tratamiento. Por lo cual emerge la constante necesidad de contar con opciones nuevas y distintas a los tratamientos convencionales que se ajusten a las características de cada paciente, sus necesidades y manifestaciones propias de la enfermedad.

Droga	Mecanismo de acción
cisplatino carboplatino	Agentes alquilantes de biomoléculas
vinorelbina	Disrupción de microtúbulos. Impide división celular
etopósido	citostático. Impide la entrada en fase G1
paclitaxel docetaxel	Estabilizan los microtúbulos impidiendo la separación de los cromosomas en la anafase
irinotecan topotecan	Inhibidores de topoisomerasa. Impiden la replicación del ADN por enrollamiento de la
gemcitabina pemetrexed	Antimetabolitos. Interrumpen la replicación.
bevacizumab	Anticuerpo anti VEGF-A. Anti-angiogénico
cetuximab	Anticuerpo inhibidor de EGFR (receptor de Tyr Kinasa) Efectivo en pacientes con EGFR mutado

**Tabla. 5.** Mecanismos de acción de las principales drogas de quimioterapia utilizadas para el tratamiento de cáncer de pulmón.



**Fig. 9.** Esquema del algoritmo de tratamiento del cáncer de pulmón según su histología y estadio. (Adaptado de Zhi et al, 2012; Grossi, 2012; Azzoli et al, 2012; Azim y Ganti, 2007; MacCallum y Gillenwater, 2006; Mehra y Treat, 2008; Clegg et al, 2002; Fuld et al, 2010)

## REFERENCIAS

- Alberg AJ, Samet JM . (2010). Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (5th ed.). Saunders Elsevier. ISBN 978-1-4160-4710-0.
- Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, et al.(2006) K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer*; 8(1):30-8.
- Azim HA Jr, Ganti AK. (2007). Treatment options for relapsed small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs*. 18(3):255-61.
- Azzoli CG, Temin S, Giaccone G. (2011). Focused Update of 2009 American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Oncol Pract*.8(1):63-6.
- Bell E, Chen L, Liu T, et al. (2010) MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential. *Cancer Lett*. 293(2):144-57.
- Camidge R y Jodrel DI. (2005) Chemotherapy. En Knowles M y Selby P. *Introduction to The Cellular and Molecular Biology of Cancer*. 4º Ed. Estados Unidos. Editorial: Oxford University Press, UK. P 399-413.
- "Cancer." *Encyclopedia Britannica*. *Encyclopedia Britannica Online*,( 2011). [www.britannica.com/EBchecked/topic/92230/cancer](http://www.britannica.com/EBchecked/topic/92230/cancer). *Acción Mundial Contra el Cáncer*. Editor: World Health Organization. 2005. P1-24.
- Cardona AF, Reveiz L, Ospina EG, et al. (2008). Palliative endobronchial brachytherapy for non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 16;(2):CD004284.
- Clegg A, Scott DA, Hewitson P, et al. (2002) Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Thorax*.;57(1):20-8.
- Cotran R, Kumar V, Collins T. (2005). Neoplasia. En: Robbins S, Cotran R. *Patología Estructural y Funcional*. Editorial: Elsevier, España. P 271-6.
- Da Silva L, Lakhani SR. (2008) Pathology of hereditary breast cancer. *Clin. Transl. Oncol*. 10(7):389- 94.
- Devereux TR, Taylor JA. (1996). Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. Giles F. Filley Lecture. Barrett JC. *Chest*. 109(3 Suppl):14S-19S.
- Ellisen LW, Haber DA. (2010). Basic Principles of Cancer Genetics. En: Chung D. *The Massachusetts General Hospital Guide To Clinical Cancer Genetics*. Editorial: Springer-Verlag, USA. P 1-22.
- Fuld AD, Dragnev KH, Rigas JR. (2010) Pemetrexed in advanced non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 11(8):1387-402.
- GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet].

- Goldstein SD, Yang SC. (2011). Role of surgery in small cell lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 20(4):769-77.
- Gostissa M, Alt FW, Chiarle R. (2011). Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 29:319-50.
- Grossi F. (2012). Management of non-small cell lung in cancer patients with stable disease. *Drugs.* 19;72 Suppl 1:20-7.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4;144(5):646-74.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. (2008). Lung cancer. *N Engl J Med.* 25;359(13):1367-80.
- Instituto Nacional del Cáncer (INC), (2010) Ministerio de Salud, Argentina. Loria, D. en base a los datos de Globocan 2008. Argentina. [www.msal.gov.ar/inc](http://www.msal.gov.ar/inc)
- Kaiser LR. (2008). *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders (4th ed.)*. McGraw-Hill. p. 1855–1856. ISBN 0-07-145739-9.
- Lu, C; On A, Vaporciyan AA et al. (2010). *Holland-Frei Cancer Medicine (8th ed.)*. People's Medical Publishing House USA. ISBN 978-1607950141.
- MacCallum C, Gillenwater HH. (2006). Second-line treatment of small-cell lung cancer. *Curr Oncol Rep.* 8(4):258-64.
- Maitra, A; Kumar V Robbins. (2007). *Basic Pathology (8th ed.)*. Saunders Elsevier. pp. 528–529. ISBN 978-1-4160-2973-1.
- Mehra R, Treat J (2008). *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders (4th ed.)*. McGraw-Hill. p. 1876. ISBN 0-07-145739-9.
- Meng S, Tripathy D, Shete S, et al. (2004) HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(25):9393-8.
- Mogi A, Kuwano H. (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2005:583929.
- Ozaki T, Nakagawara A. (2010). p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *Mod. Pathol.* 23 Suppl 2:S46-51.
- Peto, R; Lopez AD, Boreham J et al. (2006). Mortality from smoking in developed countries 1950–2000: Indirect estimates from National Vital Statistics. Oxford University Press.. ISBN 0-19-262535-7.
- Rosti G, Bevilacqua G, Bidoli P, et al. (2006). Small cell lung cancer. *Ann Oncol.* 17 Suppl 2:ii5-10.

- 
- Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, et al. (2001). Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73(1):57-69.
- Sábado Alvarez C. (2011). Molecular biology of retinoblastoma. *J. Biomed. Biotechnol.*; 2011:603925.
- Salgia R, Skarin AT. (1998). Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol.* 16(3):1207-17.
- Schultz, WA. (2005). An Introduction to Human Cancers. En: Schultz, WA. *Molecular Biology of Human Cancers*. Estados Unidos. Editorial: Springer.. P 11-22.
- Siegel R, Desantis C, Virgo K, et al. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* En prensa.
- Subramanian J, Govindan R. (2007). Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol.* 25(5):561-70.
- Taylor R, Najafi F, Dobson A. (2007). Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol.* 36(5):1048-59.
- Vaughn CP, Lyon E, Samowitz WS. (2008). Confirmation of single exon deletions in MLH1 and MSH2 using quantitative polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.* 10(4):355-60.
- Wong KK. (2009). Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 4(1):28-35.
- Zhi XY, Wu YL, Bu H, et al. (2011) Chinese guidelines on the diagnosis and treatment of primary lung cancer. *Lung Cancer Diagnosis and Treatment Expert Panel of the Chinese Ministry of Health J Thorac Dis.* 4(1):88-101.

## CAPÍTULO III

### TERAPIA FOTODINÁMICA

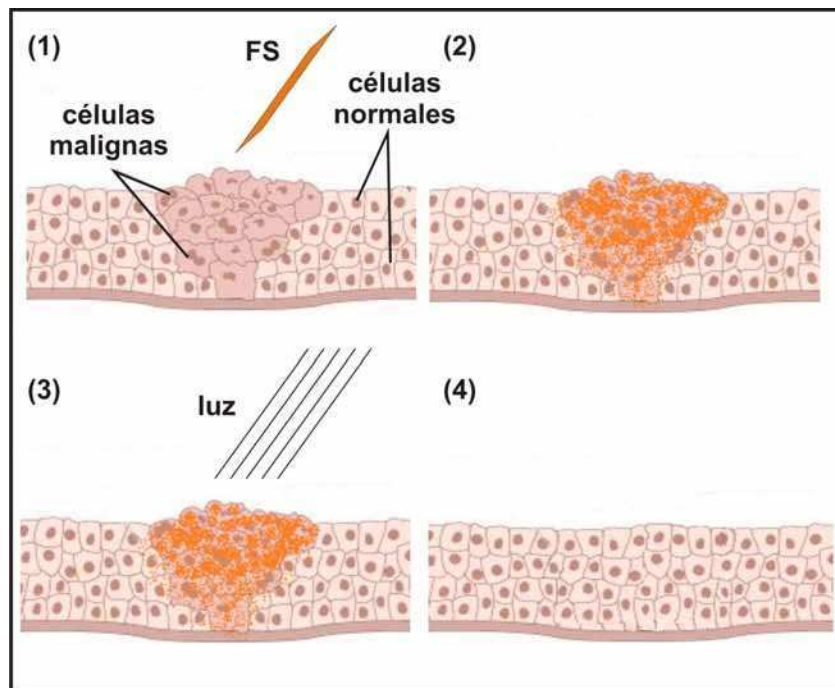
#### *III.1. Generalidades*

Desde su descubrimiento a principios del siglo XX y el consecuente desarrollo de nuevos y mejores fotosensibilizantes, la Terapia fotodinámica ha incrementado su protagonismo en el tratamiento de diversos desórdenes oncológicos y no oncológicos (Lee, 2011).

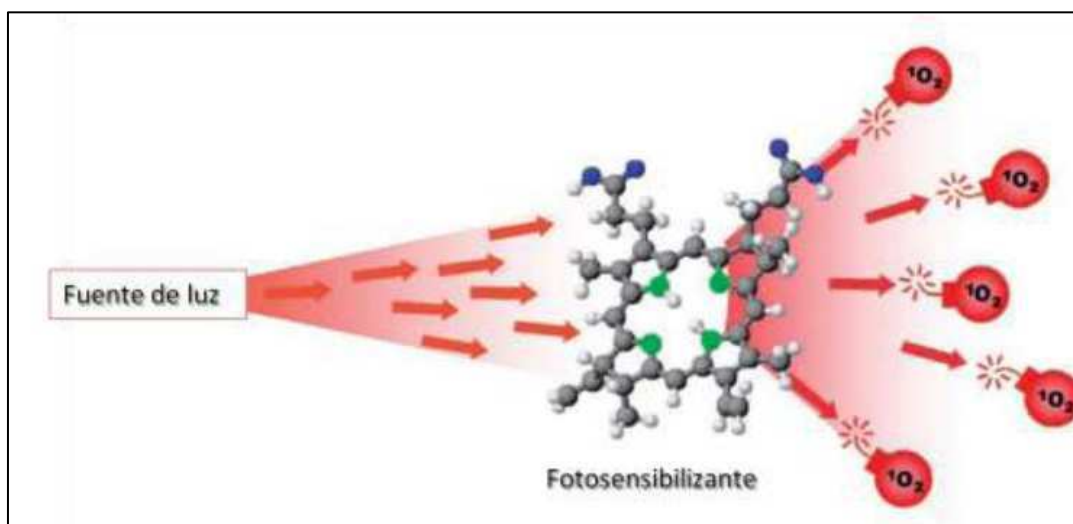
Los compuestos fotosensibilizantes (FSs) poseen la capacidad de absorber fotones y transferir esa energía absorbida a moléculas de O<sub>2</sub>, las cuales incrementan su reactividad y se convierten en oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), un poderoso agente oxidante. La terapia fotodinámica (TFD) es una terapia antineoplásica relativamente nueva, que utiliza este principio fotoquímico para causar daño oxidativo en importantes estructuras biológicas, destruyendo así el tejido maligno. Involucra el pre-tratamiento del tejido con un FS y la posterior irradiación del mismo con luz de una determinada longitud de onda (Fig.10 y 11) (Weishaupt et al, 1976; Ackroyd et al, 2001; Agostinis et al, 2011).

Según lo expuesto, para que la TFD sea efectiva es necesario un daño oxidativo significativo que produzca la muerte celular. La magnitud del daño producido depende de los siguientes factores: el FS, la luz y el daño oxidativo.





**Fig. 10.** Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica (TFD). (1) Administración de un fotosensibilizante (FS) cuya acumulación sea selectiva para las células malignas. (2) Incubación e incorporación del FS. (3) Irradiación del tejido con luz de longitud de onda adecuada. (4) Eliminación de las células tumorales de modo selectivo por acción de la TFD.



**Fig. 11.** Excitación del fotosensibilizante al absorber luz de una apropiada longitud de onda y posterior producción de oxígeno singlete.

### III.1.1. Fotosensibilizantes

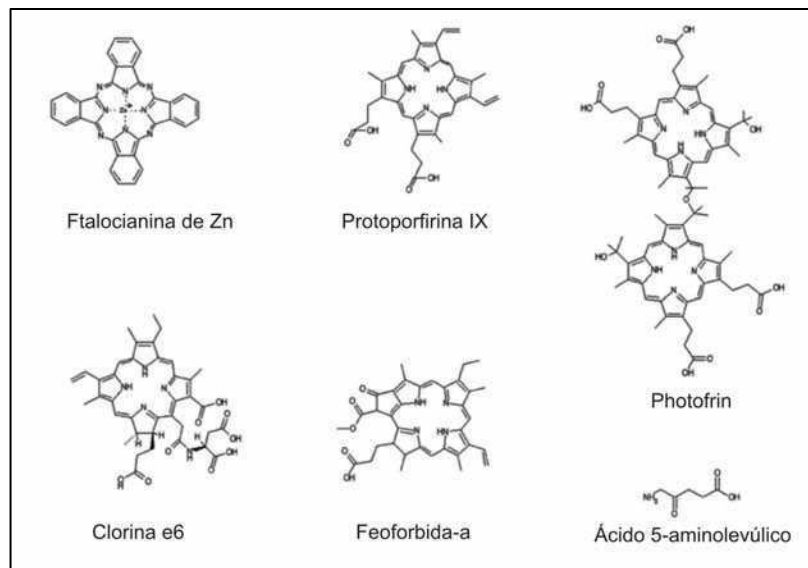
Los estados excitados tanto del FS como del O<sub>2</sub> tienen vidas medias muy cortas, por lo cual, para garantizar la efectividad de la TFD, es preciso que ambas moléculas se encuentren próximas a estructuras biológicas importantes. Si la reacción tiene lugar a cierta distancia de las estructuras target, el FS activado por la luz perderá su energía y el oxígeno singlete su capacidad reactiva, sin llegar a producir la muerte celular deseada. Un FS ideal debe ser biológicamente estable, fotoquímicamente eficiente, no debe tener toxicidad sistémica y debe ser captado y retenido exclusivamente por el tejido maligno (Kalca et al, 2000; Fernandez-Guarino, 2007)

Fotosensibilizante	Estructura	Long. Onda (nm)	Aprobación	Ensayos	Tipos tumorales
Porfímero de sodio (Photofrin)	Porfirina	630	Mundial	-	Pulmón, esófago, ducto biliar, vejiga, cerebro, ovario.
ALA (Levulan)	Precursor de Porfirina	635	Mundial	-	Piel, vejiga, cerebro, esófago.
Ésteres de ALA	Precursor de Porfirina	635	Europa	-	Piel, vejiga.
Temoporfin (Foscan)	Clorina	652	Europa	USA	Cuello, cabeza, pulmón, cerebro, piel, ducto biliar.
Verteoporfin (Visudyne)	Clorina	690	Mundial	UK	ojo, páncreas, piel.
Pirofeoforbida-a	Clorina	665	-	USA	Cuello, cabeza, esófago, pulmón.
Etil-etio purpurina	Clorina	660	-	USA	Piel, mama.
Talaporfina (NPe6)	Clorina	660	-	USA	Hígado, colon, cerebro.
Clorina e6-polivinilpirrolidona (Fotolon)	Clorina	650	-	Rusia	Nasofaríngeo, sarcoma, cerebro.
Ftalocianina de sílice (Pc4)	Ftalocianina	675	-	USA	Linfoma T cutáneo.
Padoporfina	Bacterioclorina	762	-	USA	Próstata.
Motexafin lutetium (Lutex)	Texaphyrina	732	-	USA	Mama.

**Tabla 6.** Características principales de los FSs utilizados en TFD.

Actualmente no existe un agente ideal, pero existen numerosos compuestos, tanto naturales como sintéticos, con propiedades fotosensibilizantes: ftalocianinas, clorinas, purpurinas, bacterioclorinas, sulfuro de berbecina, fluoresceína-eosina, tetraciclinas, naranja de acridina y verdinas, pero entre ellos sobresalen principalmente

las porfirinas (Pushpan et al, 2002) (Tabla 6). Photofrin, un derivado de porfirinas, fue el primer FS aprobado para uso clínico; se ha empleado exitosamente en el tratamiento de tumores gástricos, de esófago, cervical, vejiga y pulmón. También han sido aprobados para el tratamiento de varios cánceres en Europa y Japón, FSs de segunda generación como benzoporfirinas (Visudyne®), clorinas (Temoporfin®) y porficeños (9-acetoxi-2,7,12,17-tetrakis-(B-metoxietil)- porficeño: ATMPn). Actualmente se siguen experimentando nuevos FSs con el objeto de disminuir la toxicidad en ausencia de luz y aumentar la selectividad por el tumor.



**Fig 12.** Estructura de algunos FSs utilizados en TFD.

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

### III.1.2. Fuentes de luz

En lo que respecta a la irradiación del tejido tumoral existen tres factores importantes a tener en cuenta: la longitud de onda, la dosis total de luz en el sitio target y la intensidad de la misma.

La longitud de onda entregada por la fuente de luz debe ser la adecuada para poder ser absorbida por el FS a utilizar, aunque puede no coincidir con el pico máximo de absorción del FS. Puede ocurrir que en ese rango del espectro lumínico absorban gran cantidad de luz otras estructuras distintas al target, como la sangre o ciertos pigmentos; o bien la luz puede dispersarse demasiado y no llegar a penetrar adecuadamente en los tejidos. La dosis lumínica total es tan importante como la intensidad empleada. Si la dosis es demasiado baja las células lograrán reparar gran parte del daño oxidativo. Cuando se emplean dosis demasiado altas, en ciertos casos puede producirse el calentamiento de los tejidos (Kennedy, 2006).

Las fuentes de luz utilizadas actualmente en TFD pueden ser coherentes o no coherentes, es decir, los haces que emite la fuente de luz pueden ser paralelos o partir de la fuente en distintas direcciones. El uso de cada tipo de fuente de luz dependerá del tipo de aplicación.

El láser (Light Amplification Stimulated by Emission of Radiation) es una fuente de luz monocromática (de un color “puro”), coherente (los haces de luz que lo forman están en fase y son paralelos) y direccional o colimada (carece de dispersión). Estas características son ampliamente beneficiosas en la aplicación de TFD porque concentran toda la energía en una zona puntual minimizando el daño al tejido circundante y la longitud de onda puede ajustarse con gran precisión.

Se han usado ampliamente distintos tipos de láser como el láser de argón, o de Nd-YAG (neodimio-itrio-aluminio-granate) (Brancaleon y Moseley, 2002).

Dentro de las fuentes de luz no coherentes se han empleado numerosas variantes, desde fuentes relativamente simples como filamentos de tungsteno o xenón y lámparas fluorescentes hasta el desarrollo relativamente nuevo de los LEDs (Light Emitting Diodes) (Barolet, 2008; Hetzel y Böckeler, 2012; Brancaleon y Moseley, 2002).

Desde un punto de vista práctico, factores como la penetrabilidad de la luz en el tejido, la absorción de luz por parte de otros componentes distintos al FS y la dispersión de la luz respecto del target pueden ser condicionantes de la eficacia del tratamiento.

### *III.1.3. Daño oxidativo*

La fotosensibilización y la irradiación se conjugan en un tratamiento fotodinámico efectivo cuando los tejidos presentan una adecuada concentración de O<sub>2</sub> antes de la TFD, pues irá decreciendo a medida que las moléculas de O<sub>2</sub> se utilicen en los procesos oxidativos. Uno de los posibles efectos de la TFD es la formación de edemas en la zona tratada, lo cual puede limitar la circulación sanguínea, y por la tanto, la reposición de O<sub>2</sub>. Por este motivo en la TFD se suelen utilizar dosis lumínicas más bajas durante un período de tiempo mayor, o dosis lumínicas fraccionadas para permitir la reoxigenación de los tejidos (Middelburg et al, 2010). Se profundizará sobre este aspecto en el apartado IV.1.

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

Las investigaciones científicas relacionadas con la TFD tuvieron comienzo en 1900 en el Instituto Farmacológico de la Universidad de Munich, Alemania, bajo la dirección de Hermann von Tappeiner. Estudiando la toxicidad de posibles agentes anti-maláricos, Oscar Raab descubrió que la acridina poseía mayor efecto tóxico sobre organismos ciliados cuando se encontraba en presencia de luz. Este descubrimiento llevó a numerosas investigaciones relacionadas con el fenómeno (Krammer et al, 2006).

En pocos años se identificaron varias sustancias cuya toxicidad se incrementaba con la luz, como la eosina, que además era relativamente segura para el uso en humanos, ya que se había utilizado previamente para el tratamiento de la epilepsia. La primera aplicación clínica de la TFD utilizando eosina la llevaron a cabo Hermann von Tappeiner y Albert Jesionek en 1903, para el tratamiento de lesiones malignas de piel. En el mismo año, Georges Dreyer, en Copenhague, reportó la inducción de necrosis tisular utilizando eritrosina como FS. En 1904 von Tappeiner introdujo por primera vez

el término “acción fotodinámica” y asoció este proceso con la presencia de O<sub>2</sub> (Triesscheijn et al, 2006).

Las primeras aplicaciones clínicas no fueron del todo satisfactorias, y aunque posteriormente se siguió investigando y se descubrió la hematoporfirina (Hp) como un potente FS, no se observaron grandes avances hasta 1973, año en el que Tom Dougherty de Buffalo, Nueva York, fundó un grupo de investigación sobre la TFD.

El FS empleado en sus estudios fue un porfímero sódico, derivado de la Hp, y se convirtió en la primera droga aprobada para el tratamiento oncológico mediante TFD (Dougherty, 2010). Con el fin de optimizar la terapia y minimizar los efectos secundarios, se estudiaron y desarrollaron nuevas drogas, como el m-THPC y el ácido 5-aminolevúlico (ALA). Uno de los primeros trabajos que anticiparon al ALA como un FS prometedor para la TFD proviene de nuestro laboratorio, cuando en 1975 Batlle describió la destrucción selectiva de callos de soya, tejido considerado como un tumor vegetal dada su alta división celular, cuando se agregaba ALA al medio de cultivo y luego se iluminaba (Batlle et al, 1975).

Posteriormente, en 1987 Malik y Lugaci estudiaron la síntesis de porfirinas inducida por ALA en células eritroleucémicas, observando muerte celular tanto necrótica como apoptótica dependiente de la dosis lumínica aplicada en la TFD (Malik y Lugaci, 1987). En ese mismo año, Johan Moan reportó la utilización de ALA como FS en ratones, aunque en esa oportunidad no logró obtener concentraciones de porfirinas que produjeran fotosensibilización en los tumores, y tampoco en los tejidos normales (Moan et al, 1987).

En los años siguientes se realizaron numerosas investigaciones que contribuyeron a comprender con mayor claridad los mecanismos de acción y las posibles aplicaciones terapéuticas de la TFD-ALA. Algunos ejemplos de esas contribuciones son los trabajos realizados en nuestro laboratorio: Empleando células epiteliales de mamífero se demostró que la incorporación de ALA resultaba mayor en células proliferativas y era sensible a cicloheximida, sugiriendo que la captación diferencial podría estar a nivel del transporte a través de membrana (Fukuda et al, 1993a). También se desarrolló un modelo in vitro-in vivo que permitió confirmar el daño celular directo por irradiación de las células previamente incubadas con ALA (Fukuda et al, 1993b). Utilizando ese mismo modelo se demostró que el daño fotodinámico inducido por ALA combinado con ciclofosfamida o doxorubicina, podía

aumentar la efectividad de la TFD (Casas et al, 1997; Casas et al, 1998). También se comparó la administración de ALA liposomal y ALA libre (Fukuda et al, 1992), se estudió la acumulación de porfirinas y la efectividad de la TFD utilizando derivados de ALA, como hexil-ALA, undecanoil-ALA y tetrahidropiranyl-ALA (Perotti et al, 2002; Di Venosa et al, 2006).

En trabajos más recientes se estudiaron los mecanismos de muerte ocasionados por la TFD-ALA (Diez et al, 2009) así como también mecanismos de resistencia asociados a esta terapia (Casas et al, 2011; Di Venosa et al, 2012).

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

Actualmente la TFD se encuentra aprobada para una gran variedad de patologías utilizando distintos FSs. Los compuestos aprobados hasta el momento para el uso clínico incluyen: porfímero sódico (Photofrin®, Axan Pharma Inc.), ALA (Levulan®, DUSA Pharmaceuticals, Inc), metiléster de ALA (Metvix®, PhotoCure ASA), hexil-éster de ALA (Hexvix®, PhotoCure ASA), m- THPC (Foscan®, Biolitec AG), verteporfirina (Visudyne®, Novartis Pharmaceuticals).

#### *III.3.1. Aplicaciones oncológicas*

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

complejo, con un gran riesgo de dañar los tejidos circundantes (Triesscheijn et al, 2006).

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

*Cáncer de piel:* en el primer ensayo clínico con TFD se obtuvieron tasas de respuesta > 85% utilizando HpD como FS y luz roja (Dougherty et al, 1978). Desde entonces, numerosos estudios han confirmado que las tasas de respuesta de cáncer de piel superficial a la TFD son equivalentes a las obtenidas con los métodos tradicionales (crioterapia, escisión quirúrgica), pero con mejores resultados cosméticos (Rhodes et al, 2004). Para lesiones bien focalizadas, la aplicación tópica de FSs, como el ALA y el metil-ALA, constituye una buena alternativa, evitando la administración sistémica que presenta mayores limitaciones. El uso de ALA a nivel local ha demostrado ser sumamente efectivo para el carcinoma de células basales, con escasos efectos adversos (Taub, 2004). Este pro-FS también ha generado tasas de respuesta altas (75%-88%) en el tratamiento de la enfermedad de Bowen (Morton et al, 2000; Salim et al, 2003). Para el tratamiento de lesiones múltiples, o de grandes superficies, se considera más apropiada y efectiva la administración sistémica del porfímero sódico o mTHPC (Zeitouni et al, 2001; Baas et al, 2001).

*Cáncer de cabeza y cuello:* la cirugía y la radioterapia son los tratamientos convencionales para este tipo de cáncer en etapas tempranas. La TFD presenta la misma



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

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

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

*Cáncer endobronquial:* La TFD ha demostrado ser útil en distintas etapas de esta enfermedad. La utilización del porfímero sódico o HpD en el tratamiento paliativo de tumores obstructivos resultó segura y alivió los síntomas en casi todos los pacientes estudiados (Kato et al, 1998; Moghissi et al, 1999). La TFD también ha sido utilizada en el tratamiento de cáncer de pulmón en estadios tempranos, logrando una tasa de

---

sobrevida promedio a 5 años en el rango de 56%-70%, y del 90% en pacientes con carcinoma in situ (Furuse et al, 1993; Kato et al, 1998, Moghissi et al, 2004).

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

### III.3.2. Aplicaciones no oncológicas

*Enfermedades infecciosas:* la capacidad de la TFD de eliminar bacterias, hongos, virus y parásitos se denomina inactivación fotodinámica. En los últimos años esta técnica ha adquirido importancia debido a la aparición de múltiples resistencias a los antibióticos convencionales. (Wainwright, 2002; Jori et al, 2011).

*Estética:* El desarrollo cosmético exitoso de esta terapia, sentó las bases para la aplicación de los FSs como fotorejuvenecedores. Esto ha surgido a partir de la observación de las significativas mejoras en los signos de fotoenvejecimiento en la piel adyacente a lesiones causadas por queratosis actínica, tratadas con TFD (Gold, 2008)

*Desórdenes inflamatorios/inmunológicos:* Algunos ejemplos de estas patologías que han sido exitosamente tratadas con TFD son: psoriasis, acné, liquen plano, escleroderma, alopecia y degeneración macular de la retina (Taub, 2007).

*Ginecología:* La ablación del endometrio mediante TFD es una técnica que evita la cirugía y constituye una alternativa a la histerectomía para mujeres con hemorragias uterinas disfuncionales (Soergel et al, 2008).

*Diagnóstico:* La fluorescencia de algunos FSs puede servir como método diagnóstico, permitiendo la visualización del tejido maligno (Juzeniene et al, 2007).

### *III.4.- Terapia Fotodinámica basada en ALA*

#### *III.4.1. Selectividad*

El ALA no es un FS en sí mismo, sino que produce la síntesis intracelular de PpIX. Su empleo en la TFD se basa en que la administración exógena del ALA como pro-droga induce la acumulación de tetrapirroles sintetizados endógenamente, en particular, el potente FS PpIX. Si bien todas las células poseen la capacidad de sintetizar porfirinas a partir de precursores del hemo, varios tejidos malignos y en regeneración poseen características enzimáticas que favorecen la acumulación de PpIX frente a los tejidos normales, lo cual representa una gran ventaja con respecto a otras terapias anticancerígenas (Fukuda et al, 1989; Kennedy et al, 2006). Esta selectividad se basa en que los tejidos malignos exhiben una actividad disminuida de la ferroquelatasa, al mismo tiempo que la de la PBG-asa se encuentra aumentada, lo cual favorece una acumulación selectiva de la PpIX en estos tejidos (Leibovici et al, 1988; Navone et al, 1990; El-Sharabasy et al, 1992; Gibson et al, 1998). En algunas patologías no malignas como la psoriasis y la queratosis actínica, también se evidencia mayor síntesis de PpIX que en tejidos normales (Smits et al, 2009), ofreciendo posibilidades terapéuticas o de diagnóstico utilizando ALA.

#### *III.4.2. Incorporación de ALA y fotosensibilización por PpIX*

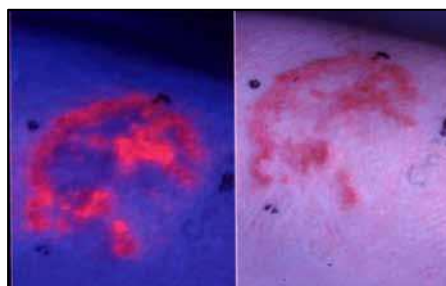
El ALA es captado por las distintas células mediante diferentes mecanismos. En levaduras, se demostró por primera vez que el ALA y el GABA comparten un sistema de transporte activo, y que la captación de ALA está mediada por la permeasa UGA 4, específica para el GABA (Bermudez-Moretti et al, 1995a; 1995b; 1996a; 1996b). En células de adenocarcinoma de colon se observó que el ALA también ingresa a la célula por un mecanismo dependiente de energía a través de transportadores de GABA y aminoácidos (Rud et al, 2000). En células de pancreatoma se demostró la participación de los transportadores peptídicos PEPT1 y PEPT2 en este proceso (Whitaker et al,

2000), mientras que en células de adenocarcinoma colorrectal se demostró recientemente la incorporación de ALA a través del transportador SLC36A1 (Frolund et al, 2010). También se observó en otras líneas celulares la implicancia de los transportadores BETA en este proceso (Rud et al, 2000; Bermudez-Moretti et al, 2002).

La eficiencia en la síntesis de PpIX una vez que el ALA ingresa a la célula y su posterior acumulación, depende de varios factores, como las actividades de algunas enzimas involucradas en la síntesis del hemo, la tasa de degradación y excreción de PpIX, su localización intracelular, el pH de la célula, el tipo y la densidad celular y la presencia o ausencia de suero en el medio (Bartosová y Hrkal, 2000; Kennedy, 2006; Ji et al, 2006). La PpIX se sintetiza en la mitocondria, y con el tiempo puede redistribuirse hacia otras regiones como el citosol, el retículo endoplasmático o a la membrana nuclear, pero no al núcleo. También se ha observado la relocalización de PpIX a la membrana plasmática y a lisosomas. El sitio de localización de la PpIX, su concentración y la dosis lumínica empleada en la TFD, determinan el tipo y la intensidad de daño producido al activarse el FS (Boyle et al, 1996; Jori et al, 1996).

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

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



**Fig. 13.** Fluorescencia de carcinomas basales tratados con ALA bajo luz blanca (derecha) y, luego de tres horas, bajo luz azul (izquierda). Se observa fluorescencia roja correspondiente a la acumulación de protoporfirina IX inducida por el tratamiento con ALA. (Tomado de: Photosensitizers in medicine, Kristian Berg Department of Radiation Biology The Norwegian Radium Hospital).

### III.4.3. Ventajas

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

- La corta vida media de los efectos fotosensibilizantes de la PpIX comparado con otros compuestos, que no duran más de 48 horas (Fukuda et al. 1993; Triesscheijn et al, 2006).

- La PpIX tiene una estructura molecular definida, con un máximo de absorción en la zona roja del espectro en los 630 nm (Pottier et al, 1986).

- El ALA se puede administrar de diversas formas que resultan inocuas y mínimamente invasivas: sistémica, intravesical, topicación, inhalación y oral. Otra vía utilizada en animales de experimentación es la intra-tumoral, en la cual el ALA se aplica directamente en tumores accesibles.

- Puede combinarse con otras modalidades terapéuticas y aplicarse luego de otros tratamientos, por no exhibir resistencia cruzada con otras drogas, el daño celular queda restringido a la zona tumoral con la consiguiente disminución de efectos secundarios sobre otros órganos, y el riesgo de generación de nuevas neoplasias es bajo, ya que el daño al ADN es limitado.

Si bien muchas posibles aplicaciones de la TFD basada en ALA (TFD-ALA) aún se encuentran en proceso de investigación, otras ya han sido aceptadas y son utilizadas en la clínica, como: tratamiento de lesiones premalignas de la piel, mucosa oral, esófago, vejiga, vulva y cérvix (Kelty et al, 2002); tratamiento, paliación, control o detección de lesiones malignas de distintos tipos (ej. gliomas); infecciones bacterianas (Ej. *Propionibacterium acne*); infecciones fúngicas (Ej. oncomicosis); infecciones virales (Ej. *Verucca vulgaris*), infecciones parasitarias (Ej. leishmaniasis cutánea); cuantificación de respuesta a tratamientos (Ej. leucemia, linfoma de células T, cáncer de mama recurrente, malaria); procedimientos cosméticos (Ej: rejuvenecimiento de la piel, hirsutismo) (Fernandez-Guarino et al, 2007).

## REFERENCIAS

- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, et al. (2001). The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 74(5):656-69. Review.
- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA. Cancer J. Clin.* 61(4):250-81.
- Baas P, Saarnak AE, Oppelaar H, et al. (2001). Photodynamic therapy with metatetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study. *Br. J. Dermatol.* 145:75-8.
- Barolet D. (2008). Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 27(4):227-38.
- Bartosová J, Hrkal Z. (2000). Accumulation of protoporphyrin-IX (PpIX) in leukemic cell lines following induction by 5-aminolevulinic acid (ALA). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 126(3):245-52.
- Batlle A, Llambias EBC, Xifra EW, et al. (1975). Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system-XV. The effect of growth conditions. *Int. J. Biochem.* 6:591-606.
- Benson RC Jr. (1986). Laser photodynamic therapy for bladder cancer. *Mayo Clin. Proc.* 61:859-64.
- Bermúdez Moretti M, Correa García S, Perotti C, et al. (2002). Delta-Aminolevulinic acid transport in murine mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *Br. J. Cancer.* 87(4):471-4.
- Bermúdez Moretti M, Correa García SR, Chianelli MS, et al. (1995a). Evidence that 4-aminobutyric acid and 5-aminolevulinic acid share a common transport system into *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol.*; 27(2):169-73.
- Bermúdez Moretti M, Correa García S, Ramos EH, Batlle A. (1995b). GABA uptake in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 41(6):843-9.
- Bermúdez Moretti M, Correa García SR, Rouvier Garay MV; et al. (1996b) Transporte del ácido 5-aminolevulínico en levaduras. *Anal. Soc. Cientif. Arg.* 226: 17-25
- Bermúdez Moretti M, Correa García S, Ramos E, Batlle A. (1996a) Delta-Aminolevulinic acid uptake is mediated by the gamma-aminobutyric acid-specific permease UGA4. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-legrand).* 42(4):519-23.
- Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, et al. (2002). Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut.* 50:549-57.
- Boyle, RW, Dolphin, D. (1996). Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 64(3):469-85.
- Brancaleon L, Moseley H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 17(3):173-86.

- Brown LM, Devesa SS. (2002). Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 11:235–56.
- Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Batlle A. (2011). Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* 18(16):2486-515.
- Casas A, Fukuda H, Batlle A. (1998). Potentiation of ALA-based photodynamic therapy with cyclophosphamide. *Cancer Biochem. Biophys.* 16: 183-96,.
- Casas A, Fukuda H, Riley P, Batlle A. (1997). Enhancement of ALA-based photodynamic therapy by Adriamycin. *Cancer Lett.* 121:105-13.
- Copper MP, Tan IB, Oppelaar H, et al. (2003). Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 129:709–11.
- Di Venosa G, Fukuda H, Batlle A, et al. (2006). Photodynamic therapy: regulation of porphyrin synthesis and hydrolysis from ALA esters. *J. Photochem. Photobiol. B.* 83(2):129- 36.
- Di Venosa G, Rodriguez L, Mamone L, et al. (2012). Changes in actin and E-cadherin expression induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in normal and Ras-transfected human mammary cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B.* 106:47-52.
- Diez B, Cordo Russo R, Teijo MJ, et al. (2009). ROS production by endogenously generated Protoporphyrin IX in murine leukemia cells. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 55(2):15-9.
- Dougherty T. (2010). *Photodynamic Therapy, Methods and Protocols.* Humana Press, Los Angeles, CA, USA.
- Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, et al. (1978). Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 38:2628–35.
- Dougherty TJ. (1984). Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2:83–116.
- El-Sharabasy MM, El-Waseef AM, Hafez MM, et al. (1992). Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br. J. Cancer.* 65(3):409-12.
- Fernández-Guarino M, García-Morales I, Harto A, et al. (2007). Photodynamic therapy: new indications. *Actas Dermosifiliogr.* 98(6):377-95.
- Frølund S, Marquez OC, Larsen M, et al. (2010). Delta-aminolevulinic acid is a substrate for the amino acid transporter SLC36A1 (hPAT1). *Br. J. Pharmacol.* 159(6):1339-53.
- Fukuda H, Batlle A, Riley PA. (1993a). Kinetics of porphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA. *Int. J. Biochem.* 25:1407-10.
- Fukuda H, Casas A, Chueke F, et al. (1993b) Photodynamic action of endogenously synthesized porphyrins from aminolevulinic acid, using a new model for assaying the effectiveness of tumoral cell killing. *Int. J. Biochem.* 25(10):1395-8.



- 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(2):133-9.
- Fukuda H, Paredes S, Batlle A. (1992). Tumour-localizing properties of porphyrins. In vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp Biochem Physiol B.* 102(2):433-6.
- Furuse K, Fukuoka M, Kato H, et al. (1993). A prospective phase II study on photodynamic therapy with photofrin II for centrally located early-stage lung cancer. The Japan Lung Cancer Photodynamic Therapy Study Group. *J. Clin. Oncol.* 11:1852-7.
- Gibson S, Cupriks D, Havens J, et al. (1998). A regulatory role for porphobilinogen deaminase (PBGD) in  $\delta$ -aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA)-induced photosensitization. *Br. J. Cancer.* 77:235-243.
- Gold MH. (2008). Therapeutic and aesthetic uses of photodynamic therapy part one of a five-part series: the use of photodynamic therapy in the treatment of actinic keratoses and in photorejuvenation. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 1(2):32-7.
- Grosjean P, Savary JF, Mizeret J, et al. (1996). Photodynamic therapy for cancer of the upper aerodigestive tract using tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14:281-7.
- Hetzel J, Böckeler M. (2012). Endoscopic Treatment for Tumorous Obstructions of the Tracheobronchial System: A Comparison of Available Techniques. *Pneumologie.* En prensa.
- Hopper C, Kübler A, Lewis H, et al. (2004). mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 111:138-46.
- Ji Z, Yang G, Vasovic V, Cunderlikova, et al. (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(3):213-20.
- Jori G, Magaraggia M, Fabris C, et al. (2011). Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of waterborne diseases. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 30(3):261-71.
- Jori, G. (1996). Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 36(2):87-93.
- Juzeniene A, Peng Q, Moan J. (2007). Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6(12):1234-45.
- Kalca K, Merk H, Mukhtar H. (2000). Photodynamic therapy in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42:389-413.
- Kato H. (1998). Photodynamic therapy for lung cancer—a review of 19 years' experience. *J. Photochem. Photobiol. B.* 42:96-9.

- Kelty CJ, Brown NJ, Reed MW, et al. (2002). The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitizer in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1(3):158-68.
- Kennedy JC. (2006). Introduction. En: *Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook*. Pottier R, Kramer B, Baumgartner R, Stepp H. Reino Unido. Editor: Royal Society of Chemistry. P 1-14.
- Krammer B, Malik Z, Pottier R, et al. (2006). Basic Principles. En: *Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook*. Pottier R, Kramer B, Baumgartner R, Stepp H. Reino Unido. Editor: Royal Society of Chemistry. P 1-14.
- Kübler AC, de Carpentier J, Hopper C, et al. (2001). Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 30:504-9.
- Ladner DP, Steiner RA, Allemann J, et al. (2001). Photodynamic diagnosis of breast tumours after oral application of aminolevulinic acid. *Br. J. Cancer.* 84:33-37.
- Lee Y, Baron ED. (2011). Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 30(4):199-209.
- Leibovici L, Schoenfeld N, Yehoshua HA, et al. (1988). Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer.* 62 (11):2297-300.
- Malik Z, Lugaci H. (1987). Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br. J. Cancer.* 56(5):589-95.
- McBride G. (2002). Studies Expand Potential Uses of Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 94:1740-1742.
- McCaughan JS Jr, Hicks W, Laufman L, et al. (1984). Palliation of esophageal malignancy with photoradiation therapy. *Cancer;* 54:2905-10.
- Middelburg TA, Van Zaane F, De Bruijn HS, et al. (2010). Fractionated illumination at low fluence rate photodynamic therapy in mice. *Photochem. Photobiol.* 86(5):1140-6.
- Moan J, Peng Q, Evensen JF, et al. (1987). Photosensitizing efficiencies, tumor, and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* 46, 713-721.
- Moghissi K, Dixon K, Stringer et al. (1999). The place of bronchoscopic photodynamic therapy in advanced unresectable lung cancer: experience of 100 cases. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.;*15:1-6.
- Moghissi K, Dixon K, Thorpe J, et al. (2004). Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer: the Yorkshire Laser Centre experience. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*1(3):253-62.
- Morton CA, Whitehurst C, Moore JV, et al. (2000). Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.* 143:767-72.

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

Ortner MA, Zumbusch K, Liebetrueth J, et al. (2002). Is topical deltaaminolevulinic acid adequate for photodynamic therapy in Barrett's esophagus? A pilot study. *Endoscopy.* 34:611–6.

Overholt BF, Lightdale CJ, Wang KK, et al. (2005). Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial. *Gastrointest. Endosc.* 62:488–98.

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

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

Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, et al. (2002). Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 2(2):187-207.

Rhodes LE, de Rie M, Enström Y, et al. (2004). Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch. Dermatol.* 140:17–23.

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

Salim A, Leman JA, McColl JH, et al. (2003). Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *Br. J. Dermatol.* 148:539–43.

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

Sibille A, Lambert R, Souquet JC, et al. (1995). Long-term survival after photodynamic therapy for esophageal cancer. *Gastroenterology*; 108:337–44.

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

Skyrme RJ, French AJ, Datta SN, et al. (2005). A phase-1 study of sequential mitomycin C and 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in recurrent superficial bladder carcinoma. *BJU Int.* 95:1206–10.

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

- Soergel P, Löning M, Staboulidou I, et al. (2008). Photodynamic diagnosis and therapy in gynecology. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 27(4):307-20.
- Taub AF. (2004). Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons. *J. Drugs Dermatol.* 3(1):S8-S25.
- Taub AF. (2007). Photodynamic therapy: other uses. *Dermatol. Clin.* 25(1):101-9.
- Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, et al. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist.* 11(9):1034-44.
- Waidelich R, Beyer W, Knüchel R, et al. (2003). Whole bladder photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid using a white light source. *Urology.* 61:332-337.
- Wainwright M. (2002). Pathogen inactivation in blood products. *Curr. Med. Chem.* 9(1):127-43.
- Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 36(7 PT 1):2326-9.
- Whitaker CJ, Battah SH, Forsyth MJ, et al. (2000). Photosensitization of pancreatic tumour cells by delta-aminolaevulinic acid esters. *Anticancer Drug Des.* 15(3):161-70.
- Wiedmann M, Berr F, Schiefke I, et al. (2004). Photodynamic therapy in patients with non-resectable hilar cholangiocarcinoma: 5-year follow-up of a prospective phase II study. *Gastrointest. Endosc.* 60:68-75.
- Zeitouni NC, Shieh S, Oseroff AR. (2001). Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. *Clin. Dermatol.* 19:328-38.

## CAPÍTULO IV

### MUERTE CELULAR POR TFD

#### *IV.1. Eventos tempranos post-TFD*

Desde el inicio del tratamiento fotodinámico, las células comienzan una serie de reacciones rápidas que darán origen a los agentes iniciadores y principales efectores del daño celular, las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas especies de corta vida media y altísima reactividad constituyen el nexo entre el tratamiento y la respuesta celular.

##### *IV.1.1. Reacciones fotoquímicas*

A corto plazo, los mecanismos que desencadenan el fotodaño están asociados a la generación de ROS. Esta asociación se ilustra en la Fig. 13, mediante un diagrama de Jablonski (Baraldi et al, 1990) correspondiente a una porfirina como sensibilizante.

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

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

Una molécula puede pasar de un estado fundamental a un estado excitado por aporte de energía. El aporte de energía puede llevarse a cabo de diferentes formas, por ejemplo por irradiación. Cuando los FSs absorben luz, se produce una transferencia de energía a diferentes niveles de excitación, dependiente de los cuantos de luz absorbidos.

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

- Estado de excitación singlete: se produce sin modificación del espín del electrón en su estado basal.
- Estado de excitación triplete: se produce cuando cambia el espín del electrón. Este estado es mucho más estable que el anterior.

En general, una vez en el estado excitado, las moléculas pueden volver al estado fundamental por diversos mecanismos:

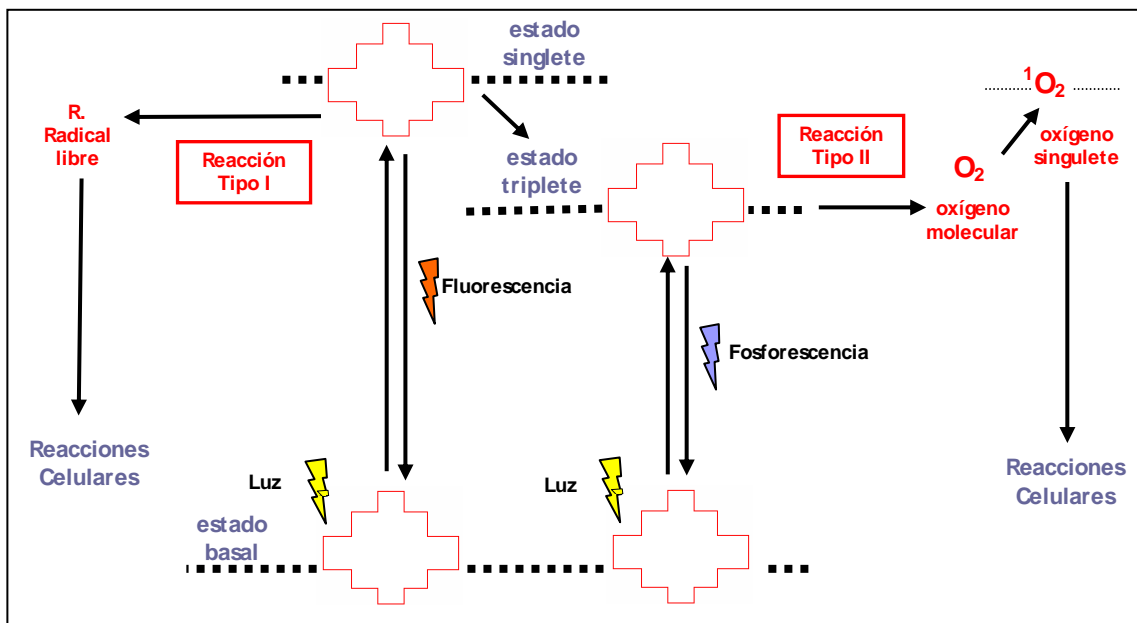
- Pérdida de su energía por colisiones con otras moléculas hasta volver al estado fundamental, produciendo un calentamiento.
- Fluorescencia. La fluorescencia es la caída al estado fundamental por emisión de un fotón de radiación adecuada a la diferencia de energía entre el nivel excitado y el fundamental. Esta emisión se produce desde un estado singlete de un nivel excitado, normalmente aquel de menor energía, S<sub>1</sub>. En el caso de la PpIX como FS se observa fluorescencia roja con emisión de longitud de onda de alrededor de 620 nm, cuando la caída es desde el estado singlete.
- Fosforescencia. Al pasar a un orbital desocupado los electrones no cambian su espín. Como se indica en el diagrama, en ocasiones puede ocurrir una conversión del estado singlete al triplete. En el estado excitado las moléculas sufren un cruce entre sistemas hacia un estado excitado de carácter triplete. La emisión de un fotón directamente para devolver la molécula a su estado fundamental no se da fácilmente, por estar prohibida por la regla de selección de espín. En estos casos se puede producir la vuelta al estado fundamental, por emisión de un fotón, pero en un tiempo muy superior al de la fluorescencia normal.

La absorción de luz lleva a la porfirina a los estados singlete y triplete. Las porfirinas excitadas en singlete pueden reaccionar directamente con los tejidos o las células (reacción fotoquímica tipo I), mientras que en el estado triplete transfieren su energía al oxígeno molecular, produciendo <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (reacción fotoquímica tipo II). Ambos

tipos de reacciones pueden tener lugar simultáneamente, y la proporción en que ocurre cada una de ellas depende principalmente de la naturaleza del FS y del sustrato (Sun et al, 2009).

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

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



**Fig. 13.** Diagrama de Jablonski correspondiente a reacciones fotoquímicas de un FS en presencia de luz..

Con estas cualidades, la PpIX reúne algunas de las condiciones de un fotosensibilizante ideal: Se obtiene fácilmente como producto endógeno de síntesis a partir de ALA, absorbe en la banda de Soret, presenta baja toxicidad en oscuridad pero es altamente reactivo en presencia de luz (como se evidencia en las consecuencias de las Porfirias) y posee buena selectividad por las células tumorales.

#### IV.1.2. Especies reactivas de oxígeno

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

La toxicidad de estas especies reside en su gran reactividad y su gran capacidad de oxidar diversos sustratos, principalmente biomoléculas. Las ROS pueden generarse por reducciones univalentes sucesivas. Estos agentes prooxidantes pueden ser de carácter radicalario (radical hidroxilo:  $\bullet OH$ , anión superóxido:  $O_2^-$ , radical alcoxilo, radical peroxilo, peroxinitrito, entre otros) o no radicalario (oxígeno singulete:  $^1O_2$ , peróxido de hidrógeno:  $H_2O_2$ , hipoclorito, etc.). En el primer caso, estos compuestos presentan una configuración electrónica con un electrón desapareado, lo cual genera una gran tendencia a reaccionar para formar pares estables. Las especies no radicalarias contribuyen a la formación de radicales libres mediante numerosas reacciones.

El sitio celular del origen de estas especies es variado y en el caso de las reacciones fotodinámicas, dependerá en gran medida de la localización subcelular del FS. El oxígeno singulete, principal efector del fotodaño en la TFD, posee una corta vida media, por lo cual no puede extenderse en la célula mucho más allá de su sitio de origen. Generalmente, el principal sitio de generación de ROS es la mitocondria, donde se localizan los aceptores de electrones de la cadena respiratoria. Si bien la oxidación de ácidos grasos ocurre en el peroxisoma, la peroxidación lipídica en membranas y la presencia de metales a nivel de las enzimas citosólicas son fuentes no menores de estas especies reactivas.

Las ROS se encuentran presentes en concentraciones basales en todos los organismos aeróbicos. La mayor fuente de ROS son los procesos metabólicos normales de las células, pero otra parte puede provenir de factores externos como la radiación solar, fungicidas o pesticidas (Clifford, 1999). La presencia de ROS es importante para el metabolismo, ya que ciertas cantidades de estas moléculas son necesarias para el desarrollo de muchos procesos fisiológicos que ocurren normalmente en el organismo (Ej: participación del  $O_2^-$  en el proceso de fagocitosis, o del  $H_2O_2$  en la síntesis de



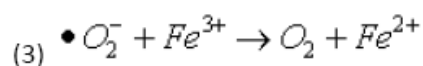
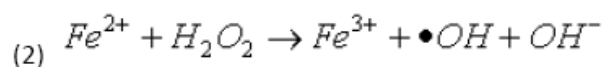
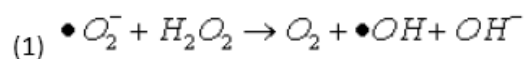
hormona tiroidea o en la maduración de los espermatozoides) (Ford, 2004; Song et al, 2007; Bylund et al, 2010).

Sin embargo cuando la producción de ROS excede las necesidades fisiológicas, éstas resultan nocivas para las células, ya que pueden causar daño en lípidos, proteínas y ADN, generando peróxidos; crosslinkings, oxidaciones y rupturas en las cadenas polipeptídicas; aductos de bases y bases propenales e inversiones del C1 de los azúcares de ácidos nucleicos, entre otras. Estos eventos conllevan a un desarreglo general del metabolismo celular normal, que en ocasiones puede llevar a la apoptosis.

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

El oxígeno en estado basal se encuentra en estado triplete y al absorber una cantidad de energía suficiente puede pasar a formar  $^1O_2$ , el cual es altamente reactivo y puede transferir sus electrones a una gran diversidad de moléculas orgánicas. El oxígeno puede activarse por otras vías, como la reducción monovalente para formar  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$  y finalmente  $H_2O$ .

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



Para protegerse de este potencial daño oxidativo, las células poseen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Thannikal et al, 2000) y diversos mecanismos que, de ser posible, apuntan a restablecer la homeostasis.

#### IV.1.3. Antioxidantes y TFD

Debido a que todos los componentes celulares son susceptibles de ser atacados por las ROS, los organismos aerobios disponen de una amplia batería de defensas antioxidantes.

Un antioxidante puede definirse como una sustancia que a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato, retrasa significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell et al, 1989). Básicamente existen dos grandes grupos de defensas antioxidantes: las enzimáticas y las no enzimáticas.

Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), que presenta una forma dependiente de cobre y zinc (CuZnSOD) y otra forma dependiente de manganeso (MnSOD), y la catalasa (CAT). La SOD convierte al  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ , mientras que la catalasa degrada el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Sanders et al, 2003). Por otro lado, la glutatión peroxidasa (GPx), también se encuentra en dos formas, una selenio dependiente y la otra selenio independiente, la primera encargada de la detoxificación de los peróxidos (Simmons y Jamall, 1988) y la segunda de la degradación de los hidroperóxidos (Ahmad et al., 1989).

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

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

Los antioxidantes no enzimáticos se incorporan por lo general en la dieta, sobre todo en las frutas y verduras. Entre sus principales características podemos citar que son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula, actúan a concentraciones elevadas, y tienen un papel despreciable frente a las defensas

enzimáticas. Estas sustancias se oxidan, quelando o secuestrando el gran potencial oxidante de las ROS y evitando así que se oxiden otras moléculas vitales para el metabolismo celular. Los antioxidantes no enzimáticos pueden regenerarse en su forma reducida mayormente mediante procesos enzimáticos específicos. Entre ellos podemos mencionar al GSH y al ascorbato, que pueden actuar como pro o como antioxidantes según el caso, y a las vitaminas liposolubles (Kappus, 1981).

Su presencia en las reacciones fotodinámicas, usualmente reduce la eficacia de la TFD. En cambio, algunos antioxidantes en determinadas concentraciones pueden aumentar la eficacia de la terapia. Por lo tanto, es posible observar tanto efectos protectores como favorecedores en la TFD complementada con antioxidantes. Por otro lado, un efecto protector de un antioxidante en la TFD podría indicar indirectamente la participación de ROS en los mecanismos de fotodaño.

Han sido reportados mecanismos de protección celular mediados por superóxido dismutasa y glutatión previniendo el daño a organelas provocado por la acción de PpIX. La presencia de trolox o alfa tocoferol succinato durante la irradiación redujo el número de células apoptóticas y los efectos citotóxicos en células leucémicas murinas tratados con FSs de localización lisosomal (Perotti et al, 2002).

Algunos antioxidantes no enzimáticos son quelantes relativamente específicos de ciertos radicales. Por ejemplo, el manitol es un secuestrante de radical hidroxilo, mientras que el glutatión reducido y el triptófano entre otros, inactivan mayormente al oxígeno singulete (Perotti et al, 2002).

#### IV.2. Mecanismos de muerte celular

Múltiples cascadas de señalización son concomitantemente activadas en las células cancerosas expuestas a estrés fotodinámico, y dependiendo de la localización subcelular de los agentes dañinos, estas señales se traducen en respuestas adaptativas o de muerte celular. La evidencia reciente indica que la TFD puede destruir células eficientemente tanto por la inducción de caminos apoptóticos como no apoptóticos (Buytaert et al, 2007).

En la erradicación de tumores mediante TFD intervienen diferentes procesos de muerte celular, los que incluyen necrosis, apoptosis, y mecanismos asociados con la formación de vacuolas autofágicas. Estas formas de muerte no son mutuamente excluyentes, pueden coexistir y ocurrir simultáneamente bajo diversas condiciones fisiológicas y patológicas. Por otra parte puede dañar la vasculatura tumoral y los vasos sanguíneos periféricos, produciendo una muerte tumoral indirecta por hipoxia y falta de nutrientes. También puede inducir una respuesta inmune que contribuye a la destrucción del tumor. La acción de estos mecanismos, y el grado en el que cada uno se manifiesta, determinan el éxito de la TFD (Dolmans et al, 2003; Henderson et al, 2004; Buytaert, et al 2007).

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

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

El tipo de muerte celular inducido por la TFD depende, entre otras cosas, del sitio de acción del compuesto FS; aquellos que se acumulan preferencialmente en mitocondrias o retículo endoplasmático generalmente promueven la apoptosis, mientras que los FS que afectan la membrana plasmática o los lisosomas predisponen a la muerte

por necrosis (Kessel et al, 1997). Más recientemente, otros autores han descrito procesos de formación de vacuolas autofágicas por efecto de la TFD (Kessel et al, 2010).

La muerte celular programada (MCP) se define como una forma de "suicidio" celular genéticamente codificado que ocurre en sitios y momentos predecibles durante el desarrollo. Tres formas de MCP morfológicamente distinguibles han sido descritas durante el desarrollo: La *MCP Tipo I* se caracteriza por cambios genotípicos como condensación nuclear y encogimiento celular. El *tipo II de MCP* se distingue por una digestión de organelas de la célula dependiente de lisosomas y la presencia de vacuolas autofágicas (autofagosomas); mientras que la *MCP tipo III* está marcada por hinchamiento celular y una rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática.

Actualmente, estos procesos reciben los nombres de apoptosis, muerte celular autofágica y necrosis, respectivamente y son programas celulares con un rol crucial en el desarrollo normal, homeostasis de los tejidos y eliminación de células anormales o dañadas (Buytaert et al, 2007).

#### *IV.2.1. Apoptosis*

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular que resulta de gran importancia en el desarrollo y remodelamiento de los tejidos. Se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, y puede ser inducida por diferentes tipos de estrés celular, incluyendo terapias anticancerígenas como la TFD (Miller et al., 2007). Los cambios morfológicos incluyen: condensación de la cromatina, clivaje del ADN en fragmentos internucleosomales, disminución del tamaño celular, formación de cuerpos apoptóticos sin ruptura de la membrana, exposición de residuos de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana y fagocitosis por parte de células vecinas.

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

(caspasas efectoras). Una vez activadas, las caspasas efectoras son las responsables de los principales cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis por medio del clivaje de numerosos sustratos.

#### *IV.2.1.1. Vías apoptóticas clásicas*

Las caspasas actúan a través de dos mecanismos, la vía intrínseca y la vía extrínseca (Fig. 14). En la primera, las caspasas iniciadoras -8/-10 y -9 activan a las efectoras pro-caspasas -3 y -7. La vía extrínseca se activa por la unión de ligandos específicos a receptores de muerte (RM) ubicados en la superficie de la membrana, como Fas, TNF-RI (receptor de factor de necrosis tumoral) y TRAIL (ligando inductor de apoptosis asociado a TNF). Esta unión induce la formación de un complejo oligomérico, DISC (complejo de señalización inductor de muerte), que recluta a las procaspasas iniciadoras -8 y -10 y promueve su dimerización. Éstas a su vez activan a las caspasas efectoras -3 y -7 (Buytaert, 2007; Galuzzi et al., 2007; Jin y El-Deiry, 2005).

Las mitocondrias ejercen un rol central en la vía apoptótica intrínseca, ya que la permeabilización de sus membranas desencadena la liberación de numerosas proteínas apoptogénicas localizadas en el espacio intermembrana, como el citocromo c, Omi/HtrA2 (serino-proteasa mitocondrial), Smac/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis) y endonucleasa G. Una vez liberado al citosol, el citocromo c se une a la proteína Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas 1), y en presencia de ATP promueve la formación de un complejo heptamérico, el apoptosoma, el cual recluta y activa a la procaspasa -9. Una vez liberados al citosol, Omi/HtrA2 y Smac/DIABLO antagonizan la actividad de proteínas inhibitoras de caspasas, mientras que AIF y endonucleasa G se translocan al núcleo y promueven la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Lam et al., 2001).

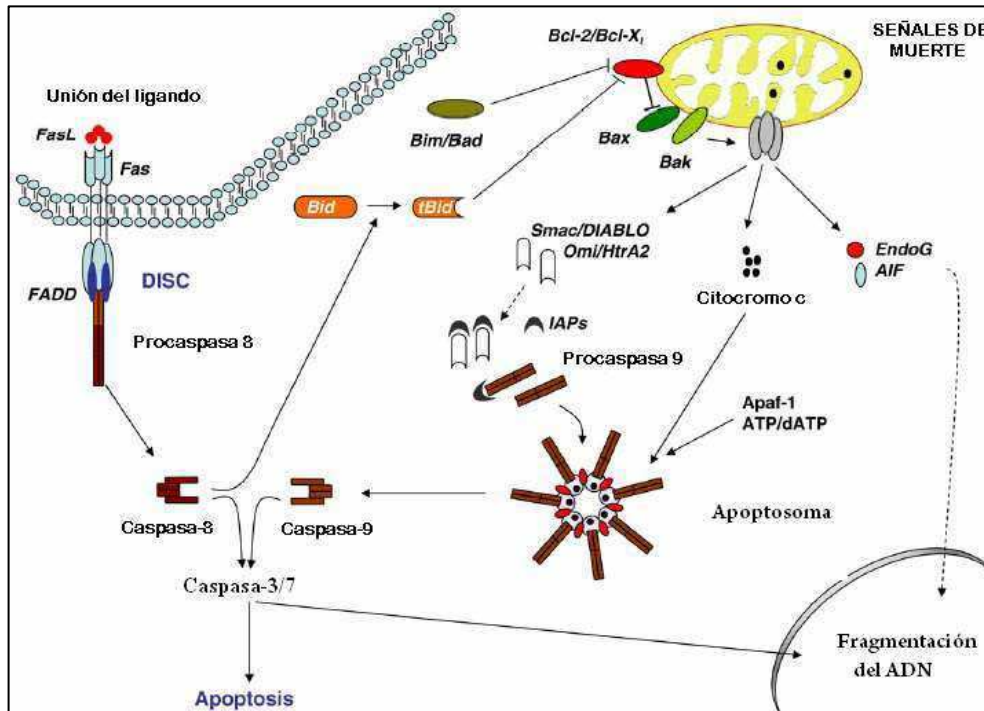


Fig. 14. Esquema representativo de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca.

Los mecanismos que llevan a la permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM) aún no se conocen con certeza. Uno de los modelos propuestos involucra un aumento en la permeabilidad de la membrana a solutos con una masa mayor a 1,5 kDa, permitiendo el ingreso de los mismos al interior de la mitocondria. Este proceso se asocia a la apertura de un canal iónico ubicado en la membrana, el poro de transición (PT). Esta apertura estaría estimulada por la presencia de calcio y la exposición de la mitocondria al daño por ROS. En la membrana mitocondrial interna (MMI), se produce una disipación del gradiente de protones con la consecuente pérdida del potencial transmembrana y cambios osmóticos que finalmente conllevan a la ruptura de la membrana mitocondrial externa (MME) y a la liberación de factores pro-apoptóticos (Green et al., 2006; Rasola y Bernardi, 2007).

Otro mecanismo propuesto para explicar la PMM consiste en la oligomerización de la familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 o la interacción entre éstas y VDAC (canal de aniones dependiente de voltaje). La familia Bcl-2 comprende al menos 20 miembros que contienen al menos un dominio de homología Bcl-2 (BH1 a BH4). Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (ej: Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w) contienen los cuatro dominios BH. Las proteínas pro-apoptóticas se subdividen en “BH123 multidominio”

(ej.: Bax, Bak) y “BH3” (ej.: Bid, Bad). Una vez activadas, las primeras sufren un cambio conformacional y forman poros que mediarían la PMM. Las proteínas “BH3” actúan uniéndose y neutralizando la actividad de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (Antignani y Youle, 2006; Tsujimoto y Shimizu, 2000).

#### *IV.2.1.2. Vías apoptóticas lisosomales*

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

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



#### *IV.2.1.3. Apoptosis y TFD*

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

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

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

Los eventos reportados luego de la TFD utilizando FSs con localización mitocondrial, involucran la PMM, permitiendo la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol y la posterior activación de caspasas (Oleinick y col, 2002; Agostinis y col, 2004). Ciertas características directamente asociadas a la apertura del PT como el aumento de calcio intracelular, el aumento de un estado celular pro-oxidante y la generación de ácidos grasos libres, también han sido observadas como consecuencia de la TFD (Moor, 2000).

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

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

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

el cambio conformacional y la activación de Bax (y Bak) durante la apoptosis inducida por la TFD, aun no se conocen con certeza (Buytaert et al, 2007). El rol de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en la TFD resulta ambiguo. Mientras que en ciertos casos una sobreexpresión de Bcl-2 se asoció a una disminución en la apoptosis inducida por la TFD, en otros, una elevada expresión de esta proteína aumentó el grado de muerte celular por la TFD (Oleinick et al, 2002; Almeida et al, 2004). En numerosos trabajos se demostró que Bcl-2 es un target de la TFD utilizando una gran variedad de FSs (Kessel y Castelli, 2001; Kessel et al, 2005; Marchal et al, 2007).

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

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

#### *IV.2.2. Necrosis*

A nivel morfológico la muerte por necrosis se caracteriza por la ruptura de la membrana plasmática, lo que induce una reacción inflamatoria que promueve la liberación del contenido intracelular y moléculas proinflamatorias.

Recientemente se ha demostrado que la necrosis no sólo ocurre como respuesta a situaciones patológicas, sino también durante algunos procesos fisiológicos como la renovación celular en el intestino delgado (Edinger y Thompson, 2004; Jin y El- Deiry, 2005).

Tradicionalmente se consideraba a la necrosis como una forma de muerte desorganizada y pasiva, pero recientemente se ha demostrado que este proceso está asociado a distintas vías de transducción de señales. Se ha reportado que en ciertas líneas celulares a las cuales se trató con inhibidores de caspasas, la activación de receptores para TNF y Fas induce necrosis a través de la activación de la quinasa RIP1

(kinasa de serina y treonina interactuante con receptor). Además, se ha demostrado que RIP1 cumple un rol fundamental en la cascada de señalización que induce necrosis activando la vía de JNK (Jun kinasa).

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

#### *IV.2.2.1. Necrosis y TFD*

En el caso de los FSs que se localizan preferentemente en la membrana plasmática, la necrosis constituye el principal mecanismo de muerte luego de la TFD (Buytaert, 2007).

Esto se debe a la rápida pérdida de la integridad de la membrana como consecuencia del fotodaño, la incapacidad de mantener el flujo de iones a través de la misma, y una rápida depleción del ATP intracelular (Hsie et al, 2003; Fabris et al, 2001).

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

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

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

### IV.2.3. Autofagia

Inicialmente la autofagia fue descrita como un mecanismo adaptativo que permitía mantener las funciones vitales en condiciones de privación de nutrientes. En mamíferos actualmente se sabe que la autofagia promueve la supervivencia celular, removiendo las organelas dañadas, metabolitos tóxicos y patógenos intracelulares.

Asimismo puede actuar como una forma de muerte celular cuando ocurre una excesiva auto-digestión y degradación de constituyentes celulares esenciales (Kessel et al, 2006; Lefranc et al, 2007).

El primer paso de la autofagia consiste en la formación del autofagosoma, una estructura con doble membrana que contiene organelas y otros elementos citoplasmáticos. Los autofagosomas se fusionan con lisosomas y el contenido interno es degradado por enzimas hidrolíticas. La familia de genes *Atg*, ampliamente conservada en eucariotas, regula la formación de los autofagosomas (Tsujimoto y Shimizu, 2005; Ricci y Zong, 2006).

Las vías de señalización de PI3K (fosfoinositol-3 kinasa) clase I y clase III regulan el proceso de autofagia. La formación del autofagosoma se encuentra bajo el control positivo del complejo de clase III, mientras que el complejo de clase I actúa inhibiendo la autofagia a través de la vía de mTOR. El proceso de formación vacuolar y transporte está mediado por Beclina-1, que pertenece al complejo PI3K de clase III y al unirse a éste promueve su activación (Fig. 15).

Las moléculas que controlan la apoptosis y las que controlan la autofagia en mamíferos se solapan únicamente en el caso de la familia Bcl-2. En condiciones de inhibición de la apoptosis las células inician mecanismos autofágicos para iniciar la muerte celular (Sasi et al, 2009).

Recientemente se ha demostrado que p53 también promueve la autofagia, y se han descrito otras moléculas asociadas a la activación de autofagia, como DRAM (gen modulador de la autofagia regulada por daño) y MAP1LC3-II (proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena liviana 3) (Buytaert et al. 2007).

#### IV.2.3.1. Autofagia y TFD

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

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

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

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

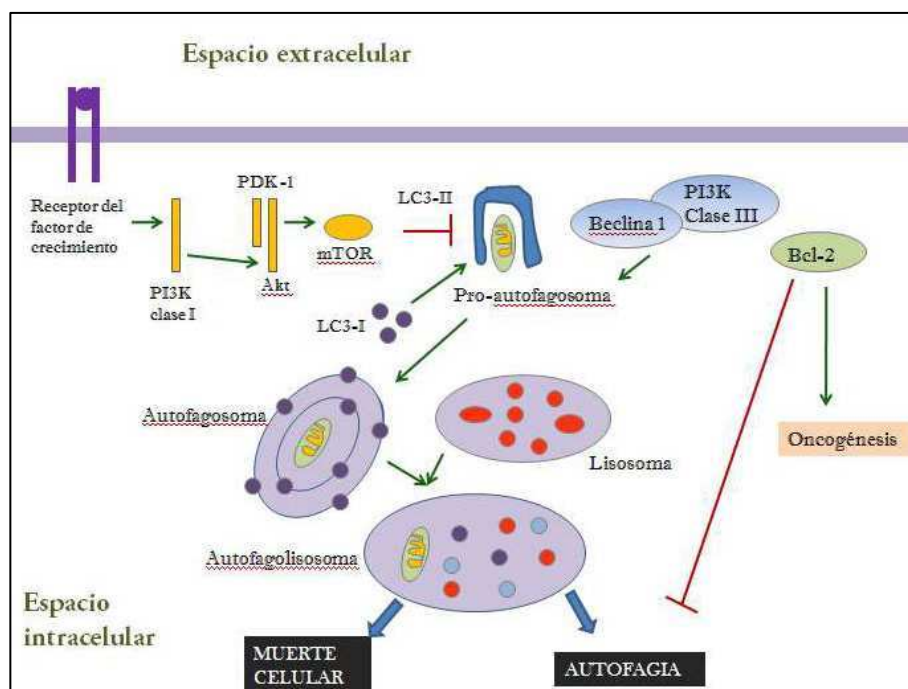


Fig. 15. Esquema representativo del proceso de autofagia.

### *IV.3. Supervivencia y resistencia a TFD*

La TFD carece de efectos altamente dañinos como los de la quimio o la radioterapia, así como de sus mecanismos de resistencia intrínsecos. Por lo general no presenta resistencia cruzada con estos tratamientos, ya que su mecanismo de acción dependiente de ROS y no asociado al daño al ADN es notablemente distinto al de las terapias convencionales y no hay un mecanismo natural de eliminación de oxígeno singlete, principal efector del daño celular (Agostinis et al, 2011; Diez et al, 2012). Sin embargo, al igual que en todo tratamiento oncológico, existen determinados fenotipos que pueden favorecer la sobrevida o la resistencia de las células a la TFD. Es tanto, o más importante, conocer los mecanismos que llevan a la muerte celular como aquellos que permiten a las células tumorales evadir el daño y sobrevivir.

Frente a dosis leves o subletales de TFD, las células pueden responder al fotodaño iniciando un proceso de rescate o desencadenando los eventos que lleven a la muerte celular. La supervivencia o muerte de las células frente a estrés físico o químico subletal implica la integración de una compleja red de vías de señalización que culmina en cambios en la expresión de genes. Estas proteínas son las que le permitirán a las células lidiar con las consecuencias de dicho estrés.

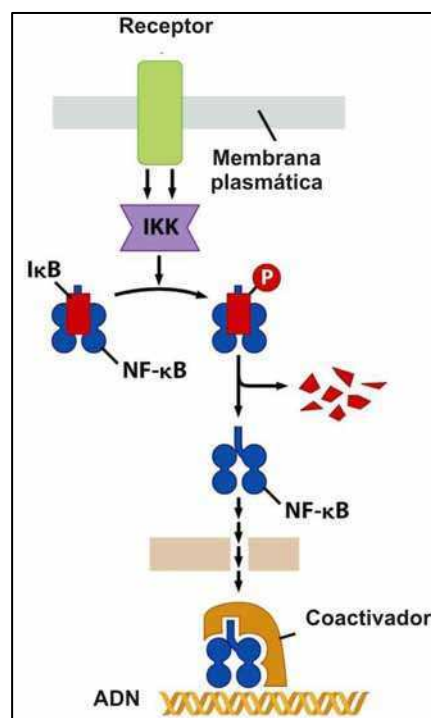
#### *IV.3.1. Factores de supervivencia*

La supervivencia de las células al tratamiento fotodinámico depende en gran medida del balance entre la expresión de las proteínas antiapoptóticas o factores de supervivencia y las proteínas proapoptóticas (Karmakar et al, 2007) que se expresan en respuesta a la TFD.

En este contexto, es relevante analizar el rol de uno de los factores sensible al estado redox en la modulación de la respuesta antiapoptótica por TFD: el factor nuclear kappa B (NFκB). En varios tipos de cáncer se ha descrito un aumento de la expresión de NFκB con un efecto antiapoptótico, promotor de supervivencia de la célula tumoral y de la resistencia a quimio y radioterapia (Wang, 1998; Beg y Baltimore, 1996), al igual que para Bcl-2 (Agostinis et al, 2004). Sin embargo, esta cualidad de conferir resistencia no puede ser directamente extrapolada a la TFD.

El factor de transcripción NF $\kappa$ B es un regulador crítico de numerosos procesos celulares como supervivencia e inflamación. Se encuentra como un hetero u homodímero que puede formarse a partir de cinco subunidades: NF $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105), NF $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100), RelA (p65), RelB y c-Rel. El dímero más estudiado es p50:p65, que es activado por las vías clásicas y generalmente promueve la expresión de genes asociados a supervivencia e inflamación.

En células normales, NF $\kappa$ B se encuentra inactivo, secuestrado en el citoplasma por proteínas inhibitorias (I $\kappa$ B  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Diversos estímulos como estrés, citoquinas o productos bacterianos activan las kinasas de I $\kappa$  (IKK) que fosforilan a los inhibidores resultando en poliubiquitinación y consecuente degradación por proteasoma. Por lo cual, el factor queda libre para trasladarse al núcleo (Fig.16), (Pereira y Oakley, 2008). La participación de ROS inducidas por TFD en la activación de NF $\kappa$ B ha sido ampliamente estudiada y está involucrado tanto en vías proapoptóticas como antiapoptóticas según el sistema en estudio (Moor, 2000). NF $\kappa$ B es un factor sensible al estado redox ya que las ROS pueden activarlo directamente, liberando I $\kappa$ B (Schreck et al, 1991) o mediante estímulos asociados a TNF $\alpha$ , ésteres de forbol e IL-1.



**Fig. 16.** Vías de señalización de NF $\kappa$ B.

La evidencia sugiere que el rol de estos factores de supervivencia en la respuesta a TFD es ambiguo. En células de glioblastoma U87MG, la TFD basada en ALA indujo apoptosis mediante la supresión de la expresión de factores de supervivencia como NFκB, BIRC-3, y Bcl-2 (Karmakar et al, 2007). Asimismo, en sistemas de sobreexpresión de Bcl-2 se observó un efecto protector frente a la apoptosis inducida por TFD con determinados FS (Oleinick et al, 2002). Mientras que en otros casos, la utilización de FS que producen la fotodestrucción de Bcl-2 (principalmente de localización mitocondrial) se observó un aumento en la apoptosis mediada por TFD (Xue et al, 2001). Así como también activación de NFκB post TFD mediada por ROS (Volanti et al, 2002; Granville et al, 2000)

Según estudios de perfiles de expresión post TFD basada en ALA en células de carcinoma escamoso, genes tempranos de respuesta a estrés como c-jun y c-fos se inducen tan pronto como 8 h luego del tratamiento en respuesta al daño oxidativo. En cambio disminuye la expresión de genes como cdc2 o c-myc (proliferación), FAAD (apoptosis) y fibronectina (adhesión). Dosis subletales de TFD provocan apoptosis sólo en un porcentaje de las células tratadas, a la vez que induce genes tempranos de respuesta a estrés, interrupción de la proliferación y desprendimiento del sustrato (Ruhdorfer et al, 2007).

#### *IV.3.2. Mecanismos de resistencia*

En la heterogeneidad de fenotipos presentes en un tumor o incluso en un cultivo celular, es esperable observar distintas respuestas al tratamiento fotodinámico. Según lo expuesto previamente, el perfil de expresión de factores de muerte y supervivencia celular determinará cuáles de esas células serán capaces de restablecer la población luego de la TFD. Estas células supervivientes merecen especial atención, pues portan los caracteres que condicionan la eficacia de la TFD.

Generalmente, las líneas celulares resistentes a TFD se obtienen a partir de ciclos sucesivos de TFD con distintos FS exógenos como Photofrin, ftalocianinas y azul del Nilo (Mayhew et al, 2001; Singh et al, 2001). En cambio, la resistencia a TFD basada en ALA debe estar inducida por mecanismos endógenos que impliquen una



reducción en la acumulación de porfirinas o una defensa antioxidante más eficaz (Casas et al, 2006).

Estos mecanismos endógenos pueden manifestarse a nivel de:

- FS: Por incorporación alterada, excesiva externalización, tráfico intracelular alterado.
- Síntesis de porfirinas: Por actividad disminuida de enzimas de la biosíntesis del hemo.
- ROS: Por inactivación o detoxificación aumentada de ROS mediante enzimas de defensa antioxidante.
- Modulación de la muerte celular: Por puesta en marcha de mecanismos de reparación de Biomoléculas.
- Disponibilidad de oxígeno: La hipoxia inducida por la misma TFD y por el daño a la vasculatura puede contribuir a la aparición de células resistentes.

En este contexto, múltiples candidatos se han propuesto como intermediarios de los mecanismos de resistencia a TFD con distintos FS: TP53 (activa mecanismos de reparación de ADN; Lee et al, 2010), HO-1 (agente protector frente al fotodaño; Nowis, 2006), IL-6 (regulador de Bax; Brackett et al, 2011), survivina (inhibidor de la apoptosis de la familia IAP; Milla et al, 2011), BCRP, MRP1 (transportadores de drogas; Jendzelovský et al, 2009; Usuda et al, 2010), baja incorporación de ALA (Egli et al, 2008), Hsp27 y Hsp60 (respuesta a estrés, modulación de ROS e inhibición de apoptosis; Kim et al, 2010; Ziegler et al, 2007; Hanlon et al, 2001), entre muchos otros.

Resulta interesante también analizar la variación en la capacidad metastásica de las células que sobreviven a la TFD, aspecto de gran relevancia clínica. Se ha reportado la pérdida parcial de la expresión de fibronectina en células tratadas y por lo tanto una pérdida de adhesión celular que podría facilitar la migración celular *in vitro* y la metástasis *in vivo*. Sin embargo se piensa que este fenómeno está más relacionado con el desprendimiento de las células del sustrato y el cambio de la morfología después de la TFD que con un aumento de la capacidad metastásica. Más aún, numerosos trabajos demuestran una capacidad metastásica reducida luego de la TFD (Tsai et al, 2009; Casas et al, 2008; Rousset et al, 1999; Runnels et al, 1999)

## REFERENCIAS

- Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, et al. (1991). Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 51:5993–6.
- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 61(4):250-81.
- Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, et al. (2004). Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3(8):721-9.
- Ahmad S, Beilstein MA, Pardini RS. (1989). Glutathione peroxidase activity in insects: a reassessment. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 12: 39-49.
- Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, et al. (2004). Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy, *Biochim. Biophys. Acta.* 1704:59–86.
- Antignani A, Youle RJ. (2006). How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane?. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18(6):685-9.
- Baraldi I, Bruni MC, Costi MP, et al. (1990). Theoretical study of electronic spectra and photophysics of uracil derivatives. *Photochem Photobiol.* 52(2):361-74.
- Beg AA, Baltimore D. (1996). An essential role for NFκB in preventing TNF-α-induced cell death. *Science.* 274:782–784.
- Bidère N, Lorenzo HK, Carmona S, et al. (2003). Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278(33):31401-11.
- Brackett CM, Owczarczak B, Ramsey K, et al. (2011). IL-6 potentiates tumor resistance to photodynamic therapy (PDT). *Lasers Surg Med.* 43(7):676-85.
- Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, et al. (2006). Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J.* 20:756–758.

Buytaert E, Callewaert G, Vandenneede JR, et al. (2006). Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy*. 2(3):238-40.

Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1776(1):86-107.

Bylund J, Brown KL, Movitz C, et al. (2010). Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radic. Biol. Med.* 49(12):1834- 45.

Casas A, Perotti C, Ortel B, et al. (2006). Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol.* 29(2):397-405.

Casas A, Di Venosa G, Vanzulli S, et al. (2008). Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 28;271(2):342-51.

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one— photosensitizers, photochemistry, and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 1(4): 279–293.

Chiu SM, Xue LY, Usuda J, et al. (2003). Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br. J. Cancer.* 89: 1590– 1597.

Clifford AA. (1999). *Nutricines: Food components in health and nutrition.* Nottingham University Press. Nottingham, UK.

Diez B, Ernst G, Teijo MJ, et al. (2012). Combined chemotherapy and ALA-based photodynamic therapy in leukemic murine cells. *Leuk Res.* 36(9):1179-84.

Dini L, Inguscio V, Tenuzzo B, et al. (2010). Rose bengal acetate photodynamic therapy-induced autophagy. *Cancer Biol. Ther.* 10(10):1048-55.

Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* . 380–387.

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. (1998). Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90(12):889-905.

- Edinger AL, Thompson CB. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16(6):663-9.
- Egli RJ, Di Criscio A, Hempfing A, et al. (2008). In vitro resistance of articular chondrocytes to 5-Aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 40(4):282-90.
- Fabris C, Valduga G, Miotto G, et al. (2001). Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res.* 61: 7495–7500.
- Fenton H. (1899). Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. *Proc. Chem. Soc.* 25: 224.
- Ford WC. (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update.* 10(5):387-99.
- Furre IE, Shahzidi S, Luksiene Z, et al. (2005). Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res.* 65: 11051-11060.
- Furre IE, Moller MT, Shahzidi S, et al. (2006). Involvement of both caspase-dependent and-independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis.* 11: 2031–2042.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, et al. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14(7):1237-43.
- Golab J, Nowis D, Skrzycki M, et al. (2003). Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 278(1):407-14.
- Granville DJ, Shaw JR, Leong S, et al. (1999). Release of cytochrome c, Bax migration, Bid cleavage, and activation of caspases 2, 3, 6, 7, 8, and 9 during endothelial cell apoptosis. *Am. J. Pathol.* 155: 1021-1025.
- Granville DJ, Carthy CM, Jiang H, et al. (2000). Nuclear factor-kappaB activation by the photochemotherapeutic agent verteporfin. *Blood.* 95(1):256-62.

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

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

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*. 2nd. edition Clarendon Press Oxford UK.

Hanlon JG, Adams K, Rainbow AJ, et al. (2001). Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 64(1):55-61.

Hartley D, Kolaja K, Reichard J, et al. (1999). 4-Hydroxynonenal and malondialdehyde hepatic protein adducts in rats treated with carbon tetrachloride: immunochemical detection and lobular localization. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 161: 23–33.

Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, et al. (2004). Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res*. 64:2120–2126.

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

Jablonski, A. (1933). Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*, volume 131, pp. 839-840.

Jendzelovský R, Mikes J, Koval' J, et al. (2009). Drug efflux transporters, MRP1 and BCRP, affect the outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci*. 8(12):1716-23.

Ji HT, Chien LT, Lin YH, et al. (2010). 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase. *Mol. Cancer*. 9:91.

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

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

Josefsen LB, Boyle RW. (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met. Based Drugs*. 2008:276109.

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

Kappus H, Sies H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*. 37:1233- 1241.

Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, et al. (2007). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. *Neurosci Lett*. 415(3):242-7.

Kessel D, Erickson C. (1992). Porphyrin photosensitization of multi-drug resistant cell types. *Photochem Photobiol*. 55: 397-399.

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

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

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

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

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

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

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

Kessel D, Oleinick NL. (2010). Photodynamic therapy and cell death pathways. *Methods Mol Biol*. 635:35-46.

- Kim J, Jung H, Lim W, et al. (2012). Down-regulation of heat-shock protein 27-induced resistance to photodynamic therapy in oral cancer cells. *J Oral Pathol Med*. En prensa.
- Krammer B, Malik Z, Pottier R, et al. (2006). Basic Principles. En: *Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook*. Pottier R, Kramer B, Baumgartner R, Stepp H. Reino Unido. Editor: Royal Society of Chemistry. P 1-14.
- Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. (2005). Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinate treated tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 433: 435–46.
- Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. (2001). Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J. Biol. Chem.* 276(50):47379-86.
- Lee SY, Luk SK, Chuang CP, et al. (2010). TP53 regulates human AlkB homologue 2 expression in glioma resistance to Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 103(3):362-9.
- Lefranc F, Facchini V, Kiss R. (2007). Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist*. 12(12):1395-403.
- Marchal S, Francois A, Dumas D, et al. (2007). Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitized MCF-7 cells. *Br. J. Cancer*. 96: 944-51.
- Marnett L. (1999). Chemistry and biology of DNA. Damage by malondialdehyde. *IARC Sci. Publ.* 150: 17–27.
- Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, et al. (2001). Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide. A methylester photosensitization, *Oncogene*. 20:4070–84.
- Mayhew S, Vernon D, Schofield J, et al. (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.
- Milla LN, Cogno IS, Rodríguez ME, et al. (2011). Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem*. 112(9):2266-78.
- Miller JD, Baron ED, Scull H, et al. (2007). Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224(3):290-9.

- Moor AC. (2000). Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* 57:1-13.
- Morgan J, Oseroff AR. (2001). Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49(1-2):71-86.
- Nowis D, Legat M, Grzela T. (2006). Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene.* 25(24):3365-74.
- Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1–21.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 143-83.
- Pereira SG, Oakley F. (2008). Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(8):1425-30.
- Perotti C, Casas A, Batlle A. (2002). Scavengers Protection of Cells Against ALA-based Photodynamic Therapy-induced Damage. *Lasers Med Sci.* 17(4):222-9.
- Rasola A, Bernardi P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis.* 12(5):815-33.
- Reiners JJ Jr, Agostinis P, Berg K, et al. (2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy.* 6(1):7-18.
- Ricci MS, Zong WX. (2006). Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* 11(4):342-57.
- Ross S, Findlay V, Malakasi O, et al. (2000). Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* 11: 2631-2642.
- Rousset N, Vonarx V, Eleouet S, et al. (1999). Effects of photodynamic therapy on adhesion molecules and metastasis. *J Photochem Photobiol. B* 52: 65-73.
- Ruhdorfer S, Sanovic R, Sander V, et al. (2007). Gene expression profiling of the human carcinoma cell line A-431 after 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. *Int J Oncol.* 30(5):1253-62.



Runnels JM, Chen N, Ortel B, et al. (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.

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

Sasi N, Hwang M, Jaboin J, et al. (2009). Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. *Mol Cancer Ther*. 8(6):1421-9.

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

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*. 10(8):2247-58.

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

Singh G, Espiritu M, Yun Shen X, et al. (2001). In vitro induction of PDT resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC cells by various photosensitizers. *Photochem Photobiol*. 73: 651-656.

Song Y, Driessens N, Costa M, et al. (2007). Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 92(10):3764-73.

Stoka V, Turk B, Schendel SL, et al. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem*. 276(5):3149-57.

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

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

Tsai T, Ji HT, Chiang PC, et al. (2009). ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. *Lasers Surg Med*. 41(4):305-15.

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

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

Usuda J, Tsunoda Y, Ichinose S, et al. (2010). Breast cancer resistant protein (BCRP) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (PDT) for centrally located early lung cancer. *Lung Cancer.* 67(2):198-204.

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

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

Volanti C, Matroule JY, Piette J. (2002). Involvement of oxidative stress in NF-kappaB activation in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 75(1):36-45.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, et al. (1998). NFκB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 281:1680–1683.

Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. (2001). Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene.* Jun 7;20(26):3420-7.

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

Yuan XM, Li W, Brunk UT, et al. (2000). Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 28(2):208-18.

Ziegler SA, Loucks C, Madsen SJ, et al. (2007). Heat shock protein 27 protects against aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy-induced apoptosis and necrosis in human breast cancer cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 26(3):173-83

## CAPÍTULO V

### CULTIVOS TRIDIMENSIONALES Y TFD

#### *V.1. Cultivos tridimensionales*

##### *V.1.1. Generalidades*

A lo largo de los últimos años, distintos tipos de cultivos tridimensionales han ganado importancia frente a los cultivos bidimensionales como nuevas alternativas y herramientas útiles para el estudio de tratamientos y el efecto de drogas como un intermedio entre el modelo *in vitro* e *in vivo*.

Algunos ejemplos de cultivos no convencionales actualmente en uso son cultivos en matrices tridimensionales utilizados para estudiar migración, invasión y diferenciación de células tumorales asociado a componentes de la matriz extracelular, sistemas de fibra hueca y cultivos *ex vivo* a partir de fragmentos tumorales. Sin embargo, estos modelos aún no están suficientemente estandarizados y/o dependen de la disponibilidad de tejido primario, cuya obtención y operatividad rutinaria puede ser complicada (Friedrich et al, 2009).

El avance en la búsqueda de nuevas matrices artificiales y medios de soporte para cultivos tridimensionales, por ejemplo para ingeniería de tejidos, ha resultado en mejoras notables en la reproducibilidad, manejo y confiabilidad de estos modelos. Claramente representando una herramienta sumamente útil, especialmente en la investigación en cáncer.

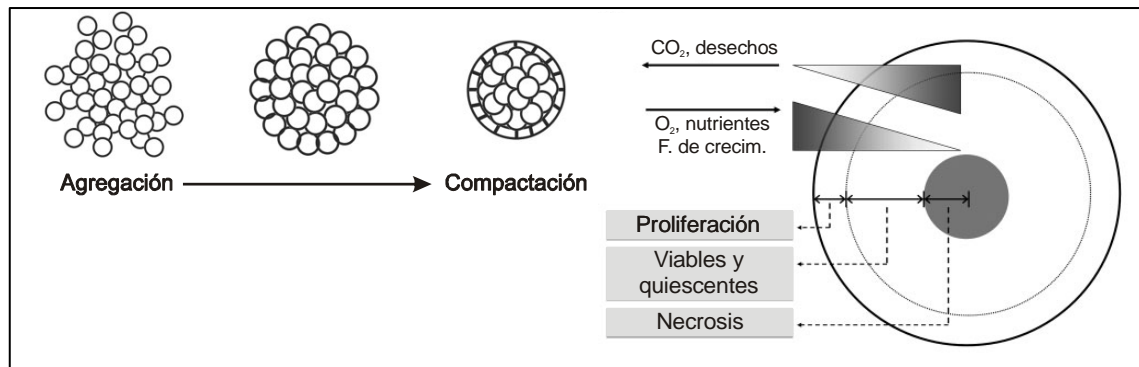
### V.1.2. Esferoides multicelulares

Entre estos modelos, se destaca el de esferoides multicelulares (EMCs), como uno de los mejor caracterizados. Tanto como para afirmar que permite simular a pequeña escala el panorama patofisiológico de un tumor en un paciente mostrando respuestas similares para distintas terapias. Los EMCs son una aplicación clásica del cultivo tridimensional (Ling y Chang, 2008).

Las células cultivadas como EMCs adquieren cierto grado de resistencia clínicamente relevante a drogas inductoras de apoptosis, simulando la quimioresistencia que se observa en tumores sólidos. Los EMCs son agregados compactos que asemejan nódulos o micrometástasis avasculares o regiones intervascuales de tumores sólidos grandes en cuanto a cinética de crecimiento, microambiente y ciertas características histomorfológicas. Reestablecen propiedades morfológicas y funcionales del tejido correspondiente *in vivo* con un patrón de diferenciación facilitado por el ensamblaje de componentes de la matriz extracelular e interacciones célula-célula y célula-matriz (Santini y Rainaldi, 1999; Khaitan et al, 2006; Dubessy et al, 2000).

A medida que aumenta el tamaño del EMC, la proliferación y la concentración de nutrientes y oxígeno establecen gradientes de distribución y una posible acumulación de catabolitos en las regiones centrales de la estructura (Fig. 17). Lo cual remite a áreas pobremente vascularizadas de tumores sólidos. Es importante tener en cuenta que EMCs relativamente grandes (500 a 600  $\mu\text{m}$  de diámetro) desarrollan áreas centrales de necrosis. Estas condiciones alteran los patrones de expresión de genes y la distribución de proteínas, afectando en consecuencia la respuesta a drogas o a tratamientos (Mueller-Klies, 2000; Oloumi et al, 2002).

El uso de EMCs como complemento de estudios basados en cultivos en monocapa implica verificar que las condiciones patofisiológicas de interés se vean efectivamente reflejadas en el modelo y garantizar la uniformidad en tamaño, forma y esfericidad. Tanto el tiempo de cultivo como la densidad inicial de células son factores condicionantes de las características deseables en un cultivo de EMCs.



**Fig. 17.** Formación y progresión de EMCs.

Existen actualmente distintas técnicas para la obtención de EMCs de modo reproducible y estandarizado, cada una con sus propias ventajas y desventajas (Lin y Chang, 2008).

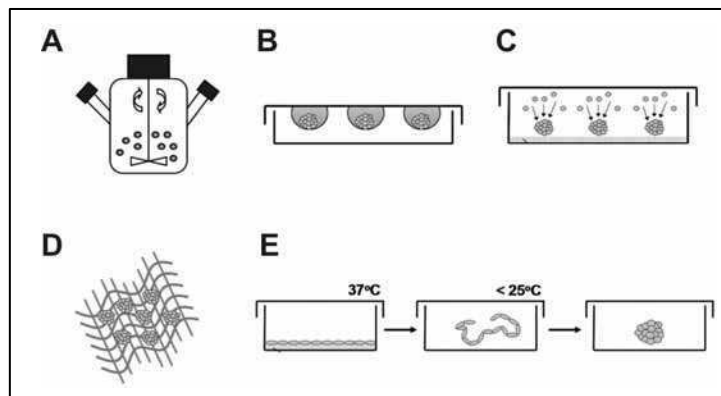
*Cultivo en agitación:* permite obtener cultivos a gran escala por largos períodos de tiempo en condiciones óptimas, pero requiere de grandes cantidades de medio de cultivo y del pasaje a un soporte de cultivo estacionario para el tratamiento y la determinación de parámetros como por ejemplo, el tamaño de los esferoides. No permite el monitoreo de esferoides individuales luego de un tratamiento (Fig. 18 A).

*Cultivo estacionario en gota suspendida:* Una gota de una suspensión celular con la densidad adecuada (30 a 50  $\mu\text{l}$  conteniendo 300 a 3000 células) se coloca sobre la tapa de una placa de cultivo de modo que quede suspendida para facilitar la agregación celular. Este método permite buena uniformidad con mínimas cantidades de medio de cultivo pero requiere es operativamente engorroso y requiere también transferir a otro soporte los EMCs para su utilización experimental (Fig. 18 B).

*Cultivo estacionario en sustratos no adherentes:* El cultivo en placas no adherentes o con pocillos en forma de “U” permite la formación de esferoides individuales aunque con un amplio rango de tamaños. Facilita el monitoreo y la manipulación de esferoides individuales. Otra variante de este método es el recubrimiento de los pocillos con agar, agarosa, matrigel o similar que provee un sustrato no adherente semisólido sobre el cual se siembra la suspensión celular. Puede

generar variaciones en los tamaños de los esferoides pero es muy poco costoso y operativamente sencillo (Fig. 18 C).

*Cultivo estacionario asistido por soportes artificiales:* Es especialmente útil para líneas celulares que no presentan facilidad espontánea para formar esferoides. Consiste en la utilización de microestructuras con una geometría definida sobre la cual se distribuyen las células por centrifugación adaptándose a la forma microscópica del molde. En otra variante, se pueden utilizar soportes a modo de mallas porosas sobre los cuales se forman agregados celulares, aunque con poca uniformidad de formas y tamaños. Placas termosensibles pueden ser utilizadas para forzar un cultivo en monocapa a suspensión y posterior compactación (Fig. 18 D y E).



**Fig. 18.** Métodos de cultivo para la obtención de EMCs. A. Cultivo en agitación. B. Cultivo en gota suspendida. C. Cultivo sobre sustratos no adherentes. D. Cultivo sobre microestructura de malla. E. Cultivo en placas termosensibles.

## V.2. Aplicaciones en TFD

Los EMCs representan un modelo *in vitro* relativamente simple que resulta muy adecuado para el estudio de distintas aproximaciones terapéuticas tales como la TFD.

El gradiente de disponibilidad de oxígeno característico de los EMCs genera poblaciones heterogéneas de células que difieren en su respuesta a las terapias dependientes de oxígeno como la TFD o la radiación ionizante, aspectos que no se reflejan en el cultivo en monocapa. Además del grado de oxigenación, también son factores condicionantes de la TFD la concentración y distribución del FS, la dosis

lumínica y la sensibilidad intrínseca del tipo celular, cuyo análisis en un modelo tridimensional resulta mejor aproximado a las condiciones fisiológicas *in vivo* (Madsen et al, 2006). Por otra parte, el modelo de EMCs simplifica significativamente la complejidad que aportan los factores dependientes del huésped como por ejemplo, la vasculatura tumoral, cuyo rol en la TFD es controversial.

El efecto antitumoral de la TFD está frecuentemente asociado al daño a la vasculatura tumoral. El equilibrio entre daño directo a las células tumorales y daño indirecto a través de la vasculatura depende de factores como la distribución relativa del fotosensibilizante en ambos compartimentos, sus propiedades farmacocinéticas y el intervalo entre la administración de la droga y la irradiación. La homogeneidad celular que presentan los esferoides y la ausencia de vasculatura, permite estudiar precisamente los efectos sobre las células tumorales y su diferenciación en la conformación tridimensional. Es por estas razones que el modelo de esferoides es relevante para el estudio de la TFD (Chen et al, 2006).

La primera utilización de EMCs como modelo *in vitro* para el estudio de TFD fue reportada en 1984 por Christensen et al, utilizando hematoporfirina como FS analizando su distribución y su efecto en la TFD. En estudios siguientes se caracterizó la respuesta a TFD en EMCs y se demostró que esferoides de células de carcinoma de colon humano eran más resistentes a TFD con hematoporfirina que las mismas células cultivadas en monocapa y que la sensibilidad al tratamiento decrecía conforme aumentaba el tamaño del esferoide. Incluso se observó que la efectividad de la TFD era dependiente de la distribución del FS en el esferoide (West, 1989; West et al, 1989).

Las áreas centrales de necrosis que se desarrollan en los EMCs están asociadas a zonas de hipoxia con muy baja concentración de O<sub>2</sub>, imprescindible para la acción de la TFD, pero no están relacionadas con el ancho de la franja de células activas del borde del esferoide (Dubessy et al, 2000). Tal es el efecto de la disponibilidad de O<sub>2</sub> que EMCs tratados con TFD-ALA e incubados en atmósfera de 95% O<sub>2</sub> muestran total disrupción de la viabilidad celular, independientemente del tamaño del esferoide mientras que con una incubación en 5% CO<sub>2</sub> la TFD solo resulta letal para esferoides de tamaños pequeños (<350µm) (Zelenkov et al, 2007).

La condición hipóxica es típica de la gran mayoría de los tumores y se caracteriza por la expresión del factor de transcripción HIF-1α. El complejo con capacidad de unión al ADN es un heterodímero de una subunidad HIF-1α y una

subunidad HIF-1 $\beta$  y participa en la regulación de genes de respuesta a hipoxia tales como VEGF. Es por lo tanto, un importante mediador en la angiogénesis y oxigenación tumoral.

El uso de EMCs en TFD permite un mejor entendimiento de la respuesta tumoral independientemente de la interacción con el sistema vascular.



## REFERENCIAS

- Chen B, Pogue BW, Hoopes PJ, et al. (2006). Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 16(4):279-305.
- Christensen T, Moan J, Sandquist T, et al. (1984). Multicellular spheroids as an in vitro model system for photoradiation therapy in the presence of Hpd. *Prog Clin Biol Res.* 170:381–390.
- Dubessy C, Merlin JM, Marchal C, et al. (2000). Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36, 179–192.
- Friedrich J, Seidel C, Ebner R, et al. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.* 4(3):309-24.
- Khaitan D, Chandna S, Arya MB et al. (2006). Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line: implications for tumor therapy. *J. Transl. Med.* 4, 12.
- Kunz-Schughart LA, Kreutz M y Knuechel R. (1998) Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int. J. Exp. Pathol.* 79, 1–23.
- Leek RD, Stratford I, Harris AL. (2005). The role of hypoxia-inducible factor-1 in three-dimensional tumor growth, apoptosis, and regulation by the insulin-signaling pathway. *Cancer Res.* 65(10):4147-52.
- Lin RZ, Chang HY. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J.* 3(9-10):1172-84.
- Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, et al. (2006). Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 38(5):555-64.
- Mueller-Klieser, W. (2000) Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit. Rev. Oncol./ Hematol.* 36, 123–139.
- Oloumi A, Lam W, Banath JP , et al. (2002). Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int. J. Radiat. Biol.* 78, 483–492.
- Santini MT y Rainaldi G. (1999). Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology.* 67, 148–157.

West CM, Moore JV. (1989). Flow cytometric analysis of intracellular hematoporphyrin derivative in human tumour cells and multicellular spheroids. *Photochem Photobiol.* 50(5): 665–669.

West CM. (1989). Size-dependent resistance of human tumour spheroids to photodynamic treatment. *Br J Cancer.* 59(4):510–514.

Zelenkov P, Baumgartner R, Bise K, et al. (2007). Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model. *J Neurooncol.* 82(1):49-60.

# *Objetivos*

---

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos de muerte y supervivencia celular luego de la TFD basada en ALA en células en cultivos bi y tridimensionales.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la síntesis, acumulación y localización intracelular de las porfirinas endógenas sintetizadas a partir de ALA.
- Evaluar la efectividad de la TFD basada en ALA y su posible modulación por agentes exógenos.
- Dilucidar la participación de las especies reactivas de oxígeno involucradas en el fotodaño.
- Investigar los cambios morfológicos y bioquímicos inducidos por esta terapia y sus consecuencias en la muerte y supervivencia celular en uno o varios ciclos de TFD-ALA, y su posible modulación.
- Evaluar la aplicabilidad del modelo de esferoides multicelulares en el estudio de la TFD-ALA.
- Estudiar las diferencias y los factores condicionantes de la efectividad de la TFD-ALA según la modalidad del cultivo.

# *Materiales y Métodos*

---

## I. Drogas y reactivos

### I.1. Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos para las distintas determinaciones y ensayos: ALA, MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolio) hidroetidina (HE), diclorohidrofluoresceín diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA), ioduro de dihexilcarbocianida (DiOC<sub>6</sub>), , glutatión reducido (GSH), triptofano, manitol, naranja de acridina (NA), bromuro de etidio (BE) y pepstatina A (PA), todos ellos de Sigma Chem. Co. (USA). Trans-1-(2'-Metoxivinil) pireno (MVP), Lyso Tracker Green, Mito Tracker Green, Hoescht, Annexin V-FITC e ioduro de propidio (IP) se obtuvieron de Invitrogen (Argentina). Los anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (USA). El kit para medición de proteínas Pierce BCA Protein Assay Kit fue obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc, USA. El resto de los reactivos empleados fueron de grado analítico, obtenidos de diversas fuentes comerciales.

### I.2. Fotosensibilizantes

El ácido 5-aminolevúlico (ALA) es uno de los precursores biológicos de la síntesis de porfirinas. Su administración en el medio de cultivo promueve la acumulación de porfirinas, principalmente Protoporfirina IX (PpIX). El ALA fue adquirido de Sigma Chem. Co. (USA). Para administrarlo al cultivo se prepararon soluciones madre en agua destilada 100 mM o 20 mM, y fue añadido al medio a una concentración final de 1 mM. Asimismo, es posible también la fotosensibilización mediante incorporación de PpIX exógena (Porphyrin Products, Frontier Scientific, USA). Para su administración al cultivo, se preparó una solución madre 50 µM, disolviendo el sólido en 10 µl de DMSO y completando luego el volumen con PBS.

Entre los numerosos fotosensibilizantes utilizados y aprobados para TFD se encuentra la Verteporfirina (Vp), la cual fue cedida por Visudyne® (Novartis AG, Suiza). Para la sensibilización de las células con Vp, se preparó una solución madre 0,25 mg/ml disolviendo el sólido en 10 µl de DMSO y completando luego el volumen con PBS.

### *1.3. Moduladores de síntesis de porfirinas*

La acumulación de porfirinas inducida por ALA exógeno puede ser modulada hacia mayores o menores niveles intracelulares. Uno de estos agentes moduladores es la Succinilacetona (SA), un inhibidor competitivo de la enzima ALA-D que cataliza la conversión de ALA a PBG. Esta droga fue preparada en agua destilada a una concentración 20 mM y añadida al cultivo simultáneamente con el ALA a una concentración final de 1 mM.

Por otro lado, la Deferroxamina (Dfx), un agente quelante de hierro, es capaz de inducir acumulación de precursores de porfirinas, impidiendo el último paso en la síntesis del hemo, la incorporación de hierro. La solución de Dfx fue preparada a una concentración de 20 mM en PBS y agregada al cultivo a una concentración final de 1 mM, 1 h antes de la incubación con ALA.

Ambos agentes fueron obtenidos de Sigma Chem. Co. (USA).

### *1.4. Antioxidantes*

Con el fin de modular el efecto de la TFD las células fueron tratadas con distintos agentes antioxidantes: glutatión reducido, manitol, triptófano, trolox y ascorbato. Todos ellos adquiridos de Sigma Chem. Co. (USA). Estos compuestos fueron disueltos en PBS para preparar soluciones madre entre 20 y 100 mM, excepto el triptófano que fue inicialmente disuelto en DMSO y luego diluido en PBS. Estos agentes secuestrantes fueron agregados al medio de cultivo libre de suero 1 h antes de la incubación con ALA.

## II. Cultivos celulares

### II.1. Líneas celulares

La línea celular utilizada para este trabajo corresponde a una histología de adenocarcinoma de pulmón. La línea tumoral A549, proviene de un adenocarcinoma de pulmón humano y fue iniciada en 1972 a partir de un carcinoma de células no pequeñas (NSCLC) de una paciente caucásica. Es una línea hipotriploide proveniente de un carcinoma de epitelio alveolar (Giard et al, 1973). Estas células tienen aspecto epitelial, con un citoplasma granular, gran capacidad de crecimiento, incluso independientemente de sustrato, carecen de inhibición por contacto, y presentan un tiempo de duplicación de aproximadamente 22 h (Fuente: ATCC).

### II.2. Determinación del número de células

El número de células empleado para cada ensayo se determinó utilizando una cámara de Neubauer y contando el número de células viables según el método de exclusión con Azul Tripán tomando alícuotas de 50  $\mu$ l de la suspensión celular más 50  $\mu$ l de Azul Tripán y 10  $\mu$ l de NaCl 0,25%.

### II.3. Cultivos bidimensionales

Los cultivos bidimensionales (en monocapa) se llevaron a cabo manteniendo las células en medio de cultivo MEM suplementado con un 5% de suero fetal bovino, gentamicina 80  $\mu$ g/ml y l-glutamina 2 mM a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> sobre sustratos adherentes. Los cultivos celulares fueron mantenidos en frascos de 75 cm<sup>2</sup> hasta 80% de confluencia. Para realizar los repiques correspondientes, las células fueron lavadas y tratadas con tripsina durante 5 min a 37°C, deteniendo el proceso con medio con suero y luego transferidas a frascos nuevos cada 48 o 72 h.



Para realizar los experimentos, las células se sembraron en densidades de  $5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  células/ml en placas de 24 o 6 pocillos y se las incubó para su crecimiento entre 24 y 72 h, según el ensayo.

#### *II.4. Cultivos tridimensionales*

Los cultivos tridimensionales (esferoides multicelulares, EMCs) se obtienen – entre otras formas – a partir de agregados celulares sobre sustratos no adherentes. Para obtener el cultivo en esferoides se sembró en placas de 6 o de 24 pocillos una densidad de  $5 \times 10^4$  cél/ml de MEM suplementado con un 5% de suero fetal bovino, gentamicina 80  $\mu\text{g/ml}$  y l-glutamina 2 mM, sobre un colchón de agar 3%-RPMI (1:1) reemplazando dos tercios del medio por medio fresco cada 48 h. Los experimentos se realizaron a los 7 días de iniciado el cultivo.

### III. Determinación de Porphirinas

#### III.1. Extracción de porfirinas intracelulares

La acumulación de porfirinas inducida por la incubación de las células con ALA o un FS exógeno puede ser cuantificada espectrofluorométricamente. Las células previamente incubadas en presencia de ALA o PpIX en las concentraciones y tiempos propios de cada experimento, se lavaron con PBS y se trataron con HCl 5% durante 20 min a 37°C para extraer las porfirinas intracelulares.

Para el caso de fotosensibilización con Vp, las células se lavaron con PBS y se trataron con Metanol:Agua (1:1) durante 20 min a 37°C para extraer la Vp incorporada durante la incubación.

#### III.2. Medición de porfirinas intra y extracelulares

Las determinaciones de fluorescencia se realizaron en espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55 con una longitud de onda de excitación de 406 nm y de 604 nm de emisión, en el caso de fotosensibilización con ALA (inducción de PpIX endógena) o PpIX exógena, utilizando una solución de protoporfirina IX (PpIX) de concentración conocida como estándar de referencia. Mientras que para la cuantificación de Vp incorporada se utilizó una longitud de onda de excitación de 420 nm y de 690 nm de emisión utilizando una solución de Vp de concentración conocida como estándar de referencia.

Para la determinación de porfirinas en el medio extracelular los medios sobrenadantes (0,5 ml) fueron diluidos con 1,5 ml de HCl 6,7% de modo de lograr una proporción final de HCl 5%, que permite la solubilización de las porfirinas.

Para cuantificar las porfirinas intracelulares en los extractos se utilizó el siguiente cálculo:

$$\text{ng porfirinas} / 10^5 \text{ células} = ((UF-B) \times \Delta) / UF \text{ St} \times 1,535 \times 2\text{ml} \times 1000$$

En el cual:

*UF*: Unidades arbitrarias de fluorescencia de la muestra

*B*: Unidades arbitrarias de fluorescencia del blanco

$$\Delta = 2 \times A^{\text{máx}} - (A^{380} + A^{430})$$

Donde:  $A^{\text{máx}}$ ,  $A^{380}$ ,  $A^{430}$ : Absorbancia de una solución de PpIX de concentración desconocida.

*UF St*: Unidades arbitrarias de fluorescencia del estándar (0,005mg/ml)

1,535: Factor de conversión a  $\mu\text{g/ml}$  PpIX

2ml: Volumen final del extracto

1000: factor de conversión de mg a  $\mu\text{g}$

La determinación de  $\mu\text{g}$  totales de Vp incorporados en las células se realizó por espectrofluorimetría utilizando estándares de Vp de concentración conocida y se aplicó el siguiente cálculo

$$\mu\text{g Vp} / 10^5 \text{ céls} = ((UF-B) \times 0,005\text{mg/ml}) / UF \text{ St} \times 2\text{ml} \times 1000$$

En el cual :

*UF*: Unidades arbitrarias de fluorescencia de la muestra

*B*: Unidades arbitrarias de fluorescencia del blanco

*UF St*: Unidades arbitrarias de fluorescencia del estándar (0,005mg/ml)

2ml: Volumen final del extracto

1000: factor de conversión de mg a  $\mu\text{g}$

#### *IV. Terapia fotodinámica*

##### *IV.1. Fotosensibilización*

Para aplicar la TFD se reemplazó el medio de cultivo por medio sin suero para minimizar la externalización de porfirinas (Böhmer y Morstyn, 1985; Ogino et al, 2011). Como procedimiento estándar se agregó ALA a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C durante 3 h en oscuridad. Se utilizó una densidad celular de  $1 \times 10^5$  células/ml.

##### *IV.2. Irradiación*

Luego de la incubación, se retiró el medio conteniendo el ALA reemplazándolo por medio fresco y las células fueron irradiadas en un cuarto oscuro ubicando las placas en un banco de dos tubos fluorescentes (Osram L 18W/765) sobre una placa de vidrio ubicada a una distancia de 21 cm de la fuente de luz. El rango de emisión del sistema es de de 400 a 700 nm, con su mayor potencia a 600 nm ( $0,4 \text{ J/cm}^2$ ).

##### *IV.3. Viabilidad celular*

Concluida la irradiación, las células fueron incubadas 1 h a 37°C en oscuridad. El porcentaje de células viables una hora después de la TFD fue determinado por el método de MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5- bromuro de difeniltetrazolio) (Wilson et al, 1990) y fosfatasa ácida (APH) (Friedrich et al, 2007). El ensayo de MTT se basa en la capacidad de las mitocondrias para convertir el MTT en formazán, un producto coloreado cuya intensidad puede medirse espectrofotométricamente. Se llevó a cabo como un procedimiento estándar en placas de 24 pocillos agregando al medio 50  $\mu\text{l}$  de una solución 5 mg/ml del reactivo e incubando durante 2 h. Al cabo de este tiempo, se

agregaron 0,5 ml de DMSO a fin de solubilizar los cristales de formazán producto de la reacción para su determinación colorimétrica (560 nm) en lector de ELISA.

Este ensayo fue adaptado al modelo de esferoides disgregándolos previamente con tripsina y permitiendo la adhesión de las células provenientes de los esferoides en placas nuevas durante 1 h.

El ensayo de APH se llevó a cabo en ambas modalidades del cultivo de manera similar, ya que no requiere la disociación del esferoide. Luego de la TFD las células se lavaron dos veces con PBS dejando 100  $\mu$ l en el último lavado. Luego se agregaron 100  $\mu$ l de buffer de ensayo el cual contiene Acetato de sodio 0,1 M, Tritón X-100 0,1% y p-nitrofenilfosfato 2 mg/ml. Al cabo de una incubación de 1,5 h se agregaron 10  $\mu$ l de NaOH 1 N y se registró la absorbancia en lector de ELISA a 405 nm.

## V. Microscopía

### V.1. Microscopía Convencional

#### V.1.1. Tinción morfológica en monocapa: Azul de toluidina.

El azul de toluidina es un colorante de contraste que permite visualizar la estructura general de la célula mediante una reacción metacromática con componentes acídicos de la célula. Para realizar esta tinción las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles en el fondo de placas de 6 pocillos y tratadas con TFD como se describió previamente. Luego de 1 h fueron lavadas y fijadas con formol 4% en PBS durante 20 min a 4°C y teñidas con azul de toluidina 0,5 % en agua destilada durante 3 min. Los cubreobjetos se lavaron hasta desaparición del color con agua destilada y se dejaron secar por 24 h para luego montarlos en portaobjetos con bálsamo de Canadá.

#### V.1.2. Tinciones histológicas en esferoides

Los esferoides tratados con distintas dosis de TFD fueron resuspendidos en PBS luego de 1 h y marcados con azul de toluidina para evitar la pérdida del material. Posteriormente, se fijaron en formol 10% en PBS y se procesaron para su inclusión en

parafina. En cortes histológicos seriados se realizaron las tinciones con hematoxilina y eosina y del ácido periódico de Schiff (PAS) para mucopolisacáridos PAS. Se realizó inmunomarcación para Ki-67 y HIF-1 $\alpha$  utilizando un anticuerpo policlonal de cabra anti-Ki-67 (M19), 1:400 (Santa Cruz Biotechnology, CA) y anti HIF-1 $\alpha$ , 1:100 (Cell Signalling, USA) según la técnica de Vectostain Elite ABC immunoperoxidase system (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

## V.2. Microscopía de epifluorescencia

### V.2.1. Hoechst

El Hoechst 33258 es una tinte intercalante que permite visualizar los núcleos de las células mediante fluorescencia azul ( $\lambda$  excitación: 350nm,  $\lambda$  emisión: 460nm). Para realizar este ensayo, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles en el fondo de placas de 6 pocillos y tratadas con TFD como se describió previamente. Luego de 1 h se lavaron con metanol frío (-20°C) y luego se incubaron en metanol a -20°C durante 7 min. Posteriormente se realizó la permeabilización con Tritón X-100 0,1% en PBS a temperatura ambiente durante 20 min. Se lavaron las placas con PBS en 3 ciclos de 5 min y se agregaron 40  $\mu$ l de una solución 0,5  $\mu$ g/ml de Hoechst 33258. Luego de 3 min se montaron los cubreobjetos sobre una gota de PBS y se analizaron al microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, equipado con una lámpara de Mercurio HBO 100 W).

### V.2.2. Naranja de Acridina y Bromuro de etidio

La tinción con Naranja de Acridina ( $\lambda$  excitación: 510 nm,  $\lambda$  emisión: 595 nm) y Bromuro de etidio ( $\lambda$  excitación: 502 nm,  $\lambda$  emisión: 526 nm) (NA/BE) permite diferenciar morfológicamente entre células viables, viables apoptóticas, apoptóticas y necróticas según se indica en la Tabla 1 (Kosmider et al, 2004). El NA penetra en células tanto viables como muertas y se intercala en el ADN doble cadena emitiendo fluorescencia verde y también fluorescencia naranja cuando se une a lisosomas o a

ADN de simple cadena. El BE es un agente intercalante que emite fluorescencia naranja-roja en células con la membrana dañada en estados avanzados de apoptosis o necrosis.

Fluorescencia	Clasificación
Verde	Viable
Verde + condensación nuclear + cuerpos apoptóticos	Viable apoptótica
Naranja + condensación nuclear	Apoptótica
Naranja uniforme	Necrótica

**Tabla 1.** Clasificación de la viabilidad celular según tinción con NA/BE.

Las células sembradas en placas de 6 pocillos o cultivadas como esferoides previamente tratadas con TFD, como se describió previamente, fueron tripsinizadas y la suspensión celular obtenida se agregó al medio sobrenadante de cada pocillo ya que éste puede contener células muertas que deben incluirse en la cuantificación. La suspensión celular se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm y se resuspendió en 500 µl a una densidad aproximada de  $1 \times 10^6$  céls./ml. Se tomó una alícuota de 50 µl de la suspensión y se agregaron 2 µl de la mezcla de ambos fluorocromos (50 µg/ml cada uno). Se contaron al menos 200 células para cada tratamiento al microscopio de fluorescencia y se determinaron los porcentajes correspondientes a cada clase.

### V.2.3. Sondas específicas para mitocondrias y lisosomas

La visualización de la morfología de mitocondrias y lisosomas se llevó a cabo mediante la utilización de sondas fluorescentes específicas: MitoTracker Green ( $\lambda$  excitación: 490 nm,  $\lambda$  emisión: 516 nm) y LysoTracker Green ( $\lambda$  excitación: 504 nm,  $\lambda$  emisión: 511 nm). Ambas fueron adquiridas de Molecular Probes, Invitrogen, (Argentina). Para ello, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles en el fondo de placas de 6 pocillos. Se cambió el medio a medio sin suero para la incubación con ALA y/o la posterior TFD y luego nuevamente para el agregado de la sonda a una concentración final de 150 nM para ambos fluorocromos. Se incubó 30 min a 37°C y se

visualizó la fluorescencia montando los cubreobjetos sobre portaobjetos con una gota de PBS.

En una técnica alternativa para visualizar la liberación de las sondas al citoplasma durante la irradiación, los fluorocromos se agregaron al medio en los últimos 30 min de las 3 h de incubación con ALA y la irradiación se realizó en presencia de las sondas.

#### V.2.4. *Monodansilcadaverina*

La monodansilcadaverina (MDC) es un compuesto fluorescente que se emplea en la detección de vacuolas ácidas ( $\lambda$  excitación: 380 nm,  $\lambda$  emisión: 525 nm) (Munafó y Colombo, 2001). Las células cultivadas sobre cubreobjetos asignadas como control (sin tratar, en medio completo) o las células tratadas con TFD o con Rapamicina (inductor de autofagia, 24 h, 50  $\mu$ g/ml) se marcaron con MDC 500 nM en PBS 30 min a 37°C. Luego de dos lavados con PBS las células se visualizaron al microscopio de fluorescencia.

#### V.3. *Microscopía Confocal*

La fluorescencia propia de la PpIX y de las sondas específicas para organelas mencionadas previamente se analizó por microscopía confocal, a fin de visualizarlas simultáneamente y en planos definidos. Para ello, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles en el fondo de placas de 6 pocillos, incubadas con ALA durante 18 h a 37°C y con las sondas MitoTracker Green y LysoTracker Green durante 15 min a 37°C como se describió previamente. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con una gota de PBS y se analizaron al microscopio confocal (Nikon D-Eclipse C1, objetivo: 60x Plan Apo Oil NA 1.40, IByME).

Para la visualización de la fluorescencia propia de la PpIX y su distribución en los esferoides, el cultivo fue resuspendido en 400  $\mu$ l de agar:RPMI (1:1) tibio y montado sobre un portaobjetos con un cordón de esmalte dentro del cual se depositó la gota de agar. Los esferoides se analizaron en distintos planos bajo el microscopio confocal.



#### V.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Para el análisis ultraestructural de las células se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10C (LANAIS, Facultad de Medicina). Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas a una concentración de  $1 \times 10^5$  céls./ml. Luego se centrifugaron y el pellet se fijó en el tubo eppendorf sobre hielo a 4°C en 500 µl de fijador provisto por el LANAIS (Glutaraldehido 2.5% en Buffer Fosfato 0.1 M). Se centrifugó 5 min a 3000 rpm y se realizaron dos lavados de 10 min en hielo con buffer fosfato 0.1 M provisto por el LANAIS. Se realizó una segunda fijación en Tetróxido de Osmio al 1% en BF sobre hielo 1 h 30 min seguido de dos lavados en agua destilada de 15 min cada uno. Luego se realizó la refijación y contraste en Acetato de Uranilo 5 % en agua destilada durante 2 h. Siguió lavados en Agua destilada, dos de 15 min cada uno y luego la deshidratación: Alcoholes de graduación creciente 2 lavados de 15 min cada uno (50°, 70°, 96° y 100°). Finalmente dos baños de 15 min cada uno con Óxido de Propileno.

La inclusión se realizó en partes iguales de Óxido de Propileno y resina Durcupan 4 h a temperatura ambiente y luego Durcupan puro toda la noche a temperatura ambiente en desecador. Se realizó la orientación de cada muestra en los moldes de inclusión y se dejó en estufa de polimerización durante tres días a 60°C.

Sobre los tacos tallados se realizaron los cortes semifinos en el Ultramicrotomo Reichert Jung, que se levantan en portaobjetos para teñir con Azul de Toluidina y luego observar al microscopio óptico. Una vez elegida la zona de interés se retallaron y se realizaron los cortes ultrafinos para ser levantados en las grillas y observar al MET. Se realizó un contraste con Plomo sobre cada grilla para observar mejor las estructuras.

## VI. Citometría de flujo

Para los distintos ensayos de citometría de flujo se utilizó un equipo Partec PAS III (IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica) para detectar la fluorescencia intracelular de los reactivos.

### VI.1. Marcado con Anexina e Ioduro de propidio

Se utilizó la técnica de Annexin-V FITC para evaluar apoptosis mediante la externalización del fosfolípido de membrana, fosfatidil serina, combinado con Ioduro de propidio (IP) que ingresa a las células cuya membrana está severamente dañada. Por ello, esta técnica permite distinguir cuatro tipos de células según se indica la Tabla 2.

La marcación se realizó con células provenientes de monocapas o esferoides tripsinizados, 1 h después del tratamiento, en suspensiones celulares de aproximadamente  $1 \times 10^6$  céls./ml. Las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 250  $\mu$ l de buffer de binding. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l de suspensión celular a la cual se le agregó 5  $\mu$ l de annexin V-FITC y 3  $\mu$ l de IP. Luego de una incubación de 15 min a temperatura ambiente se agregaron 400  $\mu$ l de buffer de binding y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Partec PAS III dentro de 1 h de teñidas (Separovic et al, 1998).

Marca		Annexina V-FITC	
		-	+
IP	+	Necrosis	Apoptosis tardía
	-	Viables	Apoptosis temprana

**Tabla 2.** Clasificación de la viabilidad celular según marcación con An/IP.

## VI.2. Marcado con sondas específicas para ROS

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

### VI.2.1. Oxígeno singulete

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

### VI.2.2. Anión superóxido

La producción de  $\text{O}_2^-$  se midió 1 h luego del tratamiento incubando las células en 500  $\mu\text{l}$  de PBS con HE 2  $\mu\text{M}$  ( $\lambda$  excitación: 510 nm;  $\lambda$  emisión: 590 nm), durante 30 min a 37° C, en oscuridad, luego se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de PBS y se analizaron inmediatamente.

### VI.2.3. Peróxidos

La producción de peróxidos $^-$  se midió 1 h luego del tratamiento incubando las células en 500  $\mu\text{l}$  de PBS con  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  2  $\mu\text{M}$  ( $\lambda$  excitación: 485nm;  $\lambda$  emisión: 530 nm), durante 30 min a 37° C, en oscuridad, luego se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de PBS y se analizaron inmediatamente.

### *VI.3. Marcado con sondas indicadoras de despolarización mitocondrial*

Para evaluar el daño mitocondrial las células se incubaron 1 h después del tratamiento con sondas que son específicamente retenidas y fluorescen en mitocondrias cuya membrana mantiene una adecuada polarización. Se utilizó DiOC6 30 nM ( $\lambda$  excitación: 484 nm;  $\lambda$  emisión: 511 nm) o Rh 123 10  $\mu$ M ( $\lambda$  excitación: 511 nm;  $\lambda$  emisión: 534 nm) que fueron agregadas a 500  $\mu$ l una suspensión celular en PBS y luego incubadas durante 30 min a 37° C. Se agregaron 500  $\mu$ l de PBS y se analizaron inmediatamente.

### *VI.4. Software*

El análisis de los histogramas y los diagramas de densidades celulares para cada ensayo se analizó utilizando el programa WinMDI 2.9 (Cytometry Core Facility, Scripps Research Institute, California, USA).

## *VII. Western blot*

### *VII.1. Tratamientos*

Para los ensayos de western blot, las células fueron cultivadas y tratadas con TFD en placas de 10 cm a fin de obtener una adecuada cantidad de proteínas en los extractos.

### *VII.2. Extractos*

Las células tratadas fueron tripsinizadas 1 h luego del tratamiento, obteniendo una suspensión celular de aproximadamente  $2 \times 10^6$  céls./ml. Para realizar la extracción de proteínas se centrifugaron las células a 4° C durante 5 min a 2500 rpm, luego fueron

resuspendidas en 1 ml de PBS frío, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y en el caso de los extractos citosólicos se resuspendieron en 160 µl de buffer de lisis (Tris 20 mM pH: 8.0, NaCl 150 mM, NaF 100 mM, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, PMSF 1 mM y cóctel inhibidor de proteasas). Se homogeneizaron y se incubaron en hielo durante 25 min. Por último se realizó una centrifugación a 4° C durante 20 min a 15.000 g para precipitar las mitocondrias y se prepararon alícuotas del sobrenadante que se conservaron a -70° C hasta ser utilizadas. Para obtener los extractos nucleares el pellet de células se resuspendió en 1 ml de Tris-HCl 10 mM con cóctel inhibidor de proteasas y se disgregó con una jeringa. La integridad de los núcleos se verificó por microscopía. Los núcleos se centrifugaron 5 min a 3000 rpm y el pellet se resuspendió en buffer de lisis y se incubó 20 min en hielo. Se realizó una centrifugación a 13500 g, 4°C, 30 min y se prepararon alícuotas del sobrenadante que se conservaron a -70° C.

### *VII.3. Determinación de proteínas*

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

### *VII.4. Electroforesis*

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

### VII.5. *Transferencia*

Una vez finalizada la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa en un equipo de electrotransferencia de acuerdo a lo descrito por Towbin et al, 1979, (buffer de corrida 1X y metanol 20%). El amperaje se mantuvo constante a 150 mA y voltaje fue de hasta 25 Volts durante 90 min. Al finalizar la transferencia, se verificó el proceso mediante tinción con rojo Ponceau en la membrana y azul de coomassie en el gel.

### VII.6. *Revelado*

Luego de la transferencia la membrana se bloqueó durante 1 h con una solución de glicina al 2% y leche en polvo al 3%, a 10° C. Al finalizar el bloqueo la membrana se lavó con PBS-Tween 0,05% en dos veces de 5 min y se incubó con el anticuerpo deseado durante tiempos variables (1,5 h o toda la noche).

Los anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnology, CA o Cell Signalling, USA) se utilizaron en las siguientes diluciones realizadas en PBS-Tween 0,01%:

- Anti citocromo c: dilución 1:500
- Anti Bcl-2: dilución 1:200
- Anti caspasa -3: dilución 1:200
- Anti caspasa -8: dilución 1:200
- Anti LC3: dilución 1:500
- Anti IκB: dilución 1:200
- Anti NFκB: dilución 1:200
- Anti b-actina: dilución 1:1000

Luego de la incubación con el anticuerpo primario en la concentración mencionada, la membrana fue lavada con PBS-Tween 0,05% (un lavado de 10 min y tres de 5 min) y posteriormente incubada con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-

conejo (dilución 1:4000 en PBS-Tween 0,01%) durante 1,5 h. Luego de este tiempo se realizaron dos lavados de 10 min y dos lavados de 5 min con PBS-Tween 0,05%.

Para la detección de las proteínas se utilizó el sistema de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham, GE Healthcare). Una vez agregado el reactivo sobre la membrana se lo dejó reaccionar durante 1 min. Luego la membrana se puso en contacto con la placa radiográfica y se dejó exponiendo durante distintos tiempos, dependiendo de la señal emitida por cada membrana. Posteriormente las placas se colocaron en solución reveladora durante 3 min.

### *VII.7. Software*

Las bandas fueron analizadas utilizando el software Scion Image (Scion Corporation, USA), luego de ser escaneadas.

### *VIII. Estadística*

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

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

## REFERENCIAS

- Böhmer RM, Morstyn G. (1985). Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature, and cell size. *Cancer Res.* 45(11 Pt 1):5328-34.
- Friedrich J, Eder W, Castaneda J., Et al. (2007). A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen.* 12(7):925-37.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 51(5):1417-23.
- Kosmider B, Zyner E, Osiecka R, et al. (2004). Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutat Res.* 12;563(1):61-70.
- Munafo, D. B. y Colombo, M. I. (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J. Cell Sci.* 114, 3619-3629.
- Ogino T, Kobuchi H, Munetomo K, et al. (2011). Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. *Mol Cell Biochem.* 358(1-2):297-307.
- Paz ML, González Maglio DH, Weill FS, et al. (2008). Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 24(3):115-22.
- Posner GH, Lever JR, Miura K, et al. (1984). A chemiluminescent probe specific for singlet oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123(2):869-73.
- Separovic D, Mann KJ, Oleinick NL. (1998). Association of ceramide accumulation with photodynamic treatment-induced cell death. *Photochem. Photobiol.* 68(1):101-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 76(9):4350-4.
- Wilson JK, Sargent JM, Elgie AW, et al. (1990). A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *Br J Cancer,* (62):189-194.



# *Resultados y Discusiones*

---

La TFD-ALA es un tratamiento que se sustenta en tres ejes principales: La acumulación endógena de porfirinas, la llegada de la luz y la generación de especies reactivas de oxígeno. Estos tres componentes convergen en un camino que llevará la célula a un proceso de muerte o a la supervivencia. En los ensayos siguientes se propone investigar el comportamiento de las células respecto de cada uno de estos agentes para dilucidar qué es lo que determina un camino de muerte celular – y en ese caso, cuál de ellos – o de supervivencia frente a la TFD.

## **PRIMERA PARTE**

### **CULTIVOS BIDIMENSIONALES**

---

#### *CAPÍTULO I*

##### *TFD a partir de porfirinas endógenas y exógenas*

Uno de los principales ejes que permiten la acción de la TFD-ALA es la capacidad del sistema en estudio de incorporar el precursor, sintetizar y retener porfirinas.

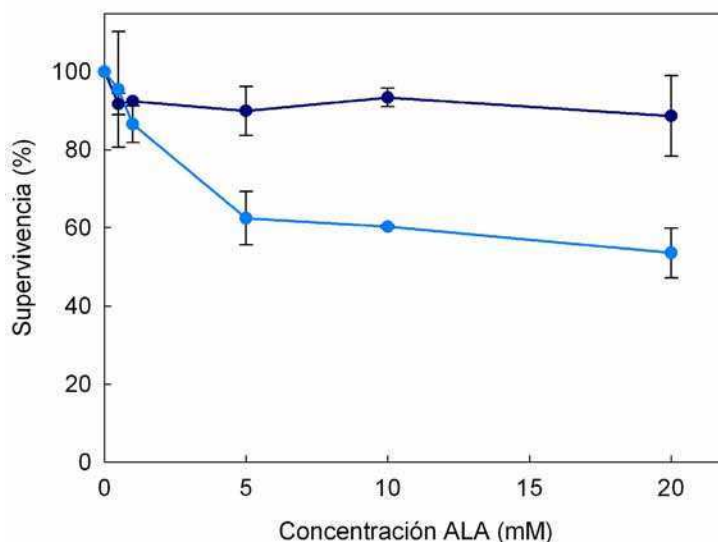
El ALA suplementado exógenamente es captado por las células y se metaboliza rápidamente incorporándose en el camino biosintético del hemo, acumulándose preferencialmente en la forma de PpIX.

El objetivo general de los siguientes estudios es caracterizar cualitativamente y cuantitativamente la acumulación de porfirinas en la línea A549 y establecer las condiciones óptimas para el tratamiento fotodinámico.

### I.1. TFD con porfirinas endógenas a partir de ácido 5-aminolevúlico (ALA)

#### I.1.1. Toxicidad del ALA en oscuridad

A fin de seleccionar una concentración de ALA que no presente efectos citotóxicos en las células, se realizó una curva de supervivencia, utilizando concentraciones crecientes de ALA durante 3 horas y 24 horas de incubación. Los resultados se grafican en la Fig I.1.



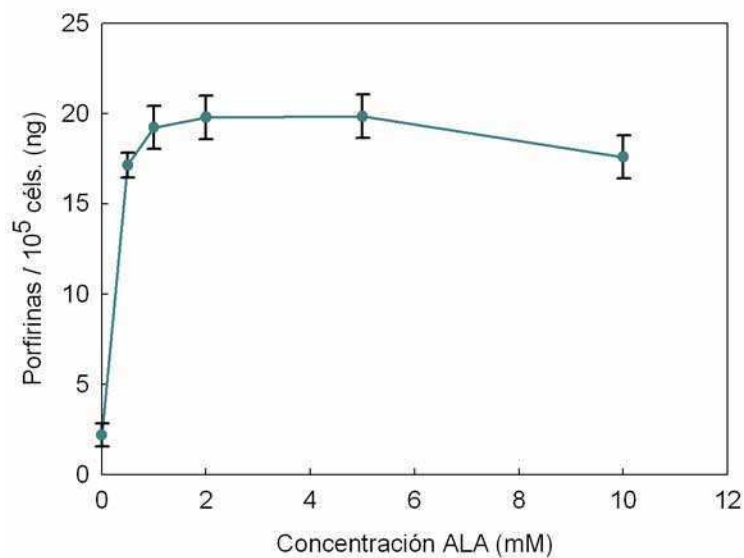
**Fig. I.1.** Curva de supervivencia a ALA en oscuridad. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de ALA (0,1 a 20 mM) en medio sin suero y luego de 3 h o 24 h se realizó el ensayo de viabilidad celular de MTT según se detalla en M&M. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar. (●: Inc. 3 h con ALA, ●: Inc. 24 h Con ALA).

Fue posible observar que la viabilidad de las células según se determinó por el ensayo de MTT no se vió mayormente afectada en el rango de concentraciones probado (0,1-20mM). Con un tiempo de incubación de 3 h la viabilidad no disminuyó más del 10 %, por lo cual, el ALA por sí mismo no afectaría el estudio de la supervivencia celular post-TFD en el rango de concentraciones de interés para la síntesis de porfirinas.

Sin embargo para tiempos largos de incubación (24 h), la viabilidad celular decrece en la medida que aumenta la concentración de ALA, llegando a un 60 % con ALA 5 mM.

### I.1.2. Curva de concentración de ALA

La capacidad de síntesis de porfirinas en las células se encuentra finamente regulada, en consecuencia, independientemente de la concentración de ALA que se suministre exógenamente, se llega a una saturación. El objetivo del siguiente experimento fue hallar la concentración a la cual las células rinden su mayor síntesis de porfirinas antes de alcanzar dicho plateau. Los resultados se grafican en la Fig I.2.

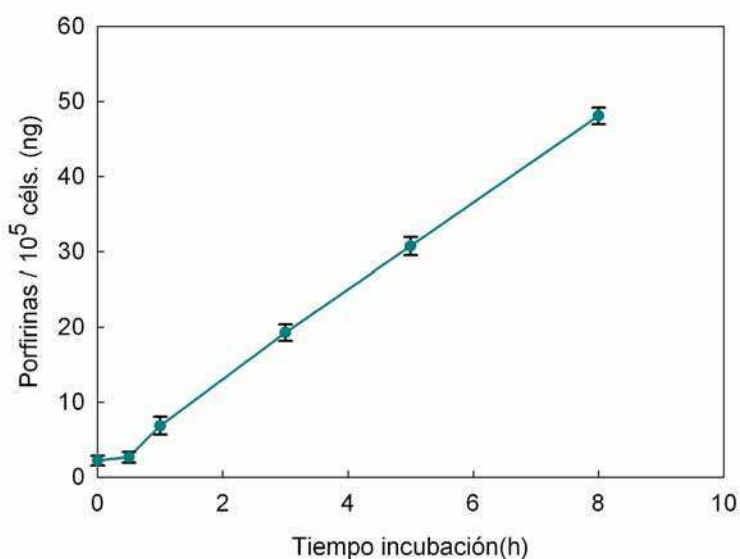


**Fig. I.2.** Curva de acumulación de porfirinas luego de incubación con concentraciones crecientes de ALA (0,5 a 10 mM). Las células fueron incubadas con ALA en medio sin suero y luego de 3 h se realizó la extracción y cuantificación de porfirinas intracelulares. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Se observa un rápido incremento en la concentración de porfirinas a medida que aumenta la concentración de ALA suministrado al medio de incubación. La saturación se alcanza con 1 mM de ALA, y el plateau se mantiene hasta una concentración de 5 mM, ya que a mayores concentraciones el ALA comienza a ejercer sus efectos citotóxicos. No se detectaron valores extracelulares significativos de PpIX en el medio de cultivo.

### I.1.3. Curva de tiempo de incubación con ALA

El tiempo de incubación es otro de los factores que determina la cantidad de porfirinas acumuladas y por lo tanto, la susceptibilidad de las células de responder a la TFD. Por ello, se evaluaron distintos tiempos de incubación, tomando la concentración de 1 mM y realizando las determinaciones luego de distintos tiempos de incubación (Fig. I.3).



**Fig. I.3.** Cinética de acumulación de porfirinas a distintos tiempos de incubación con ALA 1 mM. Las células fueron incubadas con ALA 1 mM durante tiempos entre 0,5 y 8 h en medio sin suero. Al finalizar la incubación, se realizó la extracción y cuantificación de porfirinas intracelulares. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Puede observarse un aumento lineal en la síntesis de porfirinas conforme aumenta el tiempo de incubación hasta las 8 h, con un breve periodo lag de 30 min.

De acuerdo a los resultados obtenidos de ambas determinaciones de síntesis de porfirinas en concentración y tiempo de incubación con ALA, se estableció como condiciones adecuadas para realizar el tratamiento fotodinámico una concentración 1 mM y 3 h de incubación. Bajo estas condiciones, se obtiene una adecuada síntesis de porfirinas y están en concordancia con lo reportado previamente en bibliografía (Matthews et al, 1989; Kamoshima et al, 2011).

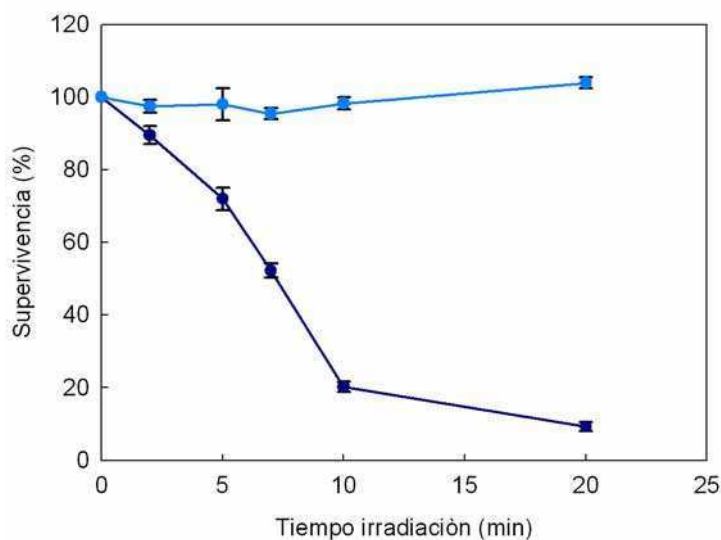
#### *1.1.4. Determinación de dosis lumínica 50*

Se entiende por dosis lumínica 50 ( $DL_{50}$ ) al tiempo de irradiación necesario para alcanzar una disminución del 50% en la viabilidad inicial luego del tratamiento fotodinámico.

Habiendo establecido previamente como sistema standard de incubación una concentración de ALA 1 mM y un tiempo de 3 h, se procedió entonces a incorporar el segundo eje que conforma la TFD: la irradiación lumínica. En nuestro caso, regulamos la dosis lumínica variando el tiempo de exposición a la luz de las células sensibilizadas previamente con las porfirinas. El objetivo de estos ensayos es la elaboración de una curva dosis-respuesta para determinar la  $DL_{50}$ .

Para este fin, las células que acumularon las porfirinas endógenas mediante la incubación con ALA, fueron expuestas a la acción de la luz proveniente de un banco de dos tubos fluorescentes (Osram L 18W/765) durante distintos tiempos (dosis) de irradiación y 1 h post tratamiento se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (Fig.I.4).

Se observa que la luz por sí sola no afecta a las células, ya que la viabilidad se mantiene alrededor del 100% en todos los tiempos de irradiación. En cambio cuando se irradian las células, la supervivencia disminuye considerablemente de manera dosis lumínica-dependiente. La interpolación en la curva para el 50% de supervivencia determina la  $DL_{50}$  que corresponde a un tiempo de 7 min. Cabe destacar que es un ensayo muy reproducible.



**Fig. I.4.** Curva de supervivencia celular 1 h post-TFD. Las células se incubaron con ALA 1 mM en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos en un banco de tubos fluorescentes. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. (●: Sin ALA, ●: Con ALA). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

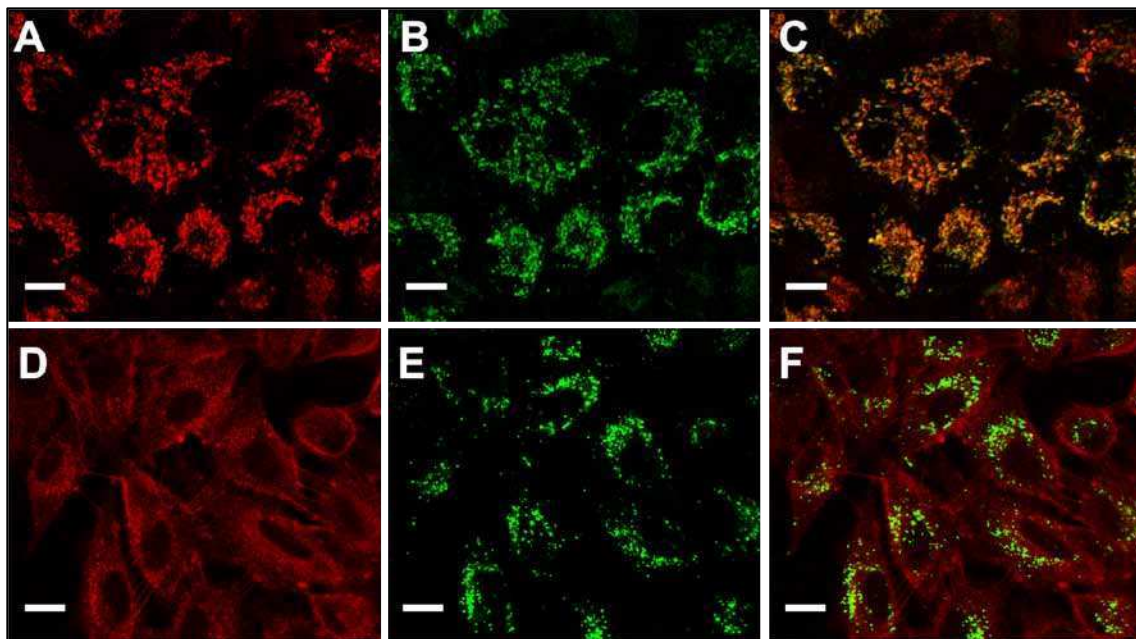
#### *1.1.5. Localización subcelular de PpIX endógena*

La administración de ALA induce la síntesis y acumulación de PpIX, FS precursor del grupo hemo. Además de la evaluación cuantitativa de la acumulación de PpIX en las células expuestas a ALA, es también fundamental caracterizar su distribución y localización intracelular. De acuerdo a sus características, cada FS presenta sitios subcelulares preferenciales de localización, lo que a su vez condiciona en gran medida el sitio primario de daño celular debido a la breve vida media de las moléculas activadas, y el subsecuente mecanismo de muerte celular (Ji et al, 2006). Aquellos FSs que se acumulan preferencialmente en mitocondrias o retículo endoplasmático generalmente promueven la apoptosis, mientras que los que afectan la membrana plasmática o los lisosomas predisponen a la muerte por necrosis (Kessel et al, 1997). Se debe tener en cuenta sin embargo, que se puede producir una relocalización intracelular del FS hacia otros sitios (Rodal et al, 1998).

La distribución intracelular de PpIX se estudió mediante microscopía confocal. Este método es considerado como una técnica más confiable y ventajosa con respecto a la microscopía de fluorescencia convencional para estudiar la localización de agentes FSs, ya que permite imágenes de mayor resolución, el análisis en tres dimensiones y la

posibilidad de utilizar dos filtros de distintas longitudes de onda al mismo tiempo (Wang et al, 2010).

Con este fin, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles e incubadas con ALA 1 mM durante 18 h en medio sin suero. Luego fueron cargadas con sondas específicas para marcación fluorescente de mitocondrias y lisosomas. Mediante microscopía confocal fue posible visualizar ambas marcas fluorescentes, aquella correspondiente a la fluorescencia roja propia de la PpIX, y la correspondiente a las sondas para marcación de organelas, en color verde (Fig.I.5).



**Fig. I.5.** Imágenes de microscopía confocal de células A549 incubadas con ALA 1 mM durante 18 h en medio sin suero y cargadas con sondas para visualización de organelas. A y D: fluorescencia de PpIX. B y E: fluorescencia propia de sondas mitocondriales y lisosomales respectivamente. C: Superposición de imágenes A y B, F: Superposición de imágenes D y E. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Las zonas donde coinciden ambas marcas corresponden a un posible sitio de colocalización.

Fue necesario aumentar el tiempo de incubación para la observación de fluorescencia de PpIX de 3 a 18 h para lograr que la relación entre fluorescencia e interferencia en la adquisición de la imagen fuera la adecuada. Si bien la cantidad de porfirinas de seguro es mayor con un tiempo de incubación de 18 h, no parece haberse externalizado aún al citoplasma o fuera de la célula en cantidades significativas puesto que se observa un patrón puntillado en la fluorescencia roja.



Como resultado, es posible identificar en las imágenes una predominancia de la marca de PpIX coincidente con la marca mitocondrial (Fig. I.5 C), y no con la lisosomal (Fig. I.5 F). Esta observación se sustenta en el hecho de que el sitio primario de síntesis de porfirinas es la mitocondria. Como la mayoría de los FS, la localización nuclear no es frecuente aunque sí se observa leve marca en citoplasma y en membrana plasmática.

#### *1.1.6. Modulación de la síntesis de porfirinas*

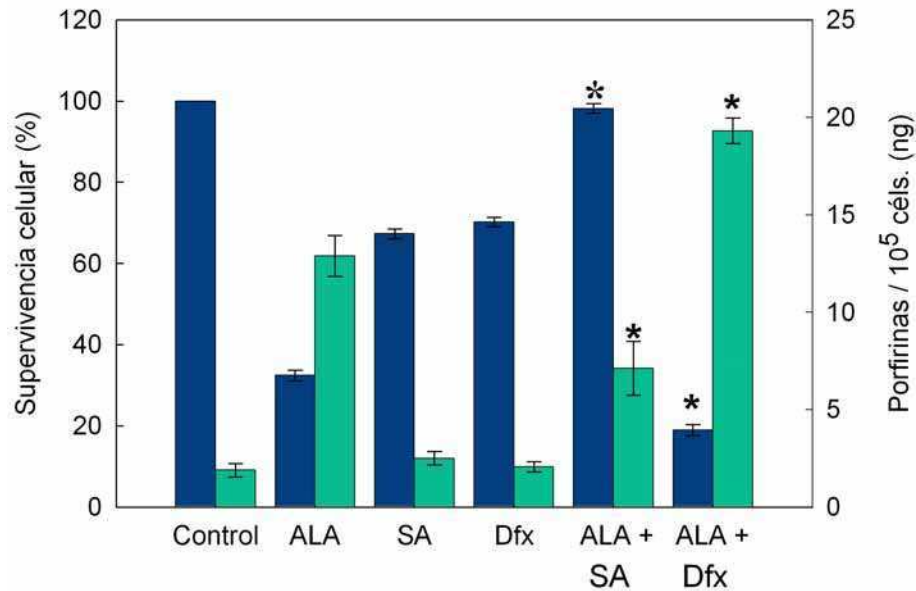
Como se indicara previamente, el ALA es el precursor biológico del FS activo, que es la PpIX, al cual se llega a través de un camino de síntesis que involucra varias etapas. (Musiol et al, 2011) por lo tanto, resulta interesante analizar la posibilidad de modificar de la eficacia de la TFD a partir de la modulación de la síntesis de porfirinas.

A tal fin se utilizaron dos compuestos que actúan sobre camino biosintético del hemo de maneras opuestas: Succinilacetona (SA, ácido 4,6-dioxoheptanoico) y Deferroxamina (Dfx). La SA es un inhibidor competitivo de la enzima ALA-D, encargada de sintetizar PBG a partir de ALA, bloqueando de este modo el curso normal de la síntesis de porfirinas y la consecuente formación de PpIX (Sassa y Kappas, 1982). Por otro lado, la Dfx es un compuesto quelante de hierro muy efectivo y específico (Valdés et al, 2010) que actúa reduciendo la cantidad de hierro disponible para la enzima FECH que culmina la síntesis de hemo añadiendo el ión metálico a la PpIX. De esta forma, se acumula una mayor cantidad de PpIX que no puede derivarse a la producción de hemo.

El objetivo de los siguientes estudios fue determinar la capacidad los compuestos citados para modular la TFD-ALA modificando los niveles de porfirinas inhibiendo o estimulando la acumulación de PpIX (Fig. I.6).

Como se vio anteriormente, la incubación de las células con ALA indujo una acumulación de porfirinas y la iluminación subsecuente redujo la supervivencia celular respecto del control. Por otro lado, ni la SA ni la Dfx modifican significativamente los niveles de porfirinas y consecuentemente la supervivencia de las células luego de irradiarlas. En cambio, la acción conjunta de cada uno de esos compuestos con el ALA evidenció la capacidad moduladora de los mismos. La SA redujo significativamente (30%) la síntesis de porfirinas en tanto que la Dfx la incrementó (25%), lo que se vio

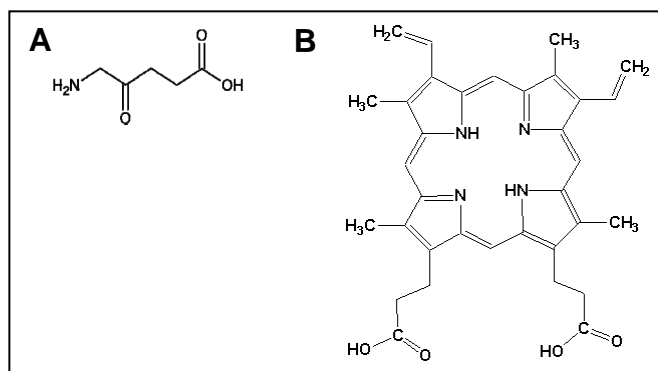
reflejado respectivamente, en una disminución y un aumento de la supervivencia celular luego del tratamiento lumínico, revelando así la especificidad de la inducción de muerte celular adjudicada a la acción combinada porfirina + luz.



**Fig. I.6.** Efecto de la SA y la Dfx sobre la síntesis de porfirinas y supervivencia celular post-TFD. Las células fueron incubadas con SA o Dfx 1 mM durante 1 h en medio sin suero, luego se adicionó ALA 1 mM y se continuó la incubación durante 3 h. Al cabo de ese tiempo, las células fueron irradiadas durante 10 min y 1 h después se determinó la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT (■). Los valores se expresan como porcentaje respecto del control incubado sin ALA y sin irradiar. Los niveles de porfirinas (■) se cuantificaron espectrofluorométricamente luego de una extracción química, según se detalló en Materiales y Métodos. (\* $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,01$ : significancia respecto de valores de incubación con ALA). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

### 1.2. TFD con porfirinas exógenas a partir de PpIX

La citotoxicidad inducida por la TFD-ALA se debe a las cualidades fotosensibles de la PpIX sintetizada endógenamente a partir de ALA exógeno. Sin embargo, es posible llevar a cabo el tratamiento fotodinámico proveyendo directamente la porfirina PpIX como FS exógeno.



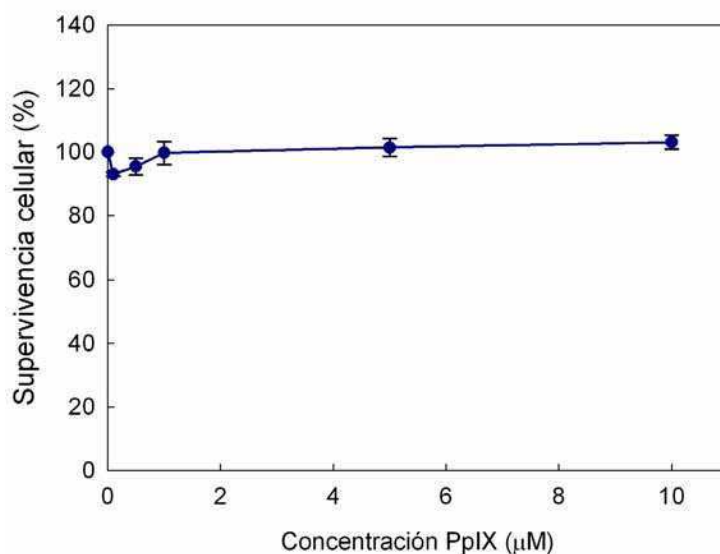
**Fig. I.7.** Estructura del ALA (A) y de PpIX (B)

Estas dos modalidades de tratamiento, si bien utilizan el mismo FS, difieren en varios aspectos. Al administrar el ALA, es necesario que la molécula sea captada por la célula y luego se incorpore en un camino de síntesis que conduce a la acumulación del FS efectivo, proceso que requiere de un tiempo de incubación; en cambio, con la PpIX al no estar involucrado un camino biosintético, los tiempos de incubación podrían ser menores. Por otro lado el ALA es una molécula pequeña, de fácil incorporación, a diferencia de la PpIX que además de su mayor tamaño presenta mayor lipofilicidad (Fig. I.7).

Con el objetivo de comparar la efectividad de la TFD basada en ALA con la TFD utilizando PpIX se condujeron los siguientes experimentos.

### *1.2.1. Toxicidad de PpIX en oscuridad*

Para determinar si la PpIX por sí misma induce toxicidad en las células se realizó un estudio de supervivencia celular mediante el ensayo de MTT utilizando concentraciones crecientes de PpIX entre 0,1 y 10  $\mu$ M (Ji et al, 2006) que equivalen a la cantidad de porfirinas en el plateau obtenido con ALA 1 mM (Fig. I.2) y a 100 veces esa concentración respectivamente. Los resultados se grafican en la Fig. I.8.



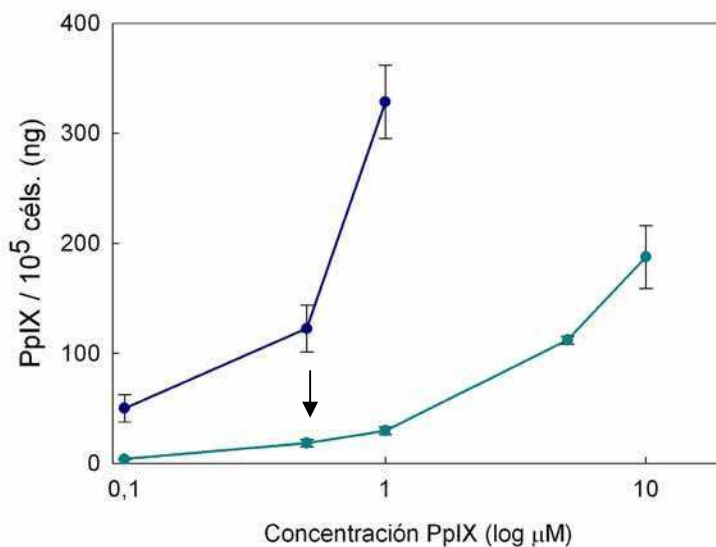
**Fig. I.8.** Curva de supervivencia a PpIX en oscuridad. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de PpIX (0,1 y 10 $\mu\text{M}$ ) en medio sin suero durante 3 h y luego se realizó el ensayo de viabilidad celular de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Puede observarse que ninguna de las concentraciones de PpIX utilizadas redujo significativamente la viabilidad celular, indicando que el FS no es dañino en ausencia de luz en un rango amplio de concentraciones.

### *1.2.2. Curva de concentración de PpIX*

La determinación de porfirinas intracelulares luego de una incubación con PpIX es una medida de cuánto se internaliza el FS, ya que no se requiere de un proceso de biosíntesis para su detección.

El objetivo del siguiente experimento fue determinar la concentración de PpIX exógena que produzca la misma cantidad de PpIX intracelular obtenida con una incubación de 3 h con ALA 1mM, a fin de llevar a cabo la TFD-PpIX en condiciones equivalentes con la TFD-ALA.



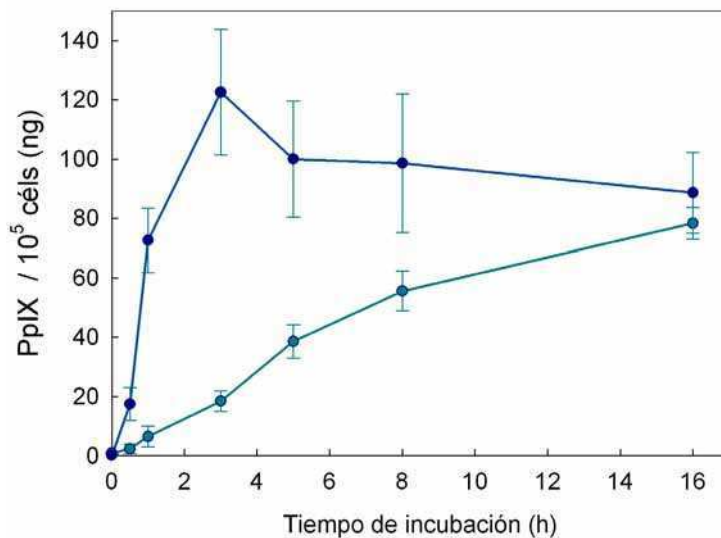
**Fig. I.9.** Curva de acumulación de porfirinas con distintas concentraciones de PpIX exógena. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de PpIX (0,1 a 10 $\mu\text{M}$ ) en medio sin suero durante 3 h y luego se realizó la extracción y cuantificación espectrofluorométrica de porfirinas intracelulares (●) y en el medio extracelular (●). La flecha indica el valor de porfirinas obtenido cuando se incubó con ALA 1 mM. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

En la Fig. I.9 se observa que la cantidad de PpIX detectada en el medio extracelular es notablemente mayor que la intracelular, y debieron omitirse los valores correspondientes a 5 y 10  $\mu\text{M}$  de PpIX exógena por excederse de la escala de medición del espectrofluorómetro, indicando que cerca de un décimo de la PpIX agregada al medio se internaliza efectivamente.

### *1.2.3. Curva de tiempo de incubación PpIX*

Se realizó una curva de tiempos de incubación con PpIX con una concentración fija de 0,5  $\mu\text{M}$ , incubando a 37°C en oscuridad durante 1 a 16 h, con el objetivo de estudiar la cinética de incorporación y acumulación de PpIX. Los resultados se grafican en la Fig. I.10.

Se observó un incremento en la concentración intracelular de PpIX y niveles elevados de PpIX extracelular, que disminuyen a tiempos largos de incubación (6 a 16 h).



**Fig. I.9.** Curva de acumulación de porfirinas con distintos tiempos de incubación con PpIX exógena. Las células se incubaron con PpIX durante distintos tiempos de incubación (0,5 a 16 h) en medio sin suero y luego se realizó la extracción y cuantificación espectrofluorométrica de porfirinas intracelulares (●) y en el medio extracelular (●). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

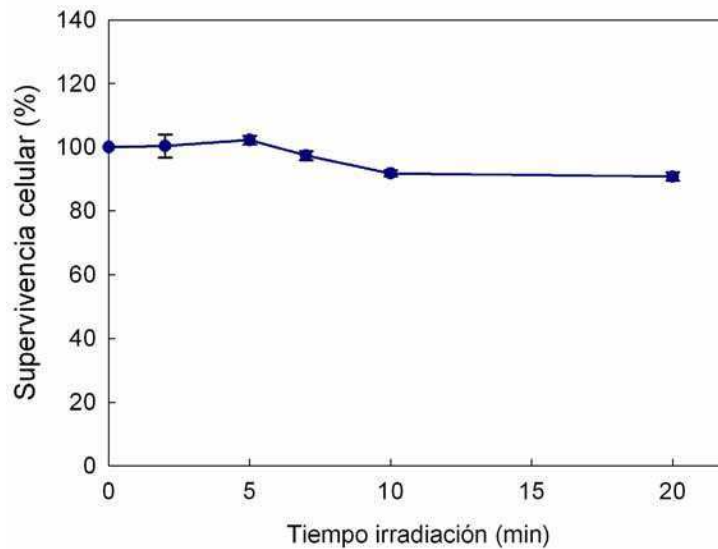
#### I.2.4. Determinación de dosis lumínica 50

Habiendo hallado las condiciones en las que PpIX exógena induce una acumulación de porfirinas similar a la encontrada en la TFD-ALA, se procedió a determinar el valor de la DL<sub>50</sub> correspondiente a la TFD-PpIX.

Puede verse en la Fig. I.11 que en estas condiciones, la viabilidad celular no se ve mayormente afectada, llegando a una disminución de la supervivencia celular del 10%, indicando que aún alcanzando una misma cantidad de porfirinas intracelulares, la PpIX exógena no es tan buen FS como la PpIX endógena. Al no observarse una caída significativa de la viabilidad celular, no es posible establecer una DL<sub>50</sub> en estas condiciones.

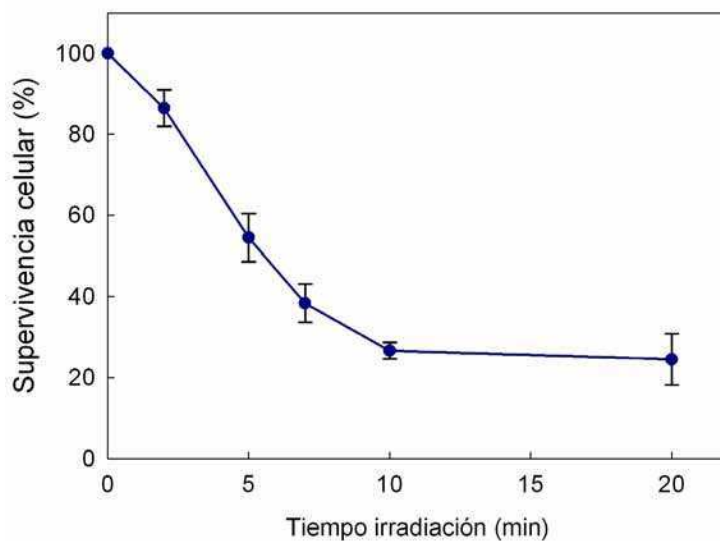
Para poder evidenciar el efecto FS de la PpIX se repitió la misma experiencia, pero con una concentración de PpIX 10 veces mayor que la previamente empleada. Los resultados se muestran en la Fig. I.12.

En este caso fue posible determinar una  $DL_{50}$  para la PpIX exógena que se halló a los 5 min con 30 seg de irradiación.



**Fig. I.11.** Curva de supervivencia celular 1 h post-TFD-PpIX. Las células se incubaron con PpIX 0,5  $\mu$ M en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Fue necesario entonces una concentración de PpIX exógena 10 veces mayor que la necesaria para igualar a la PpIX endógena (inducida por ALA) para poder observar una respuesta a TFD.



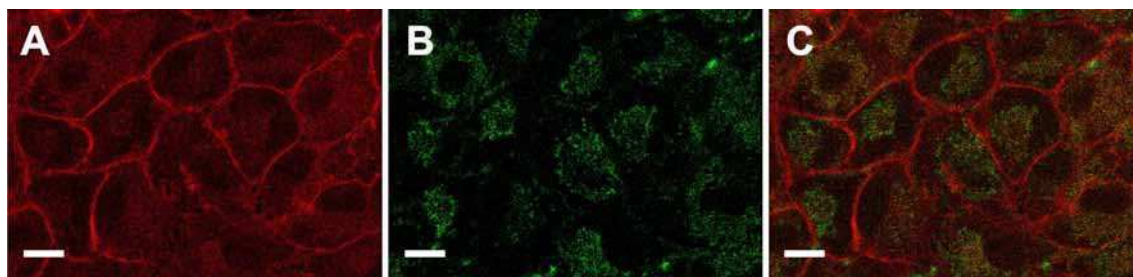
**Fig. I.12.** Curva de supervivencia celular 1 h post-TFD-PpIX. Las células se incubaron con PpIX 5  $\mu$ M en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

#### *1.2.5. Localización subcelular de PpIX exógena*

Teniendo en cuenta que la PpIX exógena presenta un comportamiento diferente de la PpIX inducida por ALA, se estudió la distribución de la misma a nivel subcelular. El objetivo de esta experiencia fue determinar si la PpIX exógena presenta una localización distinta de la endógena, lo cual podría estar relacionado con su efectividad.

Se observó que la fluorescencia correspondiente a la PpIX administrada exógenamente se localiza principalmente en la membrana plasmática (Fig. I.13). El hecho de que no se localice en un sitio primario de generación de ROS, como son las mitocondrias, implica que la potencialidad de generar daño oxidativo puede verse reducida. Es probable también que el decaimiento de la actividad FS de la PpIX se vea acelerado respecto de otra localización subcelular.

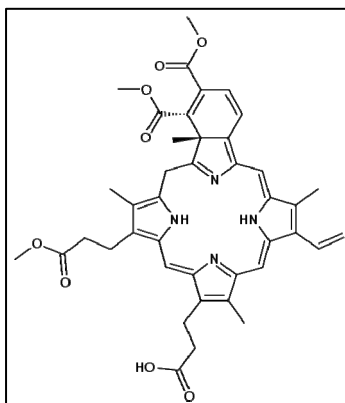




**Fig. I.13.** Imágenes de microscopía confocal de células A549 incubadas con PpIX 5 $\mu$ M durante 18 h en medio sin suero, incubadas con una sonda fluorescente para visualización de lisosomas. A: fluorescencia de PpIX. B: fluorescencia de sonda lisosomal. C : Superposición de AyB. Barra de escala: 10 $\mu$ m.

### 1.3. TFD con Verteporfirina

La Verteporfirina (Vp) es un FS derivado de benzoporfirina (Fig. I.14) (Visudyne®, Novartis) clínicamente aprobado para el tratamiento fotodinámico de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la causa más frecuente de ceguera en la población occidental, cada vez más envejecida. En una variante mucho más agresiva, llamada DMAE húmeda, crecen por debajo de la retina vasos sanguíneos anormales, con derrame, similares a nodos de venas varicosas, que acaban lesionando la visión central del paciente. La Vp administrada por vía i.v., se acumula rápidamente en los vasos retinianos anómalos y por posterior irradiación con un láser de 689 nm se producen las reacciones fotoquímicas que sellan los capilares dejando a salvo la retina superyacente.

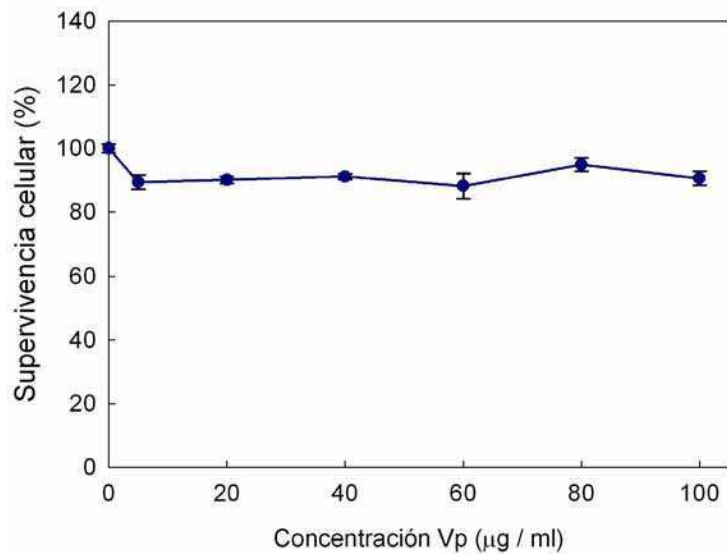


**Fig. I.14.** Estructura de la Verteporfirina.

Se realizaron estudios de acumulación de Vp a fin de compararlos con la acumulación de porfirinas inducida por ALA.

### 1.3.1. Toxicidad de Vp en oscuridad

Al igual que en los experimentos previos de citotoxicidad per se, el objetivo de este ensayo fue determinar las concentraciones de Vp que pudieran resultar tóxicas para la célula en oscuridad, de modo de seleccionar las adecuadas para llevar a cabo la TFD.



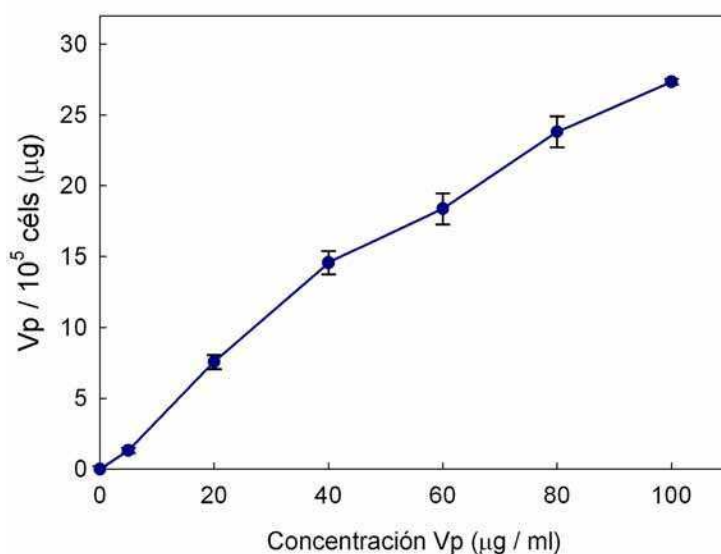
**Fig. I.15.** Toxicidad de Vp en oscuridad. Las células se incubaron 3 h con concentraciones crecientes de Vp (5 a 100 µg/ml) en medio sin suero y luego se realizó el ensayo de viabilidad celular de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Como puede observarse en la Fig. I.15, en el rango de concentraciones probadas, la citotoxicidad de Vp no fue significativa, pues la supervivencia de las células no disminuyó más del 15 %.

### 1.3.2. Curva de concentración de Vp

Se realizó el estudio de la acumulación de Vp intracelular a partir de Vp exógena en distintas concentraciones con un tiempo fijo de incubación en 3 h, con el objetivo de identificar si se produce una saturación en su incorporación (Fig. I.16).

La curva de acumulación de Vp intracelular en función de la concentración de Vp exógena mostró un continuo aumento en el rango de concentraciones probadas. No se detectaron valores significativos de Vp en el medio extracelular. Se seleccionó para los ensayos siguientes la concentración 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que si bien no produce una acumulación del compuesto ( $14,6 \pm 0,8 \mu\text{g} / 10^5 \text{ céls}$ ) comparable con la cantidad de porfirinas obtenida a partir del ALA 1 mM ( $19,2 \pm 0,2 \text{ ng} / 10^5 \text{ céls}$ ) permite llevar a cabo la TFD como se verá más adelante.



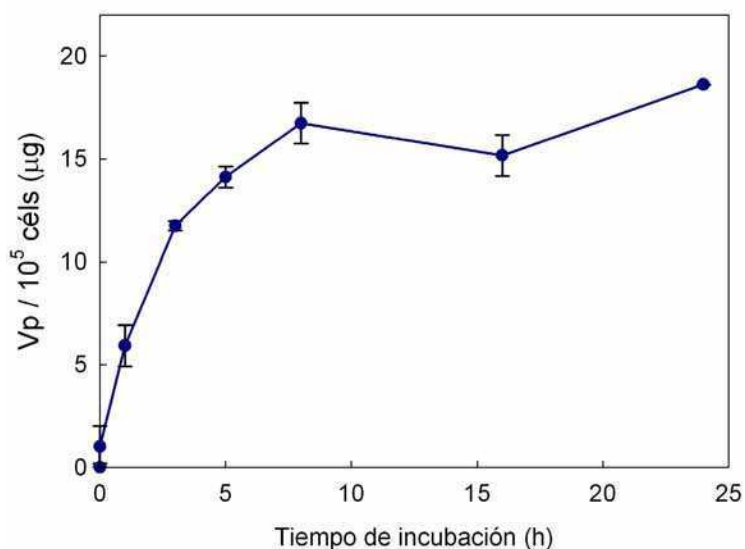
**Fig. I.16.** Curva de acumulación de porfirinas con distintas concentraciones de Vp. Las células fueron incubadas durante 3 h con Vp (5 a 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en medio sin suero y luego se realizó la extracción de porfirinas intracelulares con metanol:agua (1:1) y la cuantificación en espectrofluorómetro. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

### *1.3.3. Curva de tiempo de incubación con Vp*

Se continuó con los estudios de acumulación de Vp realizando una curva de tiempos de incubación con una concentración fija de 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incubando a 37°C en oscuridad durante 1 a 24 h, con el objetivo de estudiar la cinética de incorporación y acumulación de Vp (Fig. I.17).

Se observó que para un tiempo de 8 h de incubación se alcanza un plateau para la incorporación de Vp.

Para los experimentos siguientes se utilizó un tiempo de incubación de 3 h en el que se acumula el 70 % del compuesto respecto de los niveles alcanzados en el plateau y es el mismo tiempo de incubación que se utilizó con los otros FSs.



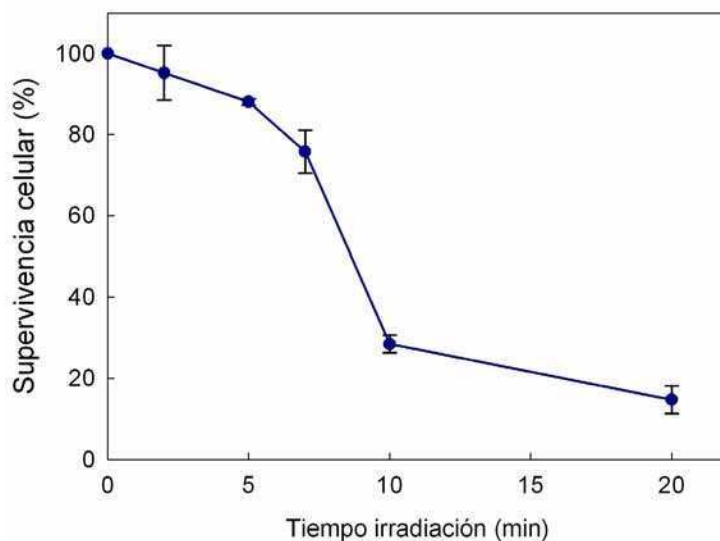
**Fig. I.17.** Curva de acumulación de porfirinas a distintos tiempos de incubación con Vp. Las células fueron incubadas con Vp 40 µg/ml durante distintos tiempos (0,5 a 24 h) en medio sin suero realizando luego la extracción de Vp con metanol:agua (1:1) cuantificación en espectrofluorómetro. Los valores representan la media ± SD: desviación estándar.

#### I.3.4. Determinación de dosis lumínica 50

Con los parámetros anteriormente determinados (concentración: 40 µg/ml y tiempo de incubación: 3 h) se realizó la TFD-Vp (Fig. I.18). El objetivo de este ensayo es determinar la DL<sub>50</sub> correspondiente a este FS.

En las condiciones utilizadas en este experimento, la DL<sub>50</sub> para TFD basada en Vp es de 8 min con 30 seg, ligeramente mayor que la DL<sub>50</sub> del ALA.

Estos estudios permiten ver que entre los FS ensayados, el ALA muestra un buen rendimiento en concentración intracelular de porfirinas y muerte celular por TFD.

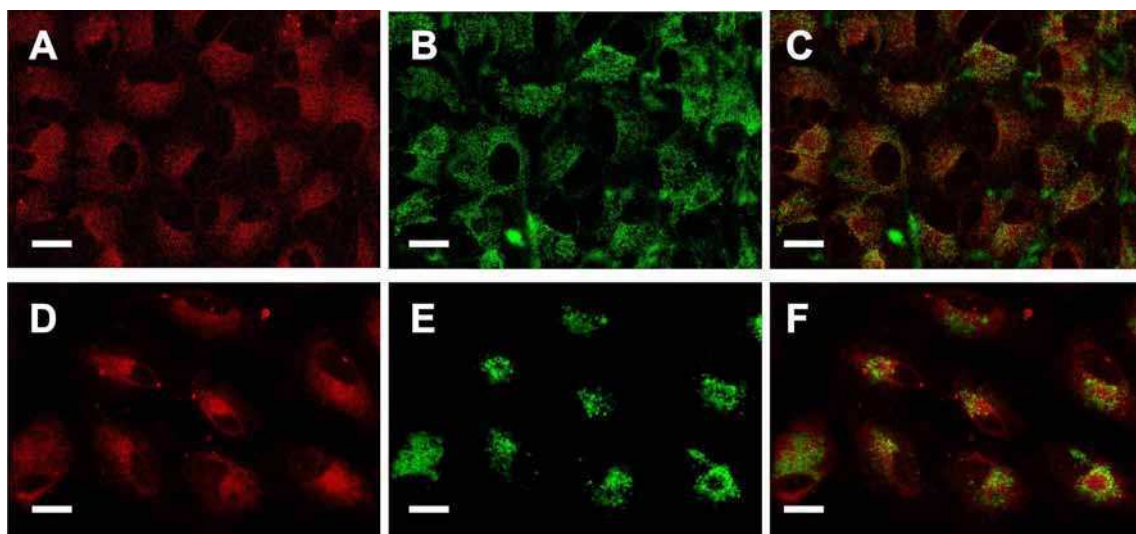


**Fig. I.18.** Curva de supervivencia celular post TFD-Vp. Las células se incubaron con Vp 40  $\mu\text{g/ml}$  en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

#### *I.3.4.1. Localización subcelular de Vp*

A fin de analizar la localización subcelular de la Vp se utilizaron nuevamente las sondas específicas para visualizar mitocondrias y lisosomas simultáneamente con la fluorescencia de la Vp (Fig. I.19).

Las imágenes de la Fig. I.19 sugieren una localización preferentemente mitocondrial para la Vp, dado que para esta organela se observó la mayor superposición de marca fluorescente (Peng et al, 2005). También es posible detectar una leve marca citoplasmática como ha sido reportado por Barnes et al (2010). Aparentemente, la membrana plasmática no es un sitio preferencial de localización para la Vp, a pesar de ser una porfirina administrada exógenamente, como ocurrió con la PpIX. Al contrario, la Vp parece tener una buena internalización celular.



**Fig. I.19.** Imágenes de microscopía confocal de células A549 incubadas con Vp 40  $\mu\text{g/ml}$  durante 18 h en medio sin suero e incubadas con sondas para visualización de organelas. A y D: fluorescencia de Vp. B y E: fluorescencia de sondas mitocondriales y lisosomales respectivamente. C y F: Superposición de A / B y D / E respectivamente. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

### CONCLUSIONES

El ALA induce acumulación de PpIX endógena conforme aumenta la concentración y el tiempo de incubación, alcanzando un plateau de acumulación a una concentración de 1 mM.

La localización subcelular de la PpIX endógena inducida por ALA (mitocondrial) es distinta de la localización de la PpIX administrada exógenamente (membrana plasmática).

La fotosensibilización con PpIX exógena no resulta tan eficiente como a partir de ALA. Aún aumentando diez veces la concentración de PpIX exógena que iguala a la de PpIX endógena, no se obtiene una  $DL_{50}$  más efectiva que la del ALA.

La localización mitocondrial de la PpIX inducida por ALA no sólo corresponde con el sitio de síntesis sino también con un posible sitio primario de daño celular.

La acumulación de Vp es mitocondrial. La viabilidad celular post TFD en las condiciones del plateau de acumulación corresponde a una  $DL_{50}$  ligeramente mayor (8 min 30 seg) que la de ALA (7 min).



*REFERENCIAS*

- Barnes LD, Giuliano EA, Ota J. (2010), Cellular localization of Visudyne as a function of time after local injection in an in vivo model of squamous cell carcinoma: an investigation into tumor cell death. *Vet Ophthalmol*; 13(3):158-65.
- Ji Z, Yang G, Vasovic V, Cunderlikova B, et al. (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* 1:84(3):213-20.
- Kamoshima Y, Terasaka S, Kuroda S, Iwasaki Y. (2011) Morphological and histological changes of glioma cells immediately after 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy. *Neurol Res*: 33(7):739-46
- Matthews W, Rizzoni W, Mitchell J, et al. (1989) In vitro photodynamic therapy of human lung cancer. *Surg Res*; 47(3):276-81.
- Musiol R, Serda M, Polanski J. (2011) Prodrugs in photodynamic anticancer therapy. *Curr Pharm Des*; 17(32):3548-59.
- Sassa S, Kappas A. (1982) Succinylacetone inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and potentiates the drug and steroid induction of delta-aminolevulinic acid synthase in liver. *Trans Assoc Am Physicians*; 95:42-52.
- Valdés PA, Samkoe K, O'Hara JA, et al. (2010) Deferoxamine iron chelation increases delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in xenograft glioma model. *Photochem Photobiol*; 86(2):471-5.
- Wang X, Wang P, Tong W, Liu Q. (2010) Comparison of pharmacokinetics, intracellular localizations and sonodynamic efficacy of endogenous and exogenous protoporphyrin IX in sarcoma 180 cells. *Ultrasonics*; 50(8):803-10.

## CAPÍTULO II

### *Muerte celular por TFD a partir de ALA*

La TFD produce en las células tratadas grandes cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que pueden enmarcarse en distintos contextos de muerte celular.

Generalmente, los límites que definen una u otra vía no son claramente definidos e incluso es posible que se entrecrucen sus caminos de señalización.

Por ello, el objetivo de los siguientes ensayos es determinar cuál o cuáles son las vías de muerte celular que se inician luego de la TFD-ALA y cómo puede modularse su resultado.

#### *II.1. Morfología celular post TFD-ALA*

##### *II.1.1. Morfología general*

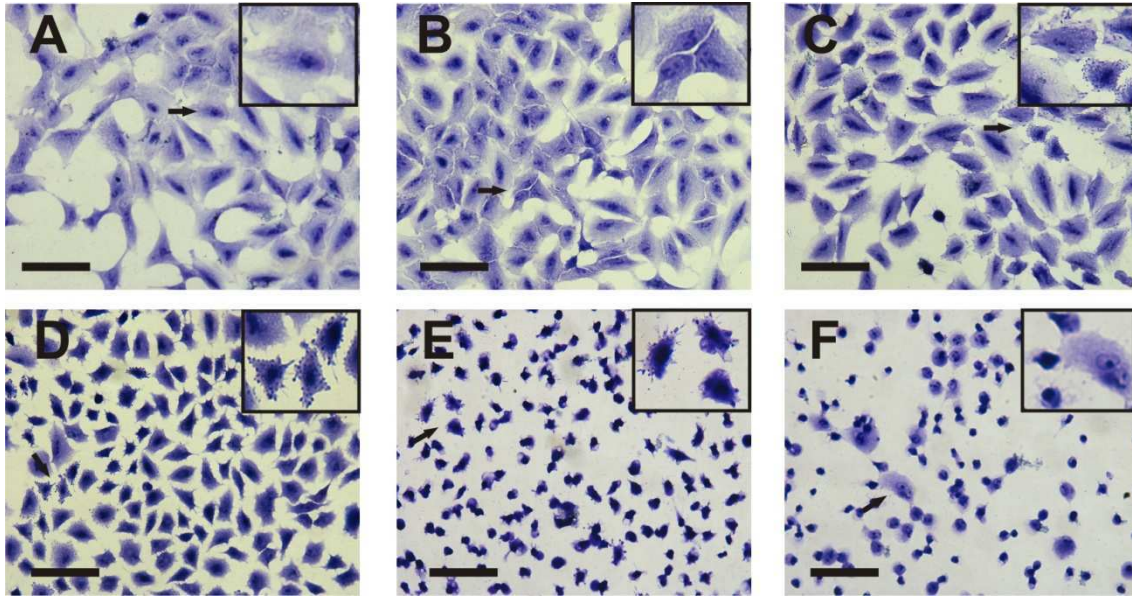
Se realizó una tinción con azul de toluidina con el objetivo de observar la morfología general de las células tratadas con TFD (Fig. II.1).

Las células A549 presentan una morfología epitelial, con abundante citoplasma y tres o más nucléolos grandes. Si la confluencia no es total también pueden presentar prolongaciones citoplasmáticas y puntos de adhesión focal (Fig. II.1 A y B).

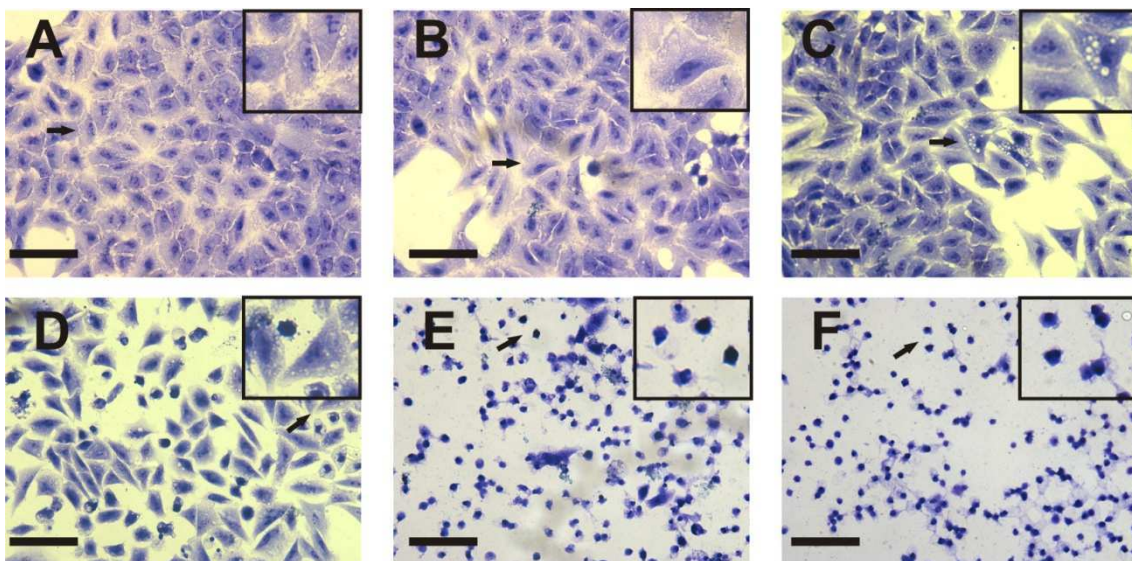
Tan pronto como 1 h después del tratamiento, las células muestran ciertos caracteres que dan cuenta de un proceso dañino. Esto es, una forma redondeada, desprendimiento del sustrato y condensación nuclear.

Como puede observarse, el cambio en la morfología es dependiente de la dosis lumínica y comienza a hacerse evidente en algunas células a partir de los 5 min de irradiación (Fig. II.1 C). Esta primera manifestación aparece principalmente como un daño a la membrana plasmática, en donde se observa un aspecto más granular, llamado “burbujeo” o “blebbing” y alteraciones a nivel citoplasmático. A los 7 min de irradiación, el daño a la membrana es conspicuo y la mayoría de las células lo presentan (Fig. II.1 D). A partir de este tiempo de irradiación también comienza a manifestarse la condensación nuclear. En células iluminadas durante 10 min es notable no sólo la condensación nuclear, sino también la reducción en tamaño y la fuerte disrupción de la

membrana plasmática en todas las células (Fig. II.1 E). A los 20 min de irradiación se observan dos tipos de células: unas prácticamente reducidas al tamaño del núcleo condensado y otras de gran tamaño en las que el núcleo está agrandado y el citoplasma disperso (Fig. II.1 F).



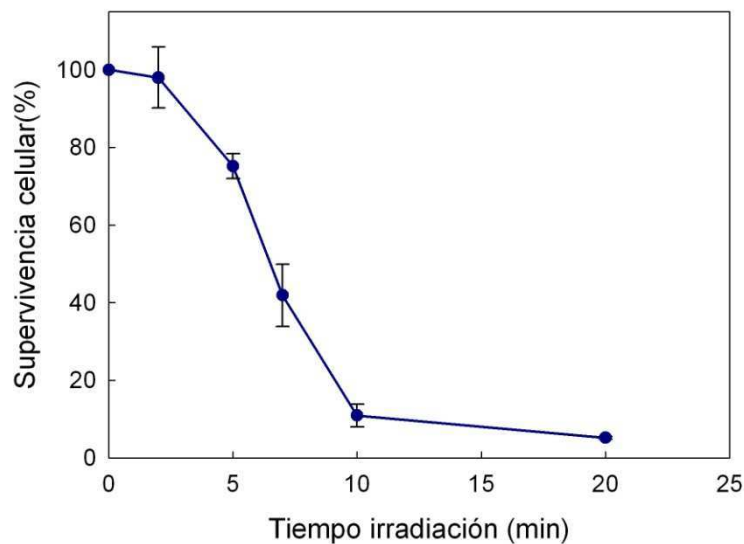
**Fig. II.1.** Morfología de células A549 1 h post TFD-ALA. Células sin tratamiento (A)., TFD 2 min (B), TFD 5 min (C), TFD 7 min (D), TFD 10 min (E), TFD 20 min (F). Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron tratadas con TFD-ALA como se describió previamente y luego fijadas con formol 4% en PBS y teñidas con azul de toluidina. Barra de escala: 100  $\mu$ m.



**Fig. II.2.** Morfología de células A549 24 h post TFD basada en ALA. Células sin tratamiento (A)., TFD 2 min (B), TFD 5 min (C), TFD 7 min (D), TFD 10 min (E), TFD 20 min (F). Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron tratadas con TFD-ALA como se describió previamente y luego fijadas con formol 4% en PBS y teñidas con azul de toluidina. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

Cuando se analiza el efecto de la TFD-ALA 24 h después de haber sido realizado el tratamiento, la morfología celular varía de un modo distinto (no así los porcentajes de viabilidad).

Al renovar el medio de cultivo y hacer la tinción 24 h después, las células pueden llegar a tener una recuperación post TFD. Una irradiación de 2 min (Fig. II.2 B) produce algunos cambios a nivel de la membrana, pero no parece alterar seriamente la viabilidad celular como se verificó por el método de MTT (Fig. II.3). Sin embargo, al iluminar 5 min (Fig. II.2 C), en lugar de observarse un blebbing en la membrana, como en el experimento anterior, se observa una fuerte vacuolización del citoplasma en algunas células, la cual se vuelve más evidente en el tiempo de irradiación de 7 min (Fig. II.2 D). En este último caso, coexisten dos tipos de células, algunas con el citoplasma vacuolado y otras con fuerte condensación nuclear y marcada reducción del tamaño. En cambio, para los tiempos de 10 y 20 min, la gran mayoría de la población celular presenta una notable condensación nuclear y en algunos casos, disrupción uniforme del citoplasma y la membrana (Fig. II.2 E y F).



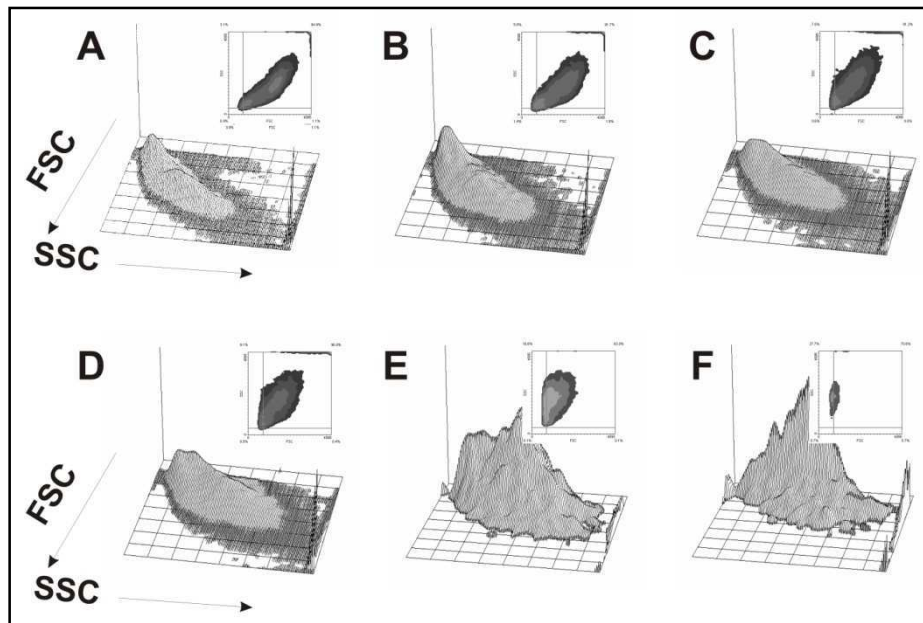
**Fig. II.3.** Curva de supervivencia celular 24 h post-TFD-ALA. Las células se incubaron con ALA 1 mM en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos en un banco de tubos fluorescentes. Luego se reemplazó el medio por medio completo fresco y al cabo de 24 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no iluminado, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

Como primera aproximación, estas observaciones permiten sugerir que dadas las características de la disrupción de la membrana y la condensación nuclear, dosis de TFD de hasta 10 min inducen un proceso apoptótico luego de 1 h. Mientras que al aumentar la dosis a 20 min, se presentan tanto indicios apoptóticos como necróticos. Si se deja un tiempo de recuperación, las células que recibieron dosis subletales de TFD (hasta 7 min) parecen mostrar un indicio de recuperación. Sin embargo, tiempos de irradiación letales (10 y 20 min) terminan por suprimir la viabilidad celular, como puede verificarse por el ensayo de MTT (Fig. II.3).

Un estudio morfológico que no utiliza microscopía, sino citometría de flujo, es el análisis de la dirección de la dispersión de la luz. Esta metodología permite visualizar la distribución de las células en tamaño y granularidad según la lectura del citómetro de flujo. En el flujo individual de cada célula a través del haz de luz del citómetro ocurre la dispersión de la luz. La luz es dispersada por las células individuales y analizada en dos detectores: uno lateral (Side scatter, SSC), indicador del grado de granularidad de la célula y uno frontal (Forward scatter FSC) indicador del tamaño de la célula, respecto de la dirección de flujo de las mismas.

Esta representación permite detectar un aumento en la población de menor tamaño y mayor granularidad que corresponde a las células con morfología apoptótica, visualizada como un aumento en SSC y una disminución en FSC (Fig. II.4).





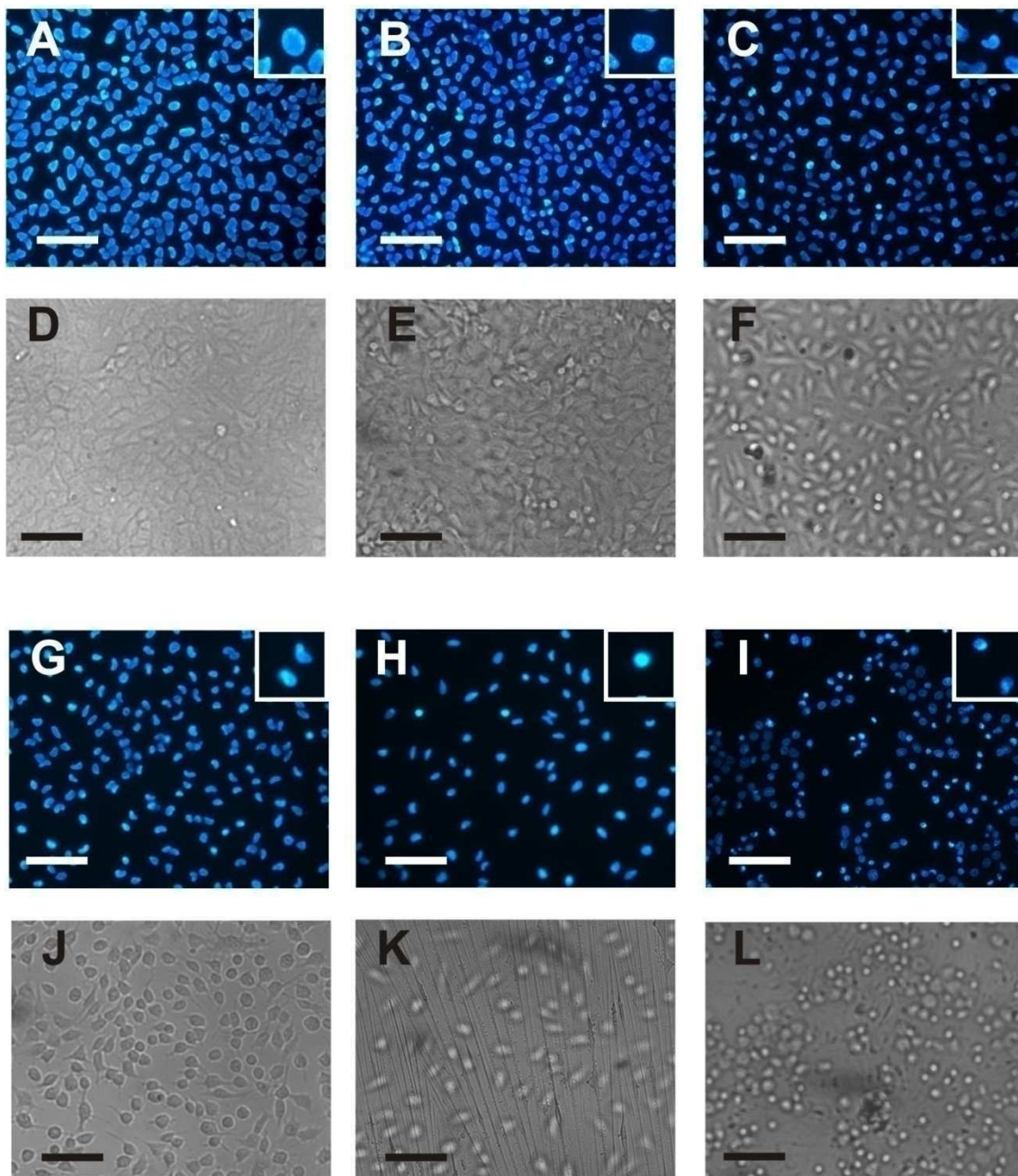
**Fig. II.4.** Histogramas de dispersión de la luz por células A549. Las células tratadas con TFD-ALA fueron tripsinizadas luego de 1 h y analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III. Células sin tratamiento (A), TFD 2 min (B), TFD 5 min (C), TFD 7 min (D), TFD 10 min (E), TFD 20 min (F).

### II.1.2. Morfología nuclear post TFD

Si bien en las tinciones morfológicas previamente discutidas es posible visualizar los núcleos, el análisis morfológico de los mismos es más apropiado mediante tinciones específicas. Para ello se realizó la tinción con Hoechst 33258.

Puede observarse en la Fig. II.5 que a medida que aumenta el tiempo de irradiación, la condensación nuclear y la refringencia de la tinción son más fuertes, verificando lo observado previamente. Puede verse también el progresivo desprendimiento del sustrato y el cambio de morfología celular hacia una forma más redondeada que se condice con el encogimiento nuclear. Para el tiempo de iluminación de 20 min se nota la coexistencia de núcleos sumamente condensados con otros agrandados y ovalados, consistentemente con la morfología previamente observada.

No se detectaron diferencias en la morfología nuclear entre tinciones realizadas 1 y 24 h post TFD, más allá de que el número de núcleos condensados para los tiempos iluminación de 5 y 7 min fue menor a 24 h que a 1 h (imágenes no mostradas).



**Fig. II.5.** Morfología nuclear de células A549 Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron tratadas con TFD-ALA como se describió previamente. Luego de 1 h fueron fijadas con metanol, permeabilizadas con Tritón 0,1% en PBS y teñidas con Hoechst 33258 0,5  $\mu\text{g}$  /ml. Células sin tratamiento (A y D), TFD 2 min (B y E), TFD 5 min (C y F), TFD 7 min (G y J), TFD 10 min (H y K), TFD 20 min (I y L). Tinción con Hoechst 33258 (A-C y G-I). Imagen de campo claro correspondiente (D-F y J-L). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

## *II.2. Apoptosis y Necrosis post TFD*

En este apartado se estudiarán ambos tipos de muerte celular iniciados por la TFD-ALA. Numerosos trabajos proponen la apoptosis como el mecanismo preferencial de muerte celular inducida por TFD-ALA y es el más ampliamente reportado (Ziegler et al, 2007; Li et al, 2012; Shahzid et al, 2011; Wu et al, 2011).

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

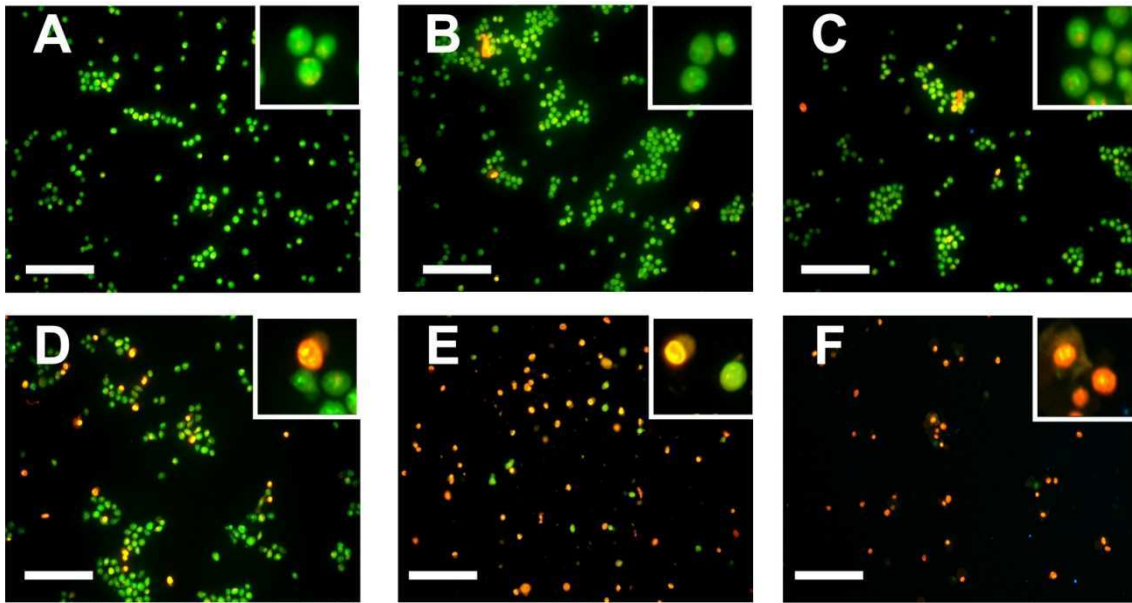
Con el fin de determinar los cambios morfológicos inducidos por la TFD se utilizó la técnica de tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE) y se evaluó la morfología celular a distintas dosis lumínicas de TFD mediante microscopía de fluorescencia, tal como se detalló previamente en M&M.

### *II.2.1. Tinción diferencial para Apoptosis y Necrosis*

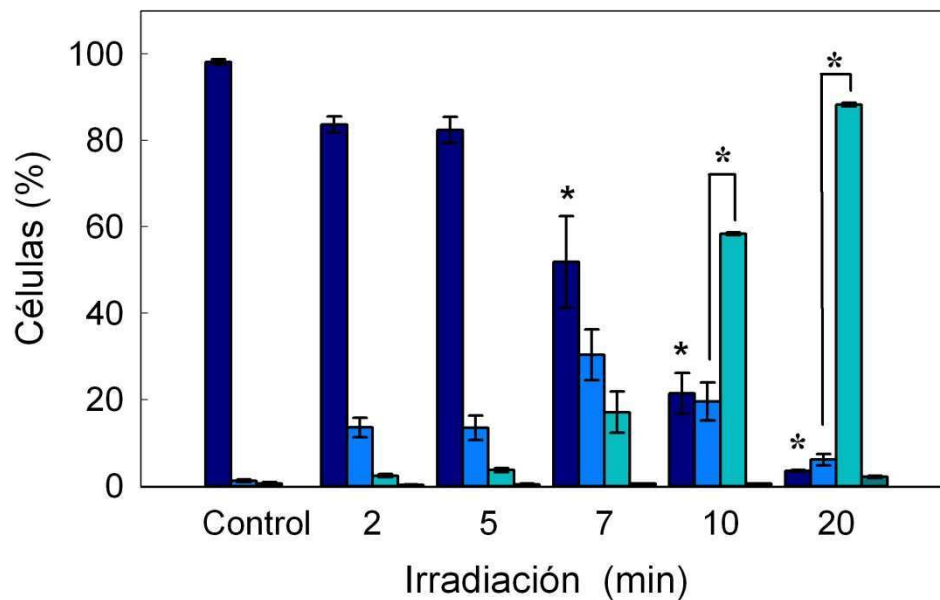
La tinción diferencial para células viables, apoptóticas tempranas (o viables apoptóticas), apoptóticas tardías y necróticas reveló, a grandes rasgos, que el cambio morfológico no se hace evidente sino hasta un tiempo de irradiación de 7 min, como había sido observado previamente (Fig. II.6). Estos cambios morfológicos involucraron la condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos inicialmente sin ruptura de la membrana plasmática y una disminución del tamaño celular.

En la cuantificación se observa que ese aumento se vuelve significativo también a partir de la  $DL_{50}$  de 7 min (Fig. II.7). Los porcentajes de apoptosis parten de  $10.2 \pm 1.1\%$  en células no tratadas hasta  $98.3 \pm 3.5\%$  luego de una irradiación de 20 min. Cabe aclarar que la cuantificación de células apoptóticas incluye tanto a las tempranas como las tardías. En todos los casos la inducción de necrosis fue muy baja, no sobrepasando el 10%, indicando que el principal mecanismo de muerte asociado a la TFD-ALA sería la apoptosis.





**Fig. II.6.** Tinción diferencial de células A549 con NA/BE 1 h post TFD basada en ALA. Células sin tratamiento (A), TFD 2 min (B), TFD 5 min (C), TFD 7 min (D), TFD 10 min (E), TFD 20 min (F). Las células tratadas con TFD-ALA fueron tripsinizadas y a una alícuota de la suspensión se le agregó la mezcla de NA/BE. Se contaron al menos 200 células bajo el microscopio de fluorescencia para cada tratamiento. Barra de escala: 200  $\mu$ m.



**Fig. II.7.** Cuantificación de células viables (■ azul), apoptóticas tempranas (■ celeste), apoptóticas tardías (■ verde) y necróticas (■ verde oscuro) 1 h post TFD a distintos tiempos de irradiación mediante tinción con NA/BE. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no iluminado, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto de los controles).

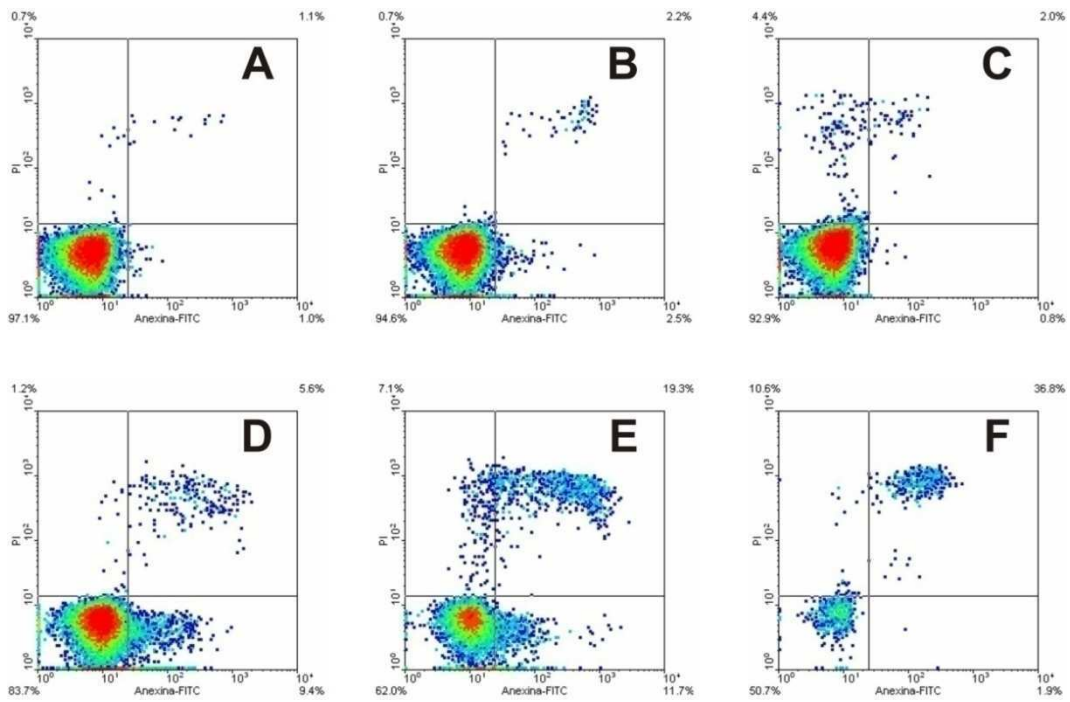
La respuesta de tipo apoptótica inducida por el tratamiento con la TFD-ALA está de acuerdo con los resultados hallados por otros autores en diversos modelos experimentales (Buytaert et al, 2007) y resulta sumamente deseable, ya que este tipo de muerte celular, además de destruir a las células malignas, provoca menor grado de reacciones inflamatorias *in vivo*.

### II.2.2. Externalización de fosfatidilserina

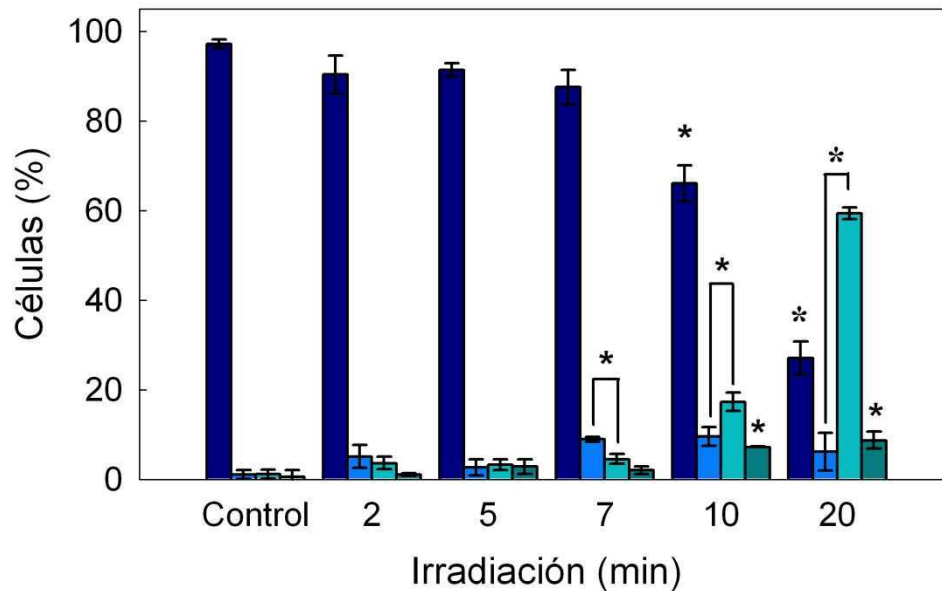
Uno de los parámetros bioquímicos que caracterizan a la apoptosis es la oxidación y externalización de los residuos de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática, pudiendo de esta manera unirse específicamente a células fagocíticas (Fruhworth et al, 2008). Algunos conjugados fluorescentes,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

En concordancia con los resultados morfológicos previos, se observó un incremento en los porcentajes de células apoptóticas nuevamente a partir de 7 min de irradiación. Los porcentajes basales de apoptosis son bajos,  $2,3 \pm 0,1\%$  y ascienden a  $64,2 \pm 5,5\%$  luego de una TFD de 20 min (Fig. II.8 y 9).

Los resultados obtenidos para ambas técnicas no arrojan en todos los casos los mismos porcentajes. Esto se debe a que la base de cada técnica para la detección de apoptosis difiere sustancialmente.



**Fig. II.8.** Marcación con An/IP para apoptosis 1 h post TFD-ALA. Células sin tratamiento (A), TFD 2 min (B), TFD 5 min (C), TFD 7 min (D), TFD 10 min (E), TFD 20 min (F). Las células tratadas con TFD-ALA fueron tripsinizadas y la suspensión se centrifugó para resuspenderlas en buffer binding. Se agregó An/ IP y se analizaron por citometría de flujo.



**Fig. II.9.** Cuantificación de células viables (■ azul), apoptóticas tempranas (■ celeste), apoptóticas tardías (■ verde) y necróticas (■ verde oscuro) 1 h post TFD-ALA a distintos tiempos de irradiación mediante marcación con An/IP y análisis por citometría de flujo. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no iluminado, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\* $p < 0,05$  y \* $p < 0,01$  respecto de los controles).

### II.2.3. Integridad mitocondrial

Teniendo en cuenta que la síntesis de PpIX se desarrolla en el espacio intermembrana de la mitocondria, y que previamente se demostró la acumulación mitocondrial de esta molécula, se esperarían cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Phi_m$ ) al tratar a las células con la TFD-ALA.

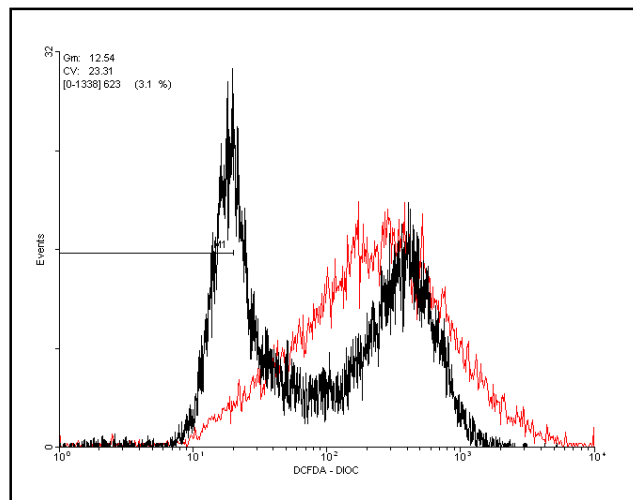
En el proceso de muerte celular por apoptosis, la pérdida de funcionalidad mitocondrial se relaciona con la permeabilización de la membrana externa a iones y moléculas de gran tamaño necesarios para que ocurra la apoptosis (Antonsson, 2004). La pérdida del  $\Phi_m$  se produce como consecuencia del colapso en el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial, proceso que también es responsable de una completa reducción de  $O_2$ , ocasionando un incremento en la producción de ROS (Paz et al, 2008). De esta manera la pérdida del  $\Phi_m$  resulta un indicador temprano en la iniciación de la apoptosis y del estrés oxidativo asociado a este proceso.

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

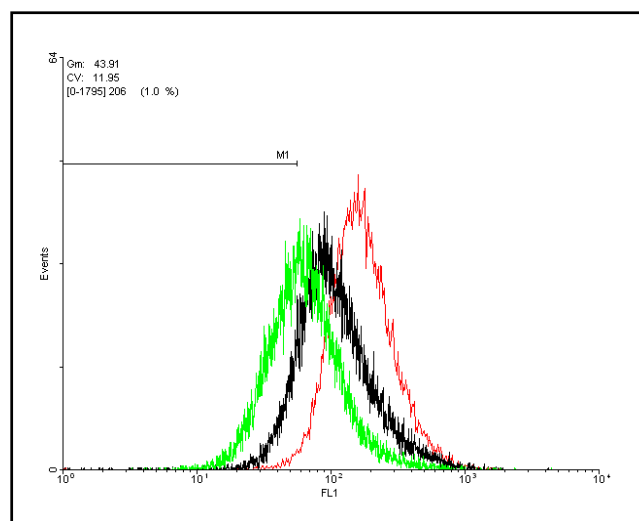
En este trabajo hemos demostrado la localización de la PpIX en mitocondrias, lo cual sugiere que dichas organelas ejercen un rol fundamental en los efectos deletéreos ocasionados por esta terapia.

El reactivo lipofílico DiOC6 se utiliza habitualmente para monitorear cambios en el  $\Phi_m$  o en el potencial de membrana plasmática. Cuando se usa a bajas concentraciones (orden nM) mide cambios en el  $\Phi_m$  y a concentraciones mayores (orden  $\mu$ M) puede ser útil para teñir al retículo endoplasmático (Paz et al, 2008). La despolarización de la membrana mitocondrial se traduce en una disminución en la intensidad de fluorescencia roja, y esta intensidad es detectada mediante un citómetro de flujo.

Como puede verse en la Fig. II.10, el histograma correspondiente a las células no tratadas (rojo) aparece hacia el eje positivo, mientras que para células tratadas con TFD de 10 min se observan dos picos, uno correspondiente a las que conservan sus mitocondrias con adecuado  $\Phi_m$  y otro desplazado hacia la región negativa del eje ( $23,8 \pm 1,3\%$ ) que corresponde a las células que han perdido su  $\Phi_m$  y por lo tanto la retención de DiOC6. Este resultado indica que se produjo una disrupción de la integridad mitocondrial.



**Fig. II.10.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de DiOC6 de células no tratadas (rojo) o 1 h post TFD 10 min (negro). Las células fueron tratadas con TFD-ALA, tripsinizadas al cabo de 1 h e incubadas con DiOC6 30 nM para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.



**Fig. II.11.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de Rh 123 de células no tratadas (rojo) o 1 h post TFD 10 min (negro) o 20 min (verde). Las células fueron tratadas con TFD-ALA, tripsinizadas al cabo de 1 h e incubadas con Rh 123 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

En un ensayo similar, basado en el mismo criterio que para DiOC6, se notó un ligero efecto dosis lumínico-dependiente en la retención de Rhodamina 123 (Rh 123) en células con mitocondrias con  $\Phi_m$  intacto (Fig. II.11).

Se observó que la TFD con 10 min de irradiación produce en las células un aumento del  $12,2 \pm 1,5\%$  en el porcentaje de células con  $\Phi_m$  alterado, mientras que la TFD de 20 min lo incrementa a  $32,1 \pm 8,5\%$ .

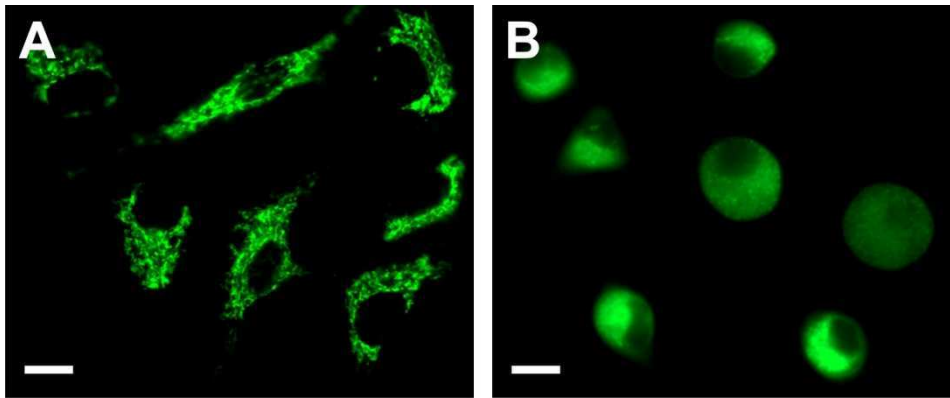
Con el fin de evaluar en forma cualitativa y a nivel morfológico los cambios mitocondriales asociados a la TFD, se utilizó la tinción con Mito Tracker Green tal como se detalló previamente en M&M. Este compuesto ingresa a la mitocondria por difusión pasiva, acumulándose allí cuando la organela está activa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

La técnica consiste en realizar la incubación con ALA conjuntamente con la sonda durante la última media hora de incubación. La irradiación se realiza en presencia de la sonda, de modo que si se produce la disrupción del  $\Phi_m$ , la sonda es liberada al citosol y emite fluorescencia aún fuera de la organela mostrando un patrón uniforme.

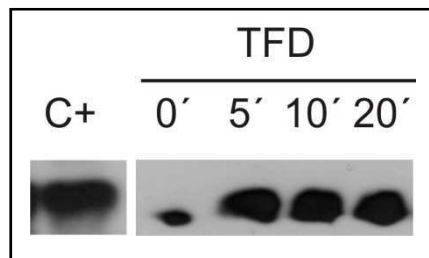
En la Fig. II.12 puede verse una morfología normal para las mitocondrias de células no tratadas, mostrando un patrón de fluorescencia a modo de fibras alargadas. En cambio, la fluorescencia se vuelve prácticamente uniforme al irradiar las células en presencia del FS y la sonda.

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

Se midió la liberación de citocromo c en la fracción citosólica mediante la técnica de western blot, utilizando citocromo c como control positivo. Se observó un aumento en la liberación del mismo cuando las células fueron sometidas a la TFD (Fig. II.13).



**Fig. II.12.** Fluorescencia correspondiente a MitoTracker Green en células no tratadas (A) o tratadas con TFD 10 min (B) en presencia de la sonda. Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron incubadas con ALA durante 2,5 h, continuando la incubación durante 0,5 h con la adición de la sonda fluorescente MitoTracker Green 150 nM y luego irradiadas 10 min. Las imágenes se tomaron inmediatamente después del tratamiento. Barra de escala: 10 $\mu$ m.



**Fig. II.13.** Expresión de citocromo c evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica de células no tratadas o tratadas con distintos tiempos de irradiación. El control positivo se realizó utilizando citocromo c comercial (C+). La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD.

El aumento en la dosis lumínica no parece afectar la intensidad de las bandas, con lo cual sería posible pensar que la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c es un proceso “todo o nada”, al contrario de lo observado con la retención de Rh 123.

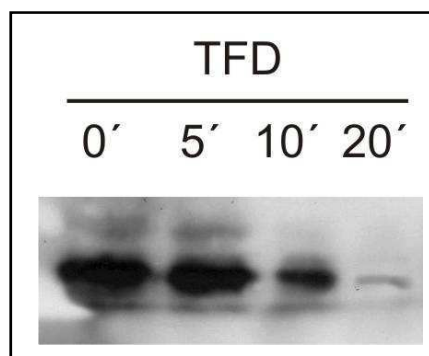
#### II.2.4. Expresión de caspasas

Las caspasas juegan un rol crucial en la mayoría de las vías apoptóticas. Las caspasas iniciadoras, tales como las caspasas -8 o -10, clivan y activan a las caspasas efectoras, -3 o -6, que subsecuentemente clivan numerosos sustratos dando lugar a los principales cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis. (Buytaert et al, 2007).

En distintos modelos experimentales se observó que luego de la TFD, la vía apoptótica más común es la que involucra la liberación de citocromo c, la activación de caspasa-9 y de caspasa-3 (vía intrínseca); sin embargo, otras vías, especialmente aquellas que involucran caspasa-8 (vía extrínseca) pueden contribuir a la muerte celular en situaciones en las que la vía principal está suprimida (Oleinick et al, 2002).

Si bien las caspasas se consideran las principales determinantes de la morfología apoptótica, un creciente número de trabajos proponen la idea de que la apoptosis inducida por la TFD puede ocurrir en forma independiente de caspasas (Furre et al, 2006; Vittar et al, 2010). Debido a las diversas respuestas a la TFD reportadas resultó de interés determinar la vía apoptótica involucrada en la línea celular estudiada.

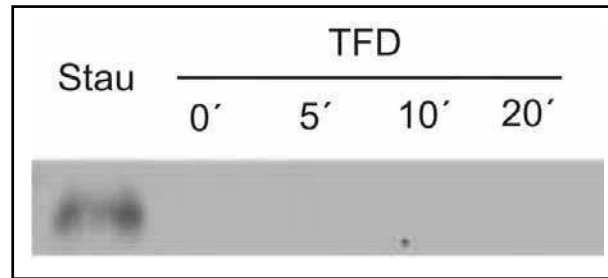
Para ello se evaluó la expresión de pro-caspasa -3 y caspasa -8, que participan en las vías intrínseca y extrínseca, respectivamente. En la Fig. II.14 se muestra una disminución en la expresión de procaspasa-3, cuando las células fueron sometidas a la TFD, indicando que esta proteína estaría participando en los eventos que conducen a la morfología apoptótica observada luego del tratamiento.



**Fig. II.14.** Expresión de procaspasa-3 evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica de células no tratadas o tratadas con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD.



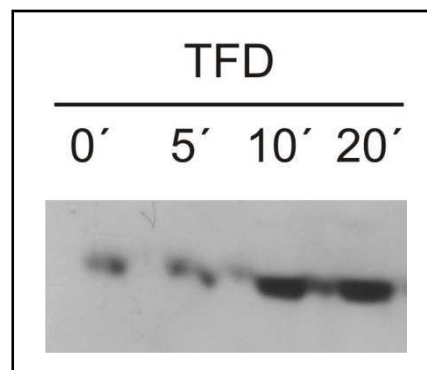
Con respecto a caspasa-8, no se detectó la forma clivada (activa) en las células tratadas con TFD, observándose solamente la expresión de la misma en un control positivo en el cual las células fueron tratadas durante 24 h con Staurosporina 10  $\mu$ M (Fig. II.15) (Belmokhtar et al, 2001).



**Fig. II.15.** Expresión de caspasa-8 evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica de células no tratadas o tratadas con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD. (Stau: control positivo con staurosporina 10  $\mu$ M, 24 h).

#### II.2.5. Expresión de Bcl-2

Se observó un aumento en la expresión de Bcl-2 inducido por la TFD (Fig. II.16). El rol de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en la TFD resulta ambiguo. Mientras que en ciertos casos una sobreexpresión de Bcl-2 se asoció a una disminución en la apoptosis inducida por la TFD, en otros, una elevada expresión de esta proteína aumentó el grado de muerte celular por la TFD (Oleinick et al, 2002). Además, en numerosos trabajos se demostró que Bcl-2 es un target de la TFD utilizando una gran variedad de FS (Kessel y Castelli, 2001; Kessel et al, 2005, Marchal et al, 2007). Esta proteína se detectó en todos los tiempos de irradiación y en el control.

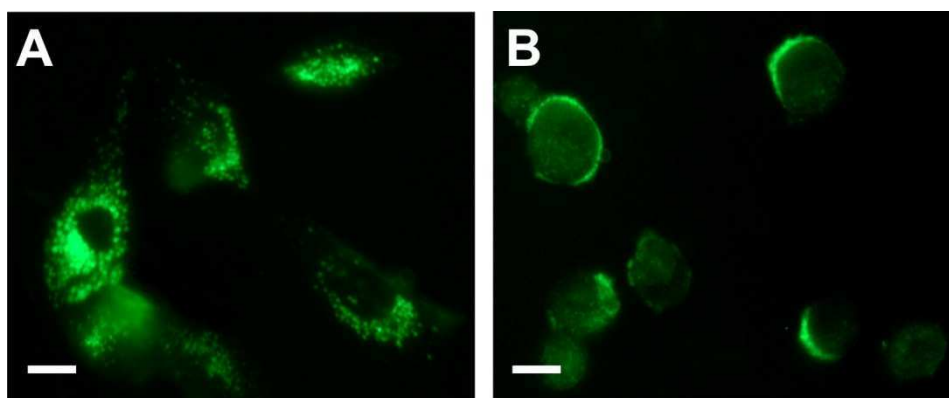


**Fig. II.16.** Expresión de Bcl-2 evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica en células no tratadas o tratadas con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD.

### II.2.6. Participación lisosomal en la apoptosis

Tradicionalmente la ruptura de los lisosomas se asociaba al proceso de muerte por necrosis, ya que durante la apoptosis éstos se mantenían estructuralmente intactos. Sin embargo en trabajos de los últimos años se demostró que la relocalización de proteasas lisosomales como la catepsina D y B desde el lisosoma hacia el citoplasma, puede participar en la ejecución de la apoptosis (Johnson et al, 2000; Guicciardi et al, 2004). Este proceso se atribuye a diversos estímulos como el estrés oxidativo, principalmente la producción de peróxido de hidrógeno o la activación de p53, entre otros (Yuan et al, 2000; Stoka et al, 2001). Si bien en las células en estudio previamente demostramos que el principal sitio de localización de la PpIX es la mitocondria, resulta interesante investigar una posible participación lisosomal en el proceso de muerte celular inducido por la TFD-ALA.

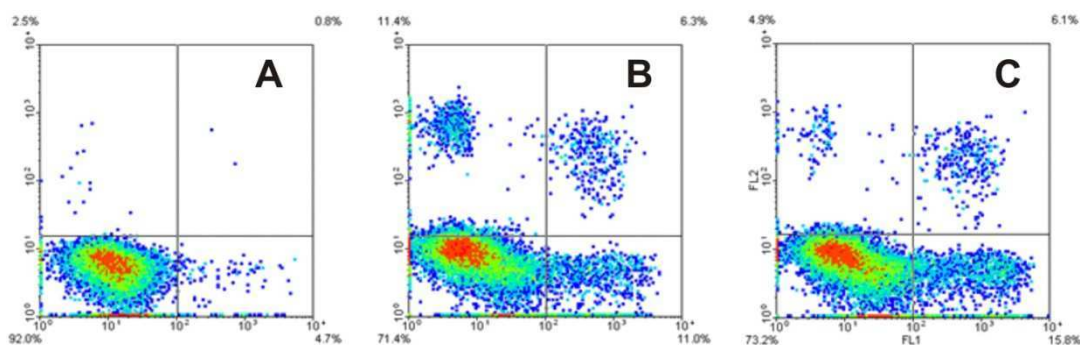
Se estudió la morfología lisosomal post TFD según el mismo criterio empleado previamente para el estudio de la participación mitocondrial. Se realizó la incubación con ALA conjuntamente con la sonda LysoTracker Green durante la última media hora de incubación. La irradiación se realiza en presencia de la sonda, de modo que si se produce la disrupción del lisosoma la sonda es liberada al citosol y emite fluorescencia aún fuera de la organela mostrando un patrón uniforme.



**Fig. II.17.** Fluorescencia correspondiente a LysoTracker Green en células no tratadas (A) o tratadas con TFD 10 min (B) en presencia de la sonda. Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron incubadas con ALA durante 2,5 h, continuando la incubación durante 0,5 h con la adición de la sonda fluorescente LysoTracker Green 150 nM y luego irradiadas 10 min. Las imágenes se tomaron inmediatamente después del tratamiento. Barra de escala: 10 $\mu$ m.

Según se observa en la Fig. II.17, el patrón de fluorescencia se ve notablemente alterado luego de realizar la TFD. Sin embargo, la marcación no se presenta completamente uniforme, sino que se visualiza una relocalización de las organelas hacia la periferia de la célula.

A fin de evaluar la participación lisosomal en la inducción de apoptosis las células se coincubaron con el inhibidor de catepsina D, pepstatina A (PA, 100 $\mu$ M) y el ALA durante 3 h y luego fueron irradiadas. Debido a que la disrupción lisosomal se considera un evento temprano en el proceso de apoptosis, las células fueron analizadas inmediatamente post TFD. Se midió el nivel de apoptosis utilizando An/IP (Fig. II.18)



**Fig. II.18.** Marcación para apoptosis luego de preincubación con PA y posterior TFD-ALA. Las células fueron coincubadas con PA y ALA y luego irradiadas 10 min. Inmediatamente después del tratamiento fueron tripsinizadas y la suspensión se centrifugó para resuspender en buffer binding. Luego se agregó An/IP y se analizó por citometría de flujo. Células sin tratamiento (A), TFD 10 min (B), TFD 10 min + PA (C).

Según estos resultados, la PA no produjo efectos significativos sobre la inducción de muerte celular por apoptosis (TFD 10 min:  $17,3 \pm 4,2\%$ ; TFD 10 + PA:  $21,9 \pm 5,1\%$ ). Lo cual sugiere que el daño lisosomal observado en la Fig. II.17 es un efecto secundario del entorno prooxidante generado por la TFD, lo cual es consistente con la disrupción parcial de los lisosomas discutida previamente.

### *II.3. Autofagia post TFD*

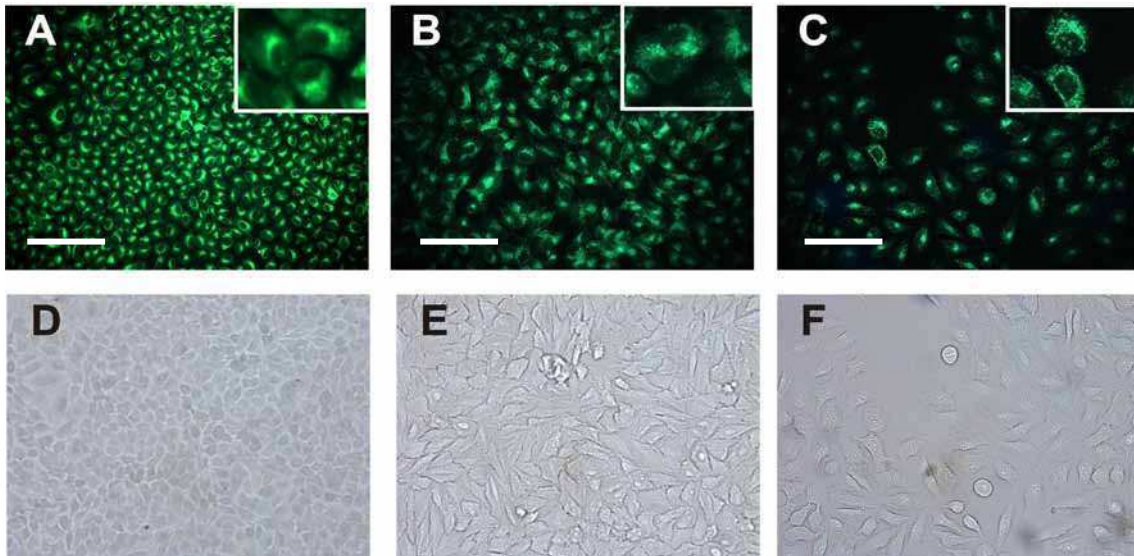
La autofagia se propuso inicialmente como un mecanismo que en situación de privación de nutrientes, permitiría a las células digerir los propios componentes y así favorecer la supervivencia. Sin embargo ha tomado importancia en los últimos tiempos como un mecanismo de muerte celular. En particular, la inducción de autofagia por TFD es un fenómeno no menor en el efecto antitumoral del tratamiento. (Reiners et al, 2010).

Previamente se había observado en la morfología celular 24 h post TFD una marcada vacuolización del citoplasma cuando las células eran irradiadas en su  $DL_{50}$  (7 min) (Fig. II.2 D). También se había detectado un aumento en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, involucrada en la regulación de la autofagia, tan pronto como 1 h después del tratamiento en una dosis de 10 min (Fig. II.15). Estos hallazgos hacen que sea relevante el estudio de la inducción de muerte celular por autofagia post TFD.

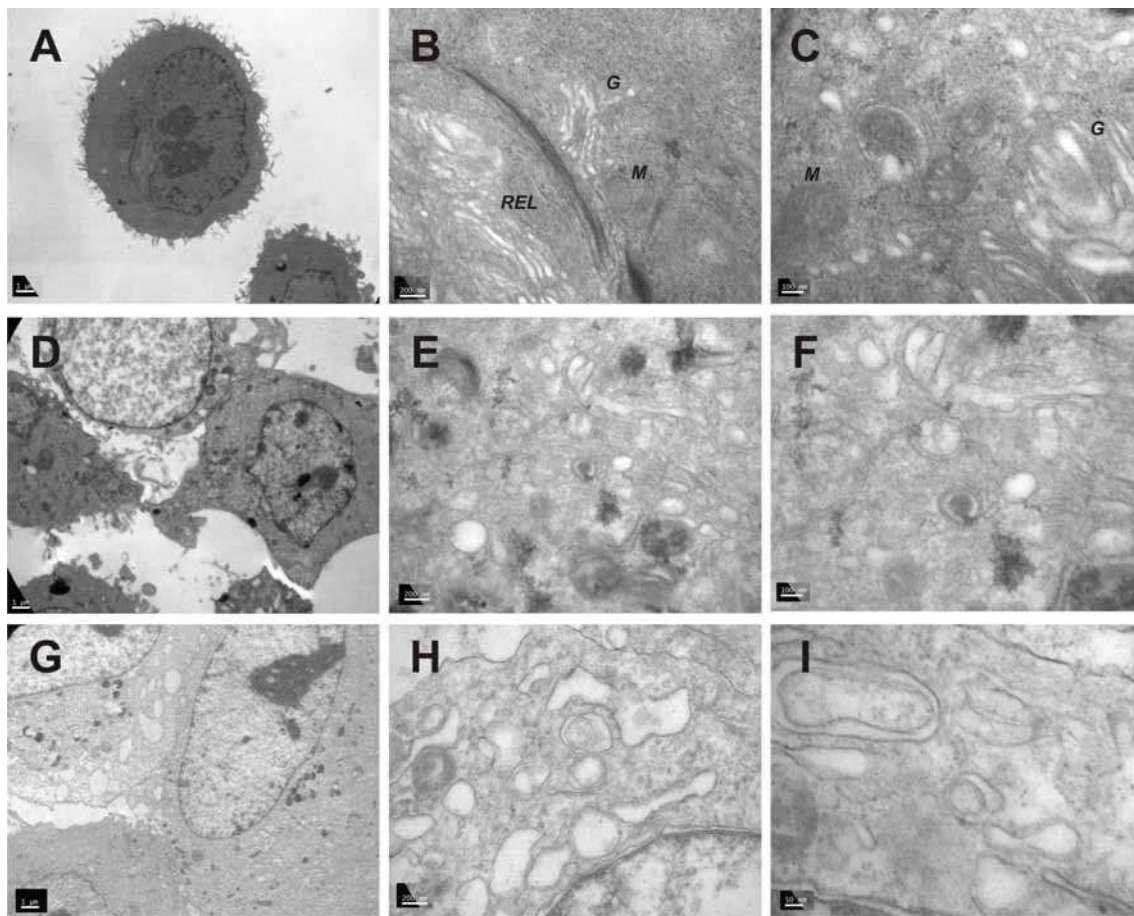
#### *II.3.1. Vacuolas autofágicas*

La inducción de autofagia, frecuentemente se evidencia por la presencia de vacuolas de digestión celular con contenido ácido, las cuales presentan indefectiblemente una doble membrana, que las distingue de las vacuolas normalmente presentes en una célula viable. Para detectar el incremento de vacuolas ácidas en las células tratadas se empleó monodansilcadaverina (MDC), un compuesto fluorescente que es captado por este tipo de vesículas multilamelares (Munafo y Colombo, 2001).

Mediante este ensayo se observó un patrón notablemente más puntillado tanto en las células tratadas con Rapamicina (inductor de autofagia, control positivo, Fig. II.19 B) como en las tratadas con TFD (Fig. II.19 C) con respecto a las células sin tratar (Fig. II.19 A), indicando una posible inducción de formación de vacuolas ácidas luego del tratamiento fotodinámico.



**Fig. II.19.** Marcación de células A549 con MDC para la detección de vacuolas ácidas. Las células fueron tratadas con TFD-ALA como se describió previamente y luego marcadas con MDC 500 nM e incubadas 30 min a 37°C. Luego de dos lavados con PBS se visualizaron al microscopio de fluorescencia. Células sin tratamiento (A y D), células tratadas con Rapamicina (50 µg/ml, 24 h) (B y E) TFD 10 min (C y F). Barra de escala: 100 µm.



**Fig. II.20.** Morfología subcelular por microscopía electrónica de transmisión de células A549 1 h post TFD-ALA. Las células fueron tratadas con TFD-ALA como se describió previamente y luego fijadas con glutaraldehído y tetróxido de osmio previo a la inclusión, deshidratación y montaje. Células sin tratamiento (A - C), TFD 10 min (D - F), TFD 20 min (G - I). Aumentos: A, D y G: 7000X. B, E y H: 50000X. C y F: 85000X. I: 140000X.

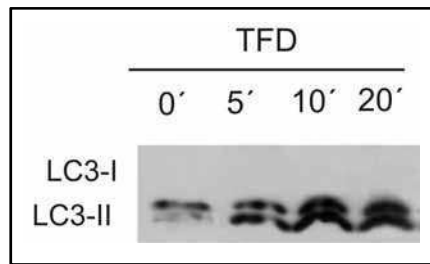
Sin embargo, la manera de detectar fehacientemente la presencia de vacuolas autofágicas es verificar la presencia de vacuolas de doble membrana mediante microscopía electrónica. De esta forma es posible visualizar la ultraestructura de estas vescículas acídicas.

Como se observa en la Fig. II.20, la morfología subcelular normal de la línea, es con un citoplasma altamente granuloso, con mitocondrias redondeadas con crestas visibles (M), aparato de Golgi (G) de gran tamaño rodeado de vescículas y retículo endoplasmático liso (REL) conspicuo. En cambio, la morfología subcelular se presenta muy alterada luego de una irradiación de 10 y 20 min, con gran vacuolización del citoplasma. De estas estructuras, numerosas vacuolas presentaron doble membrana y contenido celular dentro, indicando la posibilidad de una vía autofágica de respuesta a la TFD-ALA, lo cual es avalado por la tinción con monodansilcadaverina. Para confirmar estos resultados, es relevante estudiar la expresión del marcador de autofagia LC3.

### *II.3.2. Detección de LC3-II*

El marcador de autofagia LC3 (Light chain 3) fue originalmente identificado como una subunidad de proteínas asociadas a microtúbulos. Luego se descubrió que correspondía al homólogo de Atg8 en levaduras, que es un componente fundamental en el proceso autofágico. El clivaje de LC3 humano como modificación postraducciona ocurre durante la autofagia y produce la forma citosólica LC3-I. A medida que progresa el proceso autofágico, LC3 es convertido a LC3-II mediante lipidación por Atg7 y Atg3, lo cual lleva a su asociación con la membrana de vacuolas autofágicas. Por lo tanto la conversión de LC3 a su forma LC3-II es un indicador de autofagia (Ichimura et al, 2000; Rubinsztein et al, 2009).





**Fig. II.21.** Expresión de LC3-I y LC3-II evaluada mediante Western Blot, en la fracción citosólica en células no tratadas o tratadas con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD.

Como puede observarse en la Fig II.21, el clivaje de LC3 y la aparición de la forma LC3-II al cabo de 1 h de realizada la TFD-ALA, confirman el proceso autofágico visualizado anteriormente con la presencia de vacuolas.

### CONCLUSIONES

La TFD induce cambios morfológicos globales en las células que pueden visualizarse 1 h luego del tratamiento.

Tanto la morfología general como la morfología nuclear se ven fuertemente afectadas por la TFD-ALA. Se observa condensación nuclear, desprendimiento del sustrato, reducción de tamaño celular, aumento en la granularidad y con dosis iguales o menores a la  $DL_{50}$  se observa vacuolización del citoplasma, 24 h después del tratamiento.

La externalización de fosfatidilserina y la tinción diferencial indican que el mayor porcentaje de las células que mueren por TFD lo hacen a través de un proceso apoptótico.

Esta afirmación es consistente con la disminución en la expresión de procaspasa-3, aunque no con el aumento de Bcl-2 conforme aumenta el tiempo de irradiación.

La pérdida de integridad mitocondrial verificada por diversas técnicas (externalización de sondas fluorescentes) sugiere que la vía preferencial de inducción de apoptosis por TFD-ALA es la vía intrínseca.

La liberación de citocromo c al citoplasma, es independiente del tiempo de irradiación, sugiriendo que es un evento temprano respecto del inicio de la TFD.

Habiéndose observado disrupción de la integridad mitocondrial, se estudió el efecto del inhibidor de catepsina D, pepstatina A, a fin de evaluar la participación lisosomal en la inducción de apoptosis. Este agente no tuvo efectos significativos sobre los porcentajes de apoptosis, indicando que el daño a lisosomas no es un iniciador del proceso de muerte sino una consecuencia secundaria del mismo.



La observación de un patrón de fluorescencia puntillado para la MDC y la disrupción de la morfología subcelular con formación de vacuolas de doble membrana llevó a la presunción de un proceso autofágico post-TFD, lo cual se verificó mediante la expresión de LC3-II.

Se observó un aumento en la expresión de Bcl-2 inducido por la TFD. Si bien estos resultados parecieran no concordar con lo descrito en muchos trabajos en los que se ha demostrado que el incremento en la expresión de esta proteína se asocia a mecanismos de supervivencia, algunos autores reportaron lo contrario.

Utilizando células de la línea MCF10A, Kim et al. (2012) demostraron que la sobre-expresión de Bcl-2 se correlacionaba con un aumento en la apoptosis inducida por TFD. En estudios clínicos se observó que en pacientes con cáncer de esófago, los tejidos que presentaron mayores niveles de Bcl-2, fueron los más susceptibles a los efectos de la TFD (Koukourakis et al, 2001).

Las evidencias obtenidas hasta el momento, indican que los cambios en la expresión de Bcl-2 inducidos por la TFD, son variables, y muchas veces no pueden interpretarse en forma aislada, sino teniendo en cuenta la complejidad de procesos que determinan la inducción de apoptosis (Oleinick et al, 2002). El hecho de que Bcl-2 se encuentre aumentado como consecuencia de la TFD podría contribuir a la muerte celular por autofagia, puesto que ésta se manifiesta por lo general cuando hay presencia de factores antiapoptóticos.

Las vías de señalización de apoptosis por lo general, inhiben la muerte celular por autofagia, de modo que los indicios autofágicos aquí reportados podrían estar relacionados con mecanismos de rescate (Gordy y He, 2012).

## REFERENCIAS

- Agostinis P, Buytaert E, Breyskens H, Hendrickx N. (2004) Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci*; 3(8):721-9.
- Antonsson B. (2004) Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem*; 256/257:141–55.
- Belmokhtar CA, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. (2001) Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*; 20(26):3354-62.
- Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. (2007) Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*; 1776(1):86-107.
- Fruhwrith GO, Hermetter A. (2008) Mediation of apoptosis by oxidized phospholipids. *Subcell Biochem*; 49:351-67.
- Furre IE, Moller MT, Shahzidi S, et al. (2006) Involvement of both caspase-dependent and-independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis*; 11:2031-42.
- Gordy C, He YW. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell*. 2012 Jan;3(1):17-27.
- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene*; 23(16):2881-90.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*;408(6811):488-92.
- Johnson DE. (2000) Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia*; 14(9):1695-703.
- Kessel D, Castelli M, Reiners JJ. (2005) Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ*; 12: 502–11.
- Kessel D, Castelli M. (2001) Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol*; 74:318-22.
- Kim HR, Luo Y, Li G, Kessel D. (2012). Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after Bcl-2 transfection, *Cancer Res*. 59
- Koukourakis MI, Corti L, Skarlatos J, et al. (2001). Clinical and experimental evidence of Bcl-2 involvement in the response to photodynamic therapy, *Anticancer Res.*, , 21, 663–668).
- Li X, Zhou ZP, Hu L, et al. Apoptotic cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy of hypertrophic scar-derived fibroblasts. *J Dermatolog Treat*; en prensa.
- Marchal S, Francois A, Dumas D, et al. (2007) Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer*; 96:944-51.
- Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, et al. (2001) Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene*; 20(30):4070-84.

Munafò DB y Colombo M I. (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci*; 114: 3619-29.

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

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

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

Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, et al. (2009) In search of an "autophagometer". *Autophagy*; 5(5):585-9.

Shahzidi S, Cunderlíková B, Więdołcha A, et al. (2011) Simultaneously targeting mitochondria and endoplasmic reticulum by photodynamic therapy induces apoptosis in human lymphoma cells. *Photochem Photobiol Sci*; 10(11):1773-82.

Stoka V, Turk B, Schendel SL, et al. (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem*; 276(5):3149-57.

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

Wu RW, Yow CM, Wong CK, et al. (2011) Photodynamic therapy (PDT) - Initiation of apoptosis via activation of stress-activated p38 MAPK and JNK signal pathway in H460 cell lines. *Photodiagnosis Photodyn Ther*; 8(3):254-63.

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

Ziegler SA, Loucks C, Madsen SJ, et al. (2007) Heat shock protein 27 protects against aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy-induced apoptosis and necrosis in human breast cancer cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*; 26(3):173-83.

---

### CAPÍTULO III

#### *Especies reactivas de oxígeno*

##### *III.1. Producción de especies reactivas de oxígeno post TFD*

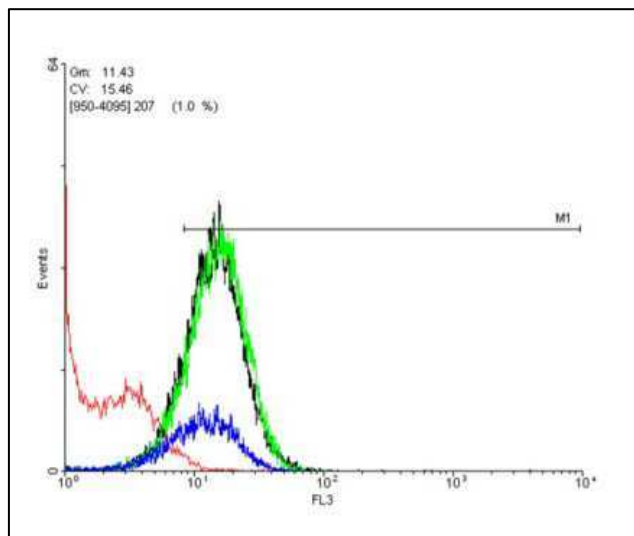
La producción de ROS es un mecanismo compartido por muchas de las terapias no quirúrgicas del cáncer incluyendo la quimioterapia, radioterapia y la TFD. Debido a la capacidad de estas especies de gatillar la muerte celular mecanismos tanto prooxidantes como antioxidantes han sido propuestos como tratamientos antitumorales (Wang y Ji, 2008). Las ROS conforman los principales agentes iniciadores y efectores de daño celular post TFD: en especial, el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), una especie altamente reactiva y de corta vida media cuyo efecto de corto plazo y corto alcance es el inicio de una cadena de reacciones de formación de otras ROS (Sharman et al, 2000). Especies reactivas y prooxidantes como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) o el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) son generadas como producto de estas reacciones fotoquímicas.

Los FSs capaces de inducir muerte celular son aquellos cuya ubicación subcelular permite un daño localizado, severo y de rápido inicio. Al excitarse luego de la irradiación se generan ROS que actúan dañando las funciones de la organela, convirtiéndola en el sitio primario de inicio de muerte celular. Este hecho explica que FSs con distinta localización subcelular disparen diferentes vías de muerte. En el caso de la PpIX endógena, su acción FS se inicia mayormente en las mitocondrias, un sitio de gran relevancia respecto del metabolismo del oxígeno.

##### *III.1.1. Producción de oxígeno singulete*

Según lo previamente expuesto, uno de los agentes fundamentales del daño oxidativo post TFD es el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) Para poder detectar su producción, se realizó el tratamiento fotodinámico como se describió anteriormente y las células fueron inmediatamente analizadas por citometría de flujo (Fig. III.1, Tabla III.1).

Dada su alta reactividad, el análisis de la producción de esta especie no se realizó 1 h post tratamiento, como en las experiencias previas, sino que las células fueron analizadas inmediatamente después del tratamiento utilizando MVP como agente de detección de esta especie reactiva.



**Fig. III.1.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de MVP. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 5 min (negro), 10 min (verde) o 20 min (azul), control no tratado (rojo). Luego fueron tripsinizadas inmediatamente e incubadas con MVP 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

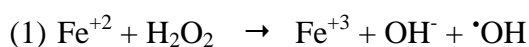
Tratamiento	% células positivas para MVP
Control	0,6 $\pm$ 1,2 %
TFD 5 min	83,7 $\pm$ 2,3 %
TFD 10 min	83,5 $\pm$ 2,1 %
TFD 20 min	67,1 $\pm$ 1,8 %

**Tabla. III.1.** Cuantificación de células positivas para fluorescencia de MVP. Los valores se expresan como % respecto del control de células no tratadas y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

Irradiaciones de 5 o 10 min no muestran diferencias significativas entre sí; a los 20 min, se observa una disminución de la producción de  $^1\text{O}_2$ , que puede atribuirse a la inestabilidad de esta especie. La producción de  $^1\text{O}_2$  parece ser un evento “todo o nada” independiente de la dosis lumínica y lábil durante el período que dura la irradiación.

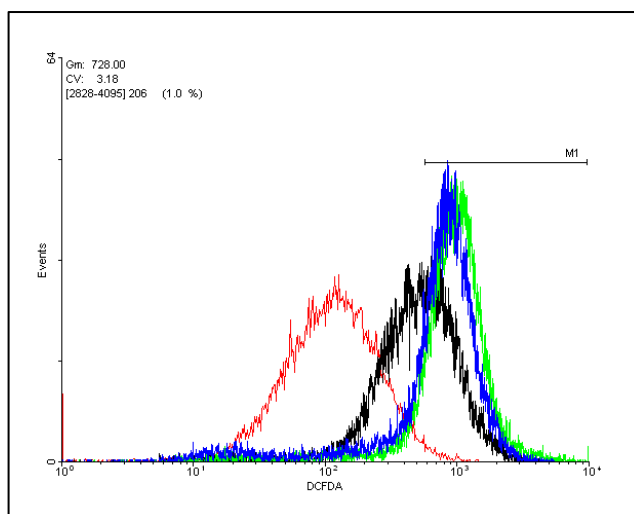
### III.1.2. Producción de peróxidos

Si bien el  $^1\text{O}_2$  es considerado el mayor disparador del daño oxidativo en la TFD, otras especies reactivas como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) están involucradas en los efectos citotóxicos. No sólo por su acción oxidante por sí mismo, sino también porque tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas, y tiene la capacidad de reaccionar con el hierro en la llamada reacción de Fenton (1), generando otra especie de alta reactividad, el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Torres, 2002).



La formación de peróxidos, como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , amplifica el efecto iniciador del  $^1\text{O}_2$ . Por lo tanto, la presencia de estas otras especies implica una progresión en las reacciones fotoquímicas que se sucederán dando lugar a daños severos en los componentes celulares (Price et al, 2009). A fin de detectar la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , las células tratadas con TFD-ALA se marcaron con  $\text{H}_2$ -DCFDA y se analizaron por citometría de flujo (Fig. III.2, Tabla III.2).

Según los resultados obtenidos, la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumenta en las células irradiadas respecto de las células sin tratamiento, de modo que los porcentajes de células positivas para los tiempos de 10 y 20 min de irradiación no difieren entre sí y son mayores que los porcentajes para el tiempo de 5 min. Este último tiempo de iluminación, de acuerdo a lo que se analizó previamente, resulta insuficiente para inducir muerte celular más allá de un 30%, aunque sí activa la generación y propagación de especies reactivas.



**Fig. III.2.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de H<sub>2</sub>-DCFDA. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 5 min (negro), 10 min (verde) o 20 min (azul); control no tratado (rojo). Luego de 1 h de finalizado el tratamiento las células fueron tripsinizadas y cargadas con H<sub>2</sub>-DCFDA 2 μM para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

Tratamiento	% células positivas para H <sub>2</sub> -DCFDA
Control	1,4 ± 0,4 %
TFD 5 min	46,5 ± 1,8 %
TFD 10 min	78,5 ± 6,5 %
TFD 20 min	70,1 ± 4,3 %

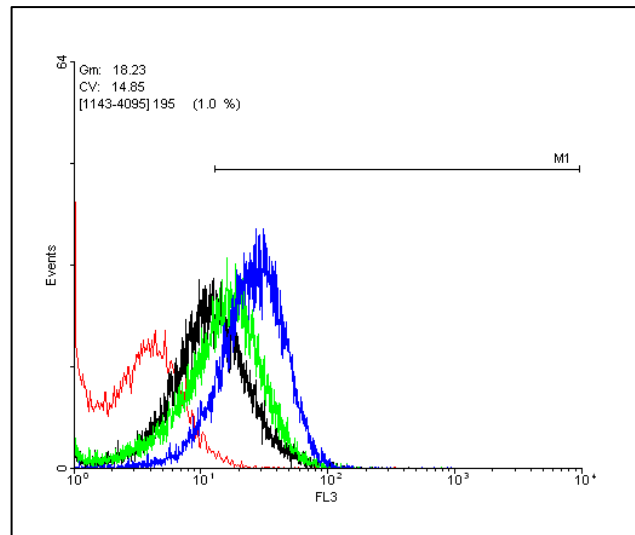
**Tabla. III.2.** Cuantificación de células positivas para fluorescencia de H<sub>2</sub>-DCFDA. Los valores se expresan como % respecto del control de células no tratadas y representan la media ± SD: desviación estándar

### III.1.3. Producción de anión superóxido

El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) no sólo es altamente reactivo, sino que espontáneamente dismuta a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o es catalíticamente convertido por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El O<sub>2</sub><sup>-</sup> es capaz de reaccionar aún más rápido con compuestos como el radical de NO, que forma peroxinitrito, altamente dañino.

Con el objetivo de detectar la presencia de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, las células tratadas con TFD-ALA se marcaron con HE y se analizaron por citometría de flujo (Fig. III.3, Tabla III.3).

Se observa que la producción de  $O_2^-$  aumenta conforme aumenta el tiempo de irradiación, a diferencia de las otras dos especies reactivas cuantificadas previamente.



**Fig. III.3.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de HE. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 5 min (negro), 10 min (verde) o 20 min (azul); control no tratado (rojo). Luego de 1 h de finalizado el tratamiento las células fueron tripsinizadas y cargadas con HE  $2 \mu\text{M}$  para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

Tratamiento	% células positivas para HE
Control	$0,6 \pm 0,4 \%$
TFD 5 min	$44,1 \pm 0,8 \%$
TFD 10 min	$53,1 \pm 3,7 \%$
TFD 20 min	$79,6 \pm 6,8 \%$

**Tabla. III.3.** Cuantificación de células positivas para fluorescencia de HE. Los datos se expresan como % respecto de células no tratadas y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar



### III.2. *Modulación de muerte celular post-TFD*

Las ventajas de la TFD basada en ALA residen en parte, en el hecho de que la PpIX, el único FS endógeno, es eliminado del sistema entre 24 y 48 h después de su administración, generando mínima fotosensibilización cutánea en los pacientes a los que se les aplica el tratamiento (Juzenas y Juzeniene, 2010; Davila, 2011). La importancia de poder modular el resultado de la TFD en cuanto a muerte celular, reside en que posibilita reducir el daño en los tejidos no malignos, y a su vez, brinda información sobre cuáles son los agentes que median la eliminación de las células tumorales.

Con el objetivo de modular la muerte celular por TFD, se analizaron una serie de agentes antioxidantes en rangos de concentración no citotóxicos o fotosensibilizantes por sí mismos.

#### III.2.1. *Grados de protección de antioxidantes*

Los antioxidantes no enzimáticos son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula y sólo actúan a concentraciones elevadas. Se los clasifica en hidrosolubles y liposolubles. Los primeros reaccionan con moléculas en medios acuosos como el citosol, mientras que los liposolubles tienen mayor participación en la protección frente a la peroxidación lipídica producida por las ROS.

Los antioxidantes tienen distintos mecanismos de acción: pueden interrumpir la reacción en cadena iniciada por radicales libres o secuestrar a los agentes prooxidantes y evitar que se propaguen (Kappus y Sies, 1981).

El rol de los antioxidantes en la TFD es controversial. Pueden presentar un efecto protector frente al daño oxidativo provocado por la TFD o pueden contribuir a incrementar su toxicidad, frecuentemente en presencia de metales catalíticos. La producción de oxígeno singlete predomina en el momento de la irradiación cuando los antioxidantes pueden considerarse verdaderos agentes reductores y por lo tanto, protectores. A medida que transcurre el tiempo, y el oxígeno se agota, sobreviene la condición de hipoxia y aumenta la contribución de los radicales libres. Mientras más tarde se agregue el antioxidante desde el momento de la irradiación más tiende a ejercer una acción prooxidante (Buettner y Jurkiewicz, 1996).

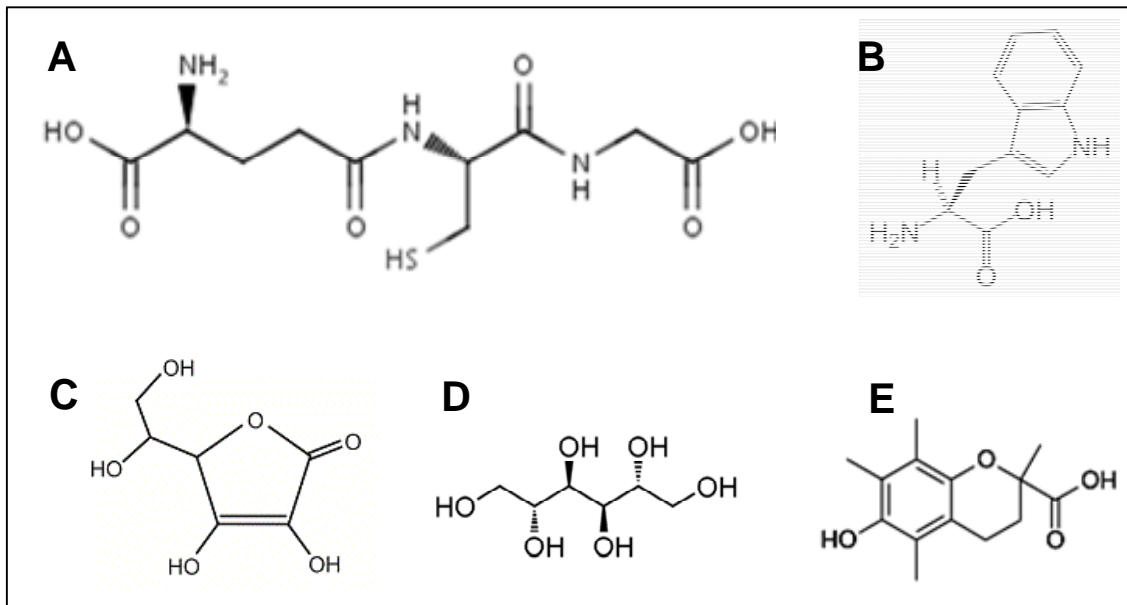
Algunos de ellos presentan cierta selectividad o especificidad en las especies reactivas que secuestran, aunque no es una cualidad propia de estos agentes. Por ejemplo, el triptófano es un aminoácido altamente susceptible a la oxidación por oxígeno singulete (Ronsein et al, 2008), mientras que el manitol es un reconocido secuestrante de radical hidroxilo (Perotti et al, 2002).

Los agentes antioxidantes seleccionados para realizar los experimentos planteados fueron: glutatión reducido (GSH), triptófano (Trp), manitol (Man), ascorbato (Asc) y Trolox (Trx), un análogo hidrosoluble de la vitamina E (Fig. III.4). El tiempo de irradiación seleccionado para realizar la TFD-ALA fue de 10 min. Una dosis mayor que la  $DL_{50}$ , que permite observar daño celular y a la vez recuperar las células con mínima pérdida para su análisis.

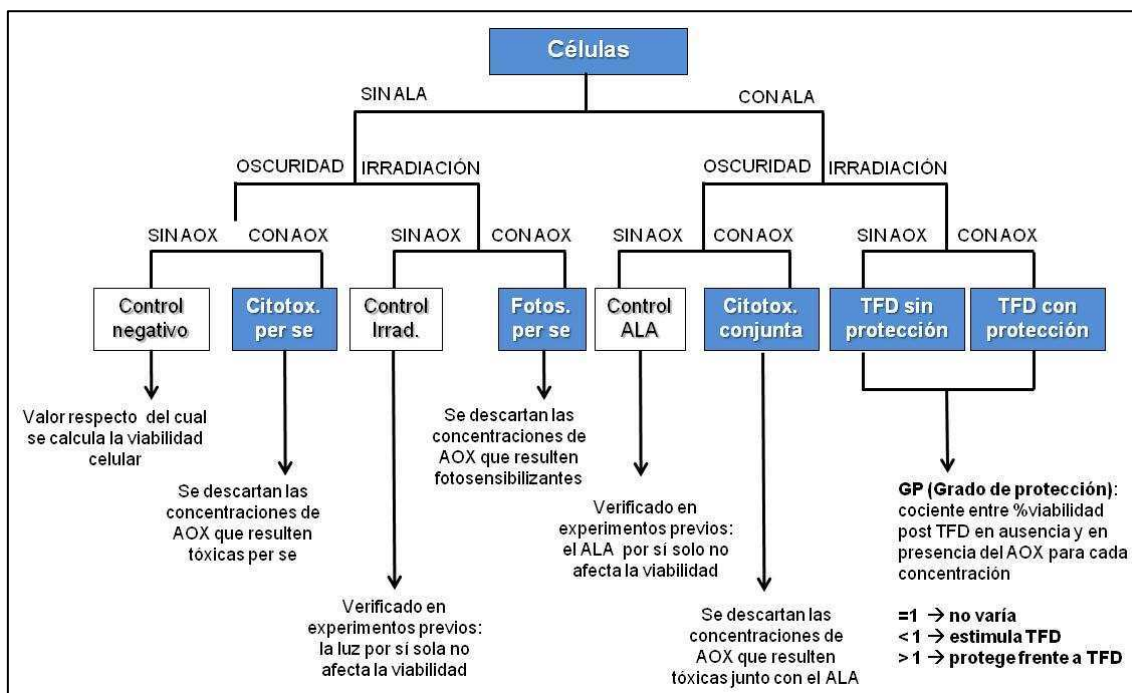
El objetivo de los experimentos que se muestran a continuación es determinar qué compuestos antioxidantes y en qué condiciones son capaces de ejercer un efecto protector frente al tratamiento fotodinámico a fin de obtener agentes moduladores del daño celular.

Para determinar las concentraciones de trabajo para cada antioxidante se siguió el esquema experimental que se indica en la Fig. III.5. El mismo consiste en identificar las concentraciones de antioxidante que resultan citotóxicas (por sí mismos o en presencia de ALA) o con actividad fotosensibilizante, a fin de descartarlas para los experimentos subsiguientes. Luego se realizó la TFD-ALA en presencia y en ausencia de los compuestos en las concentraciones seleccionadas y se calculó el grado de protección (GP) para cada antioxidante en cada concentración. El GP se define como el cociente entre el porcentaje de viabilidad celular post TFD en presencia y en ausencia del antioxidante. Este valor puede resultar: a) 1: lo cual implica que el antioxidante no tiene efecto sobre la TFD; b) Menor a 1: en cuyo caso, el antioxidante estimula la muerte celular post TFD; c) Mayor a 1: indicando que la presencia del antioxidante ejerce un efecto protector frente al daño inducido por la TFD.

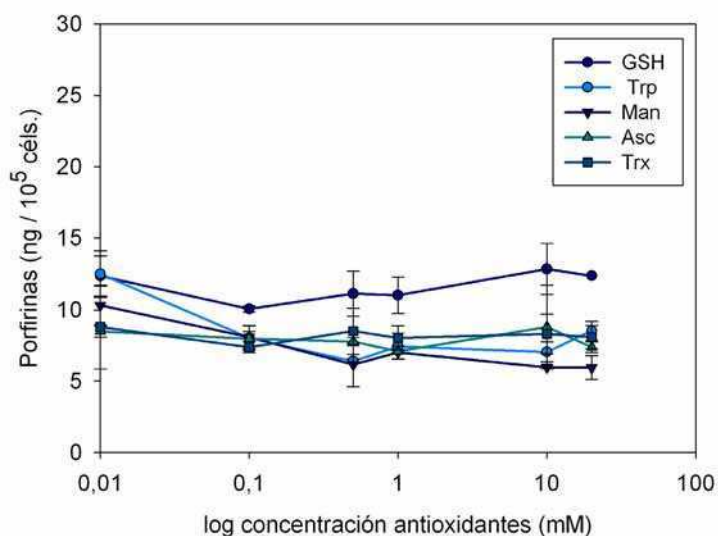
Se incluyó un control en el que se incubaron los antioxidantes en todo el rango de concentraciones no citotóxicas conjuntamente con ALA 1 mM, durante 3 h con el objetivo de verificar que la presencia de estos agentes no alterara la síntesis de porfirinas (Fig. III.6).



**Fig. III.4.** Antioxidantes empleados en experimentos de protección frente a TFD-ALA. Glutación reducido (A). Triptófano (B). Ascorbato (C). Manitol (D). Trolox (E).



**Fig. III.5.** Esquema experimental para la determinación de GPs de antioxidantes frente a TFD-ALA.



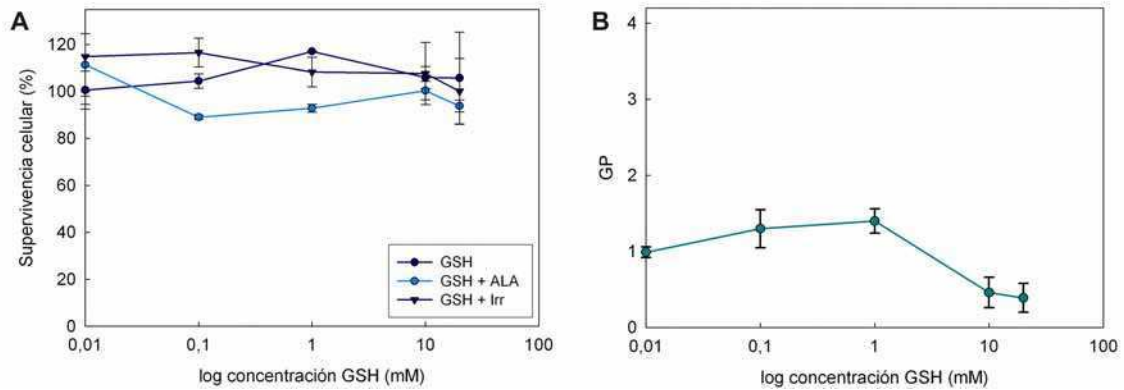
**Fig. III.6.** Efecto de antioxidantes sobre la producción de porfirinas. Las células fueron preincubadas 1 h con los diferentes compuestos en el rango de concentraciones indicado e incubadas con ALA 1 mM durante 3 h en medio sin suero. Finalizada la incubación, las porfirinas intracelulares se extrajeron y cuantificaron espectrofluorométricamente. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Puede verse en la Fig III.6 que ninguno de los antioxidantes produjo variaciones significativas en la producción de porfirinas inducidas por ALA, en el rango de concentraciones ensayadas, por lo que se descarta un efecto porfirinogénico de los mismos.

El GSH es uno de los antioxidantes endógenos más ampliamente involucrado en la detoxificación de compuestos oxidantes donando electrones a través de sus grupos tiol, convirtiéndose a su forma oxidada (GSSG). Este sistema de defensa antioxidante incluye también a la glutatión reductasa, la enzima encargada de regenerar el GSH.

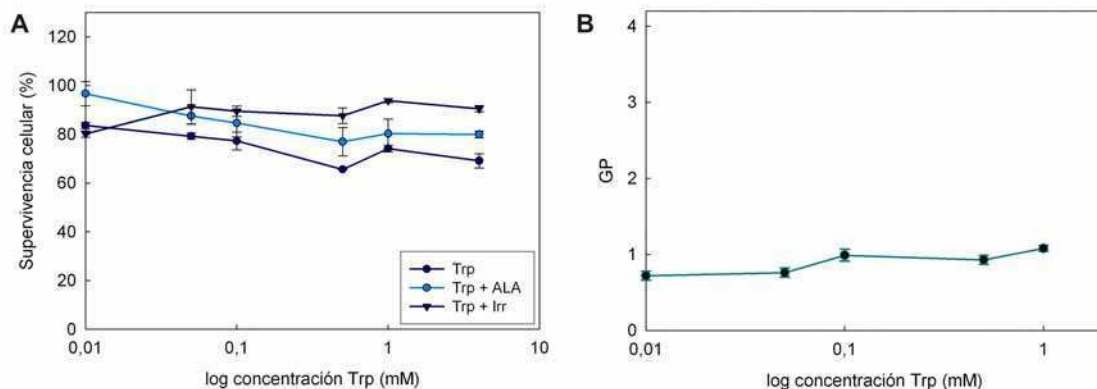
Ninguna de las concentraciones de GSH utilizadas mostró citotoxicidad o fotoactividad, por lo que el efecto protector del GSH fue testado en todo el rango (Fig. III.7). Se observó que este agente reductor brindó una protección leve frente a la TFD, alcanzando un GP máximo de  $1,4 \pm 0,2$  en la concentración 1 mM (Tabla III.4). Ha sido previamente reportado que la inhibición de la síntesis de GSH utilizando BSO (l-butionina sulfoximina) potenció la toxicidad de la TFD, con su correspondiente aumento en la apoptosis y la generación de ROS (Kimani et al, 2012). Sin embargo, la administración de GSH exógeno no parece tener la misma relevancia que la

disponibilidad de GSH endógeno como defensa frente al daño oxidativo inducido por TFD. Más aún, concentraciones mayores a 1 mM tienen un efecto que promueve la muerte celular por TFD.



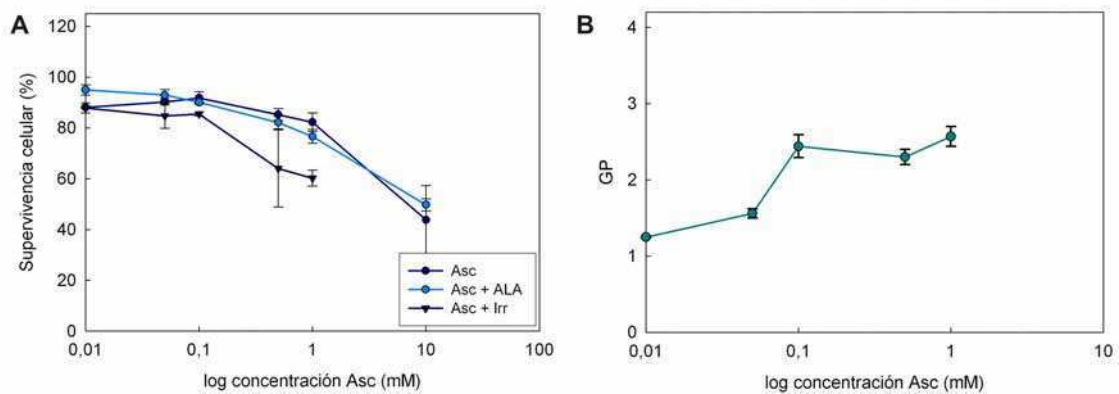
**Fig. III.7.** Efecto del GSH en la viabilidad celular. Las células fueron incubadas 3 h con GSH en presencia o en ausencia de ALA 1 mM e iluminadas 10 min o mantenidas en oscuridad. Luego se realizó el ensayo de MTT (A). Los datos se expresan como porcentaje respecto del control sin ALA y sin iluminación. GPs de GSH frente a TFD-ALA de 10 min (B). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

Contrariamente a lo esperado por su acción relativamente específica de oxidarse frente al oxígeno singulete (McLear y Hayden, 1989; Perotti et al, 2002) el Trp no brindó GP mucho mayores a 1 (Fig. III.27).



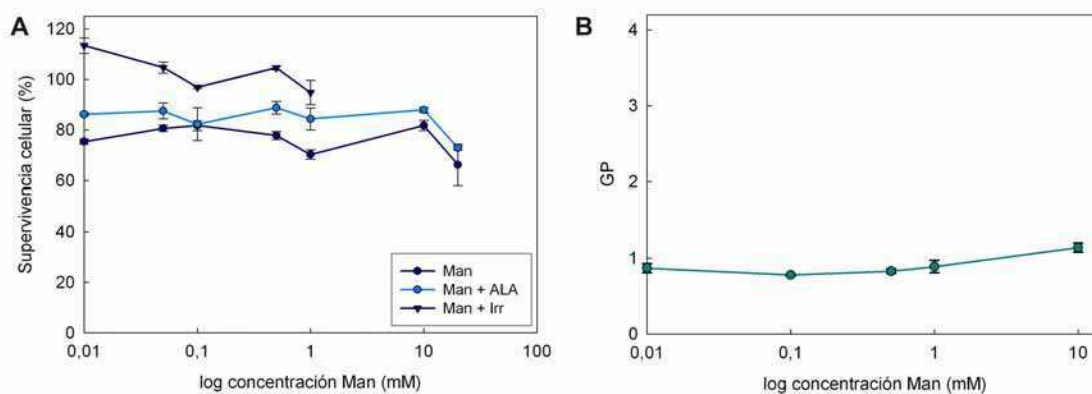
**Fig. III.8.** Efecto del Trp en la viabilidad celular. Las células fueron incubadas 3 h con Trp en presencia o en ausencia de ALA 1 mM e iluminadas 10 min o mantenidas en oscuridad. Luego se realizó el ensayo de MTT (A). Los datos se expresan como porcentaje respecto del control sin ALA y sin iluminación. GPs de Trp frente a TFD -ALA de 10 min (B). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

El Asc, en cambio, logró reducir notablemente la muerte celular por TFD alcanzando un GP de hasta  $2,6 \pm 0,1$  (Fig.III.9). Diversos resultados fueron reportados acerca de la combinación de TFD y Asc. En algunos casos, el Asc administrado *in vivo* durante 10 días previos al tratamiento fotodinámico resultó en una mayor reducción de los tumores respecto de la TFD solamente, lo cual se atribuye a la liberación de Fe y Cu de sus complejos con las proteínas como consecuencia de la TFD (Wei et al, 2012). Mientras que otros autores, en concordancia con nuestros resultados, reportan una importante protección por parte del Asc frente al fotodaño tanto *in vivo* como *in vitro* (Frank et al, 2006; Grimm et al, 2011), sugiriendo su uso en pacientes para evitar la fototoxicidad cutánea.



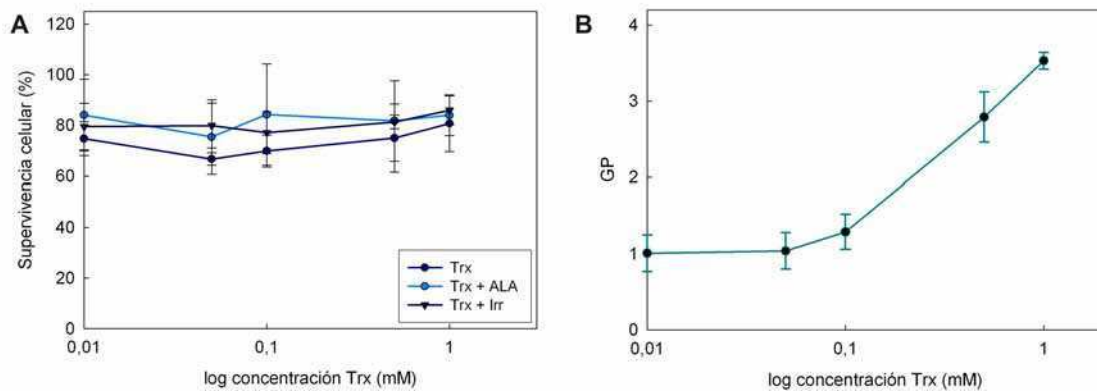
**Fig. III.9.** Efecto del Asc en la viabilidad celular. Las células fueron incubadas 3 h con Asc en presencia o en ausencia de ALA 1 mM e iluminadas 10 min o mantenidas en oscuridad. Luego se realizó el ensayo de MTT (A). Los datos se expresan como porcentaje respecto del control sin ALA y sin iluminación. GPs de Asc frente a TFD -ALA de 10 min (B). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

El Man es un reconocido secuestrante de  $\cdot\text{OH}$  cuya aplicación previa a la TFD generalmente resulta en una disminución de la muerte celular (Ding et al, 2004; Chekulayeva et al, 2011). De un modo similar al Trp, el Man no ejerció mayores efectos en el resultado de la TFD-ALA, ya que su mayor GP fue de  $1,1 \pm 0,1$  con muy poca variación en el rango de concentraciones utilizado (Fig. III.10).



**Fig. III.10.** Efecto del Man en la viabilidad celular. Las células fueron incubadas 3 h con Man en presencia o en ausencia de ALA 1 mM e iluminadas 10 min o mantenidas en oscuridad. Luego se realizó el ensayo de MTT (A). Los datos se expresan como porcentaje respecto del control sin ALA y sin iluminación. GPs de Man frente a TFD -ALA de 10 min (B). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

El Trx (derivado del  $\alpha$ -tocoferol) es un análogo hidrosoluble de la vitamina E. Junto con los carotenoides, los tocoferoles son los agentes más efectivos en la inactivación del  $^1\text{O}_2$  (Devasagayam y Kamat, 2002). Nuevamente, su efecto en la TFD es controvertido, aunque son menos los casos en que este agente favorece la TFD (Potapenko y Kyagova, 1998). Generalmente, el Trx es un agente efectivo en la protección frente al daño oxidativo iniciado por la TFD, siempre que se encuentre presente durante la irradiación (Kessel y Luo, 1996; Yoo et al, 2011). Incluso se utiliza en la práctica clínica para mejorar la recuperación del tratamiento fotodinámico de la maculopatía asociada a la edad (Scorrolli et al, 2002).



**Fig. III.11.** Efecto del Trx en la viabilidad celular. Las células fueron incubadas 3 h con Trx en presencia y ausencia de ALA 1 mM e iluminadas 10 min o mantenidas en oscuridad. Luego se realizó el ensayo de MTT (A). Los datos se expresan como porcentaje respecto del control sin ALA y sin iluminación. GPs de Trx frente a TFD -ALA de 10 min (B). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Es notable el efecto de este compuesto sobre el porcentaje de supervivencia post TFD. No sólo ejerce un efecto protector sino que éste se potencia a mayores concentraciones alcanzando un GP de  $3,5 \pm 0,1$ , el más alto de todos los compuestos probados. Por lo tanto el Trx se perfila como uno de los antioxidantes más efectivos junto con el Asc en la protección frente a la TFD-ALA, por lo cual se analizará el efecto de los mismos sobre la producción de ROS, a fin de dilucidar cuáles son las especies más relevantes en la ejecución del fotodaño.

En la tabla III.4 se sintetizan los valores de GP para los distintos antioxidantes, mostrando un claro efecto protector para Asc y Trx, y escaso o nulo efecto para los restantes antioxidantes.

Concentración (mM) / Compuesto	0.01	0.05	0.1	0.5	1	10	20
GSH	$0.9 \pm 0.1$	ND	$1.3 \pm 0.2$	ND	<b><math>1.4 \pm 0.2</math></b>	$0.5 \pm 0.2$	$0.4 \pm 0.2$
Triptofano	$0.7 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$	<b><math>1.1 \pm 0.1</math></b>	CT	CT
Ascorbato	$1.2 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.1$	$2.4 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.1$	<b><math>2.6 \pm 0.1</math></b>	CT	CT
Manitol	$0.9 \pm 0.1$	ND	$0.8 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$	<b><math>1.1 \pm 0.1</math></b>	CT
Trolox	$1.0 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.2$	$2.8 \pm 0.3$	<b><math>3.5 \pm 0.1</math></b>	$2.7 \pm 0.2$	ND

**Tabla. III.4.** Valores de GP para antioxidantes en distintas concentraciones.



### *III.2.2. Efecto de antioxidantes en la muerte celular post TFD*

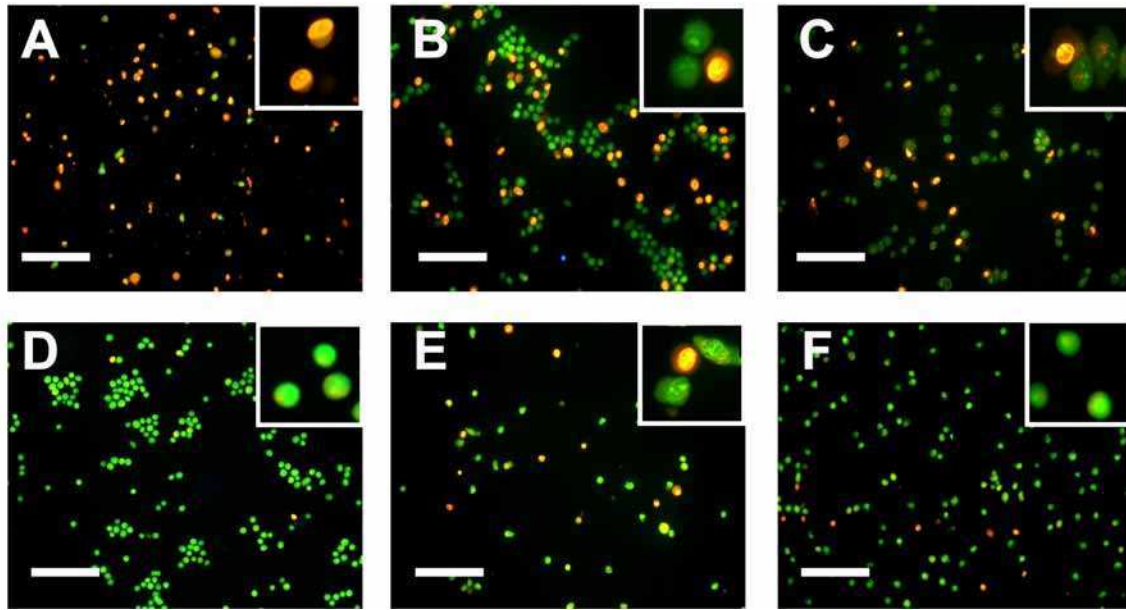
Como se comentó previamente, algunos antioxidantes pueden actuar como moduladores de la TFD, reduciendo la muerte celular cuando se hallan presentes durante la irradiación. Esta cualidad permite investigar la posibilidad de restringir el daño fotodinámico y caracterizar el grado de participación de las ROS en el inicio de los eventos que llevan a la muerte celular.

El objetivo de los siguientes experimentos fue determinar si la muerte celular por TFD puede ser modulada por la presencia de antioxidantes en su concentración de máximo GP.

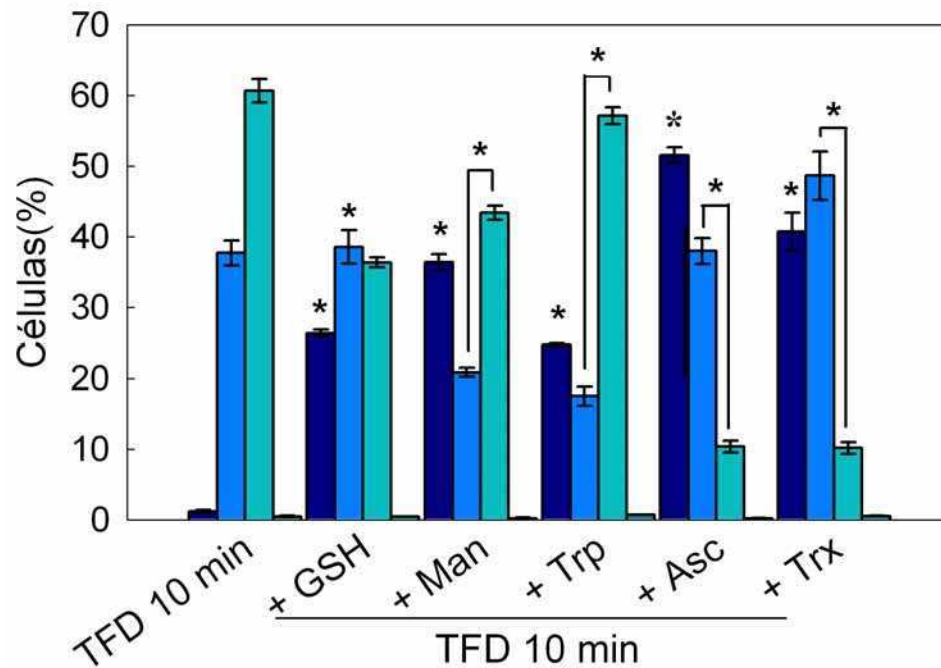
La integridad de las células que recibieron TFD-ALA en presencia de antioxidantes es claramente mayor que las que no recibieron dicha incubación. Esta observación destaca el rol preponderante de la generación y propagación de ROS para el desarrollo de los eventos de muerte celular.

La tinción morfológica diferencial empleando NA/BE revela la proporción de células viables y dañadas luego de la TFD en presencia de antioxidantes en las concentraciones determinadas según su máximo GP (Fig. III.12).

Según esta técnica, el GSH y el Trp son los dos compuestos menos efectivos en la disminución de células afectadas por la TFD, mientras que el Asc y el Trx son los pretratamientos que más células viables presentan, aunque con altos porcentajes de células apoptóticas viables. Estos resultados son consistentes con los GP obtenidos para el Asc y el Trx en la sección anterior. Puede observarse también que aquellos antioxidantes como el GSH, Man y Trp, que según el ensayo de MTT (funcionalidad mitocondrial) presentaron GP alrededor de 1, pueden ejercer un efecto protector que sí se evidencia en esta técnica basada en modificaciones de la morfología celular.



**Fig. III.12.** Tinción diferencial de células A549 1 h post TFD-ALA 10 min. Las células tratadas con TFD fueron tripsinizadas y a una alícuota de la suspensión se le agregó la mezcla de NA/BE. Se contaron al menos 200 células bajo el microscopio de fluorescencia para cada tratamiento. Sin antioxidantes (A), GSH 1 mM (B), triptófano 1 mM (C), ascorbato 1 mM (D), manitol 10 mM (E), trolox 1 mM (F). Barra de escala: 200  $\mu$ m.



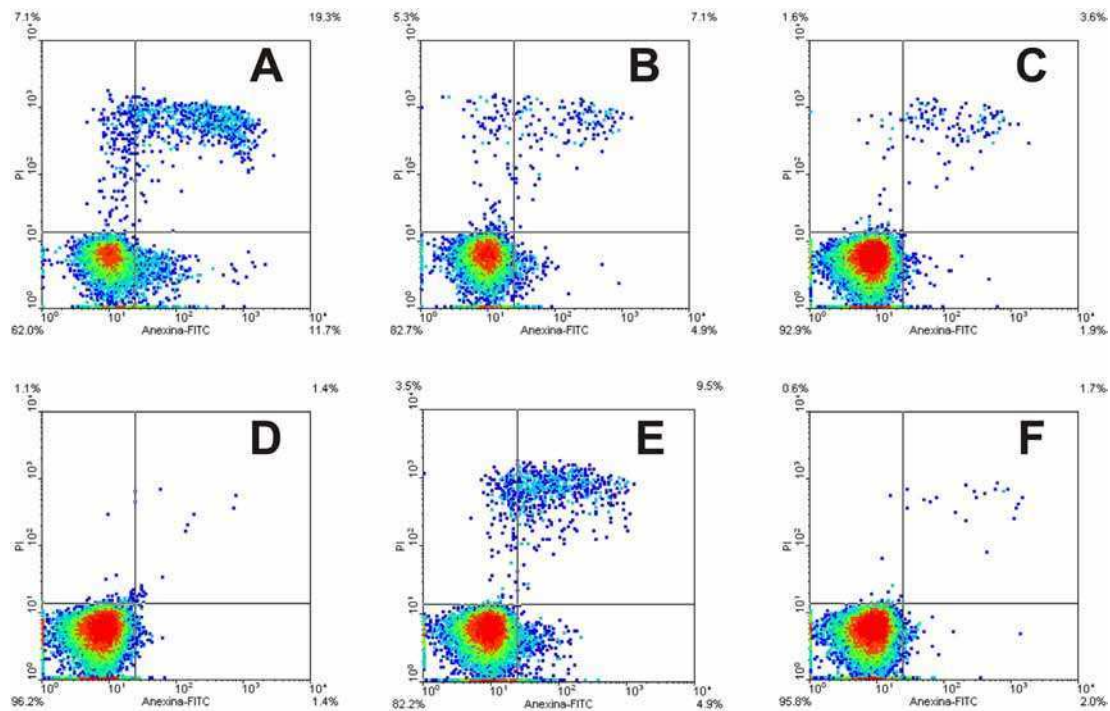
**Fig. III.13.** Cuantificación mediante tinción con NA/BE de células viables (■ azul), apoptóticas tempranas (■ celeste), apoptóticas tardías (■ verde) y necróticas (■ verde oscuro) 1 h post TFD-ALA 10 min con los distintos antioxidantes. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no iluminado, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\* $p < 0,05$  y \* $p < 0,01$  respecto del control con TFD).

Mediante la marcación con An/IP es posible también diferenciar las células viables de las apoptóticas y necróticas, permitiendo a la vez registrar la morfología celular según tamaño y granularidad (Fig. III.14 y III.16).

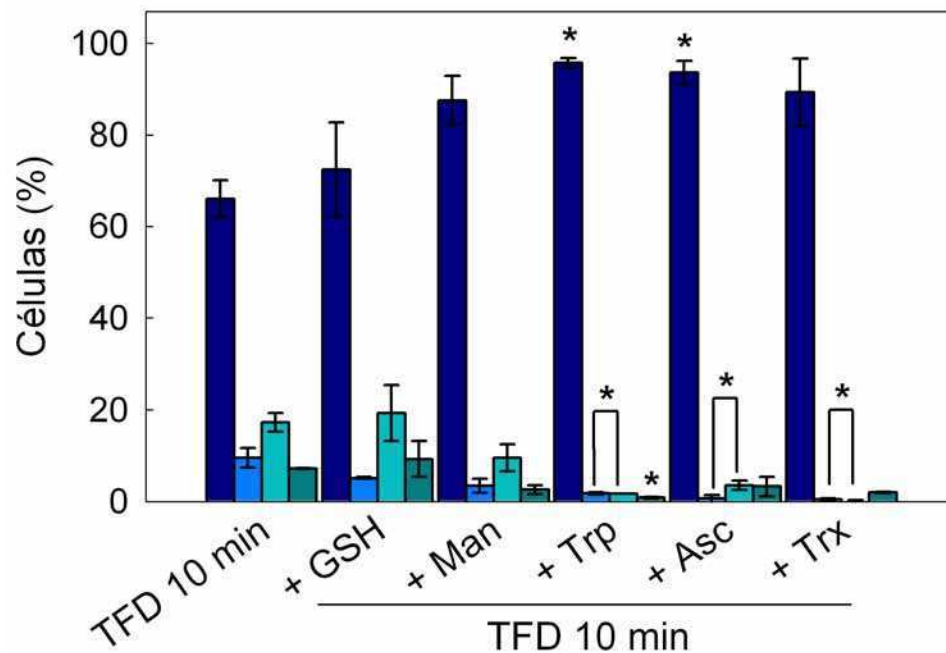
La proporción de células que aparecen en los cuadrantes correspondientes a apoptosis (An e IP positivas) se ven significativamente disminuidas cuando los antioxidantes Trp, Asc o Trx estuvieron presentes durante la irradiación. Estos resultados están de acuerdo con los valores de GP obtenidos anteriormente para Asc y Trx (Fig. III.15).

De un modo similar a lo observado con la tinción de NA/BE, los antioxidantes Trp, Asc y Trx revelan en estos resultados la capacidad de reducir significativamente los porcentajes de células apoptóticas luego de TFD de 10 min (Fig. III.15). Si bien el Trp no presentó GPs mayores a 1, ambas técnicas morfológicas le atribuyen cierta capacidad protectora en cuanto a los procesos de muerte celular post TFD.

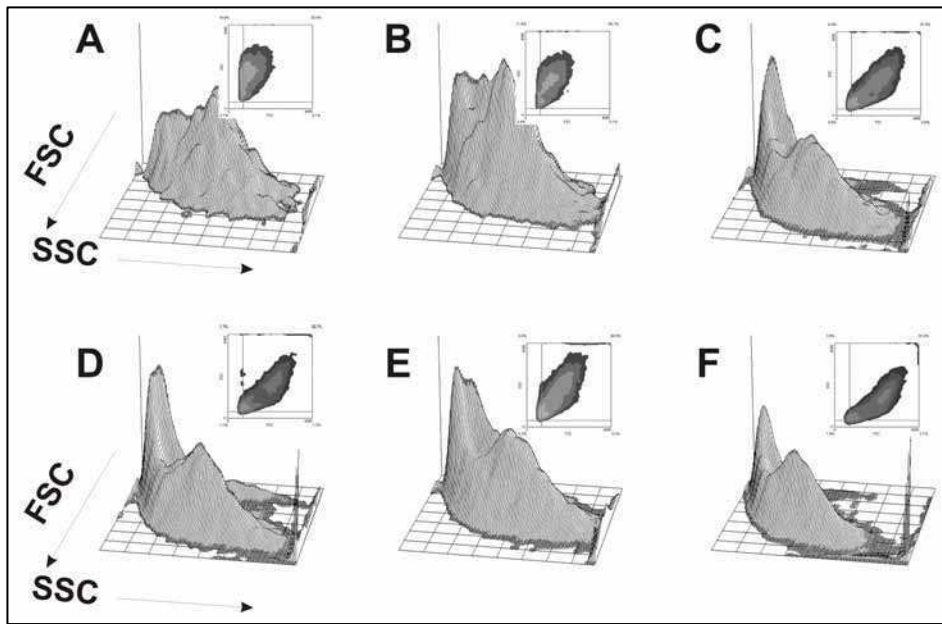
La dispersión de la luz por parte de las células varía según su granularidad y su tamaño. Células más granulares (positivas en el SSC) y pequeñas (negativas en el FSC) representan una morfología típicamente apoptótica. Puede observarse en la Fig. III.16 (A) que las células tratadas con TFD 10 min presentan estas características. En cambio, las que fueron preincubadas con los antioxidantes Asc y Trx presentan histogramas que remiten a aquellos de las células no tratadas (Fig. III.17).



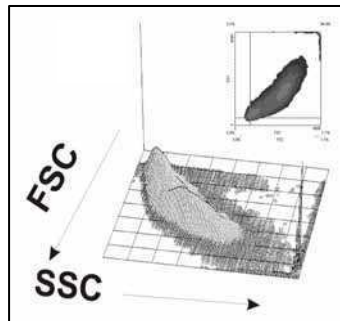
**Fig. III.14.** Marcación para apoptosis 1 h post TFD-ALA 10 min con los distintos antioxidantes. Las células tratadas con TFD fueron tripsinizadas y la suspensión se centrifugó y se resuspendió en buffer de binding. Luego se agregó An/IP y se analizaron por citometría de flujo. TFD realizada sin antioxidantes (A), con preincubación con GSH 1 mM (B), triptófano 1 mM (C), ascorbato 1 mM (D), manitol 10 mM (E), trolox 1 mM (F).



**Fig. III.15.** Cuantificación mediante citometría de flujo por marcación con An/IP de células viables (■ azul), apoptóticas tempranas (■ celeste), apoptóticas tardías (■ verde) y necróticas (■ verde oscuro) 1 h post TFD-ALA 10 min con los distintos antioxidantes. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no iluminado, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar (\* $p < 0,05$  y \* $p < 0,01$  respecto del control con TFD).



**Fig. III.16.** Histogramas de dispersión de la luz por células A549 1 h post TFD-ALA 10 min. Luego del tratamiento las células fueron tripsinizadas y analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III. La TFD se realizó sin antioxidantes (A), con preincubación con GSH 1 mM (B), Trp 1 mM (C), Asc 1 mM (D), Man 10 mM (E), Trx 1 mM (F) .



**Fig. III.17.** Histograma de dispersión de la luz por células A549 no tratadas. Las células fueron tripsinizadas y analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

Estos resultados verifican que la protección ejercida por los antioxidantes tiene un efecto global en la célula, conservando en las células tratadas con TFD y antioxidantes una morfología similar a la de células no tratadas. Indican además, de un modo indirecto, que la generación y propagación de ROS son responsables mayoritarios de iniciar el daño celular.

### III.2.3. Efecto de antioxidantes en la producción de ROS

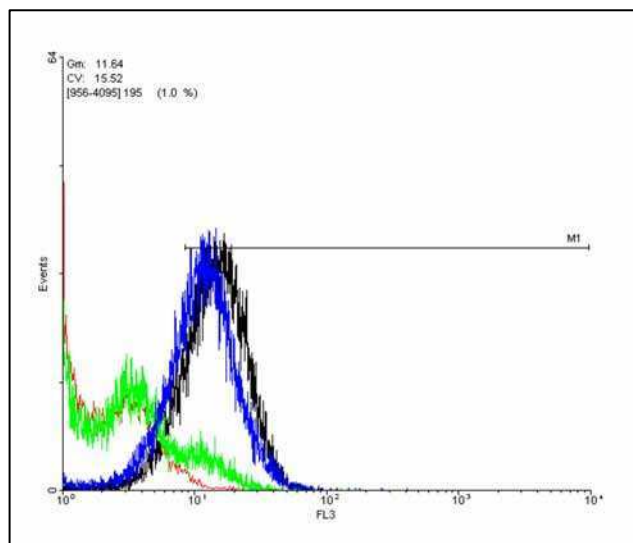
Los antioxidantes pueden tener roles controvertidos en la modulación de la TFD. Aquellos que efectivamente reducen la muerte celular probablemente ejerzan su efecto mediante la disminución de alguna especie reactiva o radical libre. Por ello deben encontrarse disponibles en la célula desde el momento de la irradiación, considerando que la generación de ROS es un evento temprano, prácticamente inmediato a la TFD.

El objetivo de los siguientes experimentos fue investigar la capacidad secuestrante de los antioxidantes en las células tratadas con TFD-ALA (y así plantear un posible mecanismo de modulación) y su especificidad respecto de las ROS.

Se analizó el efecto de Asc y Trx en la producción de  $^1\text{O}_2$ , el principal agente iniciador de reacciones fotoquímicas en la TFD, utilizando el compuesto MVP (Fig. III.18).

Sólo el Asc logró reducir significativamente la producción de  $^1\text{O}_2$ , mientras que las células pretratadas con Trx no mostraron diferencias con las células que recibieron sólo TFD (Tabla III.5). Si bien según resultados previos ambos antioxidantes lograron reducir la muerte celular, producirían ese efecto mediante la inactivación de distintas especies reactivas.

Siendo el  $^1\text{O}_2$  una de las especies reactivas fundamentales en el inicio de las reacciones fotoquímicas, se realizó el mismo experimento preincubando con los antioxidantes (GSH, manitol y triptófano) que no presentaban alto GP. Se observó que ninguno de ellos fue capaz de alterar la producción de oxígeno singulete, obteniéndose histogramas superpuestos con el de la TFD sin antioxidantes (histogramas no mostrados).

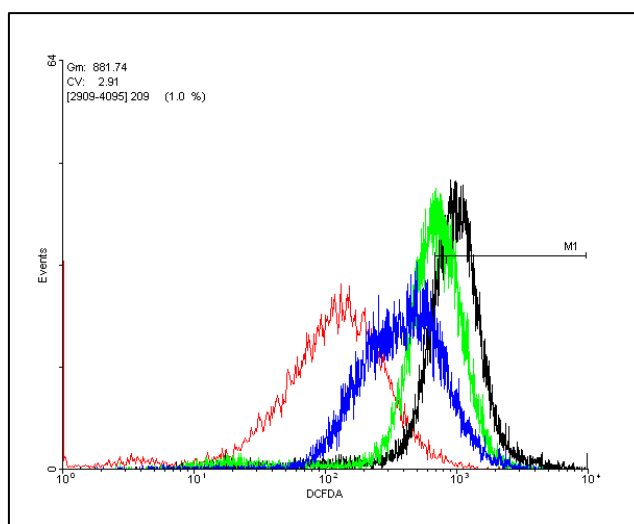


**Fig. III.18.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de MVP. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 10 min (negro) únicamente o junto con Asc 1 mM (verde) o Trx 1 mM (azul); control no tratado (rojo). Luego de la TFD las células fueron tripsinizadas inmediatamente e incubadas con MVP 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

Tratamiento	% células positivas para MVP
Control	1,1 $\pm$ 1,2 %
TFD 10 min	81,8 $\pm$ 9,3 %
TFD 10 min + Asc	9,7 $\pm$ 2,1 %
TFD 10 min + Trx	70,9 $\pm$ 0,5 %

**Tabla. III.5.** Cuantificación de células positivas para fluorescencia de MVP. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 10 min únicamente, o junto con Asc 1 mM o Trx 1 mM. Luego de la TFD se tripsinizaron inmediatamente y se incubaron con MVP 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control de células no tratadas, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

En el caso de la producción de peróxidos el comportamiento de los antioxidantes es inverso. El Trx resulta más eficiente que el Asc en la reducción de los peróxidos (Fig. III.19, Tabla III.6).



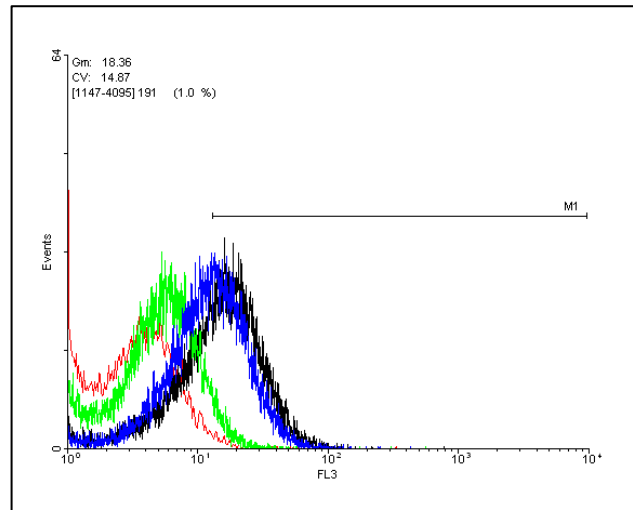
**Fig. III.19.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de H<sub>2</sub>-DCFDA. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 10 min (negro) únicamente o junto con ascorbato 1 mM (verde) o trolox 1 mM (azul); control no tratado (rojo). Luego de 1 h post TFD las células fueron tripsinizadas e incubadas con H<sub>2</sub>-DCFDA 2 μM para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III. Partec PAS III.

Tratamiento	% células positivas para H <sub>2</sub> -DCFDA
Control	0,7 ± 0,2 %
TFD 10 min	65,8 ± 10,2 %
TFD 10 min + Asc	52,2 ± 2,8 %
TFD 10 min + Trx	21,6 ± 0,6 %

**Tabla. II.6.** Cuantificación de células positivas para fluorescencia de H<sub>2</sub>-DCFDA. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 10 min únicamente, o junto con Asc 1 mM o Trx 1 mM. Luego de 1 h de finalizado el tratamiento se tripsinizaron y se incubaron con H<sub>2</sub>-DCFDA 2 μM para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III. Los valores se presentan como porcentaje respecto de un control de células no tratadas, y representan la media ± SD: desviación estándar



En cambio el e O<sub>2</sub><sup>-</sup> es inactivado por el Asc pero no por el Trx (Fig. III.20, Tabla III.7).

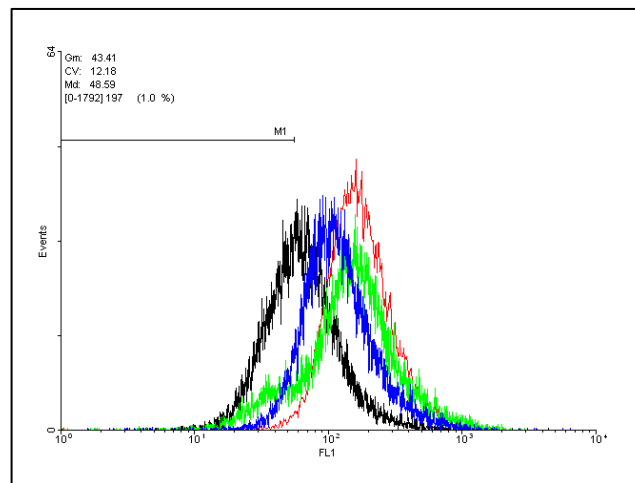


**Fig. III.20.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de HE. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 10 min (negro) únicamente o junto con ascorbato 1 mM (verde) o trolox 1 mM (azul); control no tratado (rojo). Luego de 1 h post TFD las células fueron tripsinizadas e incubadas con HE 2  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

Tratamiento	% células positivas para HE
Control	1,4 $\pm$ 0,4 %
TFD 10 min	56,2 $\pm$ 2,8 %
TFD 10 min + Asc	2,8 $\pm$ 0,3 %
TFD 10 min + Trx	34,6 $\pm$ 0,8 %

**Tabla. III.7.** Cuantificación de células positivas para fluorescencia de HE. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 10 min únicamente, o junto con Asc 1 mM o Trx 1 mM. Luego de 1 h de finalizado el tratamiento se tripsinizaron e incubaron con HE 2  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III. Los valores se presentan como porcentaje respecto del control de células no tratadas, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Como se vió en el Capítulo II, la despolarización de la membrana mitocondrial es una medición indirecta de la producción de ROS y su disrupción contribuye a establecer un estado de estrés oxidativo. Por este motivo se estudió el efecto de los antioxidantes sobre el  $\Phi_m$  luego de la TFD mediante la sonda fluorescente Rh 123. Las células con  $\Phi_m$  intacto presentan altos niveles de fluorescencia. Al sufrir la despolarización mitocondrial la fluorescencia se pierde y el histograma se desplaza hacia la izquierda del eje.

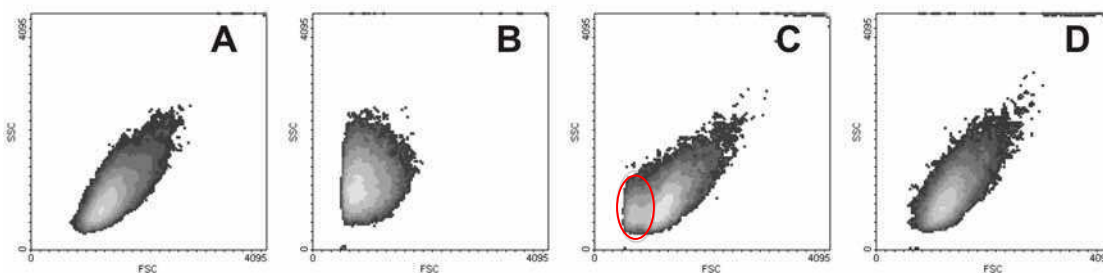


**Fig. III.21.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de Rh 123. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 10 min (negro) únicamente o junto con ascorbato 1 mM (verde) o trolox 1 mM (azul); control no tratado (rojo). Luego de 1 h de finalizada la TFD, las células fueron tripsinizadas e incubadas con Rh 123 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

Tratamiento	% células negativas para Rh 123
Control	1,1 $\pm$ 0,1 %
TFD 10 min	31,7 $\pm$ 11,1 %
TFD 10 min + Asc	13,5 $\pm$ 1,3 %
TFD 10 min + Trx	8,3 $\pm$ 0,2 %

**Tabla. II.8.** Cuantificación de células negativas para fluorescencia de Rh 123. Las células fueron tratadas con TFD-ALA 10 min únicamente, o junto con Asc 1 mM o Trx 1 mM. Luego de 1 h de finalizado el tratamiento se tripsinizaron e incubaron con Rh 123 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III. Los valores se presentan como porcentaje respecto del control de células no tratadas, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

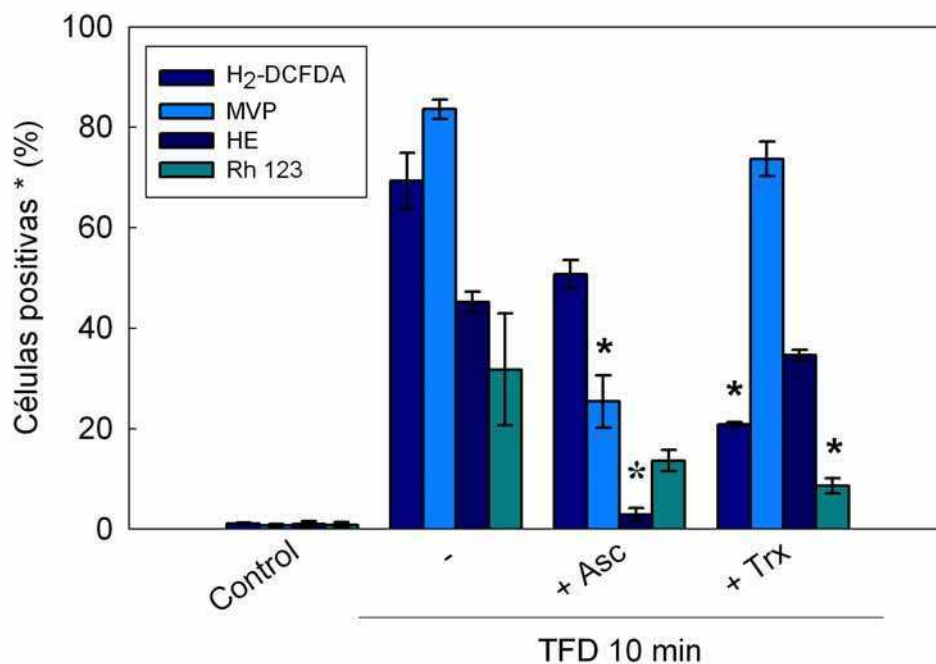
Los resultados muestran variaciones en los histogramas para los distintos antioxidantes (Fig. III.21). El Asc mantiene, luego de la TFD, una gran proporción de las células con su  $\Phi_m$  intacto, pero otra población ( $13,5 \pm 1,3 \%$ ) se halla despolarizada (correspondiente a células muertas, Fig. III.22 C). En cambio el Trx ejerce un efecto protector reflejado en un histograma intermedio entre las células tratadas y no tratadas.



**Fig. III.22.** Histogramas de dispersión de la luz por células A549 1 h post TFD basada en ALA. (A) células sin tratamiento, (B) TFD 10 min únicamente o junto con ascorbato 1 mM (el círculo indica las células muertas negativas para Rh 123) (C) o trolox 1 mM (D). Las células tratadas con TFD fueron tripsinizadas y analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

Estos resultados indican que los distintos antioxidantes poseen cierta especificidad por la cual reducen las ROS y protegen de la muerte celular por TFD, y demuestran que si bien el  $^1O_2$  ha sido reportado como el principal agente dañino, la inactivación de otras ROS como los peróxidos o el  $O_2^-$  también reduce la muerte celular.

El Asc resultó altamente efectivo en la reducción de  $^1O_2$  y  $O_2^-$ , pero no en la reducción de peróxidos. En cambio, el Trx redujo los niveles de peróxidos pero no de las otras especies reactivas. En cuanto al  $\Phi_m$ , aunque el Asc no mostró diferencias significativas, ambos antioxidantes reducen el porcentaje de células con mitocondrias despolarizadas (Fig. III.23).

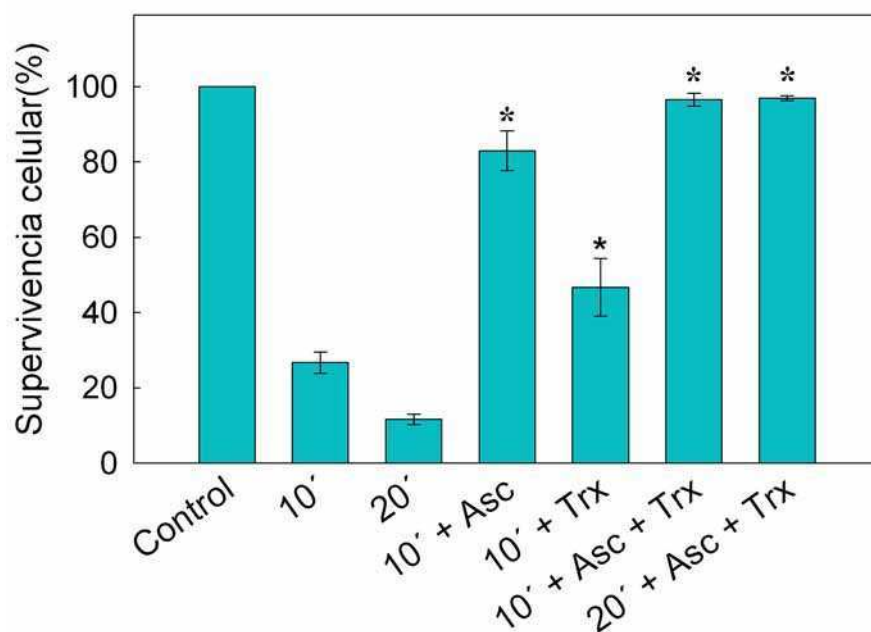


**Fig. III.23.** Efecto de Asc y Trx en la producción de ROS post TFD. Las células fueron preincubadas con Asc y Trx 1 mM durante 1 h y tratadas con TFD-ALA 10 min. Luego fueron tripsinizadas y analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar. (\*: excepto para Rh 123, se cuantifica % células negativas).

El Asc es un donador de electrones, y al hacerlo, se convierte en la especie radical ascorbilo que es relativamente poco reactiva y que al perder secuencialmente el segundo electrón se convierte en dehidroascorbato, que es más estable. La formación de estas especies está mediada por agentes como el oxígeno molecular y el anión  $O_2^-$  junto con especies reactivas del nitrógeno y metales como el cobre y el hierro. El ácido ascórbico reacciona con cierta afinidad con el  $\cdot OH$  ( $k_{obs} / M^{-1} \text{ seg}^{-1} = 1,1 \cdot 10^{10}$ , ph 7,4) y el  $O_2^-$  ( $k_{obs} / M^{-1} \text{ seg}^{-1} = 2,7 \cdot 10^5$ , ph 7,4) (Davies et al, 1991; Buettner y Jurkiewicz, 1996) lo cual es consistente con los resultados obtenidos, en los que el Asc es capaz de reducir los porcentajes de  $O_2^-$  y  $^1O_2$ , ambas especies derivadas directamente del oxígeno molecular. Al ser el Asc una molécula pequeña e hidrosoluble, por lo tanto disponible en la célula, es probable que actúe en los primeros pasos de la cadena de generación de ROS, evitando su propagación otorgándole así un alto GP frente a la TFD. Por otro lado, se ha reportado su habilidad para reducir y reciclar el tocoferol en sistemas vivos ( $k_{obs} / M^{-1} \text{ seg}^{-1} = 2 \cdot 10^5$ , ph 7,4) (Buettner, 1993; Buettner y Jurkiewicz, 1996), vinculándolo con el otro antioxidante de alto GP ensayado, el Trx.

El Trx ha sido reportado como un agente antioxidante, en particular frente a estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  (Forrest et al, 1994; Perfeito et al, 2007). Dado que es el análogo hidrosoluble de la vitamina E, carece de la porción de anclaje a la membrana plasmática, donde ejerce su protección contra la peroxidación lipídica. Sin embargo, conserva e incluso supera la capacidad antioxidante de la vitamina E y del tocoferol. De hecho es utilizado como estándar en presencia de  $H_2O_2$  para calcular la capacidad antioxidante relativa de mezclas o extractos no definidos en su composición química (Huang et al, 2005). El mecanismo por el cual el Trx previene el daño celular consiste en una inactivación directa del  $H_2O_2$  (Peus et al, 2001) y no a otros mecanismos como inducción de enzimas antioxidantes o acción antioxidante a nivel extracelular (Hamad et al, 2010). Según estos antecedentes, el Trx puede ser más efectivo en la neutralización de los efectos del  $H_2O_2$  respecto de otras especies reactivas.

La incubación con ambos antioxidantes previamente a la TFD-ALA de 10 o 20 min resultó en un efecto protector superior a dichos antioxidantes por separado (Fig.III.24), consistentemente con la posibilidad de que el Asc reduzca y recupere al Trx.



**Fig. III.24.** Efecto de Asc y Trx en la viabilidad celular post TFD por separado y combinados. Las células fueron preincubadas con Asc y/o Trx 1 mM durante 1 h y tratadas con TFD-ALA 10 o 20 min. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores se presentan como porcentaje respecto del control de células no tratadas y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

## CONCLUSIONES

La producción de ROS post TFD es un evento clave para el gatillado de los procesos de muerte celular. Se detectaron valores elevados de ROS ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ , peróxidos) como consecuencia del tratamiento.

Únicamente el  $\text{O}_2^-$  mostró un comportamiento dosis lumínico-dependiente. En el caso del  $^1\text{O}_2$  no se observaron diferencias según los tiempos de irradiación excepto para 20 min, probablemente debido a la inestabilidad de esta especie. La producción de peróxidos mostró escasa diferencia entre los tiempos de irradiación aplicados.

La modulación de la inducción de ROS fue llevada a cabo con distintos agentes antioxidantes, previo ajuste de sus GP frente al daño celular por TFD. Fue posible reducir la generación de ROS y la inducción consiguiente de muerte celular mediante el empleo de antioxidantes. Esto indica una participación inequívoca de las ROS en el inicio del fotodaño y a la vez provee una herramienta útil para modular el daño a los tejidos por TFD y minimizar su efecto en los tejidos no tumorales.

Entre los antioxidantes ensayados, el Asc y el Trx fueron seleccionados por sus altos GP, si bien el mecanismo por el cual estos agentes reducen el daño celular es diferente. El Asc actuaría en los primeros pasos de la cadena de generación de ROS, evitando su propagación, y el Trx es más efectivo en la neutralización de los efectos del  $\text{H}_2\text{O}_2$  respecto de otras especies reactivas.

El Asc resultó altamente efectivo en la reducción de  $^1\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ , pero no en la reducción de peróxidos. En cambio, el Trx redujo los niveles de peróxidos pero no de las otras especies reactivas. En cuanto al  $\Phi_m$ , aunque el Asc no mostró diferencias significativas, ambos antioxidantes reducen el porcentaje de células con mitocondrias despolarizadas ya que contribuyen a proteger del daño mitocondrial a través de la reducción de distintas ROS.

La combinación de Asc y Trx en sus concentraciones de máximo GP resultó en un efecto protector superior a dichos antioxidantes por separado. Este efecto puede ser tomado en cuenta para evitar la fotosensibilización de tejidos normales, teniendo en cuenta que según la vía de administración empleada, estos antioxidantes podrían disminuir significativamente la eficacia de la TFD en el tejido tumoral.

## REFERENCIAS

- Buettner GR, Jurkiewicz BA. (1996) Catalytic metals, ascorbate, and free radicals: combinations to avoid. *Rad Research* 145:532-541
- Buettner GR. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*; 300 (2): 535-43.
- Chekulayeva LV, Chekulayev VA, Shevchuk IN. (2008) Active oxygen intermediates in the degradation of hematoporphyrin derivative in tumor cells subjected to photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*; 93(2):94-107.
- Davies MB; Austin J, Partridge DA. (1991). *Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry*. The Royal Society of Chemistry. p. 48. ISBN 0-85186-333-7.
- Devasagayam TP, Kamat JP. (2002) Biological significance of singlet oxygen. *Indian J Exp Biol*; 40(6):680-92.
- Ding X, Xu Q, Liu F, et al. (2004) Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. *Cancer Lett*; 216(1):43-54.
- Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, et al.(1994) Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. *Free Radic Biol Med*; 16(6):675-84.
- Frank J, Flaccus A, Schwarz C, et al.(2006) Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med*; 40(5):827-36.
- Grimm S, Mvondo D, Grune T, et al (2011) The outcome of 5-ALA-mediated photodynamic treatment in melanoma cells is influenced by vitamin C and heme oxygenase-1. *Biofactors*; 37(1):17-24.
- Hamad I, Arda N, Pekmez M, et al. (2010) Intracellular scavenging activity of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Nat Sci Biol Med*; 1(1):16-21.
- Huang D; Ou B; Prior RL. (2005) The chemistry behind antioxidant assays. *J. Agric Food Chem*; 53:1841-56
- Kappus H, Sies H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*; 37:1233-41.
- Kessel D, Luo Y. (1996) Delayed oxidative photodamage induced by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*; 64(3):601-4.
- Kimani SG, Phillips JB, Bruce JI, et al. (2012) Antioxidant inhibitors potentiate the cytotoxicity of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*; 88(1):175-87.



- McLear PW, Hayden RE. (1989) Prevention of cutaneous phototoxicity in photodynamic therapy. *Am J Otolaryngol*; 10(2):92-8.
- Perfeito R, Pereira J, Oliveira CR, et al. (2007) Trolox protection of myelin membrane in hydrogen peroxide-treated mature oligodendrocytes. *Free Radic Res*; 41(4):444-51.
- Perotti C, Fukuda H, Casas A, Batlle A.(2002). Scavengers Protection of Cells Against ALA-based Photodynamic Therapy-induced Damage. *Lasers Med Sci*; 17:222–9
- Peus D, Meves A, Pott M, et al. (2001) Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival. *Free Radic Biol Med*; 30:425-32
- Potapenko AY, Kyagova AA.(1998) The application of antioxidants in investigations and optimization of photochemotherapy. *Membr Cell Biol*; 12(2):269-78.
- Price M, Terlecky SR, Kessel D. (2009) A role for hydrogen peroxide in the pro-apoptotic effects of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*; 85(6):1491-6.
- Ronsein GE, Oliveira MC, Miyamoto S, et al. (2008) Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>)]: mechanistic studies using <sup>18</sup>O-labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements. *Chem Res Toxicol*; 21(6):1271-83.
- Scorrolli L, Scalinci SZ, Limoli PG, et al.(2002) Photodynamic therapy for age related macular degeneration with and without antioxidants. *Can J Ophthalmol*; 37(7):399-404.
- Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. (2000) Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol*; 319:376-400.
- Torres WH. (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mens. Bioquim*; 26: 19-53.
- Wang J, Yi J. (2008) Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*; 7(12):1875-84.
- Wei Y, Song J, Chen Q, et al.(2012) Enhancement of photodynamic antitumor effect with pro-oxidant ascorbate. *Lasers Surg Med*; 44(1):69-75.
- Yoo JO, Lim YC, Kim YM, et al.(2011) Differential cytotoxic responses to low- and high-dose photodynamic therapy in human gastric and bladder cancer cells. *J Cell Biochem*; 112(10):3061-71.

## CAPÍTULO IV

### *Vías de supervivencia celular post TFD-ALA*

La TFD ha sido aprobada para el tratamiento de numerosas patologías, muchas de ellas, tumorales. En especial, en este caso, la aparición de células resistentes es un efecto no deseado inherente a todas las terapias antitumorales (Milla et al, 2011).

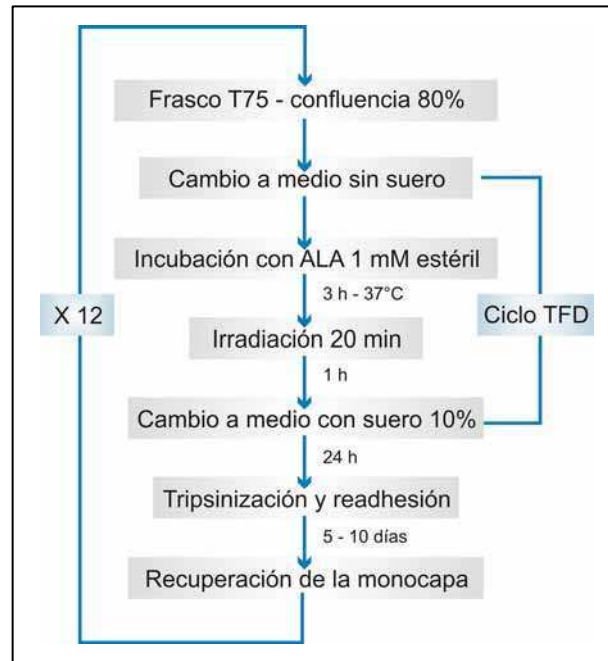
La supervivencia de las células al tratamiento fotodinámico depende en gran medida del balance entre la expresión de las proteínas antiapoptóticas o factores de supervivencia y las proteínas proapoptóticas (Karmakar et al, 2007) que se expresan en respuesta a la TFD. Habiendo estudiado los efectos tempranos en respuesta a la TFD, los siguientes experimentos apuntan a identificar cualidades que confieren a las células la capacidad de sobrevivir al tratamiento fotodinámico.

#### IV.1. *Células resistentes a TFD-ALA*

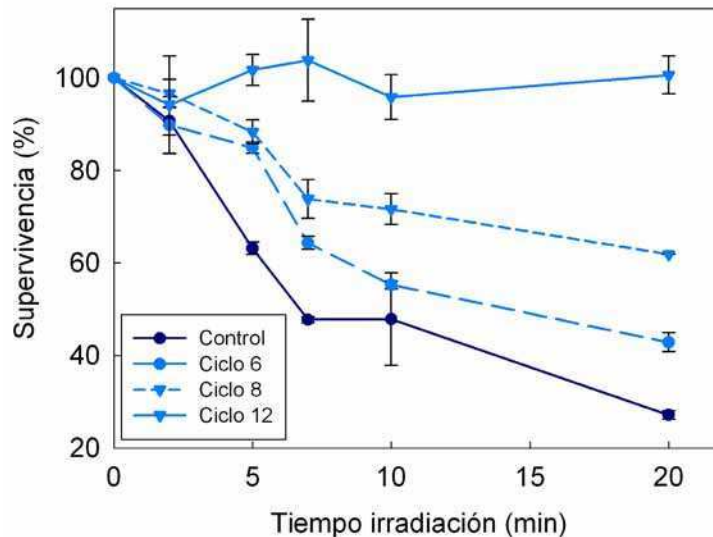
##### *IV.1.1. TFD con porfirinas endógenas a partir de ALA*

Para llevar a cabo el objetivo propuesto, se generó un linaje celular resistente a TFD-ALA mediante ciclos repetidos de irradiación y recuperación según se indica en el esquema de la Fig. IV.1. Las poblaciones celulares resultantes de cada ciclo de irradiación fueron criopreservadas y ensayadas para ser posteriormente evaluadas en su capacidad de resistencia frente a un nuevo desafío.

En la Fig. IV.2 puede notarse que la adquisición de resistencia a TFD de 20 min es un proceso progresivo, y que, como era de esperarse, a mayor cantidad de ciclos se enriquece la población celular en células resistentes. En adelante, las células utilizadas en los experimentos corresponden a células tratadas con 12 ciclos de irradiación (C-12), cuya supervivencia a post TFD es elevada aún para el mayor tiempo de irradiación (20 min).



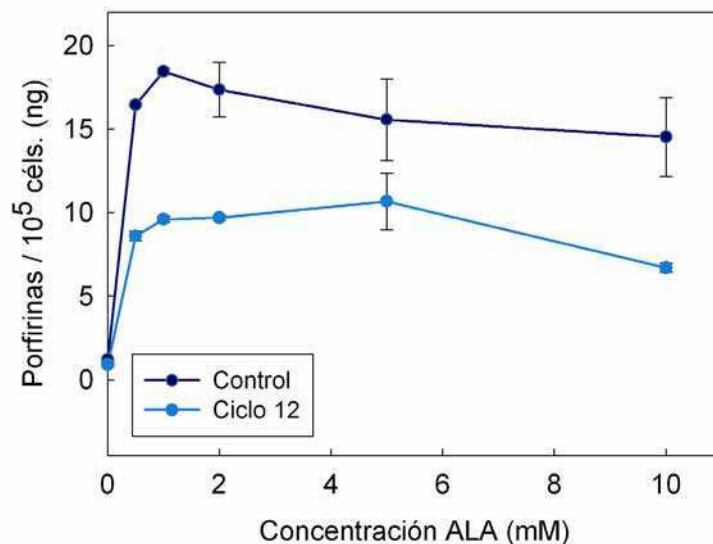
**Fig. IV.1.** Esquema experimental para la obtención de células A549 resistentes a TFD-ALA de 20 min. Las células crecidas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> fueron incubadas durante 3 h a 37°C con ALA 1 mM estéril en medio sin suero y luego irradiadas. Al cabo de 1 h se reemplazó el medio por medio fresco con 10% de suero. Luego de 24 h las células fueron tripsinizadas permitiendo la re-adhesión de las células sobrevivientes. La confluencia fue recuperada luego de entre 5 y 10 días con renovación periódica del medio de cultivo para reiniciar los ciclos de irradiación.



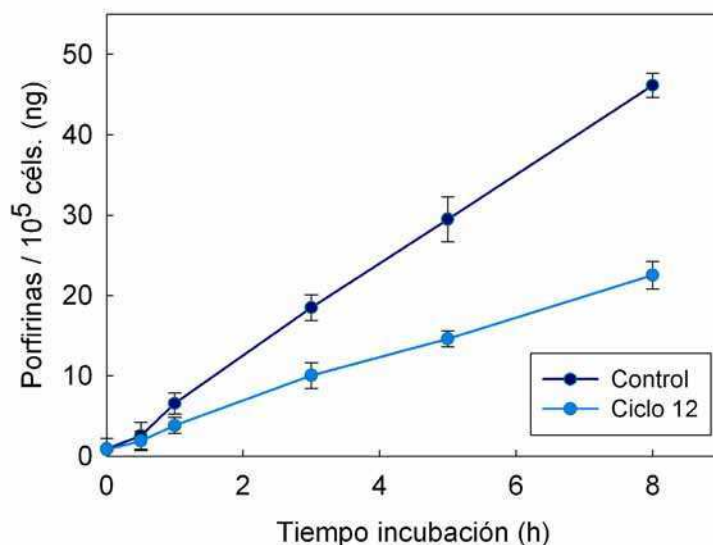
**Fig. IV.2.** Curva de supervivencia celular 1 h post TFD. Las células control (no tratadas) y resultantes de 6, 8 o 12 ciclos de TFD se incubaron con ALA 1 mM en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Una vez obtenidas las líneas resistentes, se estudió la síntesis de porfirinas en células, con el objetivo de determinar si la resistencia está relacionada con una alteración en el camino metabólico del hemo.

La síntesis de porfirinas a partir de concentraciones crecientes de ALA en células resistentes C-12 alcanzó al igual que en la línea parental, un plateau a una concentración 0,5 mM de ALA pero el nivel máximo de porfirinas acumuladas fue menor en un 50 % respecto del obtenido en las células control (Fig. IV.3). Este resultado indica que la condición primaria de selección de células resistentes reside en una menor capacidad de síntesis de porfirinas a partir de ALA exógeno. Correspondientemente, la cinética de acumulación de porfirinas fue menor en las células C-12 sobrevivientes al tratamiento de TFD-ALA (Fig. IV.4).



**Fig. IV.3.** Curva de acumulación de porfirinas luego de incubación con concentraciones crecientes de ALA. Las células fueron incubadas con ALA en concentraciones crecientes (0,1 a 10 mM) en medio sin suero durante 3 h y luego se realizó la extracción de porfirinas intracelulares y la cuantificación en espectrofluorómetro. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



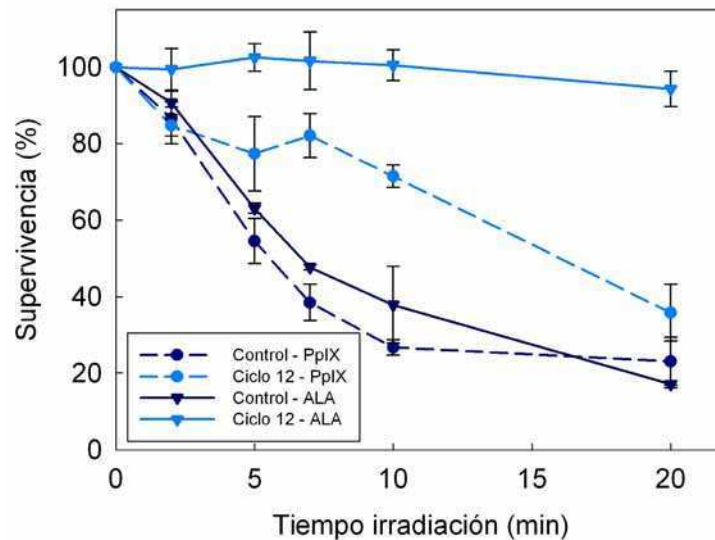
**Fig. IV.4.** Cinética de acumulación de porfirinas. Las células fueron incubadas con ALA 1 mM durante distintos tiempos (0,5 a 8 h) en medio sin suero y luego se realizó la extracción de porfirinas intracelulares y la cuantificación en espectrofluorómetro. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

#### IV.1.2. TFD con porfirinas exógenas a partir de PpIX

Teniendo en cuenta que las células resistentes a TFD-ALA presentan menor acumulación de porfirinas endógenas, resulta interesante investigar si la suplementación exógena de PpIX restituye la sensibilidad al tratamiento fotodinámico. Para ello, células sensibles y células resistentes C-12 fueron incubadas 3 h con PpIX 5  $\mu$ M, concentración que permite obtener una curva de respuesta a TFD de acuerdo a los ensayos previos.

Como puede observarse en la Fig. IV.5, la fotosensibilización con PpIX exógena induce una recuperación parcial de la sensibilidad a TFD en las células C-12, sugiriendo que la administración de PpIX exógena compensa en parte la menor producción de porfirinas de esas células. Además, en condiciones en las cuales las células control son sensibles a la acción fotodinámica de la PpIX exógena, las células resistentes C-12 responden solo parcialmente. Según se mostró previamente, la incorporación de PpIX exógena a la célula no es un proceso eficiente y se acumula preferentemente en la membrana celular. Para investigar la posibilidad de que diferencias en la incorporación de PpIX, den cuenta de la diferente respuesta observada en ambos tipos celulares, se cuantificó la cantidad de porfirina intracelular luego de 3 h de incubación con PpIX 5  $\mu$ M realizando dos lavados previos con PBS (Tabla IV.1)

Los resultados muestran que la cantidad de porfirinas intracelulares acumuladas en ambos tipos celulares es comparable y suficiente para desencadenar un proceso fotodinámico, por lo que se descarta que la menor sensibilidad de las células C-12 frente a la TFD-PpIX se deba a una menor acumulación de la porfirina.



**Fig. IV.5.** Curva de supervivencia celular 1 h post-TFD. Las células (control y C-12) se incubaron con ALA 1 mM o PpIX 5  $\mu$ M en medio sin suero durante 3 h y luego fueron irradiadas durante distintos tiempos. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Células	Control	Ciclo 12
PpIX intracelular (ng / $10^5$ céls.)	77,1 $\pm$ 2,2	80,6 $\pm$ 4,8

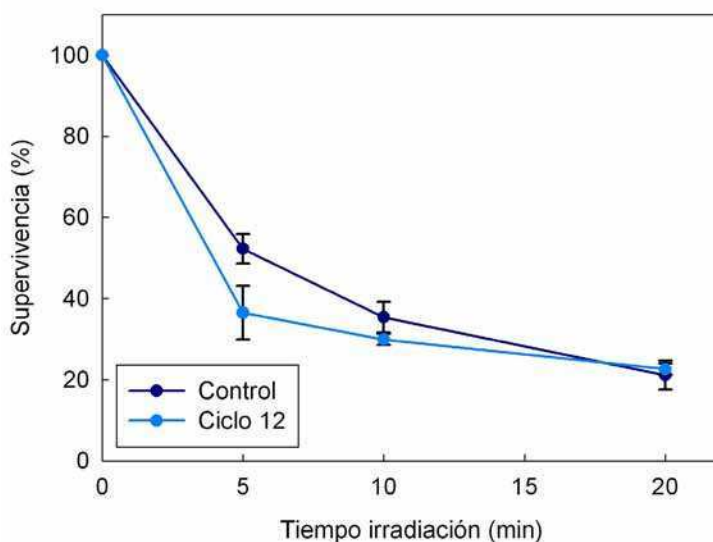
**Tabla. IV.1.** Cuantificación de PpIX intracelular en células sensibles y resistentes a ALA-TFD. Las células fueron incubadas con PpIX 5  $\mu$ M durante 3 h en medio sin suero y luego se realizó la extracción de porfirinas intracelulares y la cuantificación en espectrofluorómetro. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

#### IV.1.3. TFD con porfirinas exógenas a partir de Vp

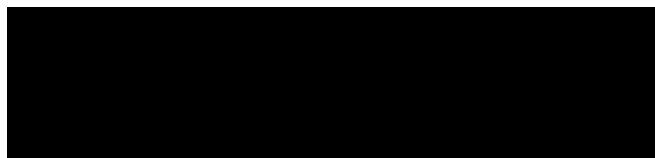
Como hemos visto en el Cap II la Vp es un FS ampliamente utilizado en la TFD de neovascularizaciones coroidales y degeneración macular asociada a la edad (DMAE), (Framme et al, 2006; Yoon et al, 2006) ya que en tiempos cortos desde su administración (15 min) tiende a localizarse en el tejido vascular, sellando los vasos sanguíneos que causan estas patologías. Pero si es empleado como FS con tiempos más largos de incubación (3 h) se favorece la localización tisular o tumoral (Chen et al, 2005).

Las células resistentes a TFD-ALA presentaron una respuesta parcial a la TFD-PpIX. Por otro lado, la TFD-Vp había sido previamente puesta a punto en concentración y tiempo de incubación. Con lo cual, se planteó el objetivo de aplicar TFD-Vp en células supervivientes a 12 ciclos de TFD-ALA y determinar si esa resistencia puede ser superada.

La TFD-Vp disminuyó significativamente la viabilidad y no mostró diferencias en la respuesta de células control y tratadas con 12 ciclos de TFD-ALA (Fig.IV.6), indicando que no se genera resistencia cruzada con otro FS. Nuevamente, la capacidad de incorporación del FS no se vió afectada en las células resistentes (Tabla IV.2).



**Fig. IV.6.** Curva de supervivencia celular 1 h post-TFD. Las células se incubaron con Vp 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



**Tabla. IV.2.** Cuantificación de Vp intracelular en células sensibles y resistentes a ALA-TFD. Las células fueron incubadas con Vp 40  $\mu\text{g/ml}$  durante 3 h en medio sin suero y luego se realizó la extracción de porfirinas intracelulares y la cuantificación en espectrofluorómetro. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

## IV.2. Caracterización de células resistentes a ALA-TFD

### IV.2.1. Morfología celular y subcelular

Las células resistentes a TFD-ALA no mostraron diferencias notables en las tinciones morfológicas utilizadas (azul de toluidina, Hoechst) respecto de las células sensibles (imágenes no mostradas). Por lo tanto, se procedió a un análisis estructural a fin de analizar diferencias más finas entre ambos tipos celulares.

En células no tratadas (Fig. IV.7 A y Fig.IV.8 A) la diferencia más representativa es un citoplasma más profuso en las células resistentes C-12 respecto de las sensibles, consistente con lo reportado por Sharkey et al (1993) para células resistentes a TFD-Photofrin. En células sensibles se identificaron organelas como el aparato de Golgi, mitocondrias de aspecto circular y retículo endoplasmático liso y rugoso. En células resistentes no fue posible distinguir organelas y en cambio se observó un citoplasma homogéneo con algunos espacios perinucleares y elementos rodeados de membrana que podrían ser mitocondrias pequeñas y sin crestas como lo observaron Arum et al (2011) en células de cáncer de vejiga murino tratadas con TFD a partir de hexil-ALA. Tanto la morfología nuclear como las prolongaciones en la membrana son estructuras conservadas en células sensibles y resistentes.

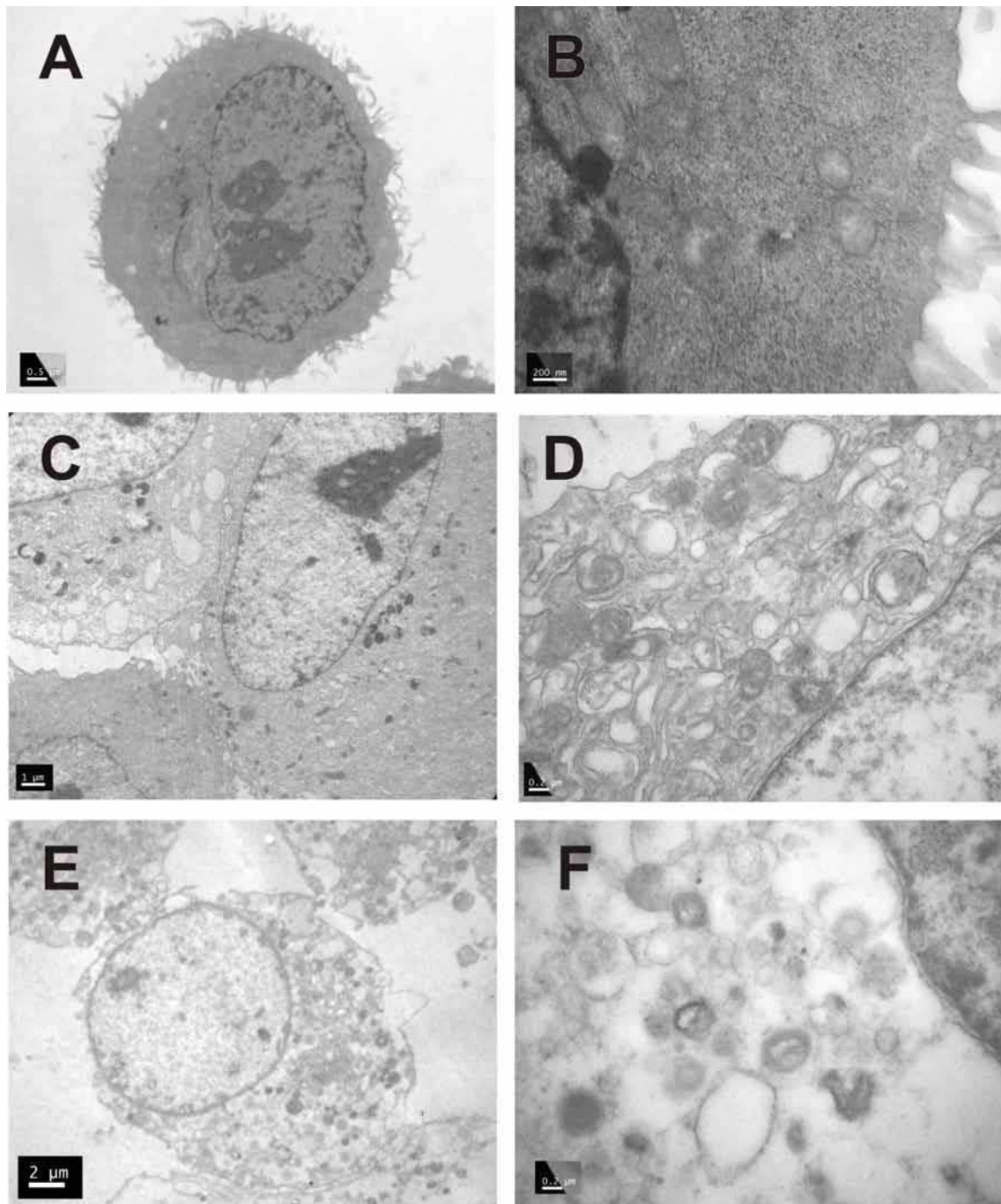
En cambio, al aplicar TFD-ALA 20 min, se observan marcadas diferencias morfológicas. Las células sensibles se ven notablemente alteradas 1 h luego del tratamiento, (Fig. IV.7 C y D) algunas de ellas con núcleos condensados y otras con núcleos de escasa densidad electrónica (Tian et al, 2006). Las membranas celulares se



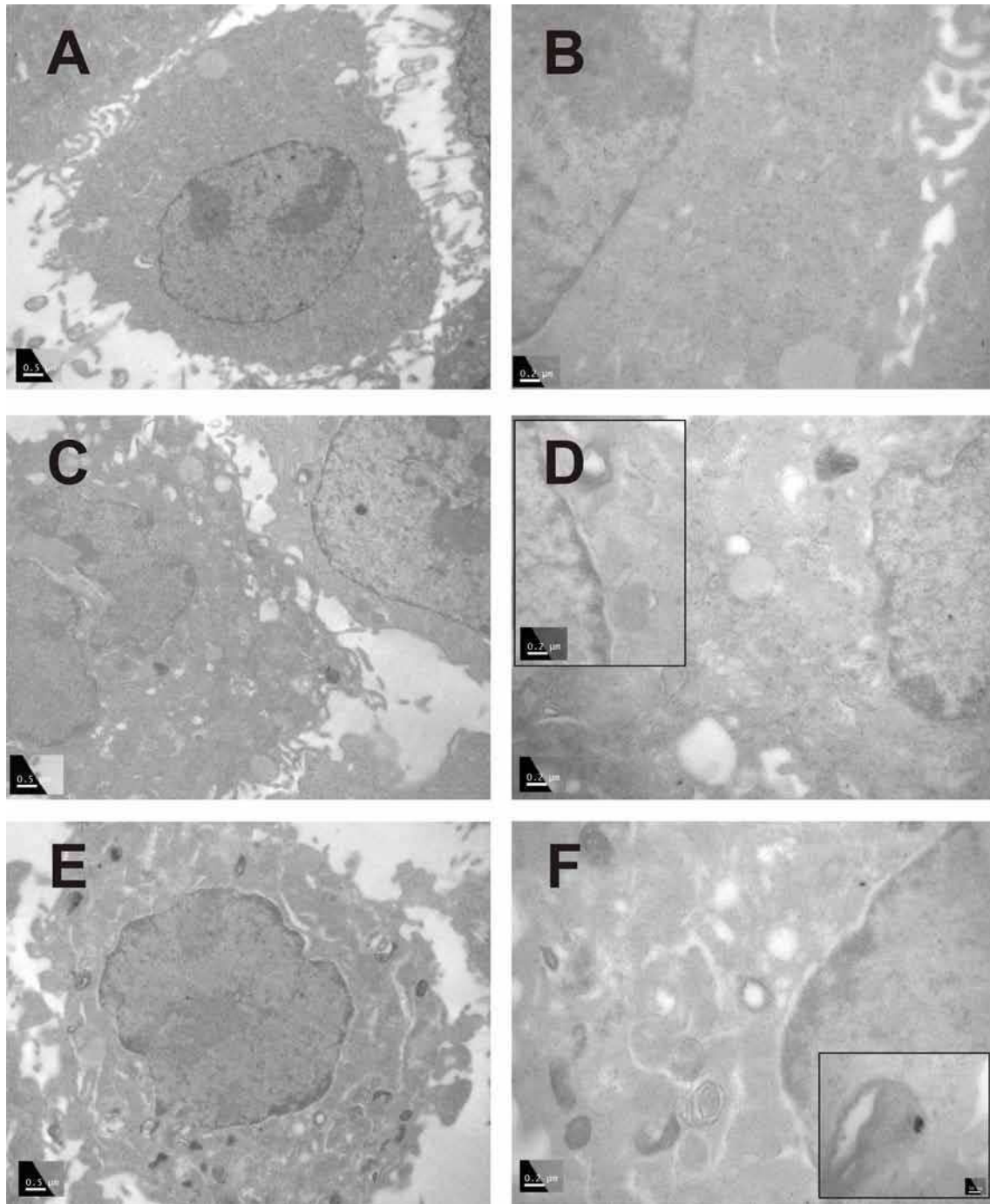
muestran irregulares y sin las prolongaciones propias de las células no tratadas. El citoplasma se presenta con numerosas vacuolas y elementos de alta densidad electrónica y sin organelas visibles (Tapajós et al, 2008). Luego de 24 h se observa menor densidad electrónica y mayor número de vacuolas, muchas de ellas, de doble membrana (Fig. IV.7 E y F).

En las células C-12, en cambio no se observa la pérdida de prolongaciones 1 h post TFD-ALA (Fig. IV.8 C y D) ni la pérdida de densidad electrónica a las 24 h de aplicado el tratamiento. La membrana nuclear presenta irregularidades pero no se observan núcleos condensados. El citoplasma de estas células presenta numerosas vacuolas, elementos de alta densidad electrónica y espacios citoplasmáticos y perinucleares al cabo de 24 h post TFD-ALA (Fig. IV.8 E y F).

Las células resistentes no disminuyen significativamente su viabilidad post TFD y son indistinguibles de las células sensibles al microscopio óptico. Sin embargo, estos resultados indican que a nivel estructural, la respuesta a TFD-ALA es claramente diferente en ambos tipos celulares. Las células resistentes desarrollan cambios en su organización subcelular pero, a diferencia de las sensibles, conservan su viabilidad.



**Fig. IV.7.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células sensibles a TFD-ALA sin tratamiento (A y B), 1 h post TFD-ALA 20 min (C y D) o 24 h post TFD-ALA 20 min (D y F). Las células fueron cultivadas en placas de 10 cm, incubadas con ALA 1 mM durante 3 h en medio sin suero irradiadas 10 min y luego fijadas en glutaraldehído 2,5% según para su procesamiento y visualización al MET según se detalla en M&M. Aumentos: panel izquierdo, 12000X (A), 7000X (C) y 3000X (D); panel derecho 30000X.



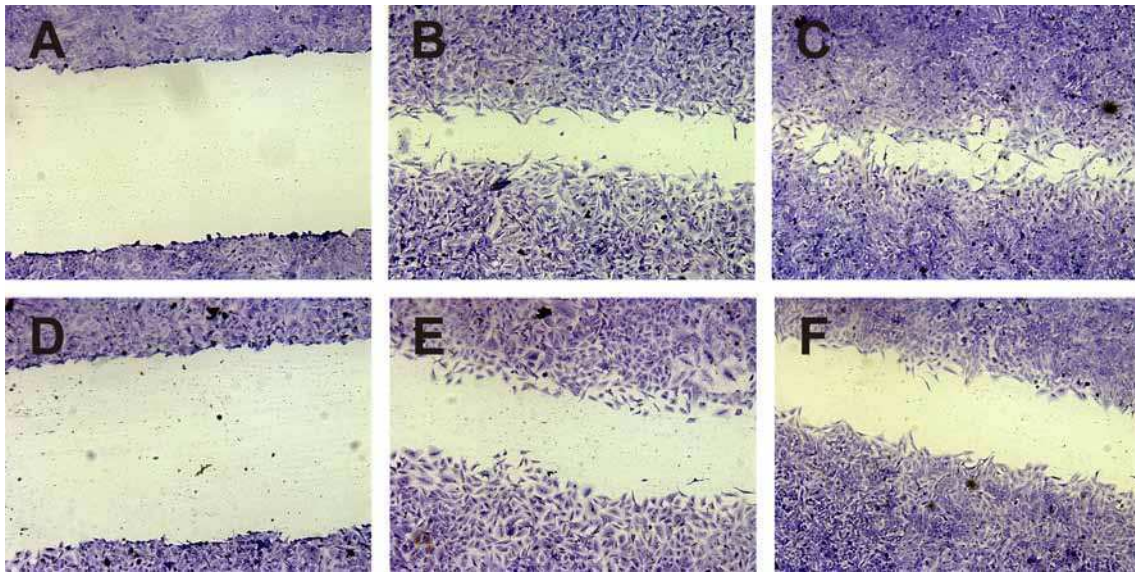
**Fig. IV.8.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células resistentes C-12 a TFD-ALA sin tratamiento (A y B), 1 h post TFD-ALA 20 min (C y D) o 24 h post TFD-ALA 10 min (D y F). Las células fueron cultivadas en placas de 10 cm, incubadas con ALA 1 mM durante 3 h en medio sin suero, irradiadas 10 min y luego fijadas en glutaraldehído 2,5% según para su procesamiento y visualización al MET según se detalla en M&M. Aumentos: panel izquierdo, 12000X; panel derecho 30000X; inserto D, 30000X; inserto F, 140000X.

#### *IV.2.2. Migración celular*

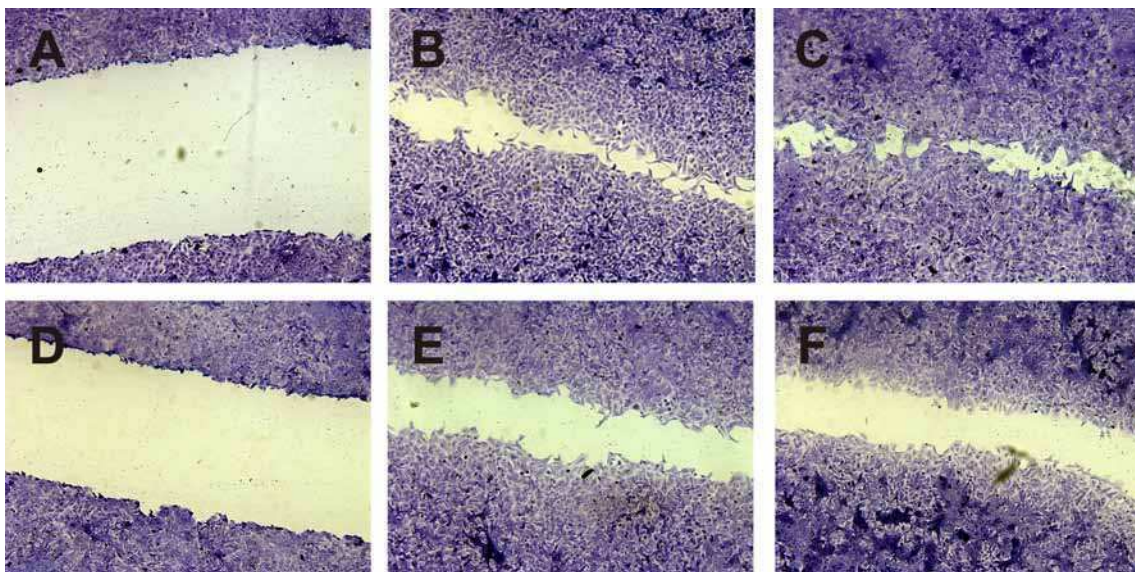
El ensayo de la herida es una técnica que permite analizar la capacidad migratoria de las células a través de un surco realizado sobre la monocapa. Numerosos trabajos han reportado una capacidad migratoria o metastásica reducida luego de la TFD (Yang et al, 2007; Casas et al, 2008; Tsai et al, 2009). El objetivo de este ensayo fue determinar si la TFD-ALA provoca cambios en la capacidad migratoria de las células control A549 y C-12, ya sea en uno o en varios ciclos de tratamiento fotodinámico.

Debido a que la TFD de 20 min daña fuertemente a las células sensibles, no fue posible utilizar dicho tiempo de irradiación en este ensayo, sino que se redujo a 10 min a fin de conservar una monocapa y visualizar efectos en la migración celular. Se observó tanto en células sensibles como resistentes C-12 una disminución de la cobertura de la herida luego de la TFD-ALA de 10 min (Fig. IV.8 y Fig. IV.9). Sin embargo, los sucesivos ciclos de TFD no confirieron a las células una reducción significativa en la capacidad de migración, más aún, luego de 24 h, las células resistentes muestran un mayor cierre de la herida que las células sensibles (Fig. IV.9 B).





**Fig. IV.9.** Ensayo de la herida en células sensibles a TFD-ALA. La herida se realizó en células no irradiadas (A-C) o 1 h luego de TFD de 10 min (D-F). Las imágenes se tomaron inmediatamente luego de realizar la herida (A y D), o luego de 24 h (B y E) o 48 h (C y F). La tinción se realizó con azul de toluidina como se describió previamente. Aumento: 400X



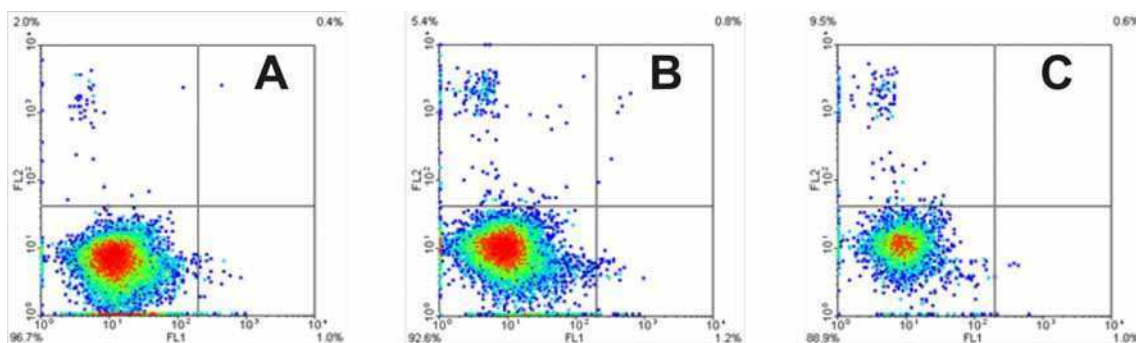
**Fig. IV.10.** Ensayo de la herida en células resistentes a TFD-ALA. La herida se realizó en células no irradiadas (A-C) o 1 h luego de TFD de 10 min (D-F). Las imágenes se tomaron inmediatamente luego de realizar la herida (A y D), o luego de 24 h (B y E) o 48 h (C y F). La tinción se realizó con azul de toluidina como se describió previamente. Aumento: 400X

### IV.3. Muerte y supervivencia celular

#### IV.3.1. Externalización de fosfatidilserina

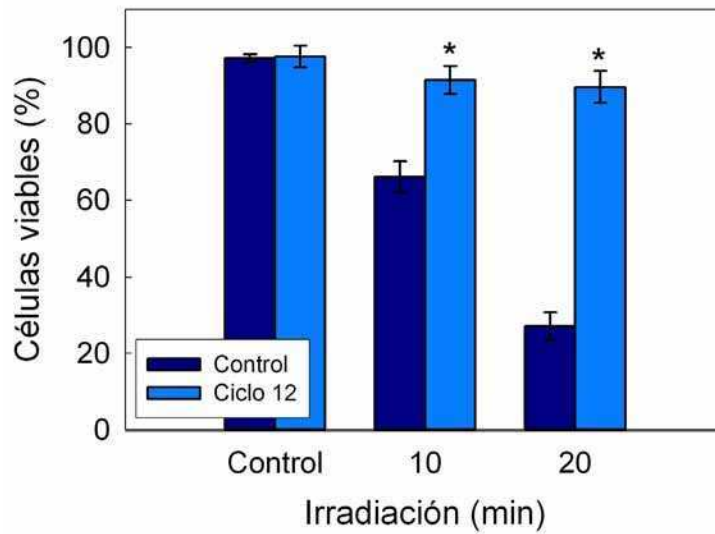
La viabilidad de células C-12 no se redujo significativamente luego de un nuevo tratamiento fotodinámico (Fig. IV.2). Se realizó en estas células la marcación con An/IP para detectar la externalización de fosfatidilserina (signo de inducción de apoptosis) a fin de determinar si la supervivencia observada en el ensayo de MTT se refleja en una menor proporción de muerte celular por apoptosis.

Como se observa en las Fig. IV.11 y IV.12, la TFD-ALA de 10 o 20 min no redujo significativamente la proporción de células viables (negativas para An e IP) respecto del control sin tratamiento.

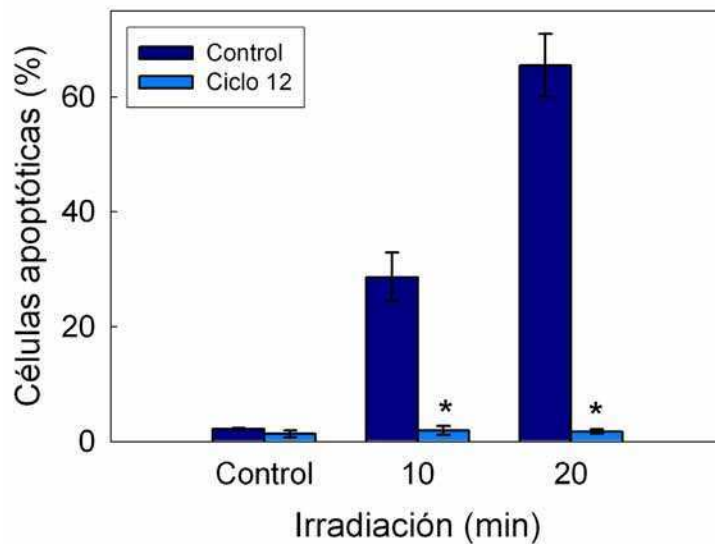


**Fig. IV.11.** Marcación con An/IP para apoptosis 1 h post TFD-ALA en células resistentes. sin tratamiento (A), TFD 10 min (B), TFD 20 min (C). Las células tratadas con TFD fueron tripsinizadas y la suspensión se centrifugó para resuspenderlas en buffer binding. Se agregó Annexina V-FITC e IP y se analizaron por citometría de flujo.

En las Fig. IV.12 y 13 se muestran cuantificaciones de células viables y apoptóticas respectivamente comparando la respuesta de células resistentes C-12 con células sensibles como control. Resulta evidente una marcada reducción en la apoptosis post TFD-ALA para ambos tiempos de irradiación.



**Fig.IV.12.** Cuantificación de células viables 1 h post TFD-ALA a distintos tiempos de irradiación mediante marcación con An/IP y análisis por citometría de flujo (\* $p < 0,05$  respecto de células control). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.



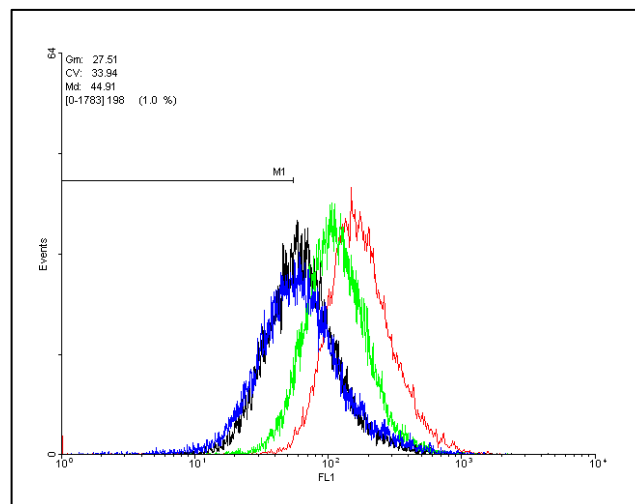
**Fig.IV.13.** Cuantificación de células apoptóticas 1 h post TFD-ALA a distintos tiempos de irradiación mediante marcación con An/IP y análisis por citometría de flujo (\* $p < 0,01$  respecto de células control). Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

### IV.3.2. Integridad mitocondrial

En base a las observaciones de microscopía electrónica se propuso analizar la integridad mitocondrial en células resistentes a TFD-ALA mediante marcación con Rh 123.

Las células sensibles a TFD-ALA presentaron 40% de células con mitocondrias despolarizadas al cabo de 1 h post TFD de 20 min según la marcación con Rh123 respecto del control de células no tratadas (1%). Mientras que las células resistentes no tratadas están desplazadas un 7% respecto de las células sensibles hacia despolarización positiva, indicando que aún sin aplicarse TFD se detectan células con mitocondrias alteradas.

Al aplicar TFD-ALA de 20 min, ambos picos, de células normales y resistentes C-12, presentan porcentajes similares de despolarización (40%) en comparación con sus respectivos controles. Estos resultados indican que las células resistentes presentan alteraciones en su integridad mitocondrial (como se observó por microscopía electrónica), impidiendo la retención de Rh 123 y que esos cambios no afectan su viabilidad post TFD-ALA según se mostró previamente en los ensayos de MTT.



**Fig. IV.14.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de Rh 123 de células sensibles a TFD-ALA no tratadas (rojo) o 1 h post TFD 20 min (negro) y células resistentes a TFD-ALA C-12 no tratadas (verde) o 1 h post TFD 20 min (azul). Las células fueron tratadas con TFD-ALA, tripsinizadas al cabo de una hora e incubadas con Rh 123 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.



En la inmunodetección de citocromo c (Fig. IV.15) en fracciones citoplasmáticas de células resistentes sometidas a TFD de 20 min, se observaron intensidades de bandas similares a las observadas en células sin ningún tratamiento, sugiriendo que las alteraciones mitocondriales de las células resistentes no conllevan a la liberación de esta proteína con sus correspondientes consecuencias en la iniciación de la apoptosis. La disociación de estos eventos (despolarización mitocondrial y liberación de citocromo c) ha sido previamente reportada por Chiu y Oleinik (2001) luego de la TFD.

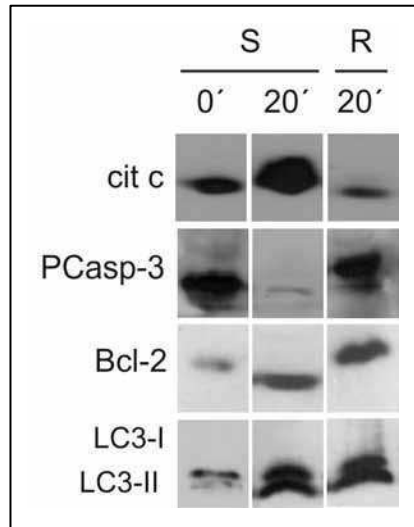
#### *IV.3.3. Expresión de factores asociados a apoptosis y autofagia*

La liberación de citocromo c al citoplasma es uno de los eventos iniciadores de la muerte celular por apoptosis a través de la vía intrínseca. Como se discutió anteriormente, los niveles de citocromo c detectados en el citoplasma de células resistentes tratadas con 20 min de TFD-ALA son similares a los hallados en células control no tratadas. Esta observación es consistente con la intensidad de la banda correspondiente a procaspasa-3, que muestra una intensidad similar a la de células control no tratadas (Fig. IV.15).

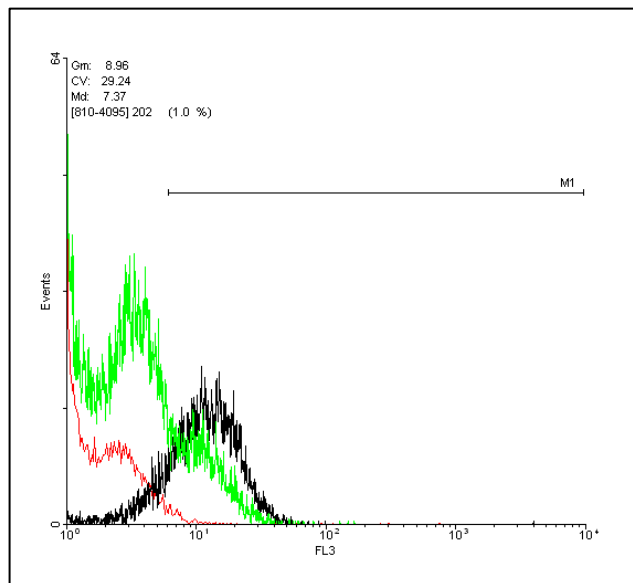
La proteína antiapoptótica Bcl-2 se encuentra expresada en similar intensidad luego de la TFD de 20 min tanto en en células resistentes como en sensibles probablemente ejerciendo un efecto pro-supervivencia. En ambos casos, es posible detectar LC3-II, marcador de vacuolas autofágicas, lo cual está de acuerdo con las observaciones de microscopía electrónica, que revelaron numerosas vacuolas de doble membrana con contenido celular.

En determinaciones anteriores se mostró que las células resistentes acumulan menos porfirinas que las sensibles, con lo cual, la producción de ROS por fotosensibilización mediada por PpIX debe ser menor. Para verificar esta hipótesis se analizó por citometría de flujo la producción de  $^1\text{O}_2$  que es una de las especies reactivas iniciadoras de daño por TFD.

Según se observa en la Fig. IV.16 las células resistentes sometidas a TFD de 20 min muestran un patrón similar al de células control (no tratadas) con dos poblaciones celulares: una negativa y una positiva para MVP ( $13,7 \pm 4,5$  %) que es significativamente menor al porcentaje observado en células sensibles ( $67,1 \pm 1,8$ %).



**Fig. IV.15.** Inmunodetección de citocromo c, procaspasa-3, Bcl-2 y LC3-I / LC3-II evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica de células sensibles (S) y resistentes (R) a TFD-ALA no tratadas (0') o tratadas con TFD-ALA de 20 min. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD. (Las bandas mostradas en esta figura provienen de un mismo gel para cada proteína y corresponden a un mismo peso molecular pero se hallan en calles separadas en el gel original. Los gels completos se muestran en el Anexo).



**Fig. IV.16.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de MVP de células sensibles a TFD no tratadas (rojo) o tratadas con TFD 20 min (negro) y células C-12 resistentes a TFD-ALA tratadas con 20 min de irradiación (verde). Las células fueron tratadas con TFD-ALA, tripsinizadas inmediatamente e incubadas con MVP 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.

#### IV.3.4. Expresión de factores asociados a supervivencia

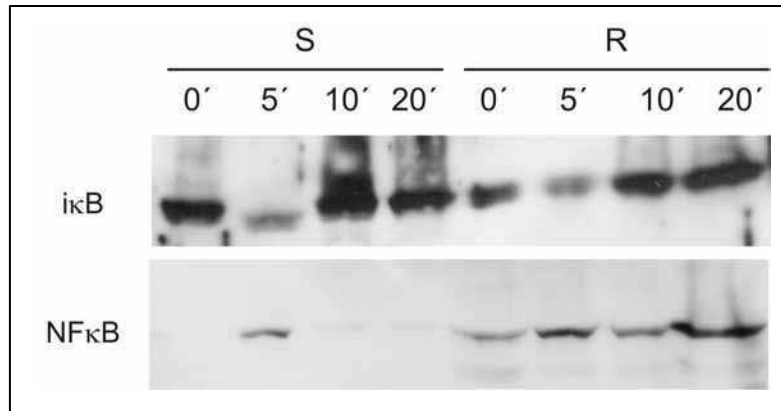
En el escenario planteado para las células resistentes a TFD-ALA se determinó una disminución en la inducción de apoptosis, pero no de autofagia post TFD y una alteración a nivel mitocondrial que no implica liberación de citocromo c. Los siguientes experimentos tienen como objetivo analizar la respuesta a TFD, no en base a la muerte celular, sino a la supervivencia.

NFκB es un factor sensible al estado redox (Schreck et al, 1991). En células normales, NFκB se encuentra inactivo, secuestrado en el citoplasma por proteínas inhibitorias (IκB α, β, γ). Diversos estímulos como estrés, citoquinas o productos bacterianos activan las kinasas de inhibidores de NFκB, llamados Iκ, (IKK) que fosforilan a los inhibidores resultando en poliubiquitinación y consecuente degradación por proteasoma. Por lo cual, el factor queda libre para trasladarse al núcleo (Pereira y Oakley, 2008). NFκB puede conformarse como homo o heterodímero, cuyas subunidades pertenecen a una familia de 5 miembros: p50, RelA o p65, p52, c-Rel y RelB que comparten una región conservada de 300 aminoácidos, implicada en la dimerización, la unión a IκB, translocación nuclear y unión al ADN (Matroule et al, 2006).

Este factor inductor de genes de supervivencia está asociado al estado oxidativo de la célula y tiene, en consecuencia, gran relevancia en la supervivencia post TFD. Por lo tanto, se analizó la expresión del inhibidor IκB y la subunidad p65 de NFκB en las fracciones citosólicas y nucleares respectivamente de células sensibles y resistentes C-12.

Las células sensibles presentaron niveles elevados de IκB en el citoplasma, excepto para el tiempo de 5 min, que es el único tratamiento que presentó un nivel apreciable de expresión nuclear de NFκB. En cambio, en las células resistentes, se observa presencia de NFκB en todos los tratamientos y en el control, con un patrón de bandas de IκB similar al de células sensibles. Puede decirse que la presencia de NFκB en el núcleo de células sensibles ocurre con dosis subletales (5 min) menores a la DL<sub>50</sub> (7 min). Mientras que las células resistentes responden incrementando la presencia de NFκB en el núcleo con los distintos tiempos de incubación. En este caso también

coinciden niveles menores del inhibidor en el citoplasma con niveles mayores de NF $\kappa$ B en el núcleo para el tiempo de 5 min.



**Fig. IV.17.** Expresión de I $\kappa$ B en fracciones citoplasmáticas y NF $\kappa$ B en fracciones nucleares evaluada mediante western blot, en células sensibles (S) y resistentes (R) a TFD-ALA, no tratadas (0') o tratadas con TFD-ALA de 5 a 20 min. La extracción de proteínas se realizó 24 h post-TFD.

### CONCLUSIONES

Fue posible obtener y mantener una población celular derivada de la línea A549 resistente a TFD-ALA mediante ciclos sucesivos de irradiación y recuperación. Esta característica se evidencia en la elevada viabilidad observada con tiempos de irradiación de 20 min. Las células resistentes mostraron menor acumulación de porfirinas, sugiriendo que esta propiedad puede ser un factor de selección al aplicar los ciclos de TFD.

LA TFD-PpIX produjo en estas células una recuperación parcial de la sensibilidad a TFD indicando que pueden existir otros mecanismos de resistencia. En cambio, la TFD-Vp provocó una disminución de la viabilidad celular en ambos tipos de células, sensibles y resistentes, indicando que los ciclos de TFD-ALA no indujeron resistencia cruzada con otros FSs de localización mitocondrial. El estudio de resistencia cruzada a FSs en células con resistencia inducida es complejo e intervienen diversos mecanismos, sin embargo, el comportamiento observado en estas células para TFD-PpIX y TFD a partir de otros FS fue similar al observado en otras líneas celulares (Mayhew et al, 2001; Casas et al, 2006)

En la morfología general de las células no se observaron diferencias notables entre células sensibles y resistentes. Mientras que al estudiar la morfología subcelular, la identificación de organelas fue posible sólo en células sensibles. La respuesta a TFD-ALA de células sensibles y resistentes fue notablemente distinta a nivel subcelular, ya que éstas últimas conservaron un citoplasma homogéneo, con presencia de vacuolas y elementos de alta densidad electrónica, mientras que las sensibles presentaron una gran desorganización de las estructuras citoplasmáticas y abundantes vacuolas. Estas observaciones sugieren que luego de sucesivos tratamientos las células modifican su respuesta a TFD a nivel subcelular.

Con respecto a los parámetros asociados a apoptosis las células resistentes C-12 respondieron a la TFD prácticamente sin alterar sus proporciones de células viables. Sin embargo presentaron niveles detectables de despolarización mitocondrial, pero sin liberación de citocromo c al citoplasma. Esto puede deberse a que una población de las

células resistentes es capaz de generar  $^1\text{O}_2$  en respuesta a la TFD. Al igual que en células no tratadas, las células resistentes no presentan activación apreciable de caspasa-3, indicando que la muerte por apoptosis no está inducida, lo cual condice con la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2. En cambio sí hay conversión de LC3-II, consistentemente con la observación de vacuolas de doble membrana en la microscopía electrónica.

Fue posible detectar la presencia del factor NF $\kappa$ B en el núcleo de células resistentes sometidas a TFD-ALA en todos los tiempos de irradiación e incluso en el control sin TFD. En cambio en las células sensibles, únicamente con la dosis más leve de TFD fue posible observar la localización nuclear de este factor. El patrón de localización nuclear de NF $\kappa$ B condice con los niveles citoplasmáticos de su inhibidor I $\kappa$ B. Estos resultados sugieren que la activación de este factor asociado a supervivencia es un evento más relacionado con un efecto a largo plazo de la TFD, mientras que las células que reciben un único tratamiento fotodinámico sólo activan esta respuesta con dosis no sólo subletales, sino también menores a la DL<sub>50</sub> lo cual ha sido reportado para otras líneas celulares (Rapozzi et al, 2011).

## REFERENCIAS

- Arum CJ, Gederaas OA, Larsen EL, et al. (2011). Tissue responses to hexyl 5-aminolevulinate-induced photodynamic treatment in syngeneic orthotopic rat bladder cancer model: possible pathways of action. *J Biomed Opt.* 16(2):028001.
- Casas A, Di Venosa G, Vanzulli S, et al. (2008) Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett*; 271(2):342-51.
- Casas A, Perotti C, Ortel B, et al. (2006). Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol.* 29(2):397-405.
- Chen B, Pogue BW, Hoopes PJ, Hasan T. (2005) Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 61(4):1216-26.
- Chiu SM, Oleinick NL. (2001). Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 84(8):1099-106.
- Framme C, Bunse A, Sofroni R, et al. (2006) Fundus autofluorescence before and after photodynamic therapy for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*; 37(5):406-14.
- Karmakar S, Banik NL, et al. (2007) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. *Neurosci Lett*; 415(3):242-7.
- Matroule JY, Volanti C, Piette J. (2006). NF-kappaB in photodynamic therapy: discrepancies of a master regulator. *Photochem Photobiol.* 82(5):1241-6.
- Mayhew S, Vernon DI, Schofield J, et al. (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(1):39-46.
- Milla LN, Cogno IS, Rodríguez ME, et al. (2011) Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem*; 112(9):2266-78.
- Pereira SG, Oakley F. (2008). Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.*;40(8):1425-30.
- Rapozzi V, Umezawa K, Xodo LE. (2011). Role of NF-κB/Snail/RKIP loop in the response of tumor cells to photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 43(7):575-85.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991 Aug;10(8):2247-58.
- Sharkey SM, Wilson BC, Moorehead R, et al. (1993). Mitochondrial alterations in photodynamic therapy-resistant cells. *Cancer Res.* 53(20):4994-9.
- Tapajós EC, Longo JP, Simioni AR, et al. (2008). In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. *Oral Oncol.* 44(11):1073-9.

Tian Y, Leung W, Yue K, et al. (2006). Cell death induced by MPPa-PDT in prostate carcinoma in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 22;348(2):413-20.

Tsai T, Ji HT, Chiang PC, et al. (2009) ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. *Lasers Surg Med;* 41(4):305-15.

Yang TH, Chen CT, Wang CP, et al. (2007) Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral Oncol;* 43(4):358-65.

Yoon KC, Ahn KY, Lee SE et al. (2006) Experimental inhibition of corneal neovascularization by photodynamic therapy with verteporfin. *Curr Eye Res;* 31(3):215-24.



## SEGUNDA PARTE

### CULTIVOS TRIDIMENSIONALES

---

#### CAPÍTULO V

##### *Cultivo en Esferoides multicelulares (EMCs)*

Los cultivos en esferoides son agregados tridimensionales compactos que muestran diferencias en las tasas de proliferación, densidad celular, oxigenación y estado nutricional a través del volumen del esferoide, así como necrosis espontáneas en su centro, si se alcanza el tamaño adecuado. Estos gradientes pueden favorecer el desarrollo de subpoblaciones celulares resistentes a agentes citotóxicos (West y Moore, 1992). Por otro lado, este modelo se ve despojado de factores dependientes del individuo, como ocurre en modelos animales (Zelenkov et al, 2007), y es a su vez notablemente más representativo a nivel expresión génica y respuesta frente a tratamientos que un cultivo bidimensional (Friedrich et al, 2009).

En gran medida, la relevancia del modelo de esferoides multicelulares (EMCs) reside en tres aspectos principales que generan un entorno comparable al de microtumores y son a su vez cualidades de gran influencia en el resultado del tratamiento fotodinámico:

- Desarrollo de matriz extracelular e interacciones celulares (Smalley et al, 2006; Elliot y Yuan, 2011)
- Establecimiento de la resistencia multicelular (Desoize y Jardillier, 2000; Gil-Cardeza ML et al, 2010)
- Generación de gradientes (Hirschhaeuser et al, 2010)

Numerosos trabajos proponen un mecanismo de resistencia a tratamientos antitumorales mediada por la propia arquitectura tridimensional del EMC, lo cual sugiere una vía de supervivencia a TFD alternativa a la expresión de factores de sobrevida (West y Moore 1992; Bates et al, 2000; Desoize y Jardillier, 2000).

Los experimentos presentados en este capítulo tienen como objetivo determinar las condiciones de crecimiento adecuadas para la obtención de EMCs para luego

investigar si la TFD-ALA en esferoides presenta resistencia multicelular, y en ese caso, los mecanismos que conllevan a la sobrevida, teniendo en cuenta que el modelo tridimensional es fisiológicamente más representativo que los ensayos realizados en cultivos en monocapas (bidimensional).

### V.1. Obtención de esferoides

Como se puntualizó previamente en la Introducción, existen diversas aproximaciones metodológicas para la obtención de EMCs. Entre ellas, el cultivo sobre sustratos no adherentes como el agar, es una técnica de bajo costo y sencilla implementación, por lo cual se adoptó como metodología para iniciar el cultivo tridimensional.

Con el objetivo de determinar la densidad celular óptima para la formación de esferoides, se prepararon placas de 6 pocillos cubiertas con 2 ml de agar:RPMI (1:1) y sobre esta matriz no adherente se sembraron densidades celulares entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  céls./ml. Los cultivos fueron monitoreados durante 15 días, renovando dos tercios del medio cada 48 h.

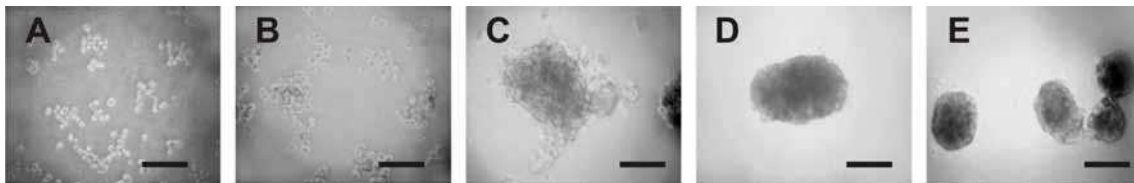
Al cabo de 7 días se tomaron muestras de los cultivos y mediante el software de adquisición de imágenes y datos QCapture Pro se determinaron los diámetros mayor y menor de al menos 10 EMCs para cada densidad de siembra. Se tomó el diámetro mayor como medida de tamaño del EMC y se calculó la relación entre el diámetro mayor y menor para obtener una aproximación a la esfericidad de la estructura (Tabla V.1).

Densidad de siembra (céls./ml)	Diámetro promedio de EMCs ( $\mu\text{m}$ )	Esfericidad (D/d)
$1 \times 10^4$	$113,3 \pm 75,1$	$1,2 \pm 0,6$
$2 \times 10^4$	$294,6 \pm 38,6$	$1,1 \pm 0,3$
$5 \times 10^4$	$466,6 \pm 41,8$	$1,1 \pm 0,2$
$1 \times 10^5$	$756,3 \pm 12,2$	$1,6 \pm 0,8$

**TablaV.1.** Diámetro mayor y relación al diámetro menor de esferoides según la densidad inicial de siembra al cabo de 7 días de iniciado el cultivo. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

La densidad de siembra de  $1 \times 10^4$  céls./ml fue descartada por el reducido tamaño de los esferoides y la elevada dispersión dimensional. Muchas de las células sembradas permanecieron aisladas en suspensión. La siembra de  $1 \times 10^5$  céls./ml también fue descartada debido a que se obtienen esferoides muy irregulares y tienden a fusionarse. En cambio, las densidades de 2 y  $5 \times 10^4$  céls./ml presentaron buena relación entre los diámetros mayor y menor (cercana a 1) aunque una siembra inicial de  $5 \times 10^4$  céls./ml permite obtener EMCs de mayor tamaño.

La formación de EMCs debe prolongarse por un tiempo tal que no sólo permita la aglomeración celular, sino también la compactación de la estructura, de modo que se establezcan las condiciones propicias para estudiar el efecto de la TFD en este modelo. El tiempo en el cual se alcanza un buen grado de compactación es a los 7 días de iniciado el cultivo a partir de la densidad celular previamente seleccionada (Fig. V.1).



**Fig.V.1.** Formación de esferoides a partir del día de siembra (A), en el día 2 (B), día 5 (C) y día 7 (D y E) Densidad de siembra:  $5 \times 10^4$  céls./ml. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ ..

A fin de estandarizar la siembra y permitir comparaciones entre EMCs y monocapa, se cuantificaron las células promedio por EMC. Para ello, los EMCs de al menos 10 pocillos fueron contabilizados y luego tripsinizados hasta obtener una suspensión celular homogénea. Alícuotas de esta suspensión fueron contadas mediante la técnica de Tripán blue incluyendo en el conteo las células muertas.

Densidad de siembra	$5 \times 10^4$ céls. / ml
Cantidad promedio de EMCs por pocillo	$42,2 \pm 18,7$
Cantidad promedio de células por EMC	$1866,1 \pm 194,6$
Porcentaje promedio de células muertas	$12,1 \pm 2,4$

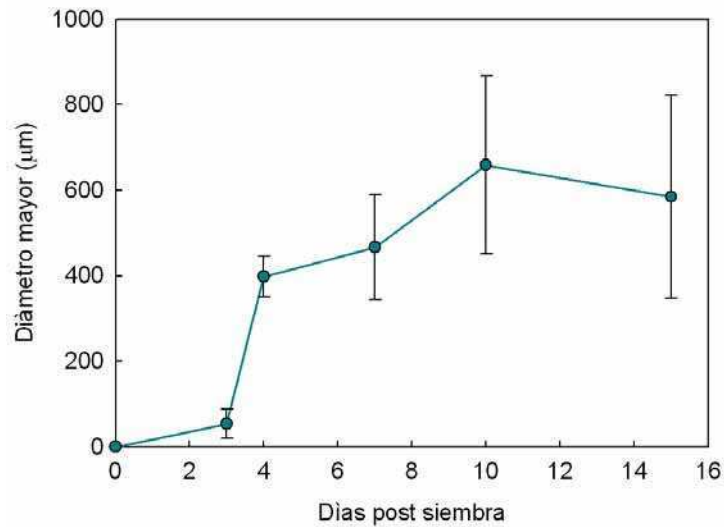
**TablaV.2.** Cuantificación de células por EMC al cabo de 7 días de iniciado el cultivo.

De la Tabla V.2 se deduce que al cabo de 7 días de cultivo se obtiene una densidad final de células en EMCs de aproximadamente  $7,8 \times 10^4$  céls./ml, indicando que hay proliferación celular, aunque a una tasa mucho menor que las células en monocapa (tiempo de duplicación: 22 h) y con un mayor porcentaje de células muertas (en una monocapa saludable no alcanza el 5%).

### *V.2. Curva de crecimiento*

Con el objetivo de identificar el tiempo de viabilidad del cultivo de EMCs se midió el diámetro mayor de al menos 10 esferoides cada día, a partir del día 3 (cuando comienzan a observarse aglomeraciones) y hasta el día 15, siendo el día 0 el de siembra. La medida del diámetro es un indicador adecuado de la viabilidad del esferoide, puesto que una reducción del diámetro implica la pérdida de células superficiales que forman el cordón de proliferación (Bourrat-Floeck et al, 1991).

La densidad de siembra de  $5 \times 10^4$  céls./ml permitió obtener esferoides compactos, con buena esfericidad aunque con cierta dispersión en los tamaños. A los 7 días de cultivo, la variabilidad en tamaños se registró entre 200 y 600  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig.V.1). Transcurridos los 10 días, el cultivo comienza a deteriorarse; se observa un aumento del diámetro promedio de los esferoides y las células pierden cohesión. Luego de 15 días la estructura se desarma parcialmente y se pierden células desde la superficie (Fig.V.2) aunque bajo condiciones de agitación sería posible prolongar la viabilidad del cultivo y aumentar el tamaño final de los EMCs.



**Fig.V.2.** Variación del tamaño promedio de EMCs en función del tiempo de crecimiento. Las células se sembraron en agar:RPMI (1:1) en una densidad de  $5 \times 10^4$  céls./ ml y se monitoreó bajo microscopio el diámetro mayor durante 15 días. Los valores representan la media  $\pm$  SD

Para los siguientes experimentos se fijó el día 7 del cultivo como punto final para tratar a los EMCs según las diferentes condiciones establecidas. En esta fase, los EMCs se encuentran aproximadamente en la mitad de su período viable, lo cual implica que hay una cierta capacidad proliferativa de las células más externas, de modo que es comparable a la fase en la que se utilizan las células en monocapa para llevar a cabo los experimentos.

*CONCLUSIONES*

Se establecieron las condiciones de cultivo en esferoides de la línea celular A549.

Se seleccionó una densidad celular de siembra de  $5 \times 10^4$  céls./ml como procedimiento estándar para el cultivo de EMCs en base al tamaño y la esfericidad obtenida en esas condiciones de cultivo.

Se estableció un tiempo de crecimiento de 7 días para los EMCs que de acuerdo al número total de células contabilizadas corresponde aproximadamente a una fase de crecimiento que se encuentra en la mitad del período de viabilidad del cultivo.

Aún en etapas viables, el cultivo presenta porcentajes de células muertas mayores respecto de la monocapa, que podrían corresponder a células del interior del EMC.

La homogeneidad de tipo celular que presentan los esferoides y la ausencia de vasculatura, permite estudiar los efectos de la TFD sobre las células tumorales y su diferenciación en la conformación tridimensional. Es por estas razones que el modelo de esferoides es relevante para el estudio de la TFD.

## REFERENCIAS

- Bates RC, Edwards NS, Yates JD.(2000) Spheroids and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol*; 36(2-3):61-74.
- Bourrat-Floeck B, Groebe K, Mueller-Klieser W. (1991) Biological response of multicellular EMT6 spheroids to exogenous lactate. *Int J Cancer*; 47(5):792-9.
- Desoize B, Jardillier J. (2000) Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol*; 36(2-3):193-207.
- Elliott NT, Yuan F. (2011) A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci* ; 100(1):59-74.
- Friedrich J, Seidel C, Ebner R, et al. (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*; 4(3):309-24.
- Gil-Cardesa ML, Villaverde MS, Fiszman GL, et al. (2010).Suicide gene therapy on spontaneous canine melanoma: correlations between in vivo tumors and their derived multicell spheroids in vitro. *Gene Ther*. 17(1):26-36.
- Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, et al. (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*; 148(1):3-15.
- Smalley KS, Lioni M, Herlyn M.(2006) Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 42(8-9):242-7.
- West CM, Moore JV. (1992) Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. *Photochem Photobiol*; 55(3):425-30.
- Zelenkov P, Baumgartner R, Bise K, et al. (2007) Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model. *J Neurooncol*; 82(1):49-60.

## CAPÍTULO VI.

### *TFD con porfirinas endógenas a partir de ALA en EMCs*

La incorporación del FS, o de su precursor biológico a nivel intratumoral es uno de los condicionantes principales en la efectividad de la TFD. Si la distribución del FS no es homogénea o es derivada en mayor proporción al sistema reticuloendotelial, la acción antitumoral de la TFD se verá notablemente reducida (Xiao et al, 2005).

El modelo de EMCs permite el estudio de la dinámica de los FS en una estructura tridimensional, similar a la de microtumores, independientemente de la vasculatura.

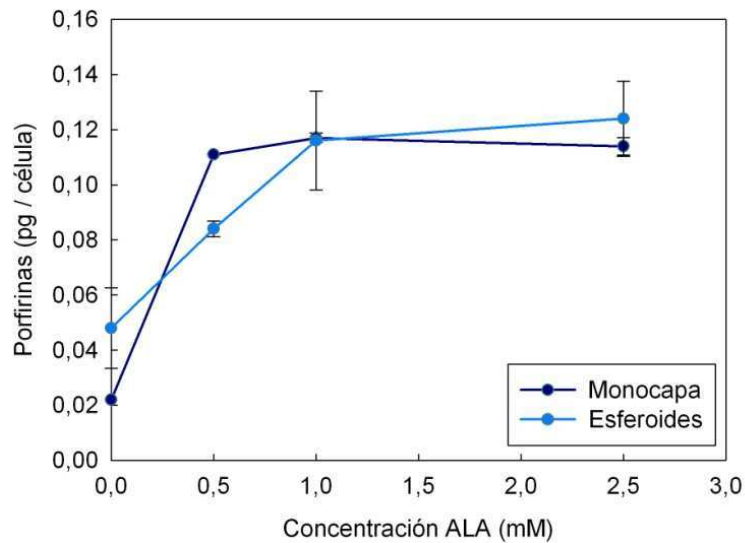
#### *VI.1. Síntesis de porfirinas en EMCs a partir de ALA*

La síntesis de porfirinas podría verse alterada por la distribución de las células en los EMCs respecto de las células en monocapa. El ALA es una molécula hidrofílica que presenta escaso transporte a través de la membrana plasmática, por lo cual es probable que la arquitectura de las células en EMCs restrinja la producción de PpIX. Con el objetivo de evaluar cuantitativamente la síntesis de porfirinas en ambas conformaciones del cultivo, las porfirinas sintetizadas a partir de ALA fueron cuantificadas espectrofluorométricamente previa extracción química con HCl 5%.

##### *VI.1.1. Curva de concentración*

La síntesis de porfirinas se evaluó a distintas concentraciones de ALA (0,5-2,5 mM) que no resultan tóxicas para la célula, con un tiempo fijo de incubación de 3 h en las dos conformaciones de crecimiento, tanto en el cultivo de células en monocapa como en ECMs.



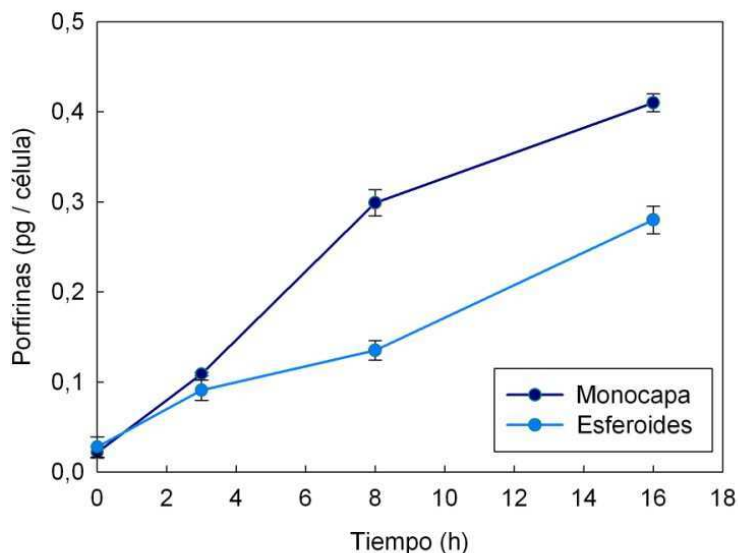


**Fig.VI.1.** Síntesis de porfirinas en función de la concentración de ALA. Las células A 549 crecidas en monocapa y en EMCs, se incubaron con diferentes concentraciones de ALA en medio sin suero. Luego de 3 h de incubación a 37°C, en oscuridad, se extrajeron y cuantificaron espectrofluorométricamente las porfirinas intracelulares. Paralelamente, esferoides de tres pocillos fueron utilizados para conteo de células (vivas y muertas) por tripán blue, a fin de relativizar la cantidad de porfirinas por célula. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

Puede observarse en la Fig VI.1 que en el cultivo en monocapa se llegó a un plateau en la síntesis de porfirinas a una concentración de ALA 0,5 mM, mientras que en el cultivo en esferoides la misma se obtuvo con ALA 1mM. Estos resultados indican un leve retraso en la saturación de síntesis de PpIX en los EMCs, aunque la cantidad total de porfirinas que se acumulan no difiere significativamente entre las células en monocapa y EMCs en el rango de concentraciones ensayado.

### VI.1.2. Curva de tiempo de incubación

Se estudió la síntesis de porfirinas en las dos modalidades de cultivo, a distintos tiempos de incubación (3-16 h) con una concentración fija de ALA 1 mM (Fig. VI.2).



**Fig.VI.2.** Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación con ALA. Las células A 549 crecidas en monocapa y en EMCs, se incubaron con diferentes concentraciones de ALA en medio sin suero. Luego del tiempo de incubación (0,5 a 16 h) a 37°C, en oscuridad, se extrajeron y cuantificaron espectrofluorométricamente las porfirinas intracelulares. Paralelamente, esferoides de tres pocillos fueron utilizados para conteo de células (vivas y muertas) por tripán blue, a fin de relativizar la cantidad de porfirinas por célula. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar.

A plazos cortos (3 h) se observó que el aumento de la síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación, es similar para ambos tipos de cultivo, pero a tiempos largos (16 h) la cinética de síntesis en la monocapa es mayor que en los esferoides, ( $0,41 \pm 0,01$  pg porf / cél. monocapa ;  $0,28 \pm 0,10$  pg porf / cél. esferoides).

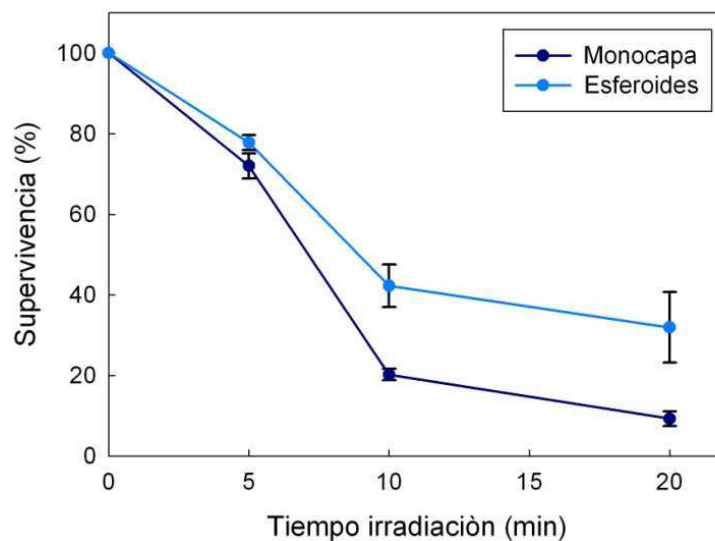
La extracción química de porfirinas intracelulares mostró que aunque el plateau de síntesis de porfirinas se alcanza antes en la monocapa que en los esferoides, la cantidad de porfirinas sintetizadas no varía significativamente entre ambas modalidades de cultivo (Fig. VI.1 y VI.2). Esta diferencia en el tiempo de saturación podría deberse a un leve retraso en la llegada del ALA a las células del interior del esferoide, que no repercute en la cantidad final de porfirinas sintetizadas. Para el tiempo de incubación de 3 h, que es la condición empleada para la posterior irradiación, los niveles de porfirinas acumulados son similares en las dos modalidades de cultivo.

### VI.3. Determinación de $DL_{50}$

Habiendo establecido las condiciones de incubación para la síntesis de porfirinas en EMCs de manera que sean comparables con las condiciones previamente establecidas para la monocapa, se procedió a evaluar la viabilidad celular luego de distintas dosis de TFD-ALA.

Para determinar la  $DL_{50}$  en los esferoides, los mismos fueron previamente disgregados con tripsina y resembrados en placas nuevas.

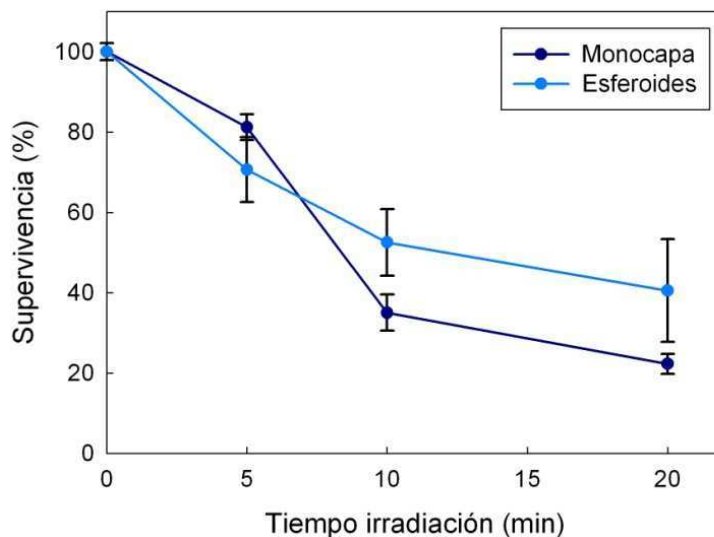
Las curvas de supervivencia post TFD según el ensayo de MTT mostraron en el cultivo 3D un ligero corrimiento (2 min) de la  $DL_{50}$  y para una irradiación de 20 min una mayor supervivencia de células en esferoides ( $31,9 \pm 8,7\%$ ) respecto de la monocapa ( $9,3 \pm 0,8\%$ ) (Fig. VI.3).



**Fig.VI.3.** Curva de supervivencia celular 1 h post-TFD-ALA. Las células en monocapa y los EMCs se incubaron con ALA 1 mM en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiados durante distintos tiempos. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de MTT. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no iluminado, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

Debido a que el método de MTT debió ser adaptado al modelo de esferoides, se empleó el ensayo de fosfatasa ácida (APH) (Friedrich et al 2007 y 2009) que permite evaluar la viabilidad celular empleando procedimientos similares para las dos modalidades del cultivo, sin necesidad de disgregar los EMCs (Fig. VI.4).

La diferencia de supervivencia celular para una misma dosis de TFD es evidente mediante ambos ensayos, MTT y APH, sin embargo, los resultados de APH muestran una mayor supervivencia celular en tiempos largos de irradiación (20 min), especialmente en la monocapa (APH:  $22,3 \pm 2,5\%$ ; MTT:  $9,3 \pm 0,8\%$ ). Se observa un corrimiento de la  $DL_{50}$  para la monocapa de 7 a 8 min y de 9 a 12 min en la  $DL_{50}$  correspondiente a los esferoides.



**Fig.VI.4.** Curva de supervivencia celular 1 h post-TFD-ALA. Las células o los EMCs se incubaron con ALA 1 mM en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos. Al cabo de 1 h se realizó el ensayo de APH. Los valores se expresan como porcentaje respecto del control no iluminado, y representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar

Los distintos ensayos de viabilidad celular, MTT y APH utilizados para evaluar el efecto de la TFD en los EMCs (Fig. VI.3 y 4) revelan una respuesta diferencial entre la monocapa y los esferoides, reflejada en un corrimiento de las  $DL_{50}$ , de aproximadamente 2 min para estos últimos, mostrando así los cultivos 3D, una mayor resistencia a iguales dosis lumínicas de TFD; este efecto es mas pronunciado especialmente a partir de los 10 min de irradiación.

Esta resistencia asociada a la multicelularidad puede estar vinculada a factores como la distribución de la PpIX inducida por el ALA (pero no sus niveles de síntesis, Fig VI.1), la accesibilidad de la luz en las distintas zonas del esferoide o la disponibilidad de oxígeno para el inicio de las reacciones fotoquímicas; factores condicionantes de la efectividad de la TFD (Olive y Durand 1994; West y Moore, 1992; Kamuhabwa et al, 2003).

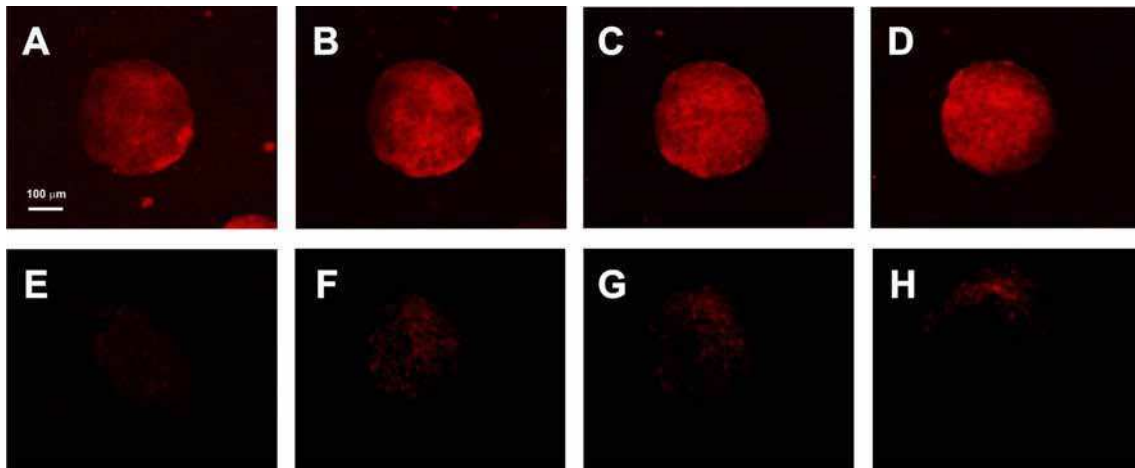
#### *VI.4. Distribución de PpIX endógena en EMCs*

Si bien la síntesis de porfirinas no muestra diferencias significativas entre las células en monocapa y en esferoides, es importante indagar qué zonas del esferoide son las responsables de esa síntesis, puesto que de presentar una distribución heterogénea, por ejemplo mayormente en las capas superficiales del esferoide, la efectividad de la TFD se vería restringida únicamente a las células capaces de captar y metabolizar el ALA. La distribución en esferoides ha sido estudiada para FS como hipericina, Photofrin, ftalocianinas, y derivados de ALA, siendo en algunos casos uniforme y en otros casos heterogénea, dependiendo del FS y el tipo celular (Bigelow et al, 2001; Kamuhabwa et al, 2003, Xiao et al, 2005).

A fin de visualizar la distribución de la fluorescencia propia de la PpIX, esferoides incubados con ALA 1 mM durante 18 h fueron incluidos en agar-RPMI y se observaron al microscopio confocal en distintos planos partiendo desde la superficie hacia el interior del esferoide (Fig. VI.5). Se incluyó un control con SA 1 mM, inhibidor de la síntesis de porfirinas a partir de ALA, para verificar la especificidad de la fluorescencia de la PpIX.

Se observó una distribución uniforme de la intensidad de fluorescencia en todos los planos analizados del esferoide. La incubación con SA inhibe en todos los planos la síntesis de PpIX a partir de ALA, indicando que la fluorescencia se debe a la captación y metabolización de este precursor. Se utilizó un tiempo de incubación de 18 h para favorecer la relación entre señal de fluorescencia y señal de fondo en la imagen. La distribución de la fluorescencia a las 3 h es similar a la de 18 h, aunque con menor intensidad.

En el capítulo siguiente se investigarán los otros posibles factores condicionantes de la eficacia de la TFD.



**Fig.VI.5.** Distribución de PpIX endógena a partir de ALA 1 mM en EMCs. Los EMCs fueron incubados con ALA 1mM durante 18 h, incluidos en agar:RPMI y montados para su visualización por microscopía confocal. Se analizaron distintos planos del EMC desde la superficie: 10  $\mu\text{m}$  (A), 20  $\mu\text{m}$  (B), 40  $\mu\text{m}$  (C) y 60  $\mu\text{m}$  (D). Control sin ALA (E). Coincubación con ALA y succinilacetona 1 mM en planos de 0  $\mu\text{m}$  (F), 20  $\mu\text{m}$  (G) y 30  $\mu\text{m}$  (H) desde la superficie del EMC.

### CONCLUSIONES

Los EMCs son capaces de captar y metabolizar el ALA de manera similar a las células en monocapa en un tiempo de incubación de 3 h. Alcanzando el plateau de síntesis de porfirinas a una concentración de ALA levemente mayor que en el cultivo bidimensional. En cambio, a largo plazo (16 h), la monocapa presenta una cinética de acumulación más rápida que los EMCs, probablemente debido a una mayor exposición de superficie en contacto con la droga.

Se encontró un corrimiento de +2 min de la  $DL_{50}$  para el tratamiento fotodinámico de esferoides y un porcentaje de supervivencia 20% mayor en EMCs para el mayor tiempo de irradiación (20 min). Ante la posibilidad de que esta diferencia fuera un artefacto de la adaptación del método de MTT a EMCs (dado que implica disgregación y adhesión de las células provenientes de EMCs tratados), se realizó el ensayo de APH. El comportamiento observado resultó el mismo, confirmando la respuesta diferencial a la TFD de los EMCs respecto de las células en monocapa.

El ALA es una molécula permeable, hidrofílica y pequeña, capaz de alcanzar las capas internas del esferoide. Según estos resultados, una concentración de ALA 1 mM y un tiempo de incubación de 3 h permiten condiciones comparables entre células cultivadas en monocapa y en EMCs, ya que las porfirinas se distribuyen uniformemente en estos últimos. Por lo tanto, la síntesis de porfirinas, tanto cualitativa como cuantitativamente no es responsable de la resistencia multicelular observada.

*REFERENCIAS*

Bigelow CE, Mitra S, Knuechel R, et al. (2001) ALA- and ALA-hexylester-induced protoporphyrin IX fluorescence and distribution in multicell tumour spheroids. *Br J Cancer*; 85(5):727-34.

Friedrich J, Eder W, Castaneda J, et al. (2007) A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen*; 12(7):925-37. Erratum en: *J Biomol Screen*. (2007);12(8):1115-9.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R, et al. (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*; 4(3):309-24.

Kamuhabwa AA, Huygens A, De Witte PA. (2003) Photodynamic therapy of transitional cell carcinoma multicellular tumor spheroids with hypericin. *Int J Oncol*; 23(5):1445-50.

Olive PL, Durand RE. (1994) Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev*; 13(2):121-38.

West CM, Moore JV. (1992) Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. *Photochem Photobiol*; 55(3):425-30.

Xiao Z, Hansen CB, Allen TM, et al. (2005) Distribution of photosensitizers in bladder cancer spheroids: implications for intravesical instillation of photosensitizers for photodynamic therapy of bladder cancer. *J Pharm Pharm Sci*; 8(3):536-43.



## CAPÍTULO VII

### *Muerte celular por TFD a partir de ALA en EMCs*

El modelo de EMCs difiere de los cultivos en monocapa, en la conformación tridimensional de las células. Por ese motivo, la posibilidad de aplicar TFD en EMCs permite establecer si la arquitectura del cultivo y el contacto entre las células ofrecen un entorno más cercano a la respuesta al tratamiento.

#### *VII.1. Morfología e histología post TFD-ALA*

Como primera aproximación al estado general y la funcionalidad de los esferoides post TFD-ALA se realizaron tinciones morfológicas tanto en esferoides intactos como en cortes histológicos.

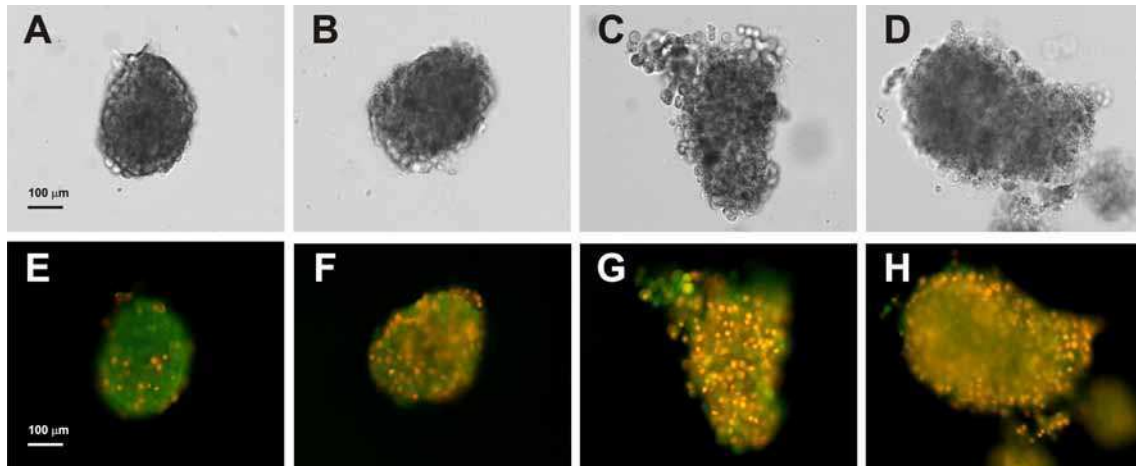
##### *VII.1.1. Tinción diferencial para Apoptosis y Necrosis en EMCs intactos*

La disminución en la viabilidad celular post TFD se verifica en el aspecto externo de los esferoides, mostrando células que se desprenden de la superficie y un aumento de la transparencia de la estructura (Fig. VII.1 A-D). El fotodaño producido por la TFD se visualizó mediante tinción diferencial con NA/BE que permitió detectar la presencia de células muertas (de fluorescencia naranja) en la superficie de los esferoides, las cuales aumentan con el tiempo de irradiación, así como la pérdida de compactación de la estructura del esferoide (Fig. VII.1 E-H).

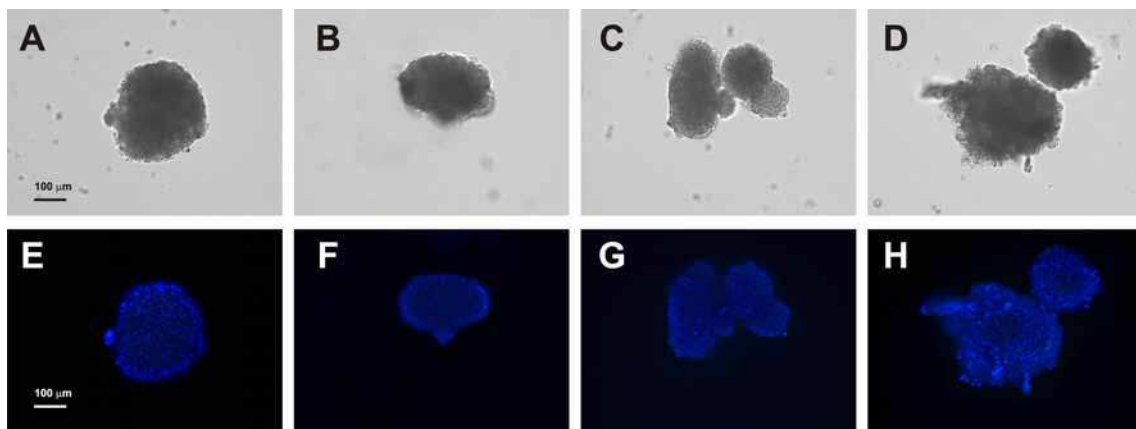
##### *VII.1.2. Morfología nuclear en EMCs intactos*

Al realizar la tinción con Hoechst en EMCs previamente fijados en metanol y permeabilizados con Tritón se observó la morfología nuclear de las células de la periferia y las capas más externas de la estructura. Según se observa en la Fig. VII.2, el

número de células con núcleos condensados no es tan abundante como en las células en monocapa para los tiempos de irradiación aplicados, aunque sí se verifica el desprendimiento de células de la superficie.



**Fig.VII.1.** Morfología general (a-D) y tinción diferencial con NA/BE (E-H) en esferoides sin tratamiento (A y E), o tratados con TFD durante 5min (B y F), 10 min (C y G) o 20 min (D y H). Los EMCs fueron resuspendidos en medio sin suero, incubados con ALA 1 mM durante 3 h e irradiados en un banco de tubos fluorescentes. Al cabo de 1 h, se resuspendieron en PBS y se tiñeron con NA/BE para su observación al microscopio de fluorescencia. Barra de escala: 100 µm.



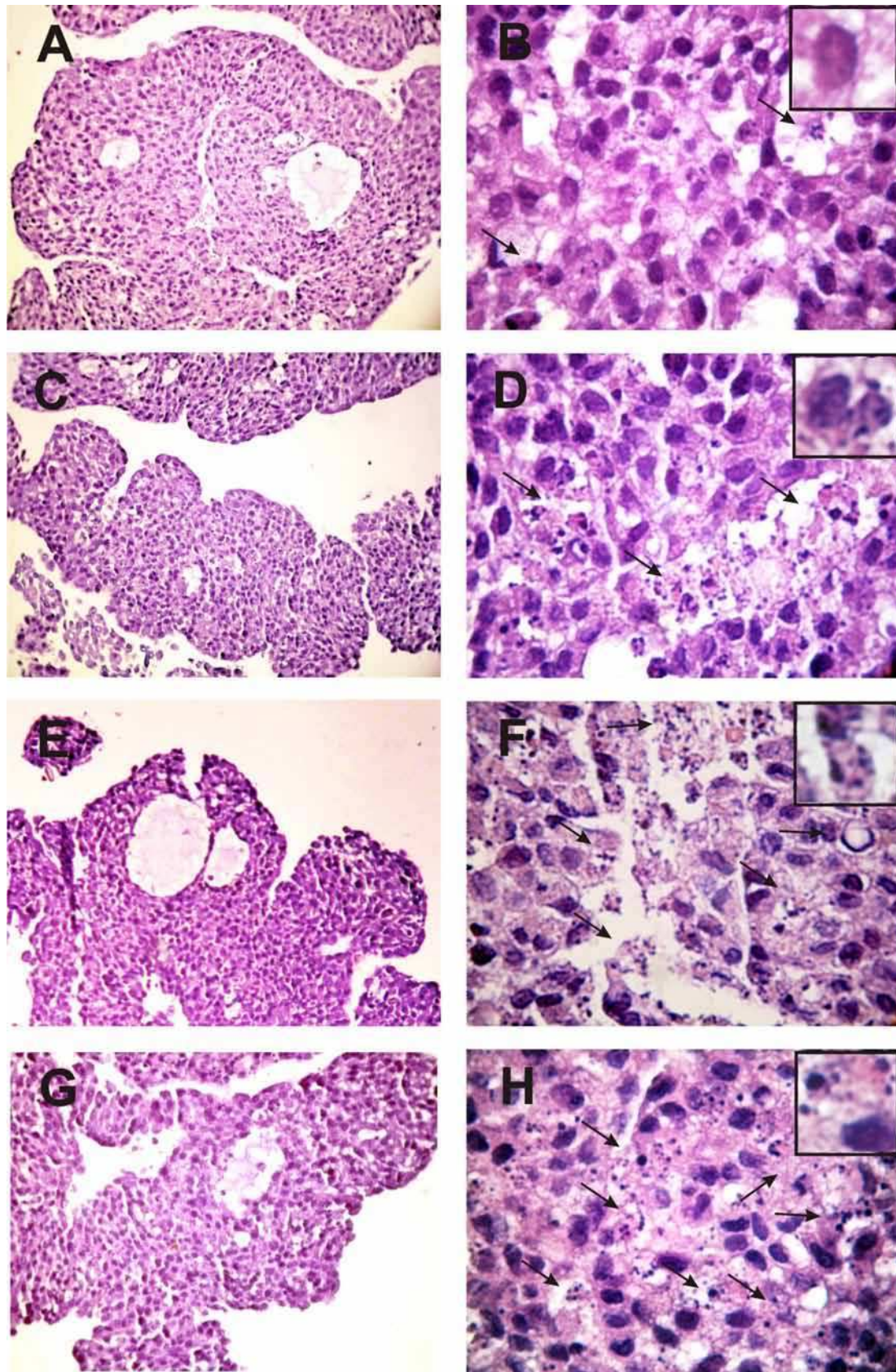
**Fig.VII.2.** Morfología general (A-D) y tinción nuclear con Hoechst (E-H) en esferoides sin tratamiento (A y E), o tratados con TFD durante 5min (B y F), 10 min (C y G) o 20 min (D y H). Los EMCs fueron resuspendidos en medio sin suero, incubados con ALA 1 mM durante 3 h e irradiados en un banco de tubos fluorescentes. Al cabo de 1 h, se los fijó en metanol y se permeabilizó con Tritón. Luego se realizó la tinción con Hoechst 3358 para su observación al microscopio de fluorescencia. Barra de escala: 100 µm.

### *VII.1.3. Tinción con hematoxilina-eosina*

Mediante tinción con hematoxilina-eosina se analizaron las características histológicas de esferoides sin tratamiento o tratados con distintas dosis de TFD. Según se observa en cortes de esferoides no tratados, la estructura presenta una superficie uniforme y compacta, con estrecha integración de las células que componen el esferoide. Se ven también indicios de diferenciación secretora, mostrando vacuolas de secreción y abundantes gránulos en las células individuales. Asimismo, se observan áreas huecas en el centro de algunos esferoides, con signos de secreción. Esta característica es consistente con la naturaleza histológica de la línea celular, proveniente de un tumor epitelial de tipo adenocarcinoma (Fig VII.3).

Al aplicar dosis crecientes de TFD se observan núcleos condensados y con tinciones atípicas, con la cromatina dispuesta en la periferia del núcleo. A medida que aumenta el tiempo de irradiación se evidencia una pérdida progresiva de compactación de la estructura y se pierde la distinción de los límites celulares; aumenta la granularidad del citoplasma y se observa gran cantidad de núcleos condensados. En todos los tiempos de irradiación es posible detectar células aparentemente intactas que conviven con células claramente dañadas.





**Fig.VII.3.** Tinción con hematoxilina-eosina en cortes histológicos de esferoides sin tratamiento (A y B), o tratados con TFD durante 5min (C y D), 10 min (E y F) o 20 min (G y H). 1 h luego de la TFD los EMCs fueron fijados en formol 10% y procesados para su inclusión en parafina. Las flechas indican núcleos apoptóticos o áreas de daño celular. Las imágenes corresponden a aumentos de 100X (panel izquierdo), 600X (panel derecho).

#### *VII.1.4. Tinción del ácido periódico de Schiff (PAS)*

A fin de verificar las propiedades secretoras del cultivo, y analizar el efecto de la TFD sobre las mismas, se realizó la tinción de PAS (reacción del ácido periódico de Schiff), que permite visualizar mucopolisacáridos de secreción (Fig VII.4). La tinción de PAS es frecuentemente utilizada para el diagnóstico y la clasificación de tumores de pulmón como adenocarcinomas (Warnock et al, 1988; Dukić et al, 2011).

En los esferoides no tratados se observa una fuerte marcación de células positivas para PAS, confirmando la presencia de productos de secreción en las áreas huecas observadas en la tinción con hematoxilina-eosina.

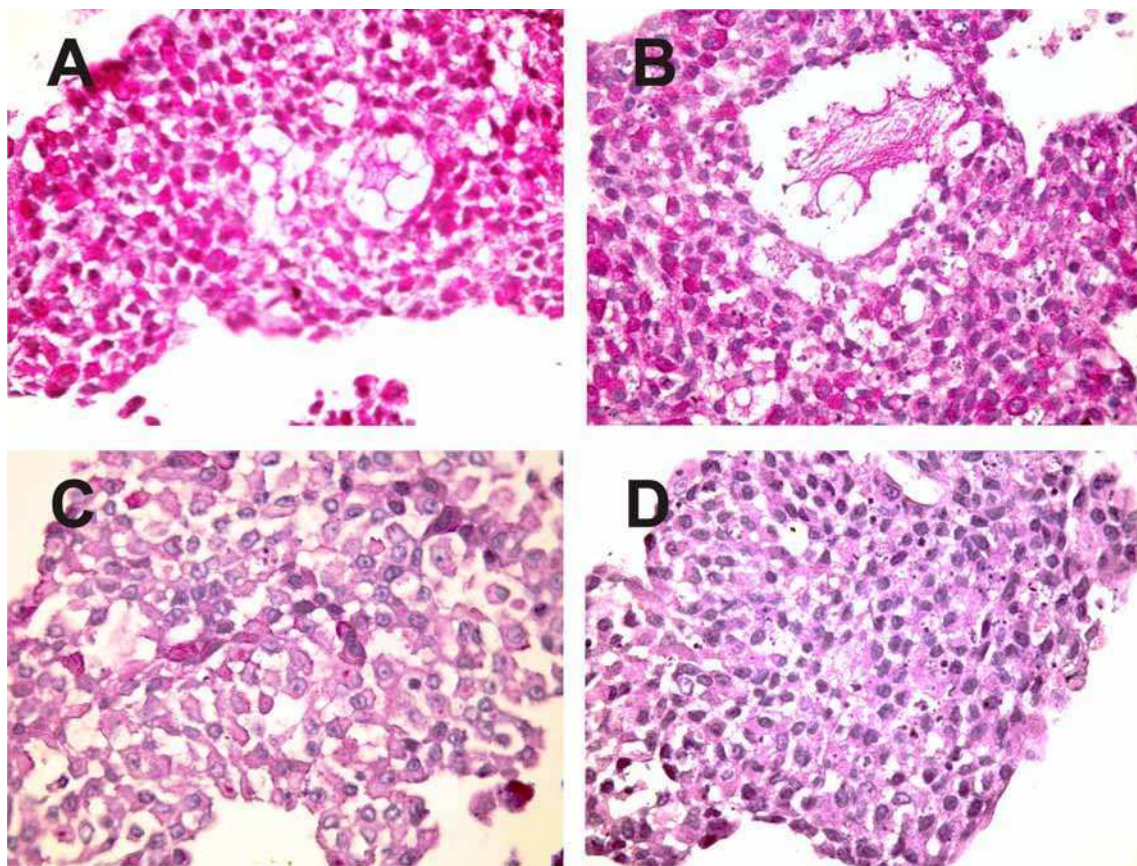
En los esferoides tratados con dosis de 5 a 20 min de TFD se observa una pérdida de la tinción, lo cual es un indicador de daño celular, además de una pérdida en la cohesión celular. Con la menor dosis lumínica aplicada, ya se aprecia una limitación de la tinción en la periferia del esferoide, que se diluye levemente hacia el centro. En cambio, en las dosis lumínicas más altas, se observa una mayor heterogeneidad, en la que conviven escasas células secretoras remanentes con células que han perdido esta capacidad, lo cual se refleja en la pálida tinción que presentan en el citoplasma.

#### *VII.1.1. Inmunodetección de Ki67*

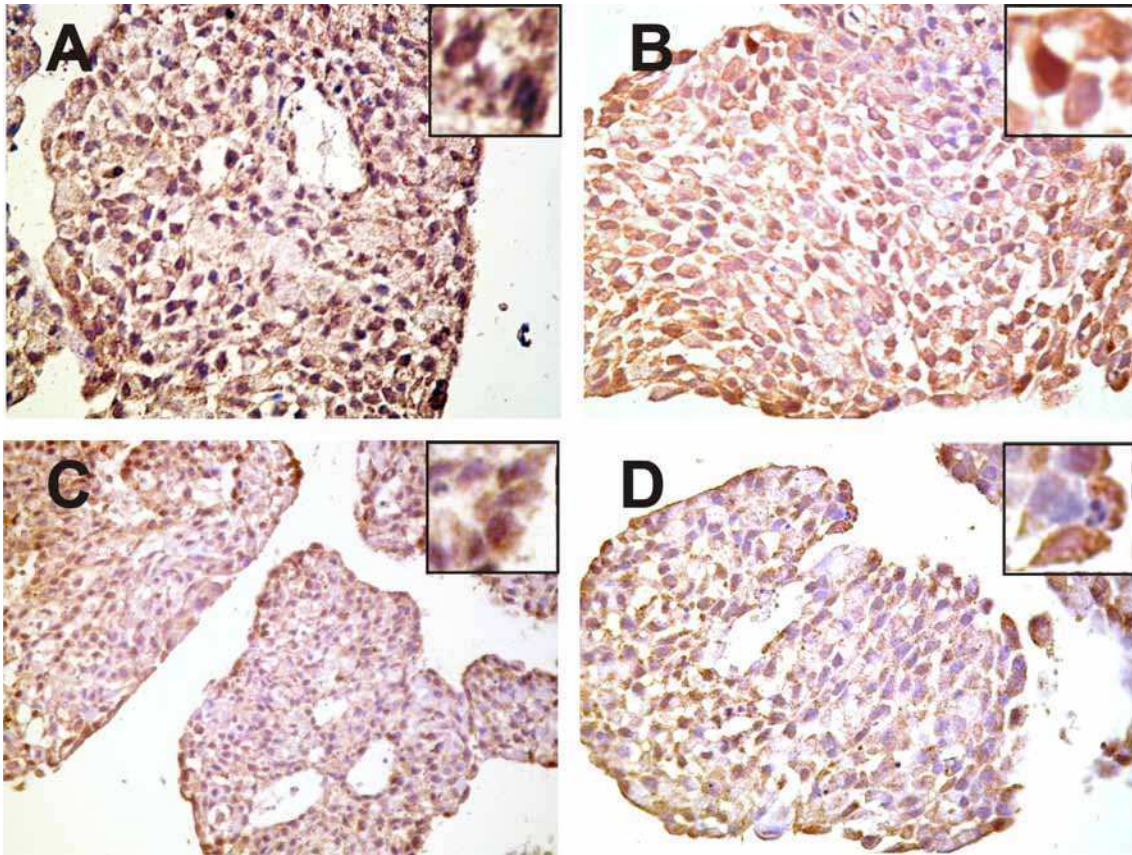
La pérdida de productos de secreción en las células del esferoide indica que la TFD podría alterar la funcionalidad de las células tumorales. Por este motivo, se evaluó la capacidad proliferativa de las células en el esferoide luego de aplicar TFD-ALA mediante inmunodetección de Ki67, una proteína expresada únicamente en células en fases del ciclo celular. Es también un marcador de uso diagnóstico y pronóstico para analizar el estado proliferativo de tumores de pulmón (Ciancio et al, 2012; Khojasteh et al, 2012).



La detección de Ki67 en esferoides control indica una mayor presencia de células proliferativas en la periferia formando una superficie que da aspecto compacto al esferoide, con marca nuclear intensa, observándose menos células positivas hacia el centro. En cambio, en los esferoides tratados, las células positivas se restringen a la periferia y muestran una morfología relativamente conservada, aunque en algunos casos, con tinción atípica (citoplasmática). Se evidencia también una pérdida en la cohesión celular con el aumento de los tiempos de irradiación (Fig. VII.5).



**Fig.VII.4.** Tinción con PAS en cortes histológicos de esferoides sin tratamiento (A), o tratados con TFD durante 5min (B), 10 min (C) o 20 min (D). 1 h luego de la TFD los EMCs fueron fijados en formol 10% y procesados para su inclusión en parafina. Las imágenes corresponden a aumentos de 100X.



**Fig.VII.5.** Detección inmunohistoquímica de Ki67 en cortes histológicos de esferoides sin tratamiento (A), o tratados con TFD durante 5min (B), 10 min (C) o 20 min (D). 1 h luego de la TFD los EMCs fueron fijados en formol 10% y procesados para su inclusión en parafina e inmunodetección con un anticuerpo policlonal de cabra 1:400 (Santa Cruz). Las imágenes corresponden a aumentos de 100X.

#### VII.1.1. *Inmunodetección del factor inducido por hipoxia (HIF1- $\alpha$ )*

Las células tumorales se adaptan a la condición hipóxica propia de los tumores induciendo genes involucrados en la angiogénesis o el metabolismo de la glucosa mediante la expresión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), constituido por dos subunidades, HIF1- $\alpha$  y HIF1- $\beta$  (Zhou et al, 2011). Su activación incrementa la capacidad invasiva y el potencial metastático de las células y en muchos casos, su inhibición está asociada a la disminución del crecimiento tumoral (Semenza, 2003).

Numerosos trabajos demuestran la capacidad de expresión de HIF1- $\alpha$  en células A549 en respuesta a hipoxia, aunque en condiciones normales de cultivo los niveles basales de expresión no son detectables (Zhou et al, 2008; Oike et al, 2012; Schilling et al, 2012; Ye et al, 2012).

En los siguientes experimentos se evaluó la expresión de HIF1- $\alpha$  en EMCs mediante inmunocitoquímica antes y después de distintas dosis de TFD-ALA.

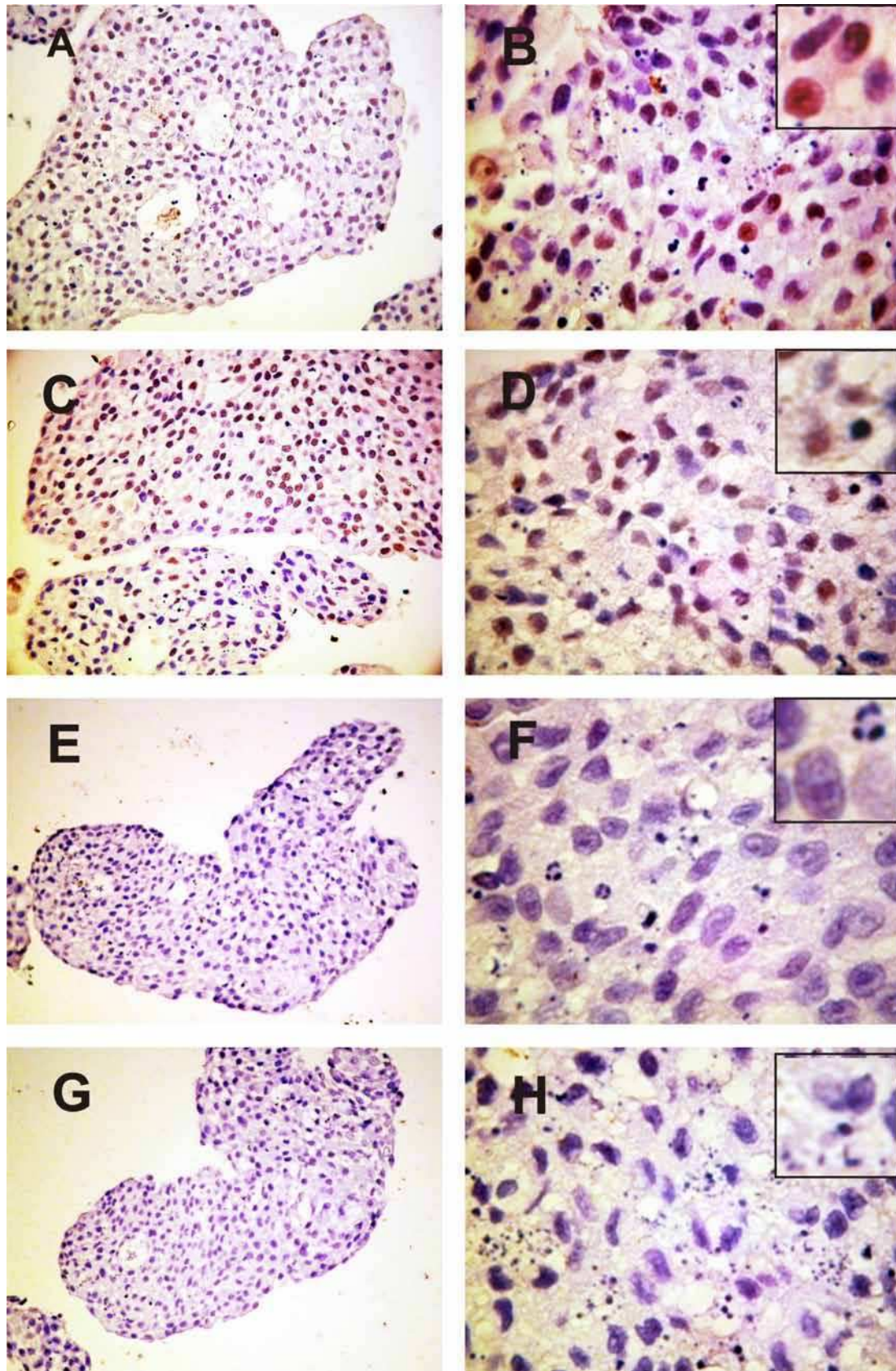
Según los resultados obtenidos, los EMCs presentan una expresión moderada de HIF1- $\alpha$ , con localización nuclear (Fig. VII.6). La distribución de la marca en el esferoide no es uniforme, sino que se observan numerosas células con marcación y células contiguas no marcadas. Con un tiempo de irradiación de 5 min no se detecta un cambio significativo en la expresión de HIF1- $\alpha$ , aunque se ve un leve aumento de la cantidad de células con marca nuclear. En cambio, tanto para tiempos de 10 como de 20 min de irradiación se observa la pérdida de la marca y los cambios morfológicos previamente descritos.

Al cultivar las células de modo tridimensional, ocurre un cambio desde el metabolismo aeróbico al hipóxico que incluye variaciones en el perfil de expresión de proteínas asociadas al mantenimiento de la estructura y el aprovechamiento de energía, entre ellas: VEGF, Ki67 (Takagi et al, 2007),  $\beta$ -catenina (Weiswald et al, 2010), HIF1- $\alpha$  (Marushima et al, 2011).

El tratamiento fotodinámico subletal podría no sólo no tener efecto en la eliminación de las células tumorales sino por el contrario, favorecer la resistencia mediada por factores de supervivencia tales como HIF según se ha reportado también para tratamientos de radioterapia (Schwartz et al, 2011) y quimioterapia (Doublier et al, 2012). En cambio tiempos de irradiación similares o superiores a la DL<sub>50</sub> marcadamente afectan la expresión de HIF en toda la estructura del esferoide, con lo cual se confirma una disrupción funcional generalizada de la estructura junto con la disminución de Ki67 y de la capacidad secretora de mucopolisacáridos.

Según indican estos resultados, la estructura interna y la diferenciación de las células en el esferoide se ven alteradas por la TFD-ALA, señalando que el efecto no es únicamente superficial, sino también en las capas internas del esferoide.





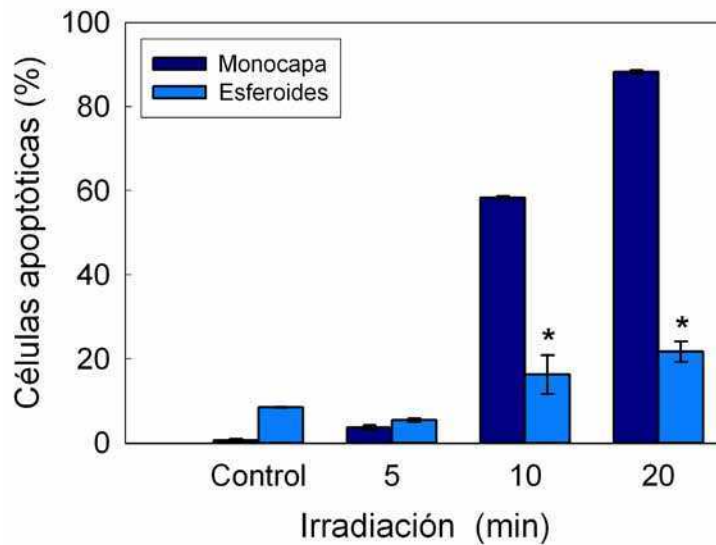
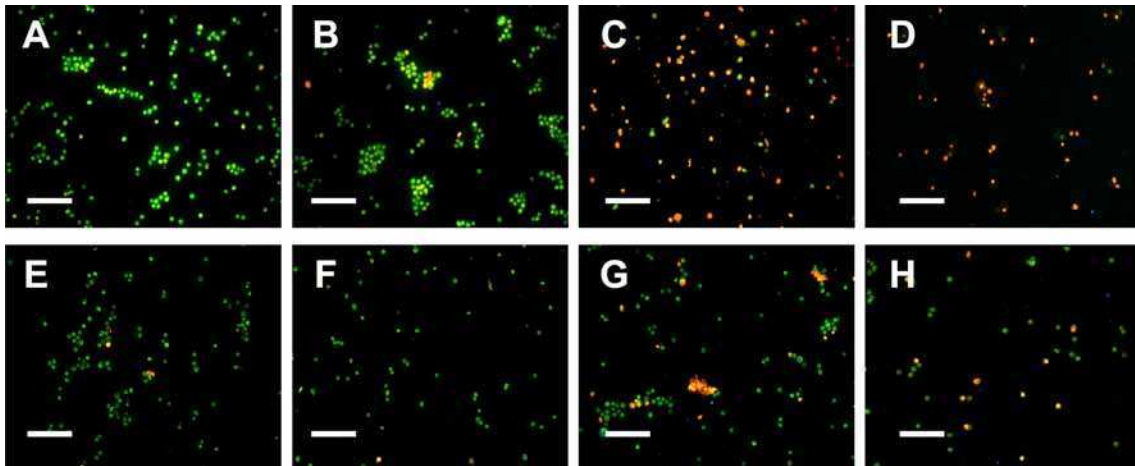
**Fig.VII.6.** Detección inmunohistoquímica de HIF1- $\alpha$  en cortes histológicos de esferoides sin tratamiento (A y B), o tratados con TFD durante 5 min (C y D), 10 min (E y F) o 20 min (G y H). 1 h luego de la TFD los EMCs fueron fijados en formol 10% y procesados para su inclusión en parafina e inmunodetección con un anticuerpo policlonal de conejo 1:100 (Cell Signalling). Las imágenes corresponden a aumentos de 250X (A y C), 100X (E y G), 400X (B y D) y 1000X (F y H).

## *VII.2. Apoptosis y Necrosis post TFD*

En los ensayos realizados en monocapa fue posible caracterizar los mecanismos que llevan a la muerte celular. Al cambiar la conformación del cultivo, podría establecerse una respuesta diferencial a la TFD mediada por la resistencia multicelular. El objetivo de los siguientes experimentos fue investigar los mecanismos de muerte celular en EMCs en respuesta a la TFD-ALA y compararlos con los observados en monocapas.

### *VII.2.1. Tinción diferencial para Apoptosis y Necrosis en EMCs disgregados*

Al realizar la tinción de las células provenientes de los esferoides disgregados se observó una mayor proporción de células viables comparadas con un mismo tiempo de irradiación en células en monocapa. Así, para un tiempo de irradiación de 20 min, que en la monocapa resulta letal para gran parte de la población celular ( $88,2 \pm 0,4\%$  células apoptóticas), se observó en los esferoides un  $21,7 \pm 2,4\%$  de células apoptóticas al cabo de 1 h post TFD, el cual es significativamente menor (Fig. VII.7 y 8).



**Fig. VII.8.** Cuantificación de células apoptóticas provenientes de monocapas o de esferoides disgregados 1 h post TFD a distintos tiempos de irradiación mediante tinción con NA/BE. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar. (\* $p < 0,05$  respecto del mismo tiempo de irradiación).

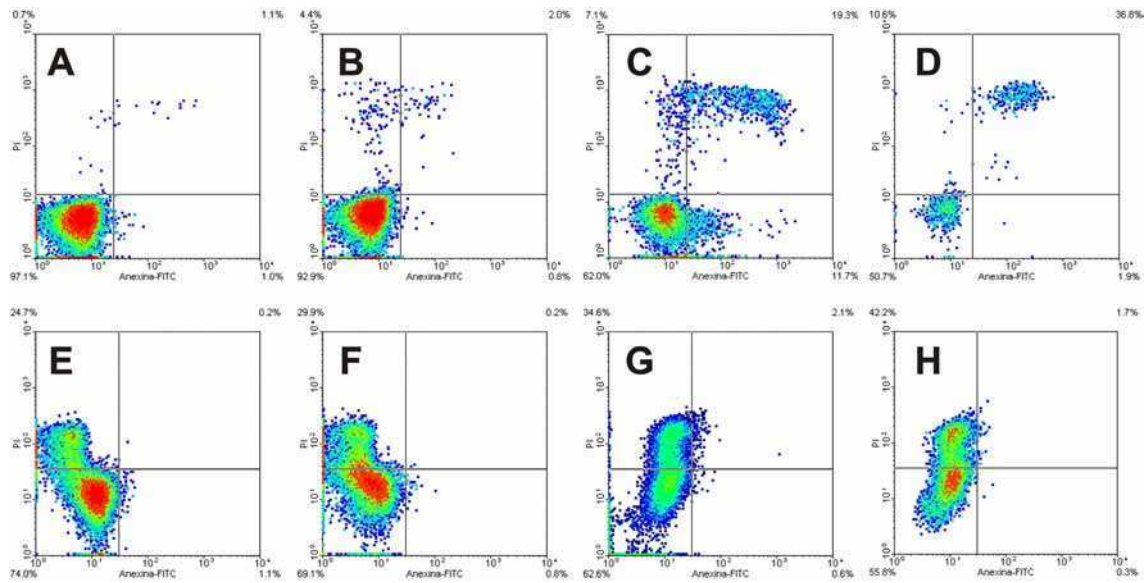
### VII.2.2. Externalización de fosfatidilserina

La marcación con An/IP reveló diferencias significativas entre la proporción de células apoptóticas totales provenientes de monocapas ( $64,2 \pm 5,5\%$ ) y de esferoides ( $1,5 \pm 0,9\%$ ) para el tiempo de irradiación de 20 minutos. (Fig. VII.9 y 10, Tabla VII.1). El bajo porcentaje de células apoptóticas detectadas mediante esta técnica no implica que la mayoría de las células del esferoide sobrevivan al tratamiento, puesto que los porcentajes de células positivas para IP (daño en la membrana, signo de necrosis) son elevados ( $42,2 \pm 7,1\%$ , TFD 20 min). En conjunto, resulta evidente una mayor sobrevivencia de células en EMCs respecto de células en monocapa, aunque la distribución de las células apoptóticas y necróticas difiere marcadamente entre ambas conformaciones del cultivo.

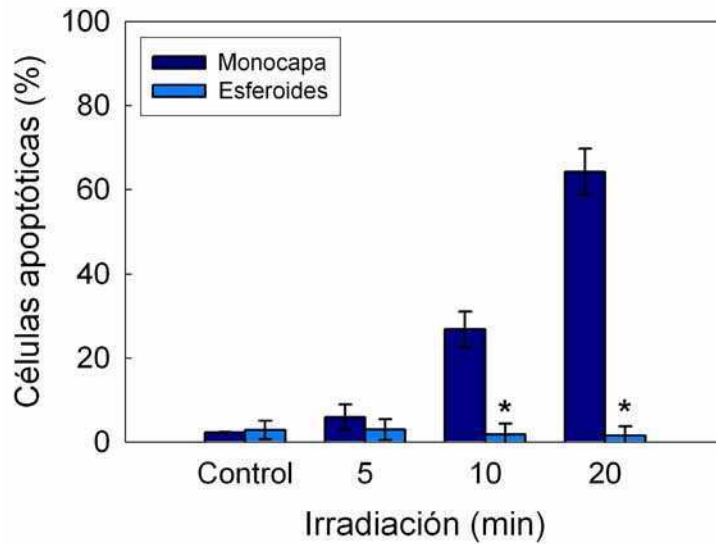
Los esferoides no tratados presentaron una población celular que se separa de la población viable, con una marcación levemente más positiva para IP (Tabla VII.1, Fig.VII.9). A medida que aumenta el tiempo de irradiación, se reduce el número de células viables y aumenta en proporción una población celular positiva para IP y con un leve corrimiento correspondiente a Annexina. Esta observación señala la presencia de células no viables (y probablemente necróticas) en EMCs control.

Estos resultados indicarían un mecanismo de muerte celular diferente para las células en monocapa y las provenientes de esferoides disgregados, predominando en estos últimos la disrupción parcial de la integridad de la membrana plasmática frente a la condensación y “blebbing” que predomina en las células de monocapas. Es probable que el conteo visual de células apoptóticas provenientes de EMCs basado en tinción con NA/BE no permita distinguir claramente estos tipos de muerte, llevando a un conteo sesgado por exceso de células apoptóticas.





**Fig. VII.9.** Marcación con An/IP de células provenientes de monocapas (A-D) o EMCs (E-H) sin tratamiento (A y E) o 1 h post TFD de 5 min (B y F), 10 min (C y G) y 20 min (D y H). Las células o los EMCs tratados con TFD-ALA se tripsinizaron y resuspendieron en buffer de binding. Se agregó Annexina V-FITC e IP para su análisis por citometría de flujo



**Fig.VII.10.** Cuantificación de células apoptóticas provenientes de monocapas o de esferoides disgregados 1 h post TFD a distintos tiempos de irradiación mediante marcación con An/IP. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar. (\* $p < 0,05$  respecto del mismo tiempo de irradiación).

Células (%)	Control		5 min		10 min		20 min	
	Monocapa	EMCs	Monocapa	EMCs	Monocapa	EMCs	Monocapa	EMCs
Viables	97,2 ± 0,1 *	74,1 ± 5,8	91,4 ± 1,5 *	69,1 ± 8,3	66,1 ± 4,1	62,6 ± 12,1	27,1 ± 3,6	55,8 ± 11,4 *
Apoptosis temprana	1,1 ± 0,1	1,1 ± 1,1	2,6 ± 1,8	1,8 ± 1,3	9,5 ± 2,1 *	1,6 ± 1,2	6,1 ± 4,2	1,3 ± 1,1
Apoptosis tardía	1,1 ± 0,1	1,7 ± 1,1	3,2 ± 1,2	2,1 ± 1,2	17,2 ± 2,1 *	1,2 ± 1,3	59,4 ± 1,3 *	1,2 ± 1,1
Necrosis	0,5 ± 0,1	24,7 ± 4,3 *	2,8 ± 1,6	29,9 ± 5,2 *	7,2 ± 0,1	34,6 ± 5,3 *	8,7 ± 1,9	42,2 ± 8,4 *

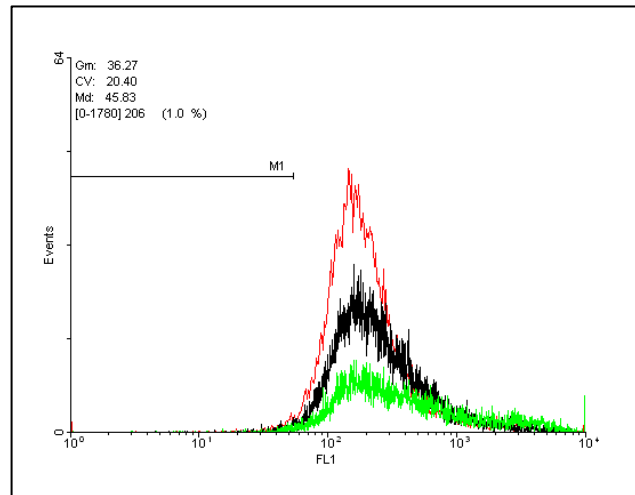
**Tabla VII.1.** Cuantificación de células viables, apoptóticas y necróticas provenientes de monocapas o de esferoides disgregados 1 h post TFD a distintos tiempos de irradiación mediante marcación con An/IP. (\*p<0,05 respecto del mismo tiempo de irradiación). Los valores representan la media ± SD: desviación estándar.

### VII.2.3. Integridad mitocondrial

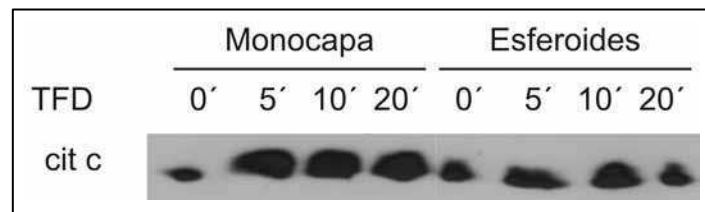
Si el mecanismo de muerte celular post TFD en los EMCs no es la vía clásica o intrínseca que se observó previamente en las células en monocapa, los marcadores de apoptosis asociados a este mecanismo deberían reflejar ese comportamiento. Con el objetivo de estudiar la vía apoptótica intrínseca en los EMCs se analizó por citometría de flujo la retención de Rh 123 en mitocondrias y la liberación de citocromo c al citoplasma.

No se observaron diferencias en los histogramas de células tratadas y no tratadas, indicando que no ocurre la despolarización de la membrana mitocondrial en células de EMCs (Fig.VII.11). La detección de citocromo c en el citoplasma es también un signo de disrupción del  $\Phi_m$ . Se observa presencia de citocromo c en el citoplasma aunque en menor proporción respecto de las células en monocapa. (Fig. VII.12).

Estos resultados respaldan la baja proporción de células apoptóticas previamente observada.



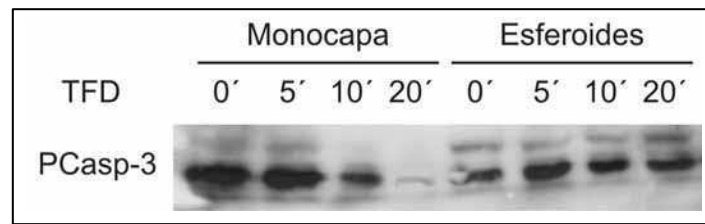
**Fig. VII.11.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de Rh 123 de células provenientes de EMCs no tratados (rojo) o 1 h post TFD 10 min (negro) o 20 min (verde). Las células fueron tratadas con TFD tripsinizadas al cabo de una hora e incubadas con Rh 123 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.



**Fig. VII.12.** Expresión de citocromo c evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica de células en monocapa o provenientes de EMCs no tratadas o tratadas con TFD-ALA con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD.

#### VII.2.4. Expresión de caspasas

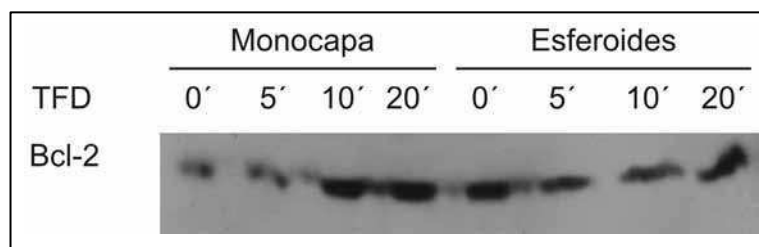
La expresión de caspasa-3 es una de las proteasas clasificadas como efectoras, asociada a la activación de la vía intrínseca. Para la activación de esta caspasa es necesario el clivaje de su precursor, procaspasa-3. Como se señaló previamente, la desaparición progresiva del precursor de procaspasa-3 indica la activación de esta proteasa en células tratadas en monocapa. En cambio, en extractos de EMCs no se observa una disminución significativa del precursor (Fig. VII.13).



**Fig. VII.13.** Expresión de procaspasa-3 evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica de células en monocapa o provenientes de EMCs no tratados o tratados con TFD-ALA con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD.

#### VII.2.5. Expresión de Bcl-2

La proteína Bcl-2 es parte de una familia de proteínas pro y antiapoptóticas. En particular, Bcl-2 tiene un efecto antiapoptótico que ejerce inhibiendo a otros miembros proapoptóticos de la misma familia y evitando la disrupción de la membrana mitocondrial. En las células en monocapa se observó previamente un aumento en la expresión de Bcl-2 en los tiempos más largos de irradiación (10 y 20 min), sugiriendo un efecto pro-sobrevivencia en respuesta a la injuria fotodinámica. En cambio, en los EMCs la expresión de Bcl-2 se detecta aún en células no tratadas y no se altera significativamente hasta el tiempo de 20 min, en el cual puede verse un leve incremento en la expresión (Fig. VII.14). La falta de participación mitocondrial en los EMCs (como se vio en VII.2.3) podría asociarse a la expresión de Bcl-2 (Strappazzon et al, 2012).

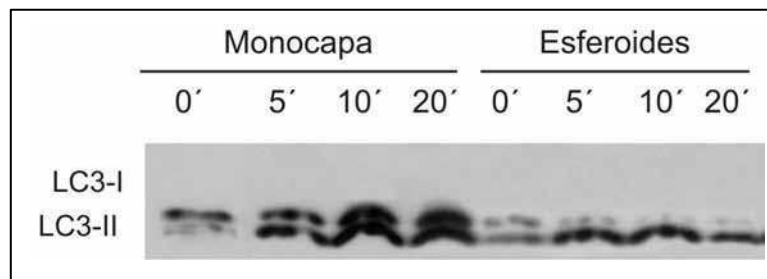


**Fig. VII.14.** Expresión de Bcl-2 evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica de células en monocapa o provenientes de EMCs no tratados o tratados con TFD-ALA con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD.



### VII.2.6. Detección de LC3-II

En las células tratadas en monocapa se pudo detectar una conversión parcial a la forma LC3-II, mientras que en los EMCs, es de mayor intensidad la banda correspondiente a LC3-II respecto de LC3-I. Lo que estaría indicando un proceso autofágico en los EMCs en respuesta a la TFD-ALA (Fig. VII.15).



**Fig. VII.15.** Expresión de LC3-I y LC3-II evaluada mediante western blot, en la fracción citosólica de células en monocapa o provenientes de EMCs no tratados o tratados con TFD-ALA con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD.

### *VII.3. Producción de especies reactivas de oxígeno post TFD en EMCs*

Habiendo estudiado previamente la producción de distintas ROS como consecuencia de la TFD en células en monocapa, se muestran a continuación experimentos cuyo objetivo fue estudiar la producción de ROS en EMCs. La disponibilidad de oxígeno es una de las limitaciones del modelo de EMCs, y puede condicionar el resultado de la TFD, siendo uno de los principales ejes de este tratamiento junto con el FS y la dosis lumínica (Dubessy et al, 2000; Madsen et al, 2006).

#### *VII.3.1. Producción de oxígeno singulete*

Una de las principales ROS en iniciar y accionar el daño celular por TFD es el  $^1\text{O}_2$  (Sharman et al, 2000) cuya producción puede ser evaluada mediante la sonda MVP (Fig. VII.16).

Anteriormente se observó un marcado aumento respecto del control negativo en la monocapa, pero en el caso de los EMCs, el porcentaje de células positivas para  $^1\text{O}_2$  fue menor al 10% en todos los tiempos de irradiación (Fig. VII.17).

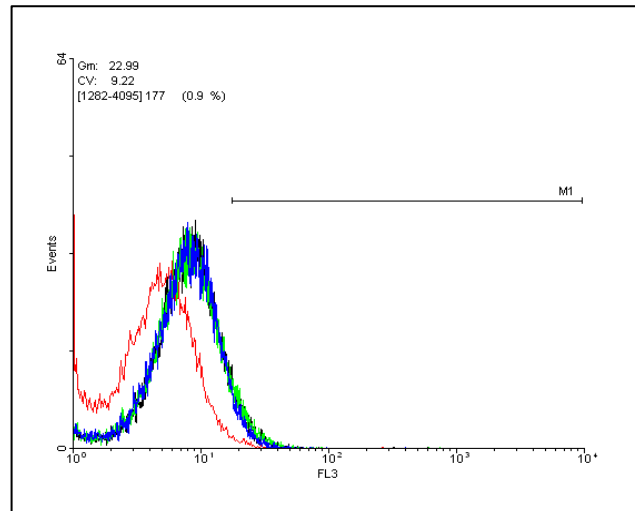
#### *VII.3.2. Producción de peróxidos*

A diferencia de lo observado en las células en monocapa, las células de EMCs presentan valores basales elevados de peróxidos. En los histogramas correspondientes a los controles negativos se observan dos picos (Fig. VII.18) de los cuales el mayoritario corresponde a marcación positiva para  $\text{H}_2\text{-DCFDA}$ . Por este motivo, no fue posible detectar variaciones en la producción de peróxidos causada por la TFD (Fig. VII.19). Esta condición parece ser propia de la conformación del cultivo, y no consecuencia del estrés oxidativo producido por el tratamiento.

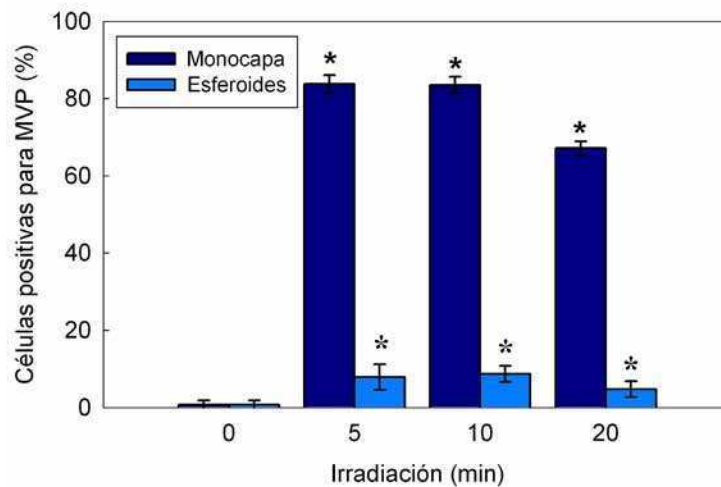
### *VII.3.3. Producción de anión superóxido*

Se evaluó la generación de  $O_2^-$  en esferoides disgregados y en monocapa mediante la sonda sonda HE (Fig. VII.20).

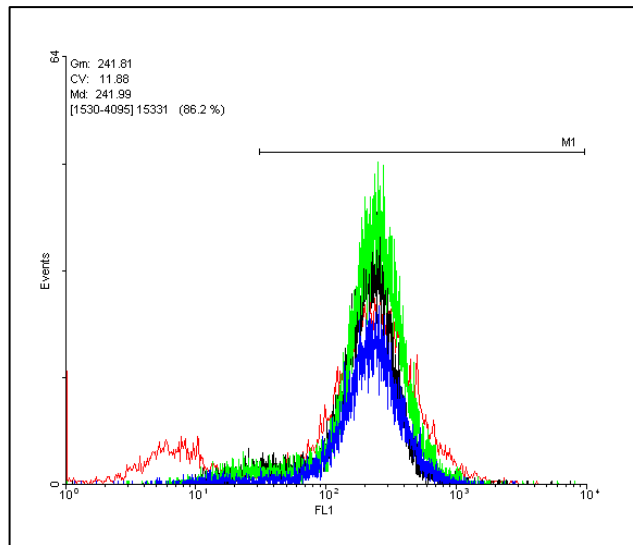
Se observa un aumento significativo respecto del control negativo a partir de 10 min para el  $O_2^-$  en las células en monocapa mientras que en los esferoides el porcentaje de células positivas fue menor al 5% en todos los tiempos de irradiación (Fig. VII.21), mostrando un comportamiento similar al observado para la producción de  $^1O_2$ .



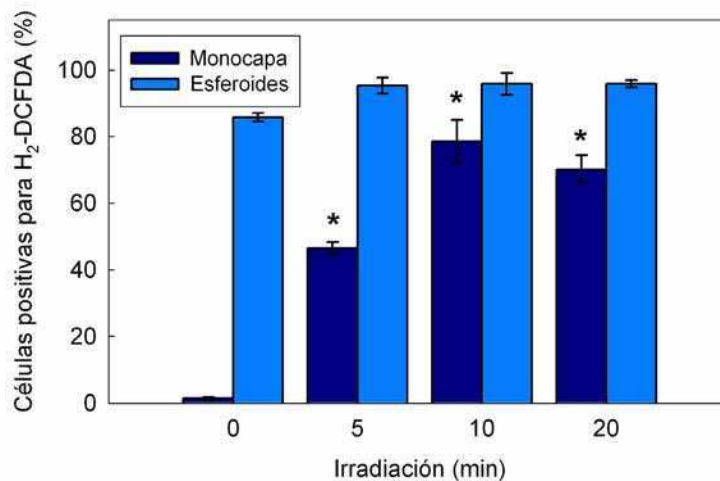
**Fig. VII.16.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de MVP de células no tratadas (rojo) o tratadas con TFD 5 min (negro), 10 min (verde) o 20 min (azul). Las células fueron tratadas con TFD-ALA, tripsinizadas inmediatamente y cargadas con MVP 10  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.



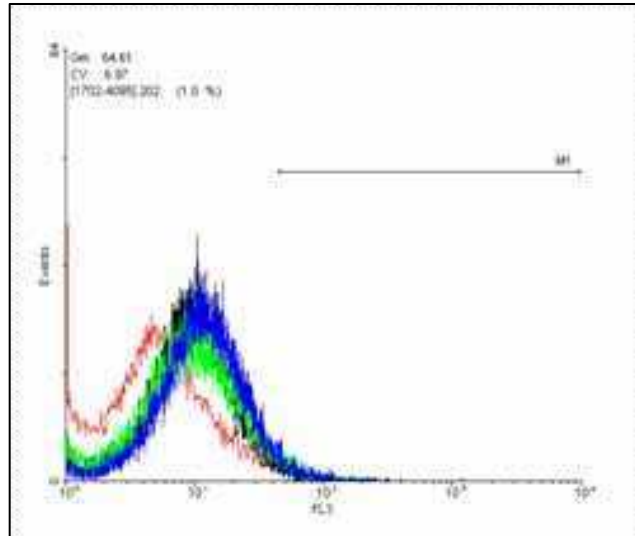
**Fig.VII.17.** Producción de  $^1\text{O}_2$  en células provenientes de monocapas y de EMCs no tratados o tratados con TFD-ALA 5, 10 o 20 min. Los valores representan la media  $\pm$  SD. (\*:  $p < 0,05$ ; \*:  $p < 0,01$  en relación a sus respectivos controles de células no tratadas).



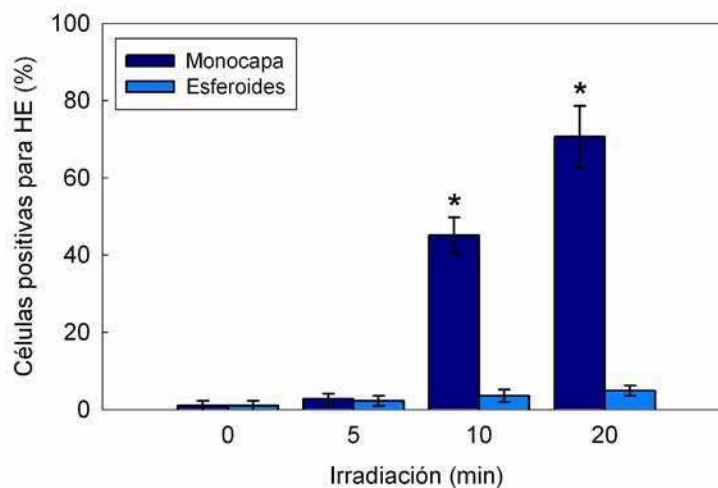
**Fig. VII.18.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de  $H_2$ -DCFDA de células no tratadas (rojo) o tratadas con TFD-ALA 5 min (negro), 10 min (verde) o 20 min (azul). Las células fueron tratadas con TFD, tripsinizadas al cabo de 1 h e incubadas con  $H_2$ -DCFDA  $2 \mu M$  para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.



**Fig.VII.19.** Producción de  $H_2O_2$  en células provenientes de monocapas y de EMCs no tratados o tratados con TFD-ALA 5, 10 o 20 min. Los valores representan la media  $\pm$  SD: desviación estándar. (\*:  $p < 0,05$ ; \*:  $p < 0,01$  en relación a sus respectivos controles de células no tratadas).



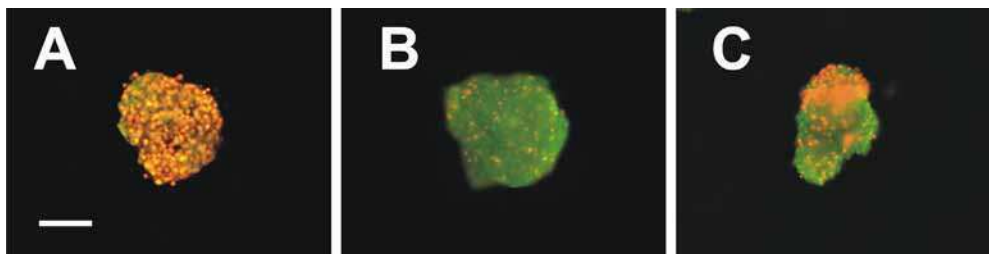
**Fig. VII.20.** Histogramas correspondientes a fluorescencia de HE de células no tratadas (rojo) o tratadas con TFD-ALA 5 min (negro), 10 min (verde) o 20 min (azul). Las células fueron tratadas con TFD, tripsinizadas al cabo de 1 h e incubadas con HE 2  $\mu$ M para ser analizadas en un citómetro de flujo Partec PAS III.



**Fig.VII.21.** Producción de  $O_2^-$  en células provenientes de monocapas y de EMCs. no tratadas o tratadas con TFD-ALA 5, 10 o 20 min. Los valores representan la media  $\pm$  SD (\*:  $p < 0,05$ ; \*:  $p < 0,01$  en relación a sus respectivos controles de células no tratadas).

#### VII.3.4. Efecto de antioxidantes en la muerte celular post TFD

Los experimentos de detección de ROS se realizaron en paralelo con la incubación con antioxidantes de alto grado de protección (ascorbato y trolox, resultados no mostrados). No se observó diferencia significativa entre la presencia y la ausencia del antioxidante. Sin embargo, pudo observarse un efecto protector por parte de estos antioxidantes a nivel superficial en las capas externas del esferoide (Fig. VII.22) que aparentemente se comportan de modo similar a las células en monocapa.



**Fig.VII.22.** Tinción diferencial con NA/BE en esferoides tratados con TFD-ALA durante 10 min en ausencia de antioxidantes o en presencia de ascorbato 1 mM (B) o trolox 1 mM (C). Los EMCs se resuspendieron en medio sin suero y se preincubaron 1 h con ascorbato o trolox 1 mM, luego se continuó la incubación con ALA 1 mM, 3 h y se irradió en un banco de 2 tubos fluorescentes. Al cabo de 1 h, se los resuspendió en PBS y se realizó la tinción con NA/BE para su observación al microscopio de fluorescencia. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

## CONCLUSIONES

La morfología de los EMCs luego de la aplicación de la TFD-ALA, presenta a nivel superficial, desprendimiento de células y abundantes células muertas con disrupción de la membrana y núcleos condensados tan pronto como 1 h luego del tratamiento, en concordancia con resultados previamente reportados (Zelenkov et al, 2007).

En la tinción histológica se constata un daño que se extiende hacia las capas internas del esferoide, con una pérdida progresiva de compactación de la estructura conforme aumenta el tiempo de irradiación. En las células individuales se detectan algunas sin daño y otras con núcleos condensados y citoplasma granular, lo cual da cuenta de una heterogeneidad de poblaciones celulares en la estructura del esferoide (Desoize et al, 1998).

Llamativamente, aún en la reducida estructura de un esferoide, en comparación con un adenocarcinoma, se observa una diferenciación de células secretoras, con vacuolas, y áreas acelulares de secreción, positivas para PAS, indicando la presencia de mucopolisacáridos. Esta cualidad ofrece al modelo de EMCs una relativa representatividad de las condiciones fisiológicas del adenocarcinoma de pulmón y su respuesta a TFD. Esta diferenciación se pierde con un tratamiento fotodinámico de 10 min indicando una alteración directa sobre la fisiología de la célula tumoral. Cabe aclarar que las células en monocapa son capaces de liberar secreciones, aunque en menor medida (Carterson et al, 2005), se marcan levemente con PAS (Carterson et al, 2005; Birben et al, 2012), y a su vez carecen de la diferenciación glandular que se observa en el EMC en las áreas centrales acelulares donde se detectó presencia de mucopolisacáridos.

En esferoides no tratados puede notarse una activa renovación celular y proliferación que se refleja en la abundante marca de Ki67, indicando que se trata de una estructura dinámica y en crecimiento, tal como se observó para otros tipos celulares (Takagi et al, 2007; Cerwinka et al, 2012). En cambio, los EMCs tratados con TFD

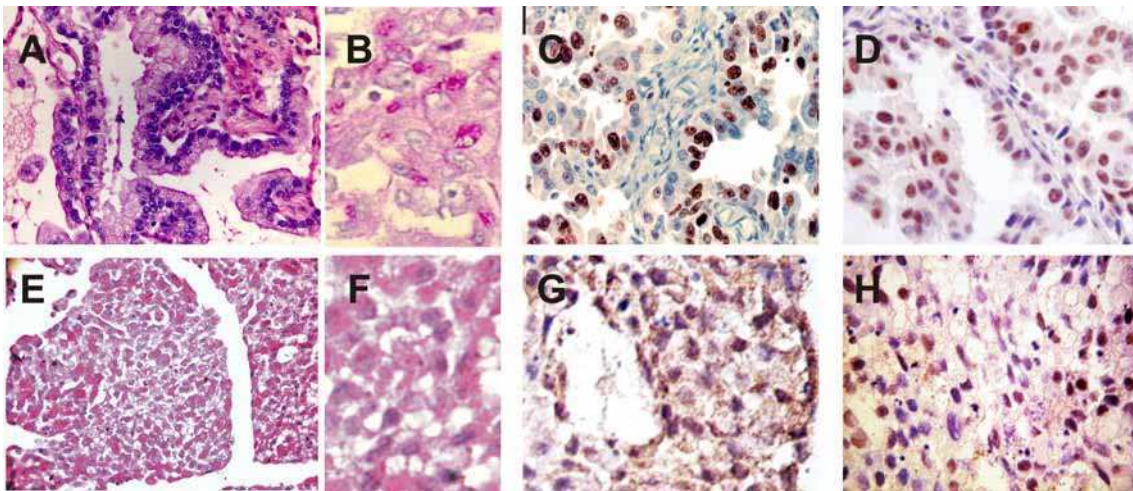


muestran un cordón de células proliferativas en la periferia y escasa marca hacia el interior de la estructura. Si bien el daño fotodinámico incide inicialmente en la capa superficial del esferoide, parecen ser esas células las únicas capaces de conservar su capacidad proliferativa, permitiendo la recuperación y el recrecimiento de la estructura (Hirschberg et al, 2006; Zelenkov et al, 2007).

El factor inducible por hipoxia, HIF1- $\alpha$  se expresa en respuesta a escasa disponibilidad de oxígeno y regula la expresión de factores proangiogénicos y de sobrevida (Sanabria et al, 2012). Los EMCs no tratados presentaron un perfil heterogéneo de expresión de HIF, sugiriendo un proceso adaptativo a la condición hipóxica propia del modelo luego de siete días de cultivo. Con dosis lumínicas bajas, la expresión de HIF no se altera e incluso se observa un incremento en la cantidad de células con marca nuclear; pero con dosis mayores o iguales a la DL<sub>50</sub>, la marca no es detectable. Estos resultados sugieren que el contexto y el microambiente en el cual se aplica la TFD en los EMCs es *a priori* propicio a la supervivencia al tratamiento. Se expresa HIF (Ji et al, 2006), escasa disponibilidad de oxígeno que dificulta la generación de ROS (Dubessy et al, 2000), áreas centrales acelulares y diferenciación funcional, células proliferativas, signos de apoptosis disminuidos (Kim et al, 2011; Finocchiaro et al, 2004) (alta viabilidad según tinción diferencial, escasa condensación nuclear, menor liberación de citocromo c al citoplasma respecto de células en monocapa, falta de despolarización mitocondrial, escasa activación de caspasa-3, baja marcación de Annexina) y expresa Bcl-2 y LC3-II que contribuye a los procesos autofágicos (Sanabria et al, 2012). A menos que la dosis de TFD sea lo suficientemente alta como para alterar la funcionalidad de las células y evitar el progreso de los mecanismos de sobrevida.

La escasa disponibilidad de oxígeno en EMCs, como modelo avascular de microtumores, se postula como el factor limitante de la efectividad de la TFD (Dubessy et al, 2000; Kamuhabwa et al, 2006) (no así la distribución de PpIX, ni la accesibilidad de la luz en el modelo empleado) ya que impide la generación de ROS en respuesta a la TFD (especialmente  $^1\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ ) y en consecuencia, la activación de vías de muerte celular apoptótica. Con esta vía de muerte parcialmente suprimida, la respuesta a TFD en los EMCs se manifiesta con indicios de autofagia y muerte celular por necrosis.

El contexto celular previamente descrito no es sólo propio del modelo de EMCs sino también de tumores pequeños o en estadios tempranos en los que la vascularización es escasa y la TFD resulta más efectiva (Fig. VII.23) (Koukourakis et al, 2001). Por lo cual la sensibilidad a la TFD en estos tumores puede ser estudiada a través de la representación en el modelo de EMCs con un cierto grado de fidelidad en cuanto a características histológicas y su implicancia en el éxito de la terapia.



**Fig.VII.23.** Comparación entre tinciones histológicas en material de biopsias de adenocarcinoma de pulmón humanas (A-D) y EMCs de células A549 (E-H). Tinción de PAS (A y B; E y F. Tomado de sitio web del Dr. Pool - Riverside Medical Center in Kankakee, Illinois, USA), inmunodetección de Ki67 (C y G. Tomado de Sterlacci et al, 2011), inmunodetección de HIF1- $\alpha$  (D y H. Tomado de HIF-1 $\alpha$ /ARNT (D28F3) XP<sup>TM</sup> Rabbit mAb datasheet, Cell Signalling, USA).

## REFERENCIAS

Birben E, Sackesen C, Turgutoğlu N, et al. (2012). The role of SPINK5 in asthma related physiological events in the airway epithelium. *Respir Med.* 106(3):349-55.

Carterson AJ, Höner zu Bentrup K, et al (2005). A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun.* 73(2):1129-40.

Cerwinka W, Sharp S, Boyan B, et al. (2012). Differentiation of human mesenchymal stem cell spheroids under microgravity conditions. *Cell Regeneration* 1:2.

Ciancio N, Galasso MG, Campisi R, et al. (2012). Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer. *Multidiscip Respir Med.* 7(1):29.

Desoize B, Gimonet D, Jardiller JC. (1998). Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Res.* 18(6A):4147-58.

Doublier S, Belisario DC, Polimeni M, et al. (2012). HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer.*12:4.

Dubessy C, Merlin JM, Marchal C, et al. (2000). Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 36(2-3):179-92.

Dukić N, Babić B, Eri Z, et al. (2011). Bronchioloalveolar differentiation in lung adenocarcinomas. *Bosn J Basic Med Sci.* (4):248-52.

Finocchiaro LM, Bumashny VF, Karara AL, Fiszman GL, et al. (2004). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in multicellular tumor spheroids. *Cancer Gene Ther.* 11(5):333-45.

Hirschberg H, Sun CH, Krasieva T, et al. (2006). Effects of ALA-mediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells. *Lasers Surg Med.* 38(10):939-45.

Ji Z, Yang G, Shahzidi S, et al. (2006). Induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 244(2):182-9.

Kamuhabwa AR, Huygens A, Roskams T, et al. (2006). Enhancing the photodynamic effect of hypericin in human bladder transitional cell carcinoma spheroids by the use of the oxygen carrier, perfluorodecalin. *Int J Oncol.* (3):775-80.

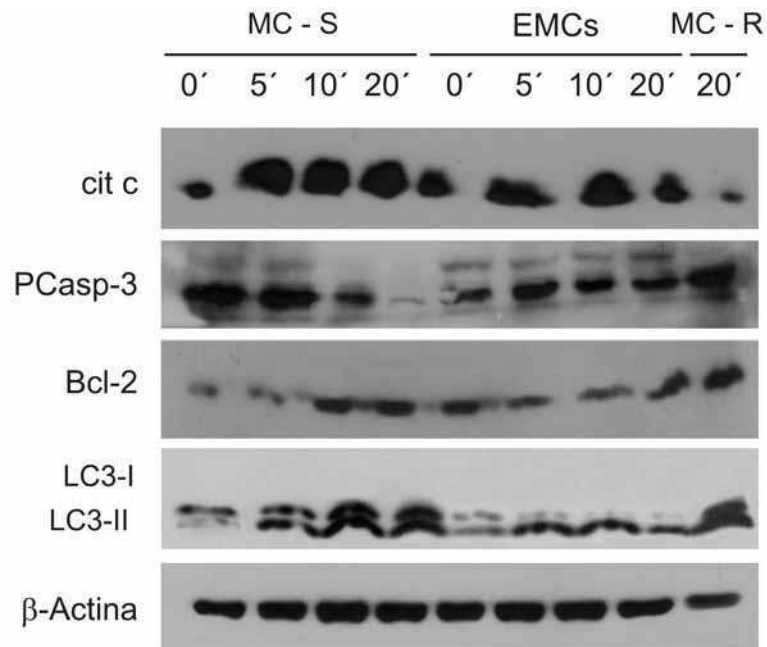
Khojasteh M, Buys TP, LeRiche J, et al. (2012). Framework for quantitative assessment of Ki67 distribution in preneoplastic bronchial epithelial lesions. *Anal Quant Cytol Histol.* (3):120-38.

Kim JW, Ho WJ, Wu BM. (2011). The role of the 3D environment in hypoxia-induced drug and apoptosis resistance. *Anticancer Res.* 31(10):3237-45.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, et al. (2001). Hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ ) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res.* 61(5):1830-2.

- Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, et al. (2006). Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 38(5):555-64.
- Marushima H, Shibata S, Asakura T, et al. (2011). Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGF $\beta$  stimulation. *Int J Oncol.* 39(5):1327-36.
- Oike T, Suzuki Y, Al-Jahdari W, et al. (2012). Suppression of HIF-1 $\alpha$  expression and radiation resistance in acute hypoxic conditions. *Exp Ther Med.* 3(1):141-145.
- Sanabria LM, Rodríguez ME, Cogno IS, et al. (2012). Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* En prensa.
- Schilling D, Bayer C, Emmerich K, et al. (2012). Basal HIF-1 $\alpha$  expression levels are not predictive for radiosensitivity of human cancer cell lines. *Strahlenther Onkol.* 188(4):353-8.
- Schwartz DL, Bankson J, Bidaut L, et al. (2011). HIF-1-dependent stromal adaptation to ischemia mediates in vivo tumor radiation resistance. *J. Mol Cancer Res.* (3):259-70.
- Semenza GL. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3(10):721-32.
- Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. (2000). Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 319:376-400.
- Sterlacci W, Tzankov A, Veits L, et al. (2011). The prognostic impact of sex on surgically resected non-small cell lung cancer depends on clinicopathologic characteristics. *Am J Clin Pathol.* 135(4):611-8.
- Strappazon F, Campello S, Cecconi F. (2012). Non-apoptotic roles for death-related molecules: when mitochondria chose cell fate. *Exp Cell Res.* 318(11):1309-15.
- Takagi A, Watanabe M, Ishii Y, et al. (2007). Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features. *Anticancer Res.* 27(1A):45-53.
- Warnock ML, Stoloff A, Thor A. (1988). Differentiation of adenocarcinoma of the lung from mesothelioma. Periodic acid-Schiff, monoclonal antibodies B72.3, and Leu M1. *Am J Pathol.* 133(1):30-8.
- Weiswald LB, Guinebretière JM, Richon S, et al. (2010). In situ protein expression in tumour spheres: development of an immunostaining protocol for confocal microscopy. *BMC Cancer.* 10:106.
- Ye MX, Zhao YL, Li Y, et al. (2012). Curcumin reverses cis-platin resistance and promotes human lung adenocarcinoma A549/DDP cell apoptosis through HIF-1 $\alpha$  and caspase-3 mechanisms. *Phytomedicine.* 19(8-9):779-87.
- Zelenkov P, Baumgartner R, Bise K, et al. (2007). Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model. *J Neurooncol.* 82(1):49-60.
- Zhou G, Dada LA, Chandel NS, et al. (2008). Hypoxia-mediated Na-K-ATPase degradation requires von Hippel Lindau protein. *FASEB J.* 22(5):1335-42.
- Zhou Q, Chen T, Ibe JC, et al. (2011). Loss of either hypoxia inducible factor 1 or 2 promotes lung cancer cell colonization. *Cell Cycle.* 10(13):2233-4.

## ANEXO



**Fig. Anexo.** Expresión evaluada mediante western blot de citocromo c, procaspasa-3, Bcl-2, LC3-I y LC3-II y b-Actina (control de carga de proteínas) en extractos citosólicos de células sensibles a TFD-ALA cultivadas en monocapa (MC-S) o en esferoides multicelulares (EMCs) y de células resistentes a TFD-ALA (MC-R) no tratadas o tratadas con TFD-ALA con distintos tiempos de irradiación. La extracción de proteínas se realizó 1 h post-TFD. Se muestran los geles enteros para cada inmunodetección.

# *Conclusiones Generales*

---

## CONCLUSIONES GENERALES

---

Los estudios de síntesis y distribución de porfirinas endógenas sintetizadas a partir de ALA en las células de adenocarcinoma de pulmón humano A549, demostraron que la acumulación de PpIX aumentó con el tiempo de incubación y la concentración de ALA hasta alcanzar un plateau con 1 mM a las 3 h, tanto en el cultivo en monocapas como en EMCs. Estudios de microscopía confocal indicaron que las mitocondrias son el principal sitio de localización de PpIX endógena pero no de PpIX administrada exógenamente (membrana plasmática) lo cual condice con una mayor efectividad de la TFD-ALA respecto de la TFD-PpIX e incluso respecto de la TFD-Vp, cuya localización también es mitocondrial (Kessel et al, 1997).

Los EMCs presentaron una capacidad de síntesis de PpIX similar a las células en monocapa y la distribución de PpIX fue uniforme en todas las capas de la estructura, indicando que la síntesis de porfirinas no condiciona la efectividad de la TFD en este modelo (Madsen et al, 2000).

En cambio, las células resistentes obtenidas luego de 12 ciclos de TFD-ALA, acumularon niveles menores del FS endógeno, sugiriendo que en este caso la efectividad de la TFD está asociada a la menor capacidad de síntesis de porfirinas, sumado a que esta acumulación disminuida no se observó cuando el FS es una porfirina exógena.

La TFD-ALA redujo significativamente la supervivencia celular de manera dosis lumínica dependiente aunque en menor medida en EMCs y en células resistentes.

En respuesta a la TFD-ALA se detectó la generación de ROS tales como  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  y peróxidos, y esa producción pudo ser modulada por agentes antioxidantes de alto grado de protección como Asc y Trx, con un consecuente aumento en la viabilidad celular. Las implicancias de este efecto protector radican en que es frecuente el uso de agentes antioxidantes para minimizar el fotodaño a los tejidos normales (McLear y Hayden, 1989; Hogikyan y Hayden, 1991; Wang y Yi, 2008; Petri et al, 2012;) y según la vía de administración de los mismos, podrían disminuir la efectividad de la TFD en el tejido tumoral.



Los diversos eventos asociados a apoptosis observados 1 h luego de la TFD (reducción del tamaño celular, irregularidades en la membrana plasmática, condensación de la cromatina, despolarización de la membrana mitocondrial, liberación de citocromo c al citoplasma, externalización de fosfatidilserina y activación de caspasa-3) sugieren que en condiciones estándar de TFD-ALA la vía preferencial de muerte celular es la vía apoptótica intrínseca. Esta conclusión es consistente con la localización mitocondrial del FS endógeno, la falta de expresión de caspasa-8, asociada a la activación de la vía extrínseca; y la falta de participación lisosomal en la iniciación de apoptosis.

En los EMCs, la respuesta diferencial observada no puede adjudicarse a una distribución heterogénea del FS ni a la accesibilidad de la luz en el interior de la estructura, dado que se detectaron células alteradas en todas las capas del EMC en cortes histológicos y fluorescencia correspondiente a PpIX en todos los planos por microscopía confocal. Por lo tanto, un factor limitante de la eficacia de la TFD en el modelo 3D puede asociarse a una reducida producción de ROS que impide el inicio de los mecanismos de muerte por apoptosis. Otros factores como la diferenciación secretora de las células o la expresión nuclear de HIF1- $\alpha$  en los EMCs no tratados pueden contribuir a reducir la eficacia de la TFD respecto de las células en monocapa.

La respuesta a TFD-ALA de las células resistentes pudo ser superada sólo en parte cuando se suplementó el FS exógenamente, indicando que otros mecanismos pueden tener importancia en la resistencia, como la expresión de factores pro-sobrevivencia (NF $\kappa$ B). Sin embargo, la inducción de resistencia a TFD-ALA no genera resistencia cruzada con otros FS como la Vp. Estos resultados sugieren la posibilidad de considerar combinaciones de FSs que compartan características similares de excitación y emisión o alternar ciclos de TFD con distintos FSs en el tratamiento de tumores con TFD a fin de minimizar la ocurrencia y proliferación de células resistentes.

Los indicadores morfológicos y bioquímicos de apoptosis se vieron disminuidos en los EMCs (junto con un aumento en la proporción de necrosis) y las células resistentes tratadas con TFD, aunque no así los asociados a autofagia, sugiriendo que la alteración de las organelas, las condiciones de hipoxia y los desarreglos de la vía apoptótica redirigen a la célula hacia mecanismos de muerte alternativos.



En el presente trabajo se estudiaron mecanismos de muerte celular que definieron una vía de muerte apoptótica intrínseca coexistente con una vía autofágica, que podría estar asociada a mecanismos de rescate en dosis subletales de TFD (Krammer y Verwanger, 2012). A su vez, se estudiaron dos modelos diferentes de mayor supervivencia a la TFD-ALA: Uno de ellos -el de EMCs- es, como sugieren algunos autores, un modelo de *resistencia multicelular adquirida* (Olive y Durand, 1994; Desoize et al, 1998), en el que únicamente se modificó la arquitectura del cultivo, con consecuencias notables en la diferenciación histológica y la respuesta a TFD. El otro, es un modelo de *resistencia celular inducida o clásica* (Desoize et al, 1998) en el que mecanismos moleculares como en este caso, la activación de factores pro-supervivencia tales como NFκB, participan en el mantenimiento de la resistencia. Estos modelos representan herramientas útiles para la comprensión de los mecanismos de muerte y supervivencia celular que se inician luego de la TFD así como también la modulación de su eficacia.

*REFERENCIAS*

Desoize B, Gimonet D, Jardillier JC. (1998). Multicellular resistance: another mechanisms of pleiotropic resistance?. *Bull Cancer*. 85(9):785-93.

Hogikyan ND, Hayden RE, McLear PW. (1991). Cutaneous photoprotection using a hydroxyl radical scavenger in photodynamic therapy. *Am J Otolaryngol*. 12(1):1-5.

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

Krammer B, Verwanger T. (2012). Molecular response to hypericin-induced photodamage. *Curr Med Chem*. 19(6):793-8.

Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, et al. (2000). Photodynamic therapy of human glioma spheroids using 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol*. 72(1):128-34.

McLear PW, Hayden RE. (1989). Prevention of cutaneous phototoxicity in photodynamic therapy. *Am J Otolaryngol*. 10(2):92-8.

Olive PL, Durand RE. (1994). Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev*. 13(2):121-38.

Petri A, Alexandratou E, Kyriazi M, et al. (2012). Combination of Fospeg-IPDT and a natural antioxidant compound prevents photosensitivity in a murine prostate cancer tumour model. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 9(2):100-8.

Wang J, Yi J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*. 7(12):1875-84.