



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

**“Estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la Terapia  
Fotodinámica de tumores a partir de ALA y sus derivados”**

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

**GABRIELA MARIANA DI VENOSA**

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

Directora asistente: Dra. Haydeé Fukuda.

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

Buenos Aires, 2006



## **“Estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la Terapia Fotodinámica de tumores a partir de ALA y sus derivados”**

La Terapia Fotodinámica (TFD) se basa en la capacidad de fotosensibilizantes de acumularse en células tumorales. La irradiación del tumor desencadena reacciones fotoquímicas que destruyen el tejido.

El ácido 5-aminolevúlico (ALA) se utiliza como precursor de Protoporfirina IX, fotosensibilizador formado endógenamente en tumores.

Por cuanto el ALA es una molécula hidrofílica, su incorporación podría incrementarse aumentando su lipofilidad por esterificación. Otra alternativa se basa en el uso de pro-drogas que posibiliten el ingreso de varias moléculas en las células (dendrimeros).

El objetivo de la Tesis ha sido optimizar la TFD empleando ALA y sus derivados, aumentar su captación mediante la administración por distintas vías y distintas preparaciones y evaluar la interacción del óxido nítrico con la TFD.

Se concluye que el uso de derivados de ALA puede ser más efectivo y pueden llegar a optimizar la TFD en dosis menores a las utilizadas con ALA.. Sin embargo, su uso está limitado al tipo y localización del tumor.

En cuanto al NO y el ALA-TFD, no se observó una interacción directa entre la citotoxicidad del NO y sus derivados, y la fototoxicidad del ALA-TFD. La resistencia al NO en tumores, no estaría relacionada con la resistencia a la TFD.

**Palabras claves:** TFD, ALA, ALA-derivados, Porphirinas, Cáncer.

## **“Photodynamic Therapy with ALA and its derivatives. *In vitro* and *in vivo* studies”**

Photodynamic Therapy (PDT) is based on the properties of photosensitizers to accumulate in tumoural cells. Irradiation of tumour leads to photochemical reactions which selectively destroy the tissue.

5-Aminolevulinic acid (ALA) is a precursor of the photosensitizer Protoporphyrin IX, endogenously formed in tumours.

Because ALA is a hydrophilic molecule, its uptake might be enhanced, increasing its lipophilicity by esterification. Other alternative is based on the use of pro-drugs which make possible the entrance of several molecules of ALA (dendrimers).

The aim of this Thesis has been to optimize PDT, using ALA and ALA derivatives, increasing their uptake by means of using different administration vias and different preparations.

The conclusion has been that the use of ALA derivatives can be more efficient to optimize PDT at lower doses than those of the parenteral ALA. However, their use is limited to the type and localization of the tumours.

As far as NO and ALA-PDT interaction, it has been found that there is not any direct interaction between cytotoxicity of NO and its derivatives and phototoxicity of ALA-PDT. Resistance to NO in tumours, would not be related to resistance to PDT.

**Key words:** PDT, ALA, ALA-derivatives, Porphyrins, Cancer.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quizás sea algo extensa, pero pocas veces se tiene la posibilidad de reconocer públicamente a aquellas personas que nos aman o contribuyen en nuestras vidas de manera positiva, por lo que no quiero perder esta oportunidad de decirle gracias:

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

A la Doctora Haydeé Fukuda, por haber sido siempre amable, complaciente y haberme aceptado en su grupo de trabajo desde mis años de estudiante.

A la Doctora Adriana Casas, por haberme brindado no sólo su guía, su confianza y generosidad, sino también su amistad.

Al Doctor Christian Perotti, por la paciencia que tuvo en mis primeros pasos dentro de esta carrera. A Lorena Rodríguez por su colaboración, estos últimos meses. A Alejandra Cicarelli, Alejandra Caballero y Marcelo Guolo, por generar siempre un ámbito amigable de trabajo.

Al Doctor Guillermo Noriega, hoy un gran compañero, pero hace unos años, el JTP que me abrió las puertas del CIPYP.

Al grupo que conforma el CIPYP, por su buena disponibilidad, su amabilidad y por siempre buscar facilitar mi trabajo.

A Victoria y Betina, porque nunca me faltó material y sobre todo limpio!!!

Al CONICET y la Wellcome Trust por las Becas otorgadas para la realización de este trabajo de Tesis.

A mamá, por todo el amor y la fuerza que dejó en mí, los que me permitieron y permiten superar pequeños y grandes obstáculos para seguir adelante.

A papá, por su aliento, su incondicionalidad y el orgullo con el que vive cada pequeño gran logro de mi vida.

A Darío y Emiliano, los mejores hermanos que Dios me puede haber regalado, la verdad...cuantos momentos difíciles se hicieron más fáciles por estar juntos!

A Germán, porque me ama, porque lo amo, me apoya, me acompaña y por sobre todas las cosas, me hace feliz.

A Gimena y María, por comprender nuestros códigos y ser dos cuñadas grandiosas!

A la familia Alonio, por haberme abierto las puertas de su casa y haberme acompañado estos últimos años.

A mis ahijados, Dani, Sofí y Franco; a Agus y Bruno, porque son personitas maravillosas que alegran mi vida.

A mis amigos: Paula, mi hermana de la vida; las brujas, Marce, Pao y Vale; los incondicionales, Martín, Laura, Dani, Adri y Petu; a Darío, Carlos, Ariel, Ingrid y a todos aquellos que me sostienen en esos momentos de desaliento y viven con alegría mis alegrías.

A TODOS mis tíos y primos, por conformar una gran familia que siempre acompaña.

Los resultados de las experiencias realizadas en esta tesis han sido publicados según se detalla:

Di Venosa G, Fukuda H, Perotti C, Batlle A, Casas A (2004) A method for separating ALA from ALA derivatives using ionic exchange extraction. *J. Photochem. Photobiol.* 75:157-163.

Di Venosa G, Perotti C, Fukuda H, Batlle A, Casas A (2005) Sensitivity to ALA-PDT of cell lines with different nitric oxide production and resistance to NO cytotoxicity. *J. Photochem. Photobiol.* 80:195-202.

Di Venosa G, Casas A, Fukuda H, Perotti C, Batlle A (2005) No cross resistance between ALA-mediated photodynamic therapy and nitric oxide. *Nitric Oxide* 13:155- 162

Di Venosa G, Fukuda H, Batlle A, MacRobert A, Casas A (2006) Photodynamic therapy: regulation of porphyrin synthesis and hydrolysis from ALA esters. *J Photochem Photobiol* 83 :129- 136.

Di Venosa G, Batlle A, Fukuda H, MacRobert A, Casas A (2006) Distribution of 5-aminolevulinic acid derivatives and induced porphyrin kinetics in mice tissues. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58: 478-486

Di Venosa G, Casas A, Battah S, Fukuda H, MacRobert A, Batlle A (2006) Investigation of a novel dendritic derivative of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38:82-91.

Casas A, Di Venosa G, Battah S, Batlle A, MacRobert A (2006) Third generation dendrimers as molecular carriers for ALA prodrug delivery: in vitro and in vivo studies. *Br. J. Cancer* (enviado para su publicación)

## **ABREVIATURAS**

3m-ALA: Tris (tert-butiloxicarbonil-5-ALA) metilamina

ALA: Acido 5-aminolevúlico

ALA-D: ALA dehidrasa

ALA-S: ALA sintetasa

ALA-TFD: Terapia fotodinámica basada en ALA

Arg: Arginina

COPROgen: Coproporfirinógeno III

CPGasa: Coproporfirinógeno oxidasa

Den18mer: 1,3,5-Tris[N-[N-[N-Imino-3,3'-bis[N-[N-[tris(metil5-aminolevulinato)metil] acetamido-propionamido]benceno

Fe-Quel: Ferroquelatasa

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutation oxidado

He-ALA: Hexil ALA éster

Hp: Hematoporfirina

HpD: Derivado de Hematoporfirina

i.p.: Intraperitoneal

L-NAME: N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil éster

MEM: Medio Mínimo Esencial de Eagle

Me-ALA: Metil ALA éster

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolyl)-2,5-difeniltetrazolio, bromuro

NO: Oxido nítrico

*P*: Coeficiente de partición aparente

PBG: Porfobilinógeno

PBG-asa: Porfobilinogenasa

PBS: Buffer fosfato salino

PPGasa: Protoporfirinógeno oxidasa

PpIX: Protoporfirina IX

PROTOgen IX: Protoporfirinógeno IX

RNOS: Especies reactivas de NO

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SA: Succinil acetona

SFB: Suero fetal bovino

SNP: Nitroprusiato de sodio

TFA: Acido trifluoroacético

TFD: Terapia fotodinámica

THP-ALA: R, S-ALA-2-(hidroximetil) tetrahidropiranyl ALA éster

Und-ALA: Undecanoil ALA éster

URO-D: Uroporfirinógeno decarboxilasa

Urogen III: Uroporfirinógeno III.



# **INTRODUCCIÓN**

## **I- Las porfirinas y el camino metabólico del hemo.**

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

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

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

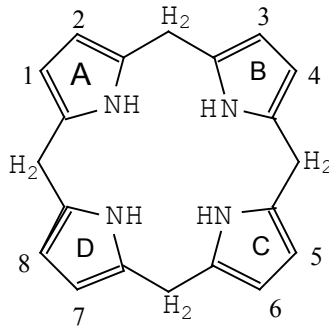
Los metabolitos fisiológicamente activos son los derivados reducidos de las porfirinas, llamados porfirinógenos, que a diferencia de las anteriores, no son coloreados ni emiten fluorescencia, y se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas (Figura I-1b).

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

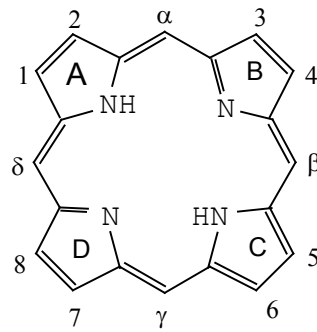
Las hemoproteínas son aquellas proteínas que contienen como grupo prostético un quelato tetrapirrólico de hierro (grupo hemo). Entre las hemoproteínas encontramos también enzimas como las peroxidasas, la catalasa y la triptofano pirrolasa.

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

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



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



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

## I-2. Biosíntesis del hemo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## **II- Terapia fotodinámica del cáncer.**

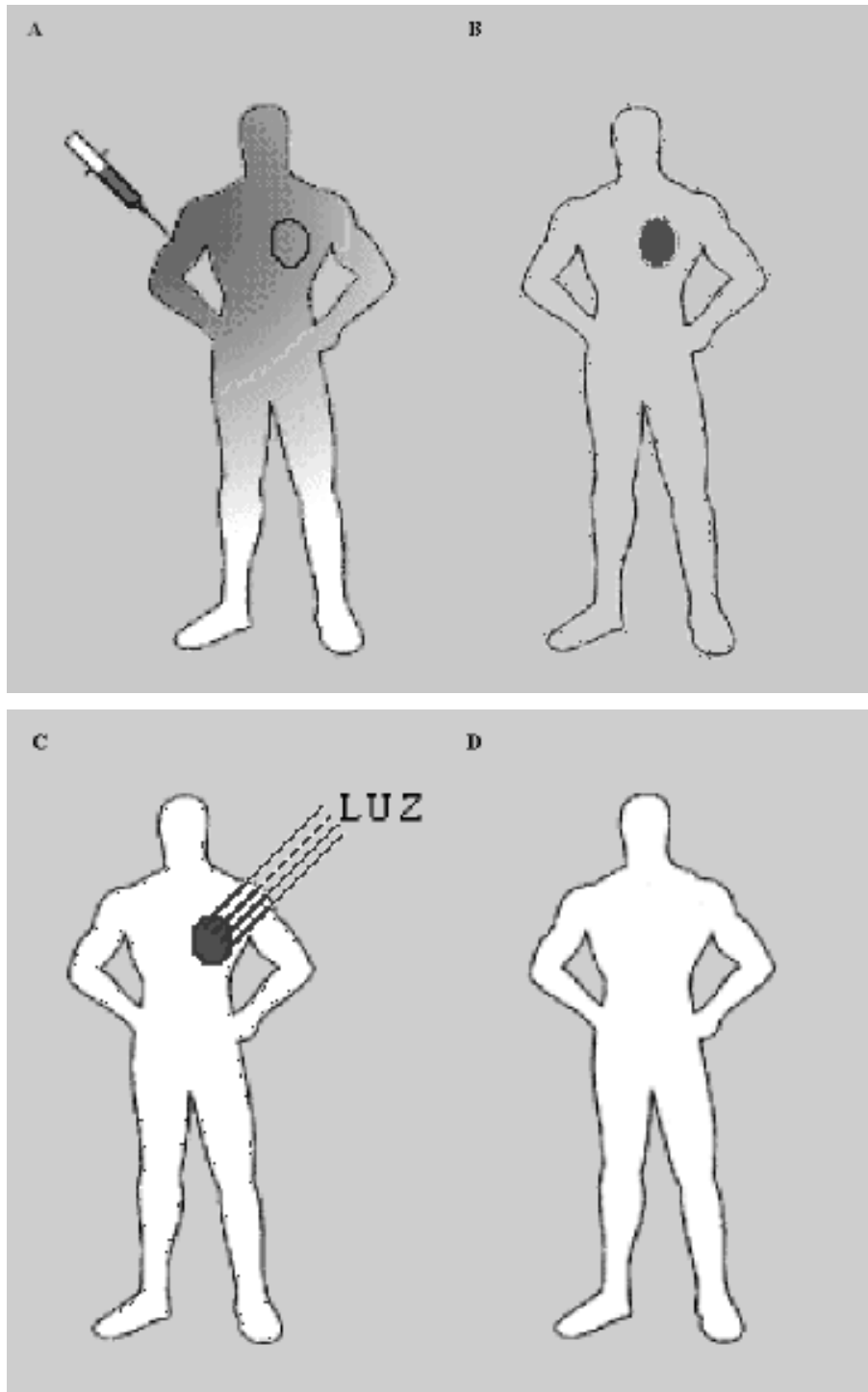
### **II-1. Introducción.**

La Terapia Fotodinámica (TFD), es un tratamiento para el cáncer, originado en el descubrimiento de que ciertos tipos de compuestos, llamados agentes fotosensibilizantes, pueden destruir a un organismo unicelular cuando éste es expuesto a la luz.

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

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

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



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

(A) administración del fotosensibilizante, (B) acumulación del fotosensibilizante en el tejido tumoral, (C) irradiación con luz y (D) remisión del tejido tumoral

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

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

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

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

## **II-3. Fotoquímica.**

Las porfirinas muestran una intensa absorción alrededor de los 400 nm en la región azul, llamada banda de Soret, y cuatro bandas de menor absorción entre los 500 y los 650 nm.

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

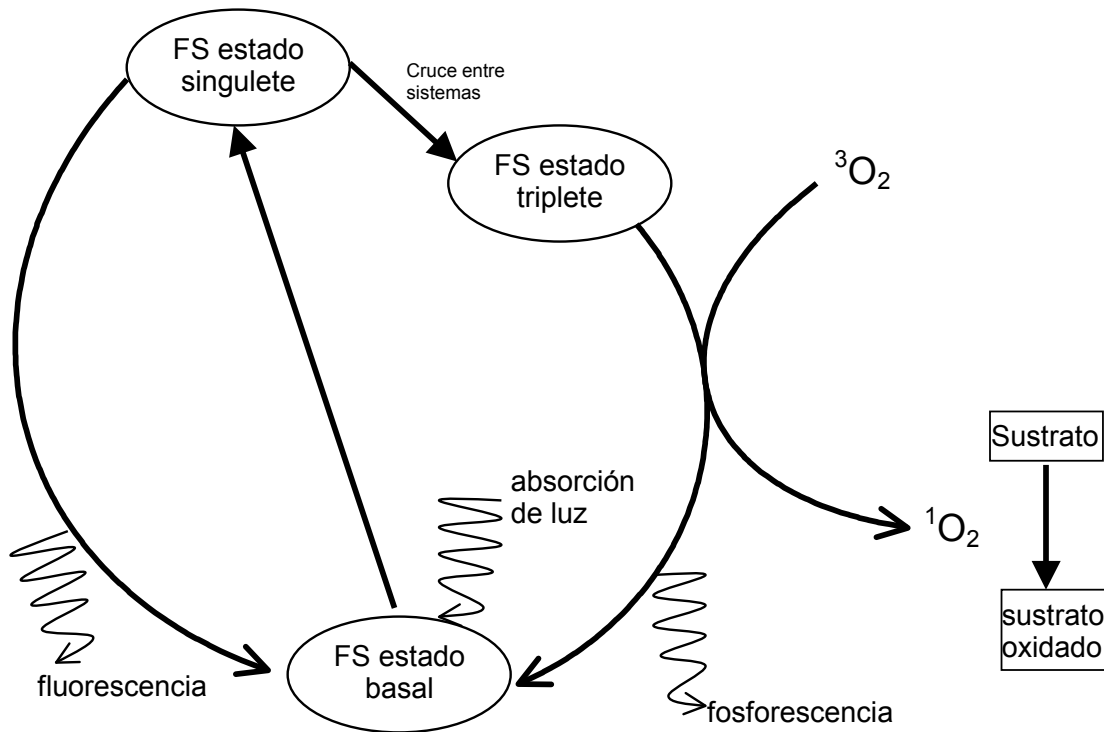


luz en los tejidos aumenta con longitudes de onda mayores (Van Gemert et al, 1985; Wilson, 1989) generalmente se usa la banda de absorción más débil que es la de 630 nm para irradiar, lo que permite una mayor penetración de la luz.

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

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

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



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

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

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

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

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

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

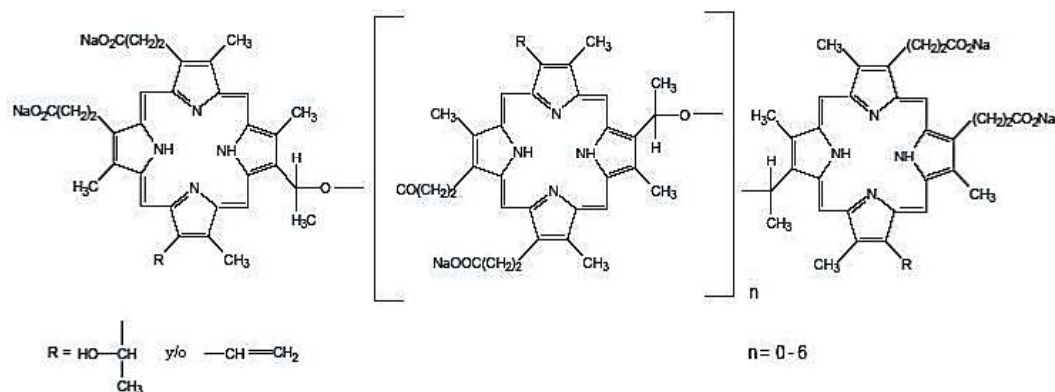
La fuente de luz –un láser de kriptón o una lámpara de mercurio con filtro- es acoplada a una fibra óptica ubicada en el canal de un endoscopio. La luz emitida por la fibra induce la fluorescencia del fotosensibilizante. La imagen es filtrada de manera de eliminar la luz excitante, y luego es amplificada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

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

Mediante el uso de tamices moleculares se logró aislar una fracción enriquecida en las especies responsables de las propiedades fotosensibilizantes del HpD (Dougherty, 1984). Esta fracción activa se denominó porfímero de sodio (Photofrin II, QLT Inc., Vancouver, Canadá y Laboratorios Lederle, Pearl River, NY, USA) y está constituida por una mezcla agregada de trímeros/oligómeros de porfirinas unidas por puentes éter y/o éster (Dougherty, 1987; Kessel et al, 1987; Dougherty & Marcus, 1992) (Figura II-3). Este producto fue el primero en ser aprobado por la FDA de Estados Unidos, y es corrientemente utilizado en la TFD clínica, ya que en diciembre de 1995 se autorizó su uso para el cáncer de esófago y en enero de 1998 para estadios tempranos de cáncer de pulmón de células no pequeñas y para los casos avanzados en que el tratamiento convencional no se pudiera aplicar.

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

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



**Figura II-3: Estructura del Photofrin**

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

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

No está dilucidado aún la razón por la cual las porfirinas se concentran preferencialmente en el tejido maligno, pero se sugirieron varias hipótesis: a) la afinidad porfirina/lipoproteína, b) la debilidad de la vasculatura tumoral, c) el drenaje linfático disminuido, d) los receptores de proteínas de baja densidad (LDL) con mucha actividad o e) a una escasa conversión a hemo debida a una baja actividad de la ferroquelatasa (Wilson et al, 1991)

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

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

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

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

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

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

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

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

Existen diversos blancos celulares de daño fotodinámico y estos dependen principalmente de la naturaleza química del fotosensibilizante empleado. Estos sitios de acción pueden ser biomoléculas o bien organelas como las mitocondrias, los microsomas, los lisosomas, el núcleo y el retículo endoplasmático (Moan et al, 1989; Jori, 1990).

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

En algunas líneas celulares murinas se observó una disminución en la actividad de algunas enzimas de membrana luego de la fotosensibilización, mientras que las enzimas citosólicas lactato y malato deshidrogenasa no sufrieron cambios (Gaffney & Sieber, 1990).

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

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

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

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

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

Webber et al (1996) observaron una respuesta apoptótica a la TFD *in vivo* en ratones con adenocarcinoma de colon, tratados con ALA para inducir la formación endógena de PPIX. Noodt et al (1996) también observaron que algunas líneas celulares expuestas a ALA-TFD morían principalmente por necrosis, mientras que otras morían por apoptosis. Se ha descrito que la TFD induce la expresión de citoquinas en células tumorales; Usuda et al (2001) encontraron que en las células de carcinoma de pulmón de

Lewis tratadas con L-aspartil clorina-TFD empleando un láser de diodos, se inducía la expresión de interleuquina 6 (IL-6), IL-2 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), pero sólo en las células que tenían aumentada la IL-6 se encontró una mayor sensibilidad a los efectos citotóxicos así como un aumento en la apoptosis.

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

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

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

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

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

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

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

Los ésteres aspárticos de Clorina e6 (NPe6) poseen una importante acción fototóxica (Nelson et al, 1987). Más recientemente se encontró que derivados etéreos de cadena larga son mejores fotosensibilizantes que sus ésteres análogos (Pandey et al, 1991). Estudios *in vitro* (Beems et al, 1987), utilizando células leucémicas murinas demostraron que la bacterioclorina A produce una efectiva destrucción celular.

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

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

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

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

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

Estudios preclínicos demostraron que la TFD de tumores aumenta la respuesta inmune del huésped. Sin embargo el rol del efecto de la TFD en células tumorales no se ha determinado. Gollinck et al (2002) estudiaron la efectividad de la inmunogenicidad de un lisado de células tumorales generado por TFD. Encontraron que el lisado funcionaba como una vacuna potente siendo más efectivos los lisados generados mediante TFD. Las vacunas



generadas mediante TFD eran tumor específicas e inducían una mejor respuesta de las células T citotóxicas.

### **III- Terapia fotodinámica a partir de ALA.**

#### **III-1. Introducción.**

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

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

En 1975 Batlle et al fueron los primeros en observar que el agregado de ALA a cultivos de callos de soja, un tejido tumoral vegetal, estimulaba la síntesis y acumulación de porfirinas y su destrucción por exposición a la luz. Malik y Lugaci, en 1987, describieron la fotosensibilización de células en cultivo expuestas a ALA.

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

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

Además de la selectividad, la ventaja que presenta la fotosensibilización endógena con ALA es que el producto principal, la PpIX, tiene una estructura molecular definida, con un máximo de absorción en la zona roja del espectro en los 630 nm (Pottier et al, 1986).

Otra ventaja del uso terapéutico del ALA es la corta vida media de los efectos fotosensibilizantes de la PpIX comparado con otros compuestos, que no se prolongan por más de 48 horas (Kennedy et al, 1990; Fukuda et al, 1992a).

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

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

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

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

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

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

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

Una de las ventajas del uso de ALA en la TFD es que, a diferencia de otros agentes fotosensibilizantes, puede ser administrado por diversas vías en forma inocua, tales como:

vía sistémica, intravesical, topicación, inhalación y por vía oral. En animales de experimentación también se ha utilizado la vía intra-tumoral para administrar el ALA en tumores accesibles, y si bien los niveles de porfirinas acumuladas fueron adecuados (Fukuda et al, 1992a; 1992b), no se observó un aumento en la eficiencia del tratamiento con respecto a las vías clásicas (Cairnduff et al, 1995), debido a la heterogeneidad de la distribución del fotosensibilizante.

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

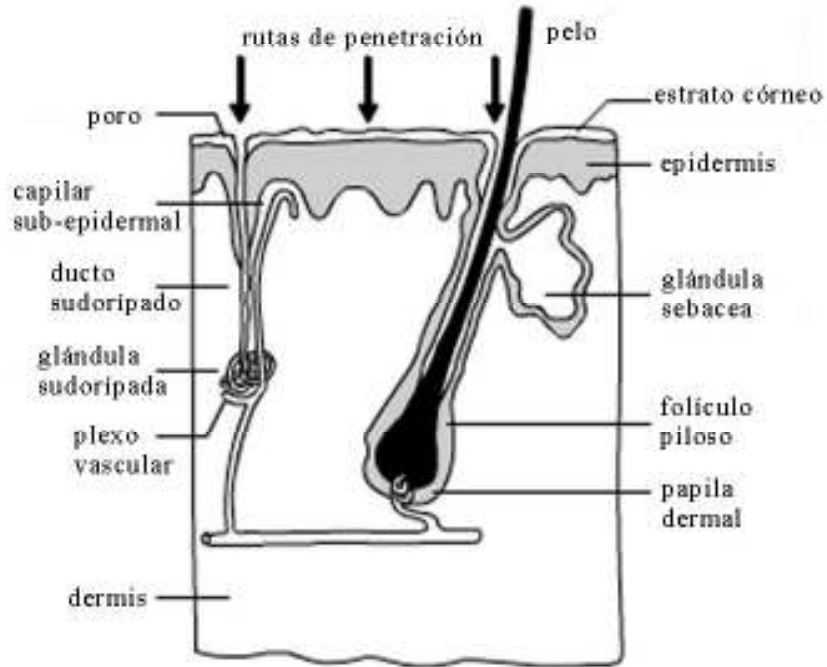
La piel normal varía en cuanto al grado de penetración del ALA, ya que las pieles orientales o nativas americanas bloquean más el pasaje del ALA que las occidentales y más aún que las europeas. Por otra parte en pieles célticas, el ALA parece penetrar de una manera puntuada, como lo muestra la fluorescencia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

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

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

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

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



**Figura III-1:** Estructura de la piel normal y vías de difusión  
 Esquema de las distintas capas de la piel normal y sus componentes

La naturaleza hidrofílica de la molécula de ALA y el hecho de que el ALA es un zwitterion a pH fisiológico y que por lo tanto tiene baja solubilidad lipídica, limita de alguna forma el pasaje a través de barreras biológicas como el estrato córneo de la piel y las membranas celulares. De aquí que la formación de PpIX a partir del ALA está frecuentemente restringida a las capas superficiales del tejido, siguiendo una distribución inhomogénea y parcial en las capas más profundas o lesiones nodulares. Para alcanzar niveles de PpIX en las capas más profundas de los tumores que sean clínicamente relevantes es necesario administrar dosis mayores de ALA (Kloek et al, 1996).

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

Con el uso de derivados de ALA más lipofílicos se espera tener una mejor difusión a través de las membranas celulares de manera tal que, tras alcanzar el sitio de acción,

ocurriría la conversión en ALA por hidrólisis enzimática, obteniendo de esta forma una mayor formación de PpIX.

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

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

En noviembre de 1999, la FDA aprobó el ALA bajo el nombre comercial Levulan para el tratamiento de la queratosis actínica utilizando una fuente de luz policromática llamada Blu-U (Ormrod & Jarvisl, 2000; Szeimies & Laudthaler, 2002).

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

Morton et al (1996) compararon la efectividad del ALA-TFD con el 5-fluorouracilo, y observaron que inicialmente el 88% de los pacientes tratados con ALA-TFD mostraban una remisión completa comparado con el 67% para el 5-fluorouracilo. Mientras que los pacientes que recibieron este último compuesto mostraban escaras y ulceraciones, los que recibieron ALA mostraron muy escasos efectos adversos. En forma similar la TFD es tan efectiva como la crioterapia para el tratamiento de carcinoma de células basales, pero con mayor poder curativo y cosmético. La TFD puede ser particularmente ventajosa para el tratamiento de lesiones grandes y/o múltiples y para aquellas lesiones que debido a su ubicación, las terapias convencionales pueden provocar riesgo de desfiguramiento o de una pobre curación. Aunque todavía no hay datos suficientes para comparar en lo que concierne

a la cirugía de rutina, la técnica de curettage y radioterapia, la TFD parece ser igualmente efectiva y en algunos casos, superior a las terapias estándar en el tratamiento de cáncer de piel no melanótico (Morton, 2002).

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

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

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

Se investigó la efectividad de la administración oral de ALA para el diagnóstico fotodinámico de tumores de mama primarios en humanos. El estudio incluyó varios pacientes con tumor de mama palpable que durante la operación se irradiaron en el sitio afectado y además se extrajeron diversas muestras. Mediante el diagnóstico fotodinámico con ALA lograron distinguir confiablemente entre el tumor primario de mama y el tejido mamario normal debido a que el tumor tenía una fluorescencia significativamente mayor, tanto macroscópica, como microscópica en todos los casos. Esto podría ser una simple herramienta para reconocer los márgenes del tumor durante la cirugía (Ladner et al, 2001).

Estudios preliminares sugieren que el fotodiagnóstico a través de la detección de fluorescencia de la PpIX, es superior a la citoscopia de tumor de vejiga tradicional. Luego de la administración intravesical de ALA a 52 pacientes se detectó por fluorescencia un 25% de casos con tumores de vejiga que habían sido omitidos por la citoscopia

convencional. La fotodetección con ALA tuvo un 94% de sensibilidad comparada contra un 70% de la citoscopia y un 43% de especificidad. Por lo tanto el fotodiagnóstico con ALA podría llegar a ser un procedimiento estándar para la detección y resección de tumores de vejiga, tales como carcinoma *in situ*, tumores multifocales y en especial para los casos en que sólo se llega endoscópicamente (Riedl et al, 1999).

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

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



## **IV- Derivados de ALA.**

### **IV-1. Introducción.**

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

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

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

Podría también lograrse una mejora basada en la estrategia del diseño de pro-drogas que pueden permitir el ingreso de varias moléculas dentro de las células. Recientes avances en la química de polímeros permiten la síntesis de estructuras definidas y polímeros hiper ramificados (o dendrímeros) los cuales pueden conjugarse con moléculas de drogas (Liu & Frechet; 1999). La estructura mínima de los dendrímeros son los dendrones, que son las sub-unidades de cada ramificación unida a la macromolécula (Figura IV-1).

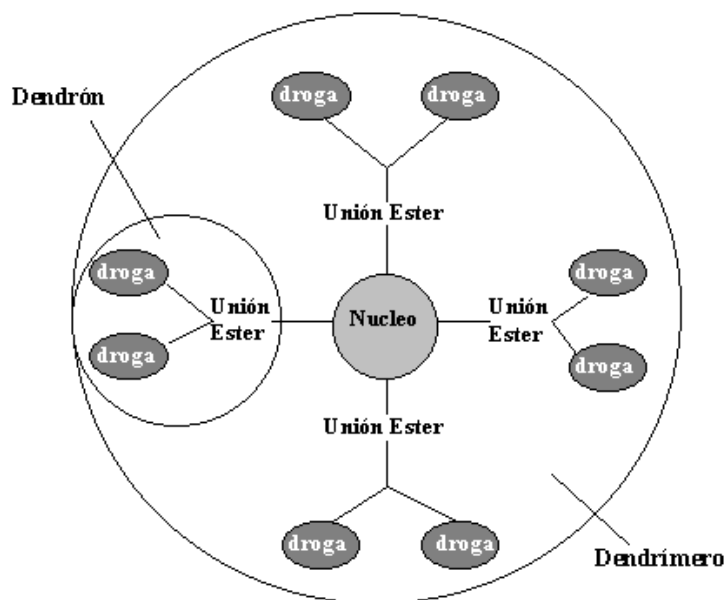
Los dendrímeros, a causa de su gran tamaño, generalmente son considerados impermeables a las membranas celulares, esta propiedad se ha utilizado exitosamente en el transporte de algunas drogas, para las cuales se logró una rápida distribución a través de la circulación, también para permitir una liberación sustanciosa cuando son implantadas en tejidos (Wu et al, 2004; Paleos et al, 2004; Namazi & Adeli, 2005 ).

Con el fin de optimizar la TFD se han diseñado una serie de dendrímeros novedosos conteniendo ALA (Battah et al; 2001), las ventajas del uso de dendrímeros son por un lado, la alta carga de residuos ALA y por otro lado la posibilidad de incrementar la lipofilidad con respecto a ALA, con una consecuente localización diferente tanto tisular como intracelular y así optimizar su distribución (Boas & Heegard, 2004; Rojo & Delgado, 2004; McCarthy et al, 2005). El comportamiento de las drogas conjugadas depende de la macromolécula a la cual se conjugan.

Estos compuestos dendríticos, contienen de 6 a 18 residuos de ALA, y algunos de ellos fueron capaces de inducir síntesis de PpIX y fotodaño celular *in vitro*.

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

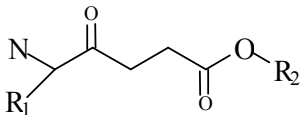
- a) la tasa de difusión a través de los tejidos
- b) la captación celular de la pro-droga
- c) la liberación de ALA a partir de la pro-droga.

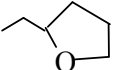
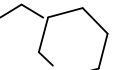
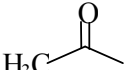
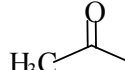
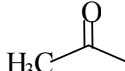


*Figura IV-1: Esquema de un dendrímero*

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

Kloek et al (1996) sintetizaron por primera vez una serie de ésteres derivados de ALA utilizando alcoholes de cadena de carbonos de longitud creciente, así como también amidas y derivados dobles de ALA (Figura IV-2). Empleando células de linfoma de Jurkat, distinguieron entre un período de incubación I (0 a 30 min.), en el cual se permite la entrada a los derivados de ALA, y un período II (3 a 9 hs.), durante el cual las células metabolizan la cantidad de pro-droga que penetró a través de la membrana durante el período de incubación I. Los autores encontraron que cuando se mantenía el período I en un mínimo, la diferencia entre los derivados y el ALA como pro-fotosensibilizantes era más pronunciada, reforzando la hipótesis de que la penetración de ALA a través de la membrana es un paso limitante en la síntesis de PpIX.



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

**Figura IV-2:** Estructura del ALA y los derivados sintetizados por Kloek et al (1998)

Analizando diversos ésteres de ALA (etil, propil, butil, pentil, hexil y octil), Kloek et al (1998) encontraron que las pro-drogas con cadenas alquilo más largas inducían un aumento en el contenido intracelular de PpIX, llegando a un máximo con pentil-ALA éster, mientras que los derivados formados a partir de alcoholes de cadenas más largas que el pentanol inducían menores concentraciones de porfirinas. Los autores explicaron estos resultados indicando que cuando la lipofiliidad de la droga aumenta más allá de un determinado valor, la droga tiende a quedar retenida en la membrana celular, y cuanto mayor es la lipofiliidad de la droga, menor es la fracción que difunde de la membrana al citoplasma, como se demuestra por el menor contenido de PpIX obtenido a partir de octil éster comparado con el hexil éster.

Experiencias similares en líneas celulares humanas de pulmón y vejiga, inducida a partir de ALA o sus ésteres derivados, mostraron que la formación de porfirinas era más elevada a partir de los ésteres de cadenas largas con respecto a los ésteres de cadenas más cortas (Kloek et al, 1998).

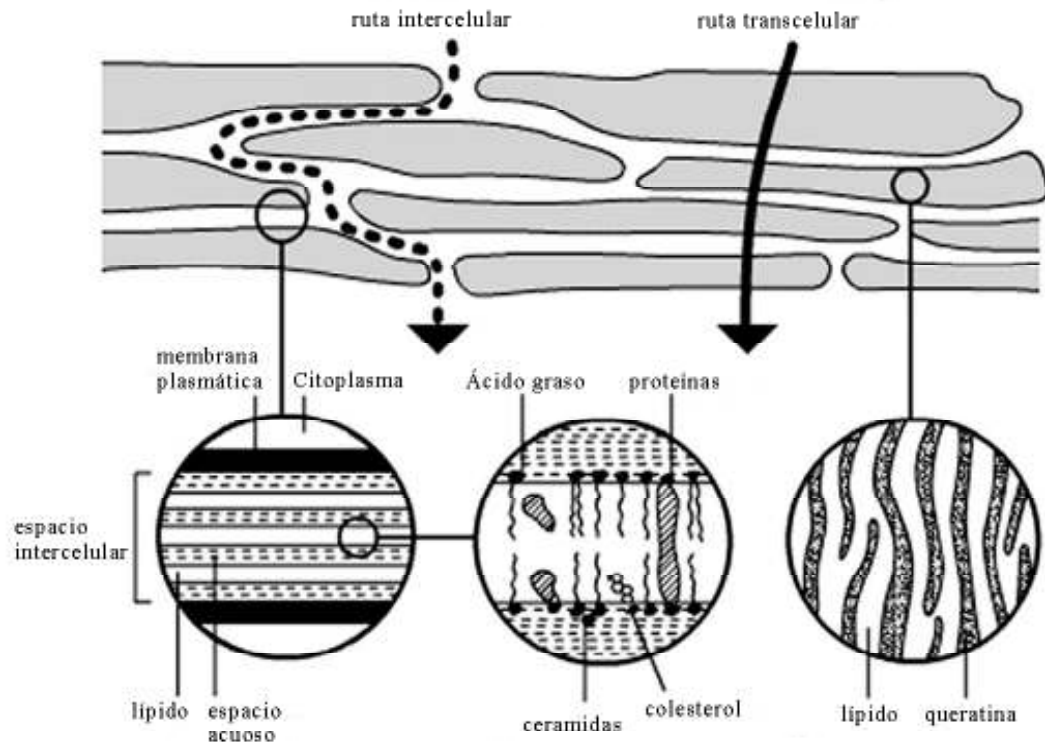
Utilizando líneas celulares provenientes de diferentes tejidos, Gaullier et al (1997) encontraron que la proporción de aumento en la síntesis de PpIX inducida por la esterificación del ALA era dependiente de la línea celular utilizada. Estos resultados no son sorprendentes, ya que hay que tener en cuenta que existen diversos factores que están involucrados en la síntesis de PpIX como la captación, la conversión a ALA, y la conversión a porfirinas.

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

La capa más externa de la piel, el estrato córneo, ha sido identificada como la principal barrera para la penetración de la mayoría de las drogas. La matriz lipídica juega el rol de mayor importancia en el funcionamiento de la barrera. Existen tres potenciales vías de permeabilización de compuestos a través del estrato córneo: la vía transapéndica, la vía transepidérmica, a través del espacio intercelular y la vía transcelular a través de las células mismas (Barry & Bennet, 1987). Las moléculas hidrofílicas ingresarían por la vía intracelular, mientras que las lipofílicas podrían atravesar el estrato córneo por la ruta intercelular. (Figura IV-3).

El obstáculo principal para la permeabilización de los compuestos polares es su baja partición dentro del estrato córneo y su dificultad para penetrar en la capa lipídica durante

la permeación. Aumentando el número de átomos de carbono de una cadena carbonada unida a una droga, da como resultado un aumento de la lipofilidad, y consecuentemente la permeabilidad. Esto podría llevar a una acumulación en la membrana o en el estrato córneo sin la posibilidad de ser liberada para ejercer su acción biológica. Recordemos que se ha señalado que la droga ideal debe tener tanto propiedades lipofílicas como hidrofílicas (Guy & Hadgraft, 1992).



**Figura IV-3:** Microcaminos de penetración de sustancias a través de la piel normal  
Esquema de las vías de penetración de compuestos a través de la piel normal y composición de las distintas capas de la piel

Por otra parte, una mayor solubilidad de los compuestos con alta lipofilidad en cremas y ungüentos puede aumentar la penetración del ALA a través de la piel. Usando un cálculo aproximado para estimar el coeficiente de permeabilidad en estado estacionario de los derivados de ALA, se puede predecir que el ALA butil éster va a ser transportado a través de la piel 50 veces más eficientemente que el ALA. Mientras que con ALA metil éster, el transporte sería el doble. Sin embargo, estos datos sólo son importantes en cuanto a la biodisponibilidad, ya que las sustancias que son muy lipofílicas, como ya se dijo, pueden

acumularse en el estrato córneo. Entonces para obtener un flujo máximo a través de la piel, se debe tener un coeficiente de partición balanceado, con una buena solubilidad en agua y lípidos (Uehlinger et al, 2000).

Algunos ésteres de ALA han sido usados en piel normal de ratón (Moan et al, 2003) y en carcinomas de células basales (Peng et al, 1995), observándose una distribución tisular más alta y homogénea comparada con las porfirinas inducidas a partir de ALA.

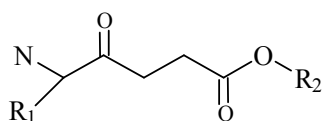
Pero a pesar del éxito que demostraron tener los derivados de ALA para permear la membrana plasmática, el uso de estos compuestos para el tratamiento de cáncer de piel está aún en discusión debido al hecho de que parecen difundir más lentamente a través del estrato córneo que el ALA.

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

Casas et al (1999) examinaron una serie de derivados de ALA hidrofóbicos (Figura IV-4) en cultivos de explantes de piel normal humana y de rata y observaron que las drogas son absorbidas a través de la dermis como ocurriría cuando se aplica la droga por la vía sistémica. Los resultados mostraron que en estos tejidos normales los derivados de ALA eran captados, deesterificados y convertidos en PpIX con menor eficiencia que el ALA. La excepción fue el derivado doble carbobenzoiloxi-D-fenil-alanil-5-ALA-etil éster, que fue tan activo como el ALA para inducir la formación de PpIX. El agregado de un quelante de hierro, CP94, aumentó significativamente la acumulación de PpIX en la piel humana expuesta a ALA, metil-ALA éster y hexil-ALA éster.

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

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



<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>Nombre</b>
H-	-H	ALA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO-	-H	butil ALA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO-	-H	pentil ALA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO-	-H	hexil ALA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-	-H	heptil ALA
	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	Carbobenzoiloxi-glicinil-5-ALA-hexil éster
	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Carbobenzoiloxi-D-fenilalanil-5-ALA-etil éster
	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Carbobenzoiloxi-glicinil-5-ALA-etil éster
		<i>N</i> -ftalilimida-5-ALA-glucosamina-tetraacetato
		<i>N,N</i> -dimetil-5-ALA
		<i>N</i> -acetil-5-ALA
		<i>N</i> -ftalilimida-5-ALA

**Figura IV-4:** Estructura de ALA y derivados empleados por Casas et al (1999)

Moan et al (2001), aplicaron metil-ALA éster y hexil-ALA éster (He-ALA) sobre la piel normal o a piel que rodeaba un adenocarcinoma de colon, y siguieron la formación de PpIX mediante la medición de la señal de fluorescencia de la piel. Encontraron que el He-ALA inducía los mismos niveles de PpIX que el ALA en la piel que rodeaba al tumor, mientras que en otros sitios distantes de la piel no se observaba fluorescencia.

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

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

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

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

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



particular, estas características pueden ser explotadas para mejorar la selectividad del ALA-TFD.

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

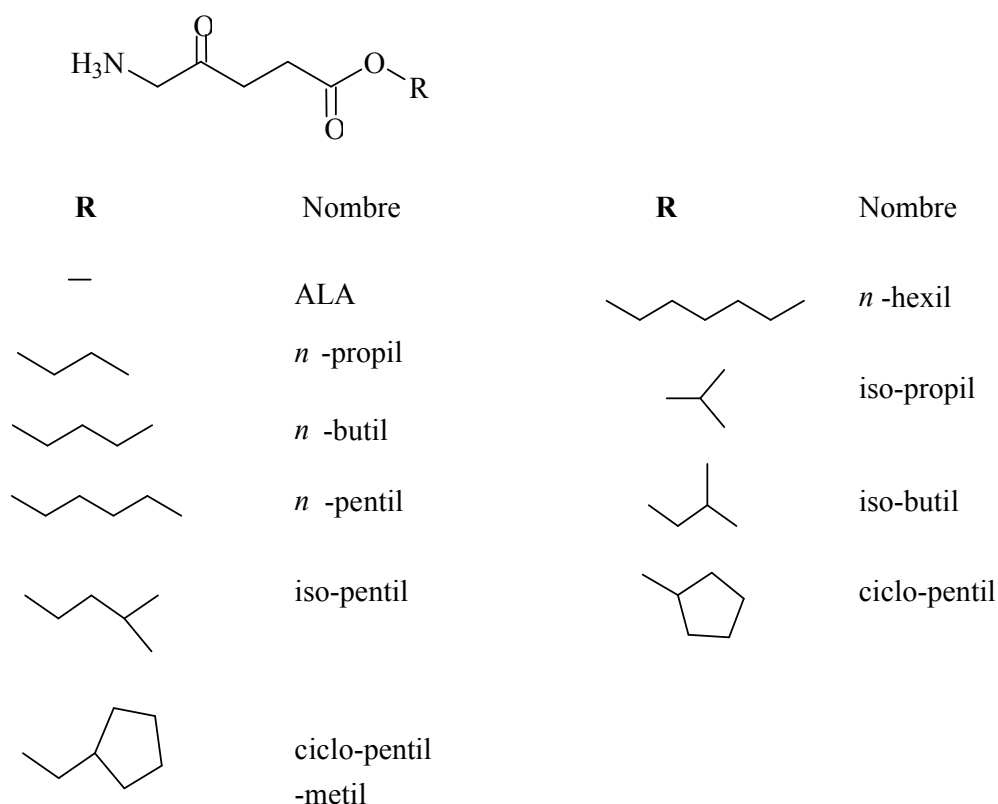
Cuando Kloek et al (1996) aplicaron en forma tópica *N*-acetil-ALA, un compuesto que había resultado ser muy eficiente *in vitro* en una línea celular de linfoma, sorprendentemente, no indujo síntesis de porfirinas. Se hipotetizó entonces que la causa de estas diferencias se debía a la falta de la enzima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

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

Aparentemente, con excepción del He-ALA, las pro-drogas de cadenas alquilo más largas parecen ser hidrolizadas más lentamente que las pro-drogas de cadenas más cortas. Con anterioridad a estos estudios, se había propuesto (Bungaard et al, 1988) que las cadenas alifáticas más largas impedían la hidrólisis enzimática, posiblemente debido a un aumento en la unión a proteínas de los compuestos más lipofílicos (Jarvinen et al, 1995). En contraste, algunos compuestos como ALA propil éster y ALA octil éster inducían una mayor concentración de PpIX en células intactas que en células lisadas, pero la razón por la cual sucedía esto aún no está clara. Una hipótesis es que algunas pro-drogas podrían gatillar mecanismos de transporte activo, resultando en un mayor contenido intracelular de la pro-droga.

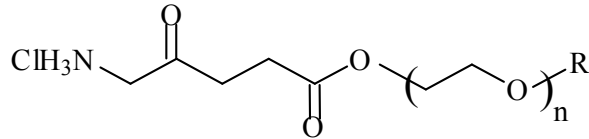
Teniendo en cuenta la especificidad de las esterasas, Whitaker et al (2000) probaron una serie de compuestos (Figura IV-5) y encontraron que hay un punto de ramificación

próximo al sitio de clivaje del éster que impediría el contacto entre el éster y el sitio activo de la esterasa. Dado que se necesita una estrecha interacción molecular para clivar esta unión éster (Sato & Hosokana, 1998), esto llevaría a una disminución en la tasa de clivaje (Dixon & Webb, 1979) resultando en una menor producción de PpIX en el caso del iso-propil y del ciclopentil ALA éster.



**Figura IV-5:** Estructuras empleadas por Whitaker et al (2000) para examinar la relación estructura / actividad, en la síntesis de PpIX

Berger et al (2000) sintetizaron ésteres de la familia del polietilenglicol. Para evaluar la selectividad de las esterasas celulares, compararon la producción de PpIX en células endoteliales y de carcinoma humanas expuestas a ésteres de ALA de la familia del etilen glicol (Figura IV-6). En las células endoteliales no se observaron diferencias entre mono, di y trietilenglicol etil ésteres, mientras que en células tumorales al aumentar el largo de la cadena de etilenglicol aumentaba ligeramente la producción de PpIX, sugiriendo cierta selectividad de las células tumorales sobre las endoteliales.



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

**Figura IV-6:** Estructuras de los derivados de etilen glicol de ALA sintetizados por Berger et al (2000)

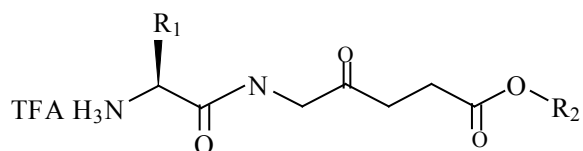
#### IV-6. Actividad de amino peptidasas en el clivaje de derivados.

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

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

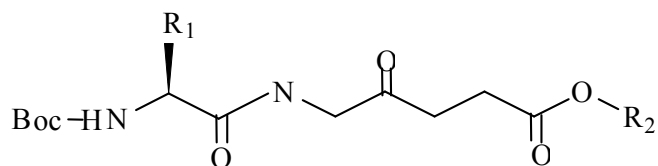
Berger et al (2000) sintetizaron algunos derivados aminoacídicos de ALA básicos, ácidos o neutros (Figura IV-7) los cuales representan sustratos potenciales de la amino peptidasa A (APA), APB o APN/M respectivamente. Los autores evaluaron la selectividad de las enzimas para atacar el ALA disponible en las células endoteliales asociadas al tumor o bien en las células tumorales de pulmón. La actividad de dichas enzimas había sido estudiada previamente en estos dos tipos celulares. En todas las líneas utilizadas se observó que los mejores precursores eran los aminoácidos neutros, cualquiera fuera la actividad de la APN/M. Por otro lado los derivados básicos no estimularon la biosíntesis de PpIX, aún en las células que expresaban una alta actividad de APB. Y los derivados ácidos fueron pobres precursores del ALA. En el mismo trabajo se demostró que para liberar el ALA de los derivados, es necesaria una aminopeptidasa activa, mediante el uso de derivados

bloqueados, que no podían ser sustrato de las aminopeptidasas similares a la APN/M (Figura IV-8)



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

**Figura IV-7:** Estructura de derivados pseudoaminoácidos de ALA sintetizados por Berger et al (2000).



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

**Figura IV-8:** Estructura de derivados pseudoaminoácidos N-protectados de ALA sintetizados por Berger et al (2000)

## **V- Óxido nítrico.**

### **V-1. Introducción.**

El óxido nítrico (NO) es una molécula altamente reactiva que genera Arginina por medio de una reacción enzimática catalizada por la óxido nítrico sintetasa (NOS). Han sido identificadas, tres isoformas de dicha enzima: la neuronal constitutiva (nNOS o NOS1), las isoformas endoteliales (eNOS o NOS3), y la isoforma inducible (iNOS o NOS2), todas son hemo enzimas (Nathan & Xie, 1994).

La interacción del NO con especies reactivas de oxígeno, modula su actividad. El NO puede, además, aumentar o disminuir efectos biológicos dañinos, dependiendo de la concentración y los medios biológicos.

El NO es producido en una amplia variedad de células y puede modular un gran espectro de actividades fisiológicas como en la acción tumoricidal de los macrófagos, en la inhibición de agregación de plaquetas con la microvasculatura, afectando el flujo sanguíneo, en el incremento de la permeabilidad vascular, en la regulación de neurotransmisión y en la regulación de apoptosis, como así también puede estar involucrado en muchos desórdenes, incluidos el cáncer (Moncada et al, 1991; Kim et al, 2001).

En algunos tipos de células, el NO puede promover la apoptosis, mientras que en otros, puede inhibirla (Kim et al, 2001). *In vitro*, el NO puede prevenir la apoptosis inducida por agentes citostáticos como la vincristina, paclitaxel (Henderson et al, 1999), flavonas y campotecinas (Korbelik et al, 1997). Además, el bien conocido mecanismo de hipoxia inducido por resistencia a drogas parece resultar, en parte, de la supresión de la producción endógena de NO (Dalbasti et al, 2002).

Por otro lado, se ha mostrado que *in vivo*, el NO puede incrementar la efectividad de algunos citostáticos administrados en dosis bajas y subterapéuticas, así como también inhibir el desarrollo de resistencia a drogas (Gupta et al, 1998).

### **V-2. Óxido nítrico y su relación con la terapia fotodinámica.**

El radical gaseoso NO, no sólo controla importantes funciones en la progresión tumoral sino que tiene gran influencia en las terapias contra el cáncer, particularmente aquellas que son mediadas por la generación de especies reactivas de oxígeno.

En roedores, se ha descubierto que la inhibición de la producción de NO reduce el diámetro vesicular y el flujo sanguíneo en tumores y algunos tejidos normales, induciendo también hipoxia. Todos estos factores son también marcadamente afectados por la TFD, por lo cual se espera que la modulación de los niveles de NO y TFD se influencien mutuamente (Ekmeckcioglu et al, 2005).

La mayoría de los trabajos publicados sobre regulación de NO en la toxicidad de la TFD está relacionada con la modulación *in vivo* del flujo sanguíneo tumoral y su influencia en la respuesta a TFD, con una consecuente potenciación de la eficacia de Photofrin (Korbelik et al, 1997; Henderson et al, 1999). Se ha demostrado que el nivel de producción endógena del NO en tumores parece ser uno de los determinantes de la sensibilidad de la TFD y que los bajos productores de NO exhiben gran sensibilidad a la TFD con Photofrin (Korbelik et al, 2000).

*In vivo*, se encontró que el ALA-TFD induce un incremento en la producción de NO (Cook et al, 2004) esto también se observó *in vitro* luego del tratamiento con TFD en células tumorales (Ogura et al, 1998), debido a un aumento de la expresión de la especie constitutiva de la NOS, y se sugirió que este incremento está involucrado con la apoptosis, luego de tratamientos de TFD con ftalocianinas en células tumorales A431 (Gupta et al, 1998) se observaron los mismos resultados

*In vitro*, tanto los donores de NO como el NO endógeno inducido por L-arginina inhiben el fotodaño producido por la TFD (Matthews et al, 2001; Wenzel et al, 2003), por ejemplo, el donador de NO, espermina-NONOato inhibe el fotodaño necrótico inducido por ALA-TFD en una línea epitelial de tumor de mama (Niziolek et al, 2003) y el agregado del sustrato de NO, arginina, disminuye la muerte celular por apoptosis luego de la TFD en células linfoblastoides con ftalocianinas de aluminio (Gomes et al, 2002).

## **REFERENCIAS**

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

Agarwall M, Clay M, Harvey H, Evans H, Antunez A, Oleinick N (1991) Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 51: 5993-5996.

Agarwall M, Larkin H, Zaidi S, Mukhtar H, Oleinick N. (1993) Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 53: 5897-5902.

Ashmun R, Look A (1990) Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood.* 75: 462-469.

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

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

Barry B, Bennett S (1987) Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 535-546

Battah S, Chee C, Nakanishi H, Gerscher S, MacRobert A, Edwards C (2001) Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for Photodynamic Therapy. *Biocon. Chem* 12: 980-988

Battle A (1989) The importance of prebiotic porphyrins in biopoiesis. *Int. J. Unit. Sci.* 2: 299-312.

Batlle A (1997) Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, suplemento 3.

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

Beems E, Dubbelman T, Lugtenburg J, Van Best J, Smeets M, Boegheim J (1987) Photosensitizing properties of bacteriochlorophyllin a and bacteriochlorin a, two derivatives of bacteriochlorophyll a. *Photochem. Photobiol.* 46: 639-643.

Ben-Hur E, Rosenthal I (1985) Factors affecting the photokilling of cultured Chinese hamster cells by phtalocyanines. *Radiat. Res.* 103: 403-409.

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

Benson R, Farrow G, Kinsey J, Cortese D, Zincke H, Utz D (1982) Detection and localization of *in situ* carcinoma of the bladder with Hematoporphyrin derivative. *Mayo Clin. Proc.* 57: 548-555.

Berger Y, Greppi A, Siri O, Neier R, Juillerat-Jeanneret L (2000) Ethylene glycol and amino acid derivatives of 5-aminolevulinic acid as new photosensitizing precursors of protoporphyrin IX in cells. *J. Med.Chem.* 43: 4738-4746.

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

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



Bissonnette R, Tremblay J, Juzenas P, Boushira M, Lui H (2002) Systemic photodynamic therapy with aminolevulinic acid induces apoptosis in lesional T lymphocytes of psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol.* 119: 77-83.

Blumer M (1974) Evidence for isomerism in fossil porphyrins of 420- 504 molecular weight. *Ann. Acad. Brasil. Cienc.* 46: 77-81.

Boas U, Heegaard P (2004) Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* 33:43-63.

Boehncke W, Sterry W, Kaufmann R (1994) Treatment of psoriasis by topical photodynamic therapy with polychromatic light. *Lancet.* 343: 801.

Bridges J, Sargent N, Upshall D (1979) Rapid absorption from the urinary bladder of a series of n-alkyl carbamates: a route for the recirculation of drugs. *Br. J. Pharmacol.* 66: 283-289.

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

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

Bundgaard H, Buur S, Lee H (1988) Timolol prodrugs: preparation and hydrolysis kinetics of N- benzoyl carbamate esters of timolol and related compounds. *Acta Pharm. Suec.* 25: 293-306.

Cairnduff F, Roberts D, Dixon B, Brown S (1995) Response of a rodent fibrosarcoma to photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid or polyhaematoporphyrin. *Int. J. Radiat. Biol.* 67: 93-99.

Casas A, Batlle A, Butler A, Robertson D, Brown E, MacRobert A, Riley P (1999) Comparative effect of ALA derivatives on protoporphyrin IX production in human and rat skin organ cultures. *Br. J. Cancer.* 80: 1525-1532.

Chan S, Po A (1989) Prodrugs for dermal delivery. *Int. J. Pharmac.* 55: 1-16.

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

Cook T, Wang Z, Alber S, Liu K, Watkins S, Vodovotz Y, Billiar T, Blumberg D (2004) Nitric oxide and ionizing radiation synergistically promote apoptosis and growth inhibition of cancer by activating p53. *Cancer Res.* 64: 8015-8021.

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

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

Dalbasti T, Cagli S, Kiline E, Oktar N, Ozsoz M (2002) Online electrochemical monitoring of nitric oxide during photodynamic therapy. *Nitric Oxide* 7: 301-305.

Davey F, Mick R, Nelson D, MacCallum J, Sobol R, Royston I, Cuttner J, Ellison R, Bloomfield C (1988) Morphologic and cytochemical characterization of adult lymphoid leukemias which express myeloid antigen. *Leukemia* 2: 420-426.

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

Di Ilio C, Sacchetta P, del Boccio, LaRovere G, Federici G (1985) Glutathione peroxidase., glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Lett.* 29: 37-42.

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

Dixon M, Webb E (1979) *Enzymes*, Longman Group: London.

Doiron D, Profio A, Vincent R, Dougherty T (1979) Fluorescence bronchoscopy for detection of lung cancer. *Chest*. 76: 27-32.

Dolan M, Roy S, Garbiras B, Helft P, Paras P, Chae M, Moschel R, Pegg A (1998) O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase inactivation by ester prodrugs of O6-benzylguanine derivatives and their rate of hydrolysis by cellular esterases. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1701-1709.

Dougherty T (1984) Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2: 83-116.

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

Dougherty T, Marcus S (1992) Photodynamic therapy. *Eur. J. Cancer.* 28: 1734-1742.

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

Dube J, Frenette G, Tremblay Y, Belanger A, Tremblay R (1984) Single case report of prostate adenocarcinoma in a dog castrated three months previously. Morphological, biochemical, and endocrine determinations. *Prostate.* 5: 495-501.

Edelson R, Berger C, Gasparro F (1987) Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 316: 297-303.

Ekmeckcioglu S, Tang C, Grimm E (2005) No news is not necessarily good news in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 5: 103-115.

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

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

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

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

Friesen S, Hjortland G, Madsen S, Hirschberg H, Engebraten O, Nesland J, Peng Q (2002) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (review). *Int. J. Oncol.* 21: 577-582

Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T (1998) Photodynamic therapy in dermatology. *Arch. Dermatol.* 134: 207-214.

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

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

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

Gaffney D, Sieber F (1990) Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of soluble and membrane-bound enzymes in L1210 leukemia cells. *Cancer Res.* 50: 7765-7769.

Gaullier J, Berg K, Peng Q, Anholt H, Selbo P, Ma L, Moan J (1997) Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cell in culture. *Cancer Res.* 57: 1481-1486.

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

Gollnick S, Vaughan L, Henderson B (2002) Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.* 62: 1604-1608.

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

Gomer C, Luna M, Ferrario A, Rucker N (1991) Increase transcription and translation of heme oxygenase in Chinese Hamster fibroblasts following photodynamic stress or Photofrin II incubation. *Photochem. Photobiol.* 53: 275-279.

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

Gomes W, Almeida R, Carvalho P, Duarte C (2002) Nitric oxide modulates tumor cell death induced by photodynamic therapy through a cGMP-dependent mechanism. *Photochem. Photobiol.* 76: 423-430.

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

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

Gupta S, Ahmad N, Mukhtar H (1998) Involvement of nitric oxide during phtalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 58: 1785-1788.

Guy R, Hadgraft J (1992) *En Prodrugs-Topical and Ocular Drug Delivery*, (Sloan ,Dekker eds.) Dekker Inc, New York, 1-16.

Hamblin M, Newman E (1994) On the mechanism of the tumour- localising effect in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* 23: 3-8.

Hamblin M, Zahra T, Contag C, McManus A, Hasan T (2003) Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J. Infect. Dis.* 187: 1717-1725.

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

He J, Whitacre C, Xue L, Berger N, Oleinick N (1998) Protease activation and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment. *Cancer Res.* 58: 940-946.

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

Henderson B, Sitnik-Busch T, Vaughan L (1999) Potentiation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent. *Photochem. Photobiol.* 70: 64-71.

Hryhorenko E, Rittenhouse-Diakun K, Harvey N, Morgan J, Stewart C, Oseroff A (1998) Characterization of endogenous protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in resting and activated peripheral blood lymphocytes by four-color flow cytometry. *Photochem. Photobiol.* 67: 565-572.

Imlay J, Linn S (1986) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1309.

- Jamieson C, McDonald W, Levy J (1990) Preferential uptake of benzoporphyrin derivative by leukemic versus normal cells. *Leuk. Res.* 14: 209-219.
- Jarvinen T, Poikolainen M, Suhonen P, Vepsalainen J, Alaranta S, Urtti A (1995) Comparison of enzymatic hydrolysis of pilocarpine prodrugs in human plasma, rabbit cornea, and butyrylcholinesterase solutions. *J. Pharm. Sci.* 84: 656-660.
- Jori G (1989) *In vivo* transport and pharmacokinetic behavior of tumours photosensitizers. *Ciba Found Symp.* 146: 78-94.
- Jori G (1990) Photosensitized processes *in vivo*: proposed phototherapeutic applications. *Photochem. Photobiol.* 52: 439-443.
- Juillerat-Jeanneret L, Lohm S, Hamou M, Pinet F (2000) Regulation of aminopeptidase A in human brain tumor vasculature: evidence for a role of transforming growth factor-beta. *Lab. Invest.* 80: 973-980.
- Kelly J, Snell M (1976) Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol.* 155: 150-151.
- Kennedy J, Pottier R (1992) Endogenous protoporphyrin IX., a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* 14: 275-292.
- Kennedy J, Pottier R, Pross G (1990) Photodynamic Therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol.* 6: 143-148.
- Kessel D, Spikes E (1984) Porphyrin accumulation by atheromatous plaques of the aorta. *Photochem. Photobiol.* 40: 59-63.
- Kessel D, Woodburn K (1993) Biodistribution of photosensitizing agents. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 25: 1377-1383.

Kessel D, Thompson P, Musselman B, Chang C (1987) Probing the structure and stability of the tumor localizing derivative of hematoporphyrin by reduction with LiAlH<sub>4</sub>. *Cancer Res.* 47: 4642-4645.

Kim P, Zamora R, Petrosko P, Billiar T (2001) The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1421-1441.

Kloek J, Beijersbergen van Henegouwen G (1996) Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 64 : 994-1000.

Kloek J, Akkermans W, Beijersbergen van Henegouwen G (1998) Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochem. Photobiol.* 67: 150-154.

Kolesnikov M, Egorov I (1977) Porphyrins and phycobilins in precambian rocks. *Orig. Life.* 8: 383-390.

Korbelik M (1997) The role of nitric oxide in the response of solid tumours to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 65: 55S-56S.

Korbelik M, Parkins C, Shibuya H, Cecic I, Stratford M, Chaplin D (2000) Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* 82: 1835-1843.

Kurwa H, Barlow R (1999) The role of photodynamic therapy in dermatology. *Clin. Exp. Dermatol.* 24: 143-148.

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

Lange N, Jichlinski P, Zellweger M, Forrer M, Marti A, Guillou L, Kucera P, Wagnieres G, van den Bergh H (1999) Photodetection of early human bladder cancer based on the



fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *Br. J. Cancer* 80: 185-193.

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

Lemoli R, Igarashi T, Knizevski M, Acaba L, Richter A, Jain A, Mitchell D, Levy J, Gulati S (1993) Dye-mediated photolysis is capable of eliminating drug-resistant (MDR<sup>+</sup>) tumor cells. *Blood* 81: 790-800.

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

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

Liu M, Frechet J (1999) Designing dendrimers for drug delivery. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2: 393-401

Lydaki E, Dimitriou H, Papazoglou T, Liu WQ, Kalmanti M (1997) Merocyanine 540 mediated photolysis of normal bone marrow, committed hemopoietic progenitors and neoplastic cells. Implications for bone marrow purging. *Leuk. Res.* 21: 641-650.

McCarthy T, Karellas P, Henderson S, Giannis M, O'Keefe D, Heery G, Paul J, Matthews B, Holan G (2005) Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol. Pharm.* 2:312-318.

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

- Malik Z, Hanania J, Nitzan Y (1990) Bactericidal effects of photoactivated porhyrins. An alternative approach to antimicrobial drugs. *J. Photochem. Photobiol.* 5: 281-293.
- Markey G, Curry R, Swain D, Morris T, McCormick J, Alexander H, Edgar S (1993) Monocyte esterase deficiency in gastrointestinal cancer. *J. Clin. Pathol.* 46: 529-532.
- Marti A, Lange N, van den Bergh H, Sedmera D, Jichlinski P, Kucera P (1999) Optimisation of the formation and distribution of protoporphyrin IX in the urothelium: an *in vitro* approach. *J. Urol.* 162: 546-552.
- Matthews N, Adams M, Maxwell L, Gofton T, Graham C (2001) Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 1879-1885.
- Mercer Smith J, Mauzerall D (1981) Molecular hydrogen production by uroporphyrin and coproporphyrin. A model for the origin of photosynthetic function. *Photochem. Photobiol.* 34: 407-410.
- Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G (1996) Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol.* 32: 153-157.
- Meyer-Betz F (1913) Untersuchungen über die biologische (photodynamische). Wirkung des hematoporphyrins und andere Derivative des Bluts and Gallenfarbstoffs. *Arch. Dtsch. Klin. Med.* 112: 476-503.
- Minnock A, Vernon D, Schofield J, Griffiths J, Parish J, Brown S (1996) Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phtalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol.* 32: 159-164.
- Miyamoto Y, Umebayashi Y, Nishisaka T (1999) Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* 53: 53-59.

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

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

Moan J, Liu M, Iani V (2001) On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *Int. J. Cancer.* 92: 139-143.

Moan J, Ma L, Juzeniene A, Jani V, Juzenas P, Apricena F, Peng Q (2003) Pharmacology of protoporphyrin IX in nude mice application of ALA and ALA esters. *Int J Cancer.* 103 (1): 132-135

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

Moncada S, Palmer R, Higgs E (1991) Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.

Morgan A, Garbo G, Kreimer-Birnbaum M, Keck R, Chaudhuri K, Selman S (1987) Morphological study of the combined effect of purpurin derivatives and light on transplantable rat bladder tumors. *Cancer Res.* 47: 496-498.

Morton C (2002) The emerging role of 5-ALA-PDT in dermatology: is PDT superior to standard treatments? *J. Dermatolog. Treat.* 13: 25-29

Morton C, Whitehurst C, Moseley H, McColl J, Moore J, Mackie R (1996) Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *Br. J. Dermatol.* 135:766- 771.

Namazi H, Adeli M (2005) Dendrimers of citric acid and poly (ethylene glycol) as the new drug-delivery agents. *Biomaterials.* 26:1175-1183.

- Nathan C, Xie Q (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 78: 915-918.
- Navone N, Fusardi A, Resnik E, Batlle A, Polo C (1988) Porphyrin biosynthesis in human breast cancer. Preliminary mimetic studies. *Med. Sci. Res.* 16: 61-62
- Navone N, Polo C, Frisardi A, Andrade N, Batlle A (1990) Heme biosynthesis in human breast adenocarcinoma. Mimetic *in vitro* studies and some heme enzymic activity levels. *Int. J. Biochem.* 22: 1407-1411.
- Nelson J, Roberts W, Berns M (1987) In vivo studies on the utilization of mono-L-aspartyl chlorin (NPe6) for photodynamic therapy. *Cancer Res.* 47: 4681-4685.
- Neuberger A, Scott J (1953) Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis. *Nature* 172: 1093-1094.
- Nitzan Y, Shainberg B, Malik Z (1987) Effect of photoactivated hematoporphyrin on Gram-positive bacteria. *Curr. Microbiol.* 15: 251-258.
- Niziolek M, Korytowski W, Girotti A (2003) Nitric oxide inhibition of free radical-mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 997-1005.
- Noodt B, Berg K, Stoke T, Peng Q, Nesland J (1996) Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br. J. Cancer.* 74: 22-29.
- Obochi M, Canaan A, Jain A, Richter A, Levy J (1995) Targeting activated lymphocytes with photodynamic therapy: susceptibility of mitogen-stimulated splenic lymphocytes to benzoporphyrin derivative (BPD) photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 62: 169-175.
- Ogura T, De George G, Tatemichi M, Esumi H (1998) Suppression of anti-microtubule agent-induced apoptosis by nitric oxide: a possible mechanism of a new drug resistance. *Int. J. Cancer Res.* 89: 199-205.

Oleinick N, Chiu S, Ramakrishnan N, Xue L (1986) The formation, identification and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br. J. Cancer*. 55: 135-140.

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

Paleos C, Tsiourvas D, Sideratou Z, Tziveleka L (2004) Acid- and salt-triggered multifunctional poly(propylene imine) dendrimer as a prospective drug delivery system. *Biomacromolecules* 5:524-529.

Pandey R, Bellnier D, Smith K, Dougherty T (1991) Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 53: 65-72.

Peng Q, Warloe T, Moan J, Heyerdahl H, Steen H, Nesland J, Giercksky K (1995) Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. *Photochem. Photobiol.* 62: 906-913.

Popken G, Schultze-Seemann W, Seiler K, Birkel M, Wetterauer U (2000) Intravesical administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA). Safety and pharmacokinetics of 5-ALA and its metabolite protoporphyrin IX. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56: 241-246.

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

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

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

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

- Riedl C, Plas E, Pfluger H (1999) Fluorescence detection of bladder tumors with 5-aminolevulinic acid. *J. Endourol.* 13: 755-759.
- Rimington C, Krol, C (1955) Decarboxylation of porphobilinogen- and iso-porphobilinogen- $\alpha$ -carboxylic acids. *Nature* 175: 630-631.
- Rojo J, Delgado R (2004) Glycodendritic structures: promising new antiviral drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 579-81.
- Rubino C, Rasetti L (1996) Porphyrin metabolism in human neoplastic tissues. *Panminerva Med.* 8: 290-292.
- Saiki I, Fujii H, Yoneda J, Abe F, Nakajima M, Tsuruo T, Azuma I (1993) Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int. J. Cancer* 54: 137-43.
- Salet C, Moreno G (1990) Photosensitization of mitochondria: molecular and cellular aspects. *J. Photochem. Photobiol. B.* 5: 133-150.
- Satoh T, Hosokawa M (1998) The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 257-288.
- Sawaki M, Enomoto K, Takahashi H, Nakajima Y, Mori M (1990) Phenotype of preneoplastic and neoplastic liver lesions during spontaneous liver carcinogenesis of LEC rats. *Carcinogenesis* 11: 1857-1861.
- Scheuplein R (1967) Mechanisms of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J. Invest. Dermatol.* 48: 79-88.
- Schoenfeld N, Epstein O, Lahav M, Mamet R, Shaklai M, Atsom A (1988) The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett.* 43: 43-48.

Shemin D, Russel C (1953)  $\delta$ -aminolevulinic acid., its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 4873-4874.

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

Sieber F, Spivak J, Sutcliffe A (1984) Selective killing of leukaemia cells by merocyanine 540-mediated photosensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7584-7587.

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

Sima A, Kennedy J, Blakeslee D, Robertson D (1981) Experimental porphyric neuropathy: a preliminary report. *Can. J. Neurol. Sci.* 8: 105-114.

Singer C, Bown S, Linch D, Huehns E, Goldstone A (1987) Phtalocyanine photosensitization for *in vitro* elimination of residual acute non-lymphoblastic leukaemia: preliminary evaluation. *Photochem. Photobiol.* 46: 745-749.

Singer C, Linch D, Bown S, Huehns E, Goldstone A (1988) Differential Phtalocyanine photosensitization of acute myeloblastic leukaemia progenitor cells a potential purging technique for autologous bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* 68: 417-422

Smal M, Dong Z, Cheung H, Asano Y, Escoffier L, Costello M, Tattersall M (1995) Activation and cytotoxicity of 2- $\alpha$ -aminoacyl prodrugs of methotrexate. *Biochem. Pharmacol.* 49: 567-574.

Smith O, Traul D, Sieber F (1992) Photodamaging effects of merocyanine 540 on neutrophils and HL-60 cells. *Exp. Hematol.* 20: 1278-1284.

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

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

Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstädter F, Knüchel R (1995) Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer Protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.* 62: 887-895.

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

Szeimies R, Karrer S, Sauerwald A, Landthaler M (1996) PDT with topical application of 5-ala in the treatment of actinic keratoses. An initial clinical study. Pharmacology and treatment. *J. Photochem. Photobiol.* 192: 246-251.

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

Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N (2000) 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J. Photochem. Photobiol.* 54: 72-80.

Usuda J, Okunaka T, Furukawa K, Tsuchida T, Kuroiwa Y, Ohe Y, Saijo N, Nishio K, Konaka C, Kato H (2001) Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int. J. Cancer* 93: 475-480.

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



Van der Akker J, Bruijn H, Beijersbergen van Henegouwen G, Star W, Sterenberg H (2000a) Protoporphyrin IX fluorescence kinetics and localization after topical application of ALA pentyl ester and ALA on hairless mouse skin with UVB-induced early skin cancer. *Photochem. Photobiol.* 72: 399-406.

Van den Akker J, Iani V, Star W, Sterenberg H, Moan J (2000b) Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetic and the role of the *stratum corneum*. *Photochem. Photobiol.* 72: 681-689.

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

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

Vrouenraets M, Visser G, Stigter M, Oppelaar H, Snow G, van Dongen G (2001) Targeting of aluminum (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies: improved efficacy in photodynamic therapy. *Cancer Res.* 61: 1970-1975.

Webber J, Luo Y, Crilly R, Fromm D, Kessel D (1996) An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin *in vivo*. *J. Photochem. Photobiol.* 35: 209-211.

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

Wenzel U, Kuntz S, Daniel H (2003) Nitric oxide levels in human preneoplastic colonocytes determine their susceptibility toward antineoplastic agents. *Mol. Pharmacol.* 64: 1494-1502.

Whitaker C, Battah S, Forsyth M, Edwards C, Boyle R, Matthews K (2000) Photosensitization of pancreatic tumor cells by aminolevulinic acid esters. *Anti-Cancer Drugs Design* 15: 161-170.

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

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

Wilson M, Pratten J (1994) Sensitization of *Staphylococcus aureus* to killing by low power laser light. *J. Anti-microb. Chemother.* 33: 619-624.

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

Woodburn K, Vardaxis J, Hill A, Kaye A, Phillips D (1991) Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem. Photobiol.* 54: 725-732.

Wu X, Huang S, Zhang J, Zhuo R (2004) Preparation and characterization of novel physically cross-linked hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and amine-terminated polyamidoamine dendrimer. *Macromol. Biosci.* 4:71-75.

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

## **OBJETIVOS**

- Establecer si el método de Mauzerall & Granick (1956) es aplicable para la cuantificación de derivados ésteres de ALA, y desarrollar un método de separación de ALA y derivados de ALA empleando resinas de intercambio iónico
- *In vitro*, estudiar la naturaleza de la regulación de la síntesis de porfirinas a partir de ésteres de ALA, Hexil-ALA y THP-ALA, en la línea celular de adenocarcinoma mamario LM3.
- *In vivo*, estudiar la síntesis y distribución de las porfirinas formadas a partir de los ésteres de ALA, THP-ALA y Und-ALA, en los tejidos de ratón luego de la administración sistémica de los mismos.

Determinar si los ésteres de ALA son retenidos en algún órgano específico, pues de ser así, sería posible seleccionar el órgano potencialmente más indicado como blanco para el ALA-TFD.

Investigar el uso tópico de Und-ALA y THP-ALA en términos de selectividad y síntesis de porfirinas totales.
- Realizar estudios de síntesis de porfirinas en el modelo de explantes de órganos como así también estudios de afinidad para establecer posibles correlaciones entre estos sistemas y los modelos *in vivo*.
- Estudiar la capacidad de los dendrímeros de liberar moléculas de ALA e inducir la formación de porfirinas a partir de ellas, tanto en cultivos de células como en el modelo animal.
- Con el dendrímero aminometano tris-metil ALA (3m-ALA), que contiene tres residuos de ALA acoplados al corazón central de la molécula por medio de uniones ésteres: evaluar *in vitro* e *in vivo* la eficacia para inducir la síntesis de porfirinas.
- Con el dendrímero 1,3,5-Tris[N-[N-[N-Imino-3,3'-bis[N-[N-[tris(metil 5-aminolevulinato)metil]acetamido-propionamida]benceno TFA sal (Den18mer), que

contiene 18 residuos: evaluar *in vitro* e *in vivo* su eficacia para inducir la síntesis de PpIX estableciendo una correlación entre la estabilidad y las cinéticas de síntesis de porfirinas.

- Estudiar la interacción entre el ALA-TFD y el NO, empleando tres líneas de adenocarcinoma murino: LM2, no productora de NO, LM3 y LM3-SNP, ambas productoras de NO en cantidades similares.
- Investigar la capacidad de estas células para inducir la síntesis de PpIX a partir de ALA, y establecer si ellas presentan una respuesta diferencial al tratamiento de ALA-TFD.
- Mediante el empleo líneas celulares resistentes a la citotoxicidad inducida por NO y líneas celulares resistentes a la TFD, establecer si los mecanismos de citotoxicidad al NO y al ALA-TFD están relacionados o son independientes.
- Estos resultados y las interacciones entre ALA, porfirinas, precursores y donores de NO nos permitirán esclarecer el rol del NO en el daño mediado por el ALA-TFD.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **I- Reactivos.**

ALA, ALA metil éster (Me-ALA), PpIX, GSH, GSSG, nitroprusiato de sodio (SNP), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), L-arginina, MTT y las resinas Dowex 50 X8 (malla de 100 a 200), y Dowex 50W X2-200(H), se obtuvieron de Sigma Chem Co. DETA NONOato fue de Cayman Chemical, USA

El resto de los reactivos empleados fueron de grado analítico.

## **II- Síntesis de derivados de ALA.**

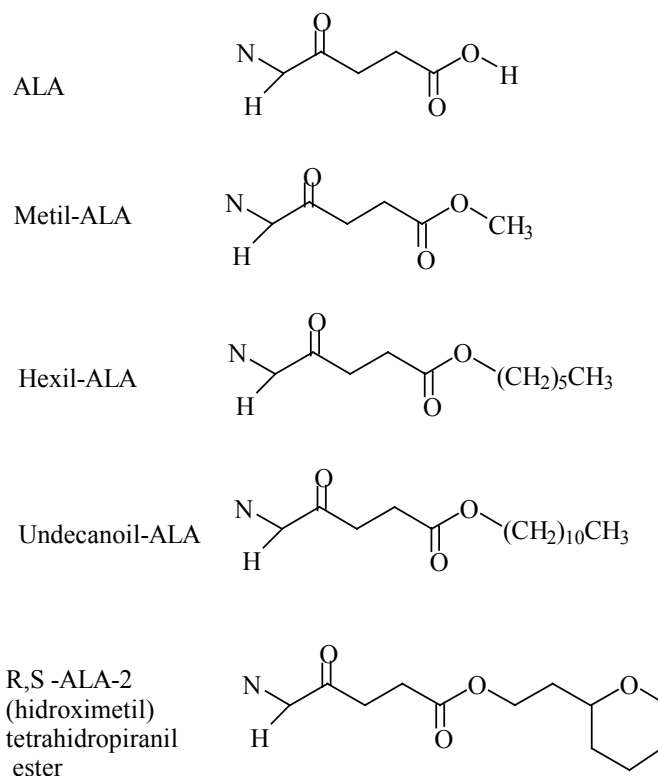
### **II-1. Síntesis orgánica de ésteres de ALA.**

Los derivados de ALA se obtuvieron como sales de cloruro de hidrógeno. ALA hexil éster (He-ALA) y Undecanoil-ALA (Und-ALA) (Figura II-1) se sintetizaron de acuerdo al método de Takeya (Takeya et al, 1992) mediante una reacción de ALA con hexanol y undecanol respectivamente en presencia de cloruro de tionilo. La mezcla se llevó a 70°C hasta que el ALA.HCl se disolvió completamente, confirmando la reacción por TLC (Cl<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>/MeOH 9:1). El exceso de alcoholes fue evaporado en rotavapor con bomba de alto vacío. Luego se adicionó dietiléter, y las sales de los derivados de ALA.HCl cristalizaron a 4°C. El rendimiento fue del 40 al 60%.

R, S-ALA-2-(hidroximetil)tetrahidropiranyl éster se preparó de manera similar. El producto crudo se purificó en una columna cromatográfica de sílica gel, eluyendo con mezclas de Cl<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>/MeOH. Finalmente, el producto se recristalizó en dietiléter con un rendimiento de alrededor del 20%.

La pureza de los compuestos sintetizados fue siempre superior al 95%, establecido por las técnicas de TLC y RMN.

Los derivados de ALA se disolvieron en agua destilada inmediatamente antes de su uso y el pH de los medios de cultivo no varió por el agregado de ALA o sus derivados.



**Figura II-1:** Estructuras de ALA y los derivados de ALA

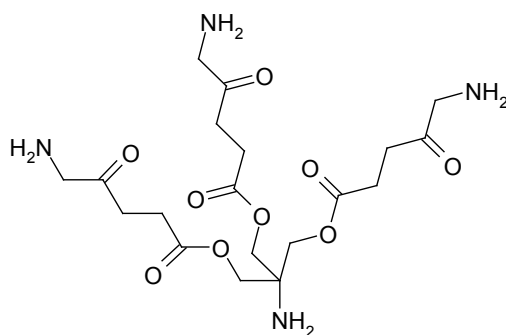
## II-2. Síntesis orgánica de dendrímeros de ALA.

El espectro RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se realizó en un espectrómetro Jeol EX270 MHz. El espectro ultravioleta fue realizado en un espectrómetro Unicam UV2 en solución de diclorometano. El espectro infrarrojo fue realizado en un espectrómetro Nicolet FTIR como capas delgadas en diclorometano. El espectro de masa se obtuvo, usando un EI/CI, FAB o técnica de electrospray con una matriz NOBA.

La cromatografía analítica de placa delgada se llevó a cabo en un equipo ICN Adsorbentien, de fondo aluminado y recubiertas con placas de sílica, en las cuales se visualizaron los productos usando luz ultravioleta (254 nm). Para la columna cromatográfica se usó gel de sílica (malla 220-440, Fluka). Los valores de  $R_f$  se cuantificaron con el mismo sistema de solventes que se usó en la cromatografía analítica de placa delgada, salvo que indique lo contrario. El sistema de HPLC se corrió en una columna de Si(55w) 250x4,6 mm acoplado a un detector Gilson 714.

Todos los reactivos fueron de Organix, Aldrich o Avocado y utilizados sin purificación previa excepto se indique lo contrario. Los solventes se purificaron de acuerdo a los procedimientos estándar de laboratorio (Leonard et al, 1996). Tris(tert-butiloxicarbonil-5-ALA)metilamina se sintetizó por el método de Battah et al.(2001).

Para la síntesis de tris metil 5-ALA (3m-ALA), se disolvió Tris(tert-butiloxicarbonil-5-ALA)metilamina en diclorometano, se agregó trifluoroacético (TFA) a la solución y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 4 h. Los solventes se evaporaron bajo presión reducida hasta obtener un residuo aceitoso, el que se disolvió por agregado de metanol y dietileter, bajo atmósfera de argón hasta la precipitación del producto. Los solventes se decantaron y el residuo se secó en vacío para dar el producto final, 3m-ALA (Figura II-2) como sal de trifluoroacético. El rendimiento fue del 55%.

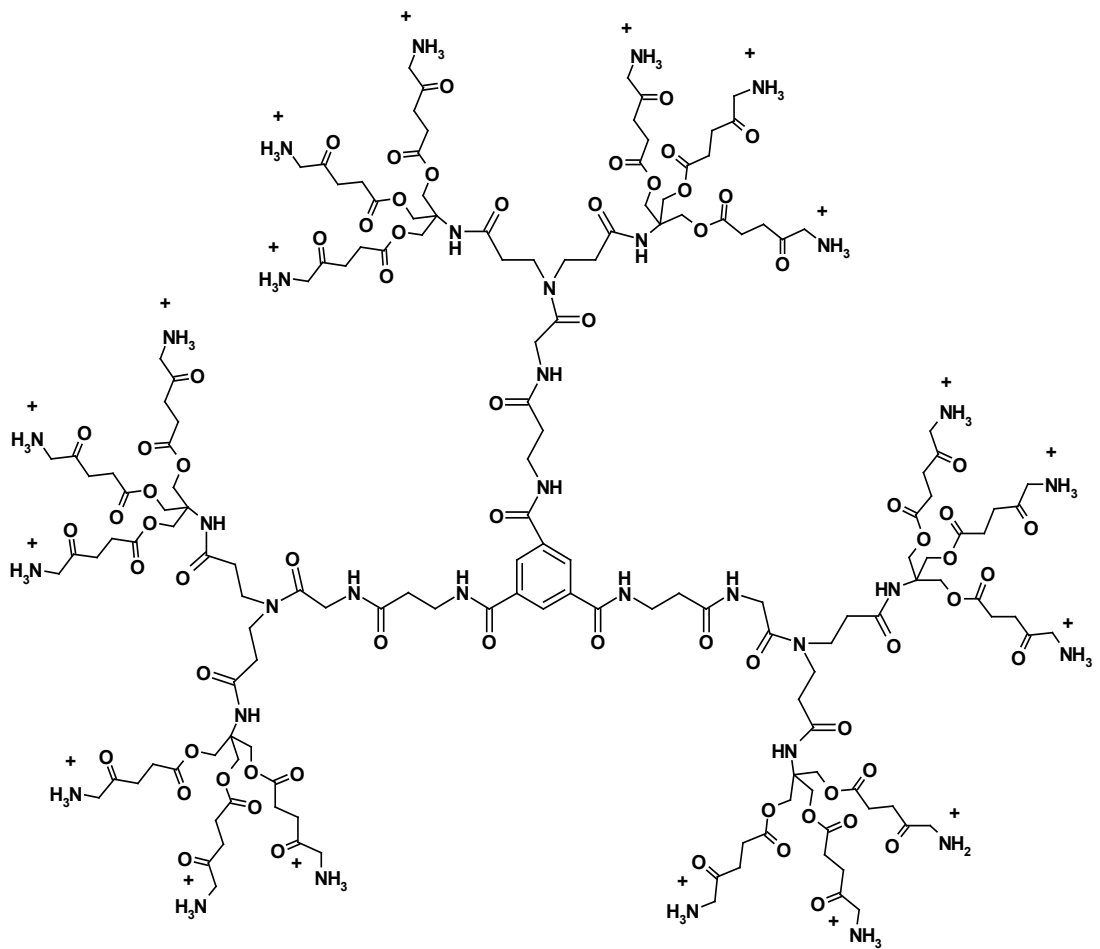


**Figura II-2 3m-ALA**

La síntesis de 1,3,5-Tris[N-[N-[N-Imino-3,3'-bis[N-[N-[tris(metil 5-aminolevulinato)metil]acetamido-propionamido]benceno (Den18mer) (Figura II-3) consta de varios pasos descritos por Battah et al (2001).

Se disolvió Aminolevulinato metil- metil [propamidopropionamida] benceno en diclorometano, se agregó TFA, y se agitó la solución a temperatura ambiente por 2 h. Se evaporaron los solventes bajo presión reducida hasta obtener un residuo aceitoso que se recristalizó a partir de una mezcla de metanol, acetato de etilo y éter, obteniéndose el compuesto final, 1,3,5-Tris[N-[N-[N-Imino-3,3'-bis[N-[N-[tris(metil 5-aminolevulinato)metil]acetamido-propionamido]benceno como sal de trifluoroacético (Den18mer) (Figura II-3). El producto final es un sólido amarillo pálido. El rendimiento fue del 41%.





*Figura II-3: Den18mer*

### **III- Caracterización de los derivados de ALA.**

#### **III-1. Determinación de PBG y ALA.**

Las determinaciones de PBG y ALA se realizaron según el método de Mauzerall y Granick (1956).

La determinación de PBG se basa en su reacción con el reactivo de Ehrlich para dar un compuesto coloreado que presenta un máximo de absorbancia a 555 nm. El reactivo de Ehrlich está compuesto por p-aminobenzaldehído (p-DMAB), HCl concentrado y ácido acético glacial.

La técnica empleada consiste en mezclar un volumen de la muestra con igual volumen del reactivo de Ehrlich, a temperatura ambiente. Luego de la adición del reactivo, el máximo de color se alcanza a los ocho minutos, manteniéndose constante hasta los 15 minutos, cuando comienza a decaer.

Debido a la capacidad que poseen todas las aminocetonas de condensarse con acetilacetona o etilacetato a pH 4,6, para formar un pirrol con una posición libre, es que Mauzerall y Granick (1956) se basaron en la técnica anterior para cuantificar ALA.

Para la formación del pirrol a partir de ALA y su posterior cuantificación, se mezclan 0,5 ml de buffer acético-acetato 1M pH 4,6 conteniendo la muestra de ALA con 0,05 ml de acetil acetona y el sistema se calienta diez minutos en un baño a 100° C. Luego de enfriar, se mezcla con igual volumen del reactivo de Ehrlich y a los ocho minutos se lee la absorbancia a 555 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard con arreglo de diodos modelo 8452A.

#### **III-2. Validación de la cuantificación de los derivados de ALA.**

Se agregaron diferentes cantidades de derivados de ALA disueltos en agua destilada a buffer acético-acetato 1M pH 4,6. Luego fueron condensados con acetil acetona en un baño de agua a 100° C durante 10 min. Una vez enfriado, cada alícuota se mezcló con igual volumen del reactivo de Ehrlich, y se leyó la absorbancia a 555 nm. Los productos de reacción de Ehrlich tienen una intensidad máxima de absorción a los 555 nm para todos los derivados de ALA.

Los productos de condensación de los dendrímeros 3m-ALA y Den18mer, también resultan indistinguibles de los obtenidos con ALA, dando un espectro de absorción idéntico. Los cálculos indican que sólo un residuo de ALA de dichos derivados se condensa con acetilacetona para formar el pirrol coloreado, por lo tanto, concentraciones equimolares de ALA, Den18mer y 3m-ALA poseen igual absorbancia a 555 nm. La razón por la cual reacciona sólo un ALA por molécula de dendrón puede deberse a impedimentos estéricos al formarse los dipirroles coloreados (Mauzerall y Granick, 1956).

### **III-3. Caracterización de los productos de los derivados de ALA, luego de la condensación y la reacción de Ehrlich.**

Para descartar la hipótesis de una posible hidrólisis de los derivados de ALA durante la reacción de condensación, el producto de condensación de He-ALA con acetil acetona, se liofilizó durante una noche, removiendo así el exceso de acetil acetona. Por tratamiento con hidroxilamina del producto seco, se confirmó la presencia de un grupo éster de acuerdo a la reacción de identificación descrita en Shriner et al (1980). En forma paralela la reacción de ALA con hidroxilamina no dio un producto coloreado.

Además, para descartar una posible hidrólisis del He-ALA provocada por el medio ácido o por acción del calor, se calentó en baño a 100° C, una solución de He-ALA en buffer acético-acetato durante 10 min, luego se agregó igual volumen de reactivo de Ehrlich. El compuesto resultante se dializó durante la noche para eliminar las sales, se filtró para eliminar el exceso de p-DMAB y finalmente se liofilizó. Se confirmó la presencia de He-ALA mediante TLC en acetona: metanol (6:4) y revelado con ninhidrina.

Habiendo confirmado que el He-ALA no se hidroliza durante la reacción de condensación, se puede extender esta conclusión al resto de los derivados de ALA, ya que los resultados obtenidos en todos los casos resultaron coincidentes.

### **III-4. Separación de ALA a partir de derivados de ALA por cromatografía de intercambio catiónico.**

Se emplearon 3 g de resina Dowex 50 X8 empaquetados en columnas de plástico de Bio Rad. Luego del lavado y tratamiento con 5 ml de HCl 4 N, 5 ml de HCl 1 N y 5 ml de agua, una alícuota de 3 ml de soluciones de ALA o derivados de ALA preparadas en TCA

5%, se sembró en la columna permitiendo la elución de la misma. Luego, se agregaron 7 ml de acetato de sodio 1 M, recolectando los eluidos en alícuotas de 1 ml. Luego, 0,25 ml de cada eluido se mezcló con 0,25 ml de buffer acético-acetato 1 M pH 4,6 y 0,05 ml de acetyl acetona. La condensación y cuantificación se realizó como se ha descripto previamente.

Bajo estas condiciones los derivados de ALA quedan retenidos en la columna y se eluyen con 10 ml de HCl 10 M recolectados de a 1 ml. Luego, 0,1 ml de cada fracción eluida se mezcló con igual volumen de NaOH 10 M para ajustar el pH, excepto el eluido 1, el cual no necesitó agregado de NaOH. Se agregó buffer acético-acetato 1 M pH 4,6 hasta completar 0,5 ml y finalmente se condensó con acetyl acetona.

Para regenerar la resina se trató sucesivamente con 5 ml de HCl 4 N, 5 ml de HCl 1 N y 5 ml de agua.

### **III-5. TLC de ALA y derivados de ALA.**

Las fracciones eluidas con acetato de sodio y HCl, se dializaron durante la noche con el fin de eliminar sales y luego se liofilizaron. La presencia de ALA y derivados de ALA se confirmó por TLC, usando acetona: metanol (6:4) y revelado con ninhidrina.

### **III-6. Determinación de coeficientes de partición.**

Los coeficientes de partición aparentes ( $P$ ) para ALA y ésteres de ALA, se determinaron en un sistema de dos fases de octanol-buffer (Uehlinger et al, 2000). Se saturó por agitación una mezcla de buffer fosfato salino (PBS) (100 ml de solución 0,1 M de pH 7,5) y octanol (100 ml) durante 30 min. Al cabo de ese tiempo se separaron las dos fases y a 2ml de cada una de ellas se les agregó 50  $\mu$ l de una solución 200 mM de ALA/derivados de ALA. Se reunieron nuevamente alícuotas de cada fase, se agitaron vigorosamente y se dejó a 4°C durante una noche, permitiendo nuevamente la separación de ambas fases. La absorción de las prodrogas en ambas fases se determinó espectrofotométricamente a 270 nm.

Los coeficientes de partición ( $P$ ) se calcularon a partir de la relación de absorbancias de los compuestos en cada fase, de acuerdo a:

$$P = \text{abs}_{\text{oct}}/\text{abs}_{\text{PBS}} = C_{\text{oct}}/C_{\text{PBS}}$$

Donde  $abs_{oct}$  y  $abs_{PBS}$  representan las absorbancias en octanol y PBS, y  $C_{oct}$  y  $C_{PBS}$  representan las concentraciones en las mismas fases, respectivamente.

## **IV- Experiencias *in vitro*.**

### **IV-1. Líneas celulares y cultivo celular.**

Las líneas celulares LM2 (Galli et al, 2000) y LM3 (Werbajh et al, 1998) provienen de diferentes adenocarcinomas mamarios murinos surgidos espontáneamente (M2 y M3) en ratones BALB/c.

La línea LM3-SNP, resistente a la citotoxicidad del NO, se obtuvo de la línea celular LM3 luego de sucesivas exposiciones al donador de óxido nítrico SNP (Niziolek et al, 2003). Estas células son 2 veces más resistentes, a la citotoxicidad del NO, produciendo los mismos niveles de NO y cuando se inyectan *in vivo* exhiben menos desarrollo y grado de crecimiento del tumor. Además, la línea LM3-SNP es menos angiogénica que la parental (Galli et al, 1999)

La línea celular LM2 es no productora de NO, mientras que LM3 y LM3-SNP producen NO en cantidades similares (Eijan et al, 1998; Galli et al, 1999).

Las células se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM), suplementado con 2mM de L-glutamina, 40 µg/ml de gentamicina y 5% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron a 37° C en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se utilizaron 48h luego de cada siembra.

### **IV-2. Determinación del número de células.**

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

### **IV-3. Ensayo de viabilidad de MTT.**

La relación fototoxicidad/toxicidad, fue determinada mediante el ensayo de MTT (3-(4,5- dimetil tiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazoliobromuro) (Denzinot & Lang., 1986), método basado en la actividad de la dehidrogenasa mitocondrial, la cual se ha demostrado que correlaciona bien con otras medidas de citotoxicidad, como por ejemplo, formación de colonias (Evans et al, 1997). Luego de los tratamientos, se agregó en cada pocillo, 0,5

mg/ml de MTT y las placas se incubaron a 37° C por 1 h. Como resultado se obtuvieron cristales de formazán, que se disuelven en DMSO y se lee la absorbancia de la solución obtenida a 560 nm en un lector automático de placas (Spectra Count Packard).

#### **IV-4. Tratamiento de TFD.**

Las células se incubaron en medio sin suero conteniendo ALA y 3 h después fueron irradiadas. Luego de la irradiación, el medio se reemplazó por medio con suero sin ALA y las células se incubaron otras 19 h para permitir que ocurra el fotodaño, y se midió la viabilidad. Se define la dosis letal 50 (DL50) como la dosis de luz que produce el 50% de muerte celular, empleando concentraciones de ALA que producen el valor plateau de porfirinas.

#### **IV-5. Tratamiento lumínico.**

Se usaron dos tubos fluorescentes (Osram L 36 W/10) que produce un espectro de luz entre 400 y 700 nm, con la radiación máxima a 600 nm. Las placas se ubicaron sobre una lámina de vidrio a 20 cm de la fuente lumínica. La potencia de luz emitida se midió con un radiómetro Yellow Springs Kettering modelo 65 (Yellow Spring, HO, USA). Se utilizaron potencias entre 0,1 y 1 J/cm<sup>2</sup> y la densidad de poder fue de 0,5 mW/cm<sup>2</sup>.

#### **IV-6. Inducción de resistencia a ALA-TFD.**

La línea LM3-SNP se mantuvo en frascos de 25 cm<sup>3</sup> y se expuso a ciclos de TFD con incremento de concentraciones de ALA (3 h de incubación) en medio sin suero y con aumento de dosis lumínicas (0,18 a 0,24 J/cm<sup>2</sup>) sobreviviendo del 5 al 10% de las células (Tabla IV-1). Luego de 24 h del tratamiento, estas células fueron transferidas a un nuevo frasco y a las dos semanas fueron expuestas al siguiente tratamiento de ALA-TFD. La población final recibió un total de 11 ciclos y fue identificada como LM3-SNPL11. Finalmente, por el método de dilución limitante se aislaron seis clones. Se define DL50 como la dosis de luz que produce el 50% de muerte celular en concentración saturante del pro-fotosensibilizador y el índice de resistencia a ALA-TFD como la relación LD50 del clon resistente/LD50 de LM3-SNP.

**Tabla IV-1:** Ciclos de tratamiento de ALA-TFD para inducir resistencia

Ciclos	Dosis de ALA (mM)	Dosis de Luz (J/cm <sup>2</sup> )
1	0,2	0,18
2	0,2	0,18
3	0,2	0,18
4	0,2	0,36
5	0,2	0,36
6	0,2	0,45
7	0,3	0,75
8	0,5	1,3
9	0,5	1,5
10	0,6	1,7
11	0,6	2,0

#### **IV-7. Sensibilidad de las líneas celulares tumorales a la citotoxicidad inducida por SNP.**

Las células se sembraron por triplicado en placas de 24 pocillos en una densidad de  $7 \cdot 10^4$  células/ml. Después de 48 h de incubación se reemplazó el medio por medio fresco con el agregado de SNP y las células se incubaron otras 18 h. El porcentaje de viabilidad se determinó por el ensayo de MTT. SNP-DL50 se definió como la dosis de SNP (mM) necesaria para producir el 50% de muerte celular. El índice de resistencia a SNP fue definido como la relación DL50 del clon resistente / DL50 de LM3.

#### **IV-8. Resistencia a PpIX exógena.**

Las células se incubaron 2 h en medio conteniendo 1mM de PpIX y se iluminaron con dosis de luz crecientes (0,1 a 2 J/cm<sup>2</sup>). Luego de 19 h se realizó el ensayo de viabilidad de MTT.



#### **IV-9 Determinación de proteínas celulares.**

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

#### **IV-10. Producción de NO.**

Distintas densidades celulares de las diferentes líneas celulares se sembraron por triplicado en placas de 24 pocillos. Luego de 48 h de incubación a 37° C se reemplazó el medio por MEM sin rojo fenol más 5% de SFB. A las 18 h se cuantificó la producción de NO, por medio del agregado del reactivo de Griess (1% sulfamina en 30% de ácido acético con 0,1 % de dicloruro de N-(naftil)etilendiamina en 60% de ácido acético) en el sobrenadante (Loscalzo, 2002). La absorbancia se midió a 550 nm con un espectrofotómetro con lector de placas (Spectra Count Packard). La concentración de nitrito se determinó a partir de una curva estándar de NaNO<sub>2</sub> diluido en medio de cultivo. Los resultados de la producción de NO se expresaron como nmol NO<sub>2</sub>/10<sup>6</sup> células.

También se incubó medio sin células bajo las mismas condiciones y se determinó la producción de NO, la que se expresa como nmol NO<sub>2</sub>/0.5 ml medio. Se comprobó que la presencia de L-NAME, SNP, ALA y arginina en el medio de incubación no interfiere con la reacción de Griess.

#### **IV-11. Medición de Glutation.**

El contenido intracelular de glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG), se determinó mediante una modificación del método de Hissin y Hilf (Galli et al, 1999). Las células sembradas en placas de 6 pocillos, se lavaron dos veces con PBS frío y se levantaron mediante raspado. Luego, se suspendieron en 500 µl de buffer fosfato-EDTA (PEB): 25% HPO<sub>3</sub> (3:1, v/v), se sonicaron en un baño de hielo durante 30 seg a 10 µm de amplitud en un sonicador Soniprep 150 y luego se centrifugaron a 10.000 g por 15 min. Para la determinación de GSH, se mezclaron 200 µl de la suspensión con 1,8 ml de PEB y 100 µg de o-ftaldehído disuelto en metanol. Luego se mantuvo 15 min a temperatura

ambiente y se midió la fluorescencia en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-510, usando como longitudes de onda de excitación y de emisión, 350 nm y 420 nm, respectivamente. Para la determinación de GSSG, se incubó por 30 min. a temperatura ambiente, 200 µl de la suspensión con 200 µl de N-etilmaleimida 0,04 M, agregándole luego 1,6 ml de NaOH 0,1 M. Se agregaron 100 µg de o-ftaldehído, determinando la fluorescencia también a 350 nm y 420 nm para la emisión y la excitación, respectivamente. La cuantificación se realizó utilizando curvas de calibración preparadas con las drogas puras y los resultados se expresan en µg de GSH/GSSG por  $10^5$  células.

#### **IV-12. Actividad de la GSH S-transferasa.**

La actividad de la GSH S-transferasa se midió de acuerdo a la modificación del método de Habig et al, (Granger et al, 1990), empleando 1-cloro-2,4-dinitrobenceno, que es sustrato para las cuatro transferasas (A,B,C y E). Las células se lavaron rápidamente y se suspendieron en PBS, se sonicaron en un baño de hielo por 30 seg con una amplitud de 10 µm y se centrifugaron a 10.000 g por 10 min. El sobrenadante se mezcló con GSH 1mM y 1-cloro-2,4 dinitrobenceno 1 mM en buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5. La reacción tiene lugar durante 3 min a 25° C y el cambio de absorbancia del producto de reacción se midió a 340 nm. La actividad de la GSH S-transferasa se expresó como nmol de producto/  $10^6$  células x min.

#### **IV-13. Determinación intracelular de ALA, derivados de ALA y PBG.**

Las células de la línea LM3 se sembraron en placas de 100 mm. Luego de 72 h, se cambió el medio por medio sin suero conteniendo ALA o derivados de ALA 0,6 mM y se continuó la incubación por 3 h. Pasado ese tiempo las placas se lavaron 4 veces con PBS, se agregó TCA 5% y se separaron las células de las placas por medio de raspado. Luego de una centrifugación, el sobrenadante se utilizó para las determinaciones de ALA o sus derivados y PBG; empleando para ello una modificación del método de Mauzerall y Granick (1956). Para la determinación de ALA o sus derivados, luego de la condensación con acetilacetona, se centrífugo y se cuantificaron los pirroles formados con el reactivo de Ehrlich, midiendo la absorbancia a 555 nm. Como control, se condensaron estándares de

ALA y sus derivados. El agregado de Triton X100 o una sonicación previo al tratamiento con TCA, no modificó la liberación de ALA o derivados de ALA de las células.

Para la determinación de PBG, se agregó directamente el reactivo de Ehrlich al sobrenadante desproteinizado con TCA.

Los valores de ALA y de los derivados de ALA, se obtuvieron por sustracción de los valores de PBG a partir del total de porfirinas condensadas.

#### **IV-14. Separación de ALA y derivados utilizando columnas cromatográficas de intercambio iónico.**

Las células se sembraron en placas de 100 mm. A las 72 h, se eliminó el medio y las células se expusieron 3 h a ALA o derivados de ALA 0,6 mM, en medio sin suero. Finalizada la incubación, las células se lavaron 4 veces con PBS y se agregó TCA al 5%. Se rasparon las placas, se centrifugó y se reunió el contenido de dos placas (3 ml). Se empleó una alícuota de cada sobrenadante para determinar ALA y PBG como se describió previamente, el resto se sembró en una columna de resina Dowex 50 X8 y se eluyó el PBG con 5 ml de agua. Luego se eluyó el ALA con 7 ml de acetato de sodio 1 M y los derivados de ALA con 10 ml de HCl 10 N, como se describió previamente. De esta manera, se separó el ALA de sus derivados, y los porcentajes respectivos se calcularon, sustrayendo previamente la contribución del PBG.

#### **IV-15. Medición de síntesis de porfirinas, luego de extracción química.**

Las células se incubaron con diferentes concentraciones de ALA o sus derivados en medio sin suero. Para extraer las porfirinas acumuladas en las células, se agregó 1 ml de HCl 5% y se dejó a 37° C media hora. El proceso se repitió dos veces, reuniendo los extractos para su cuantificación. Las porfirinas liberadas al medio, se cuantificaron por el agregado directo de 2 ml de HCl 5%. Estas condiciones resultaron ser óptimas para una extracción completa de porfirinas. Las mediciones se realizaron en un espectrofluorómetro Shimadzu RF 510, utilizando una longitud de onda de excitación de 406 nm y de emisión de 604 nm, y empleando PpIX (Porphyrin Products, Logan, Utah, USA) como estándar de referencia.

## **V- Experiencias con eritrocitos.**

### **V-1. Ensayo de ALA dehidrasa en eritrocitos.**

Se utilizó el método de Bustos et al. (1980), lisando 0,5 ml de eritrocitos humanos en 7 ml de buffer Tris HCl 50 mM, pH 7,4, conteniendo Triton X100. La incubación se realizó utilizando 0,2 ml de eritrocitos lisados, en buffer fosfato 50 mM, pH 6,8 y ALA 2,5 mM en un volumen final de 1 ml, durante 1 h a 37° C, con agitación. La reacción se detuvo con el agregado de 0,1 ml de TCA 10%. Luego de una centrifugación se determinó en el sobrenadante, el PBG formado con el reactivo de Ehrlich y se midió la absorbancia a 555 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard. La actividad de ALA-D se expresa en unidades enzimáticas, las que se definen como nmol de PBG/h, ml GR.

### **V-2. Ensayo de Porfobilinogeno Deaminasa en eritrocitos.**

Se utilizó el método de Batlle et al (1978). Los eritrocitos humanos (0,5 ml) se lisaron en 7 ml de buffer Tris HCl 50 mM, pH 7,4 conteniendo Triton X100. Luego, 0,2 ml de eritrocitos lisados se incubaron en buffer Tris HCl 0,5 M pH 8,2 en presencia de porfobilinógeno (PBG) 0,3 mg/ml. Al cabo de 2 h de incubación a 37° C, se detuvo la reacción con TCA 5% (concentración final). Las porfirinas formadas se determinaron en el sobrenadante luego de su centrifugación y exposición a la luz por 30 minutos, y se cuantificaron espectrofotométricamente.

## **VI- Experiencias *in vivo*.**

### **VI-1. Animales.**

Se emplearon ratones machos BALB/c de 12 semanas de vida, pesando entre 20-25 g. Los animales fueron alimentados con dieta Purina 3 (Molinos Río de la Plata) y agua *ad libitum*. Una suspensión de  $1,65 \times 10^5$  células de la línea LM3 se inyectó subcutáneamente en los flancos de los ratones. Las experiencias se realizaron 20 días después de la implantación. Los tumores utilizados tenían un tamaño uniforme de 1 cm diámetro.

Los animales fueron tratados de acuerdo a la guía de Uso y Cuidados de Animales establecida por el Comité de la Asociación Argentina de Especialistas en Animales de Laboratorio (AADEALC) y en total concordancia con la Guía Británica para el Buen Cuidado de animales en Neoplasia Experimental (Workman et al, 1988).

### **VI-2. Administración de ALA y derivados.**

El ALA y los derivados de ALA se disolvieron en solución fisiológica en un volumen final de 0,15 ml inmediatamente antes de la inyección intraperitoneal (i.p.).

Para la administración tópica, el ALA o ésteres de ALA, se disolvieron en 0,3 ml de una solución de polietilenglicol 4000: solución fisiológica (1:1), inmediatamente antes de su uso.

Para la administración tópica de ALA o 3m-ALA se disolvieron en 0,2 ml de solución fisiológica inmediatamente antes de su uso. El agregado de DMSO 10% a esta loción de solución fisiológica constituyó la formulación loción/DMSO. Luego de rasurar la zona tumoral, se aplicaron las formulaciones de ALA y los derivados de ALA sobre el tumor con un pincel suave por un período de 5 min, tiempo en el cual ya no se observan vestigios de la loción.

El área de aplicación se la denominó piel tumoral, mientras que la piel normal fue tomada del flanco opuesto.

### **VI-3. Espectroscopía de fluorescencia.**

Se realizaron mediciones de fluorescencia *in vivo* para seguir la cinética de formación de PpIX luego de la aplicación tópica de ALA o de derivados de ALA. Se acopló a un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS50B una fibra óptica, capaz de conducir la excitación proveniente de la piel, producida por una longitud de onda de 407 nm y registrar la fluorescencia de emisión de la PpIX a los 635 nm. Considerando, el coeficiente de atenuación para la piel, la luz de 407 nm penetra lo suficientemente profundo en la epidermis y la dermis (Van den Akker et al, 2002). La fibra se fijó a la piel con un espaciador de goma que provee una distancia entre la fibra y el tejido, constante y fija de 7 mm. Estas condiciones proporcionan una señal máxima de fluorescencia para cada muestra. Se midió la intensidad de fluorescencia en función del tiempo y se expresó en unidades arbitrarias (U.F.). Además, se hizo un barrido del espectro de emisión para verificar que la señal de fluorescencia correspondía a PpIX, y se vio que no había contribución de porfirinas hidrofílicas. La fluorescencia de PpIX se correlaciona con la concentración de PpIX en la piel tumoral (PT).

### **VI-4. Extracción de porfirinas en tejidos.**

Los animales topicados o inyectados con ALA o sus derivados, fueron sacrificados previa inyección con heparina (0,15 ml, 1000 UI) y luego del sacrificio se perfundieron con 200 ml de solución fisiológica estéril. Se extrajeron los tejidos y se homogeneizaron en una solución de acetato de etilo:ácido acético glacial (4:1) (Fukuda et al, 1994). Las mezclas se centrifugaron por 30 min a 3000 g, y las porfirinas de la fase acuosa se extrajeron con HCl 5%, repitiéndose la extracción hasta que no se detectó fluorescencia en la fase orgánica. Se utilizó un espectrofluorómetro Shimadzu RF-510, fijando la longitud de onda de emisión en 604 nm y la longitud de onda de excitación en 406 nm, parámetros que permiten detectar tanto las porfirinas hidrofílicas como las hidrofóbicas. Como estándar de referencia se empleó PpIX (New Frontiers, USA).

#### **VI-5. Determinación de ALA en cerebro.**

Los ratones se inyectaron con ALA o THP-ALA y luego de 5 min, se sacrificaron y se extrajeron los cerebros de manera cuidadosa. A las muestras se les agregó TCA 5% final, para desproteínizar y se centrifugaron 30 min a 3000 g. Para la determinación de ALA se utilizó el método de Mauzerall y Granick modificado (1956). La reacción de condensación se desarrolla a pH 4,6 en presencia de acetyl acetona y los pirroles resultantes se cuantifican a 555 nm luego de la adición del reactivo de Ehrlich. También se condensaron los estándares de ALA y THP-ALA para ser utilizados en los cálculos.

#### **VI-6. Afinidad de ALA y derivados de ALA por los tejidos.**

En este experimento se prepararon los homogenatos con 0,5 g de tejido y buffer acético-acetato 1M pH 4,6 (10% p/v), luego se agregaron ALA o los derivados de ALA en una concentración final de 0,125 mM y todo el sistema se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. El tiempo de incubación, el pH y la temperatura, no cambiaron a lo largo de los experimentos. Finalmente, se agregó TCA 5% (concentración final) para precipitar las proteínas y se centrifugaron los homogenatos por 30 min a 3000 g. Los sobrenadantes, se conservaron y los precipitados se lavaron tres veces con buffer acético acetato, utilizando todos los sobrenadantes para las determinaciones de ALA/ALA derivados. Los cuatro sobrenadantes se condensaron con acetyl acetona y el ALA o los derivados de ALA se determinaron como se describió previamente. Los porcentajes de recuperación de ALA o de derivados de ALA se calcularon teniendo en cuenta los controles de condensación realizados sin tejido.

## **VII- Cultivo de explantes de órganos.**

Se utilizó el sistema de cultivo de explantes de órganos desarrollado por Polo et al (1988). Explantes de alrededor de 50 mg en medio mínimo esencial de Eagle, suplementado con L-glutamina 2 mM y gentamicina (40 µg/ml) se incubaron a 37° C durante 3 h en presencia de ALA o derivados de ALA 0,6 mM en placas de 24 pocillos. Al cabo de ese tiempo, se lavaron con PBS y se realizó la extracción de porfirinas de la misma manera que se describió para los tejidos. Las condiciones de tiempo y concentración óptimas fueron descritas por Fukuda et al (1989).



### **VIII- Análisis estadístico.**

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

## **REFERENCIAS**

Batlle A, Wider E, Stella A (1978) A simple method for measuring erythrocyte porphobilinogenase, and its use in the diagnosis of acute intermittent porphyria. *Int J Biochem.* 9: 871-876.

Battah S, Chee C, Nakanishi H, Gerscher S, MacRobert A, Edwards C (2001) Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for Photodynamic Therapy. *Biocon. Chem.* 12: 980-988

Bustos N, Stella A, Wider E, Batlle A (1980) Studies on erythrocytic aminolevulinic acid dehydratase. I. Its purification and possible therapeutic applications. *Int. J. Biochem.* 12: 745-750.

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277

Eiján A, Davel L, Rueda H, Rozenberg G, Lustig E, Jasnís M (1998) Differential nitric oxide release and sensitivity to injury in different murine mammary tumour cell lines. *Int. J. Mol. Med.* 2: 625-630.

Evans P, Whiteman M, Tredger M, Halliwell B (1997) Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids, *Free Rad. Biol. Med.* 23: 1002-1008.

Fukuda H, Paredes S, Batlle A (1989) Tumour-localizing properties of porphyrins. *In vitro* studies using the porphyrin precursor, aminolevulinic acid, in free and liposome encapsulated forms. *Drugs Design and Delivery* 6: 133-139.

Galli S, Colombo L, Vanzuli S, Daroqui M, Vidal M, Jasnís A, Lustig E, Eiján A (2000) Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 17: 1259-1265.

Galli S, Davel L, Jasnis M, Sales M, Lustig E, Eijan A (1999) Selección de una línea de células tumorales resistente a la citotoxicidad por óxido nítrico. *Medicina Buenos Aires* 59: 631.

Granger D, Hidds J, Perfect J, Durack D (1990) Metabolic fate of L-arginine inhalation to microbiostatic capability of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 85: 264-273.

Leonard J, Lygo B, Procter G (1996) En *Advanced Practical Organic Chemistry*. Ed. Thormes N., London.

Loscalzo J (2002) Oxidative stress in endothelial cell dysfunction and thrombosis. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 32: 359-360.

Mauzerall M, Granick S (1956) The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* 219: 435-437.

Niziolek M, Korytowski W, Girotti A (2003) Nitric oxide inhibition of free radical-mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells, *Free Rad. Biol. Med.* 24: 997-1005.

Polo C, Navone N, Afonso S, Vazquez E, Buzaleh A, Buanchi A, Schoua E, Batlle A (1988). Induction of porphyrin biosynthesis in tissue explants and the effect of antimetotics. *ATLA* 16: 137-147

Shriner R, Fuson R, Curtin D (1980) *Aplicación de test de clasificación. En: Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Manual de laboratorio.* Ed. Limusa, México. Grupo Noriega Editores.

Takeya H (1992) Preparation of 5-aminolevulinic acid alkyl esters as herbicides. *Chem. Abs.* 116: 189633 m.

Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N (2000) 5-aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J. Photochem. Photobiol.* 54: 72-80

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

Van den Akker J, Iani V, Star W, Sterenborg H, Moan J (2000) Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: Differences in Protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum. *Photochem. Photobiol.* 72: 681-689.

Werbajh S, Urtreger A, Puricelli L, de Lustig E, Bal de Kier Joffe E, Kornblihtt A (1998) Downregulation of fibronectin transcription in highly metastatic adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 440: 277-281.

Workman P, Twentyman P, Balkwill F, Balmain A, Chaplin D, Double J, Embleton J, Newell D, Raymond R, Stables J, Stephens T, Wallace J (1998) United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (Second Edition). *Br. J. Cancer* 77: 1-10.

## **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

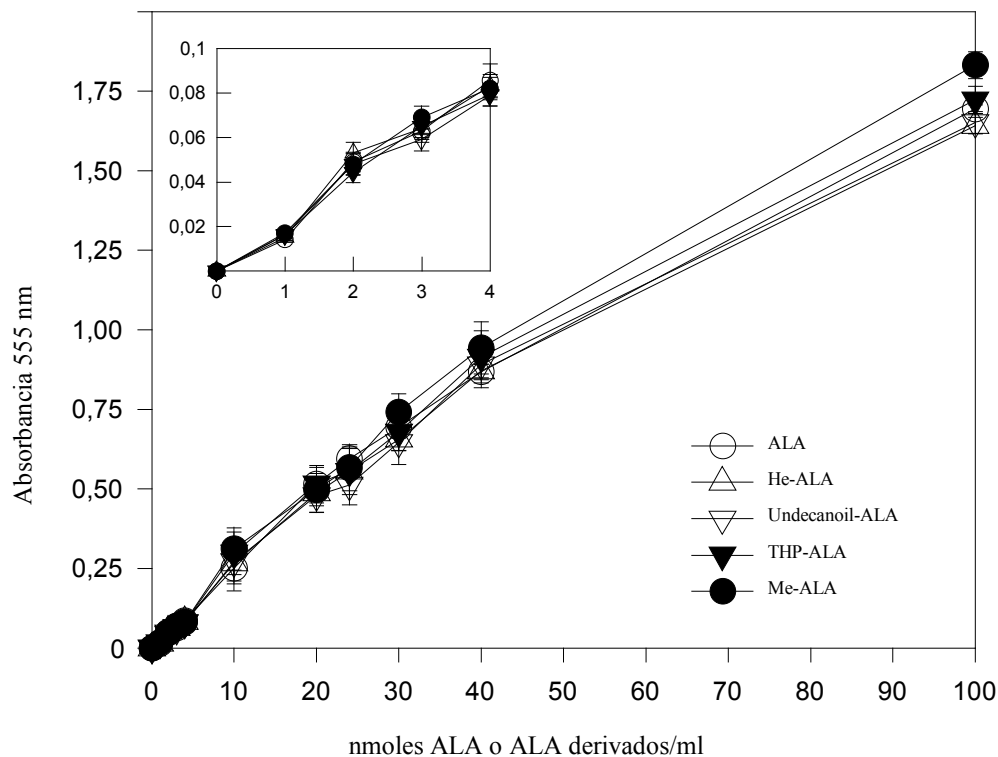
## **I- Separación de ALA y los derivados de ALA mediante cromatografía de intercambio iónico.**

### **I-1. Validación del método de cuantificación de los derivados de ALA.**

Se empleó el método de Mauzerall y Granick (1956) como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura I-1. La relación entre la absorbancia a 555 nm y la concentración de ALA o derivados de ALA resultó ser lineal hasta los 100 nmoles/ml. El desvío estándar fue el mismo tanto para ALA como para sus derivados (menos de 5 %), y el límite de detección para todos los compuestos de ALA ensayados fue de 1 nmol/ml.

Los espectros de absorbancia de los pirroles productos de condensación tanto de ALA como sus derivados ésteres con el reactivo de Ehrlich fueron idénticos, lo que demuestra que con este reactivo se pueden detectar sin distinción tanto ALA como sus derivados éster.

Con el fin de determinar la naturaleza de los productos de condensación de los derivados de ALA que participan en la reacción de Ehrlich, se realizaron los siguientes ensayos. En el primero, luego de condensar el derivado He-ALA con acetyl acetona se liofilizó la mezcla a los efectos de eliminar el exceso de acetyl acetona no reaccionante y luego se realizó una cromatografía en TLC. Empleando hidroxilamina según el método de Shriner et al (1980), se identificó el grupo éster del Hexil-ALA. Por otro lado, cuando una solución de He-ALA en buffer acetato de pH 4,5 se sometió a 10 min de calentamiento a 100° C, se identificó también por TLC, la presencia de He-ALA y no la de ALA. Resultados similares se obtuvieron luego de mezclar una solución de He-ALA con el reactivo de Ehrlich. Estos resultados permiten descartar la hipótesis de una hidrólisis de los ésteres en las condiciones en que se desarrolla la condensación aldólica, y por el tratamiento de ácidos como el reactivo de Ehrlich.



**Figura I-1:** Validación del método para derivados de ALA.

El ALA y los derivados de ALA se determinaron como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como nanomoles de ALA / derivados de ALA por ml de mezcla de reacción, antes del agregado del reactivo de Ehrlich.

## I-2. Elución de ALA y derivados de ALA por cromatografía de intercambio iónico.

La Tabla I-1 muestra el porcentaje de recuperación de ALA y los derivados de ALA luego del pasaje de soluciones de concentración 6; 0,6 y 0,06  $\mu\text{M}$ , a través de una columna de intercambio iónico Dowex X-50 y elución con acetato de sodio 1M.

La recuperación de ALA en el eluido con acetato de sodio fue de alrededor del  $90 \pm 4$  % para las tres concentraciones ensayadas, de esa cantidad el 85 % se eluyó en las fracciones entre 3 y 6 ml. Teniendo en cuenta las fracciones recogidas, y que en cada

fracción se puede detectar un mínimo de 2 nmol ALA/ ml, sería entonces posible detectar un total de 9,5 nmoles de ALA. Pero si consideramos que el porcentaje de recuperación del ALA sembrado es de alrededor del 90 %, podríamos decir que en realidad son 12 los nmoles totales de ALA detectables por este método

En el caso de los derivados Hexil, Undecanoil y THP-ALA, para todas las concentraciones ensayadas, se recuperó en la fracción acetato de sodio de un 3 al 9 % del total sembrado. Este bajo porcentaje puede deberse a un pequeño porcentaje de ALA libre presente como impureza en los ésteres de ALA. Para el Metil-ALA el porcentaje de éster detectado en las fracciones de acetato de sodio fue algo mayor, llegando a un 20-30% de recuperación.

Es de hacer notar que en estas experiencias el ALA y los derivados de ALA se disolvieron en ácido tricloroacético (TCA), ya que este es el ácido normalmente utilizado para precipitar las proteínas, obteniéndose los mismos resultados cuando los compuestos se disolvieron en agua destilada.

**Tabla I-1:** *Porcentaje de recuperación de ALA o derivados de ALA en los eluidos de acetato de sodio*

µmoles de ALA / derivados de ALA sembrados	6 µmoles	0,6 µmoles	0,06 µmoles
ALA	89,1 ± 4,30	91,2 ± 3,20	94,4 ± 5,20
He-ALA	5,4 ± 0,36	6,4 ± 0,35	2,7 ± 0,18
Me-ALA	28,3 ± 0,15	27,5 ± 0,12	21,8 ± 0,11
Und-ALA	6,8 ± 0,25	5,3 ± 0,14	6,4 ± 0,21
THP-ALA	9,2 ± 0,45	11,3 ± 0,53	2,5 ± 0,07

*Se sembraron diferentes cantidades de ALA o derivados de ALA (6; 0,6 y 0,06 µmoles) en las columnas de Dowex 50-X8 (3 g) y se eluyeron con 7 ml de acetato de sodio 1 M, recogándose fracciones de 1ml. En cada fracción se cuantificó el contenido de ALA/derivado de ALA según se detalla en Materiales y Métodos y la suma total se expresa como porcentaje de ALA o derivados de ALA recuperados.*



Con el fin de eluir los derivados de ALA retenidos en la columna, se probaron diferentes soluciones de alta fuerza iónica: acetato de sodio 2 M y 3 M, HCl 1 N y 4 N, BaCl<sub>2</sub> 1 M y KOH 5 M. En todos los casos sólo se logró eluir de un 5 al 10 % de la cantidad total sembrada. Con acetato de amonio 2 o 3 M, se observaron interferencias en la cuantificación colorimétrica de los eluidos.

Finalmente una elución con HCl 10 M permitió recuperar la casi totalidad de los ésteres Hexil, Undecanoil y THP-ALA, en las tres concentraciones ensayadas (Tabla I-2). La cromatografía en TLC de los eluidos de las columnas previamente dializados, confirmaron la presencia mayoritaria de los ésteres de ALA, lo que permite descartar la hipótesis de que en las condiciones ácidas de elución se produzca la hidrólisis y liberación de los derivados unidos a la resina. Por otro lado, con el éster Me-ALA, la recuperación en las fracciones clorhídricas fue del 70%.

**Tabla I-2:** *Porcentaje de recuperación de ALA o derivados de ALA en los eluidos de HCl 10 M*

µmoles de ALA / derivados de ALA sembrados	6 µmoles	0,6 µmoles	0,06 µmoles
ALA	15,0 ± 0,77	0	0
He-ALA	95,6 ± 3,82	102,0 ± 6,12	83,4 ± 4,97
Me-ALA	71,5 ± 2,15	68,7 ± 4,33	73,6 ± 3,18
Und-ALA	98,3 ± 5,30	95,4 ± 5,77	75,6 ± 4,64
THP-ALA	97,6 ± 4,15	101,0 ± 6,28	77,8 ± 3,87

*Continuando con la experiencia indicada en la Tabla I-1, a las columnas Dowex 50-X8 eluidas con acetato de sodio 1 M, se las trató con 10 ml de HCl 10M, y se recogieron fracciones de 1 ml. En cada uno de ellos se cuantificó el contenido de ALA/derivado de ALA según se detalla en Materiales y Métodos y la suma total se expresa como porcentaje de ALA o derivados de ALA recuperados.*

A diferencia de lo que sucede con la elución del ALA con acetato de sodio, con HCl 10 M los ésteres de ALA se van disociando de la resina en forma gradual, de manera tal

que todas las fracciones eluidas contienen entre un 10 a un 20 % del total sembrado en la columna. Esta mayor distribución de los ésteres a lo largo de todas las fracciones eluidas hace que la sensibilidad del método para estos derivados sea 5 veces menor comparado con el ALA, de manera tal que, si se tiene en cuenta el ajuste del pH por agregado de NaOH, este límite llega a 5 nmol por ml de fracción. Considerando la variación de recuperación en los eluidos, se calcula que el límite de detección fue de 50 nmoles. Cuando se sembraron 0,06  $\mu$ moles (60 nmoles) se subestimó un 10 % del total.

Cuando se sembraron 6  $\mu$ moles de ALA, se recuperó sólo un 10 % en las fracciones de HCl, debido a la saturación de la resina bajo estas condiciones.

### **I-3. Separación de mezclas de ALA y derivados de ALA.**

Se prepararon diferentes mezclas de concentraciones equimolares de ALA y derivados de ALA (6; 0,6 y 0,06  $\mu$ moles de ALA y una cantidad igual de los distintos derivados de ALA), que se sembraron en una columna de Dowex 50-X8 y eluyeron con acetato de sodio 1 M y HCl 10 M en forma sucesiva, como fue descrito previamente. Los porcentajes de ALA y derivados de ALA recuperados fueron los mismos que se obtuvieron con los compuestos en forma separada (datos no mostrados).

### **I-4. Determinación de ALA, derivados de ALA y PBG en células.**

La Tabla I-3 muestra la acumulación de ALA y derivados de ALA en células LM3 incubadas con ALA o derivados de ALA y el porcentaje de ALA presente en la forma libre. Se puede observar que el ALA y/o He-ALA acumulado a partir de He-ALA es 4 veces mayor que el ALA acumulado a partir de ALA, pero que sólo el 20% del He-ALA ha sido hidrolizado a ALA libre. La cantidad de ALA y/o THP-ALA acumulado a partir de THP-ALA es 2,8 veces mayor que la cantidad acumulada a partir de ALA pero sólo el 40 % es convertido a ALA libre. Finalmente para Und-ALA, el ALA y/o Und-ALA acumulado en las células es mucho menor comparado con los otros dos derivados, y no se pudo separar por cromatografía iónica.

Debido a la baja sensibilidad del método para la determinación de los derivados de ALA en los eluidos de HCl, el porcentaje de ALA libre fue calculado considerando los resultados obtenidos en los eluidos de acetato de sodio y el total de ALA luego de sustraer

la contribución de PBG, de esta manera se calculó la recuperación de los derivados de ALA en los eluidos de HCl.

La cantidad de PBG detectada fue muy baja para todas las condiciones ensayadas (datos no mostrados), y si tenemos en cuenta que el PBG no es retenido en las resinas Dowex 50-X8, podemos entonces asegurar que no hay posibilidad de interferencias de este compuesto en la cuantificación de ALA o derivados de ALA en los eluidos colectados.

**Tabla I-3:** *Acumulación de ALA y derivados de ALA en células LM3*

	nmoles totales de ALA / derivados de ALA <sup>1</sup>	Porcentaje de ALA <sup>2</sup>
Control	2,24 ± 0,09	100
ALA	18,06 ± 0,90	100
He-ALA	58,72 ± 8,58	20
Und-ALA	4,36 ± 0,14	N.D.
THP-ALA	50,19 ± 6,49	40

<sup>1</sup> La cantidad de ALA o derivados ALA en las células se cuantificaron según se describe en *Materiales y Métodos* luego de 3 h de incubación con 0,6 mM de cada uno de los compuestos. Los controles corresponden a niveles basales de células no tratadas. N.D.: no-detectable por este método, sin distinción entre ALA y derivados.

<sup>2</sup> El ALA se diferenció de los derivados de ALA empleando los datos de los eluidos de acetato de sodio. El porcentaje de ALA libre se calculó con los datos del total de ALA+ALA derivados (<sup>1</sup>), después de sustraer la contribución de PBG.

### **I-5. Discusión.**

En este capítulo se ha demostrado que es posible cuantificar los derivados ésteres de ALA por la técnica clásica de Mauzerall y Granick, mediante una condensación con acetil acetona seguida del tratamiento con el reactivo de Ehrlich, método comúnmente utilizado para la determinación de ALA en fluidos biológicos. El espectro de absorbancia para los productos de la condensación con el reactivo de Ehrlich fue idéntico tanto para ALA como para los derivados de ALA y los ensayos realizados demostraron que los ésteres no se

hidrolizan durante el proceso de condensación ni durante la reacción con el reactivo de Ehrlich.

También se describe el desarrollo de un método simple y económico para separar ALA de sus derivados, basado en una cromatografía de intercambio iónico. Considerando que el ALA es retenido en las columnas catiónicas Dowex 50-X8 por medio de su grupo amino, los derivados de ALA deberían ser retenidos por este mismo mecanismo. Sin embargo, fue necesario utilizar una alta fuerza iónica para liberar los derivados de ALA de la resina. Nuestra hipótesis es que las condiciones altamente ácidas producidas por el HCl 10 M conducen a una relajación estructural de la resina, la cual permite liberar las moléculas atrapadas. Luego de regenerarlas, las columnas se pudieron reutilizar conservando sus propiedades, indicando que los cambios producidos por las condiciones ácidas son reversibles.

Mientras que las interacciones iónicas están involucradas en la retención de todos los derivados de ALA, otros factores, además de esas interacciones contribuirían en su liberación. La longitud de la cadena lateral del compuesto es aparentemente crucial en este proceso, ya que el derivado de cadena más corta, el éster Metil-ALA, es retenido en la resina en forma parcial: un 30 % eluye con el acetato de sodio 1 M y el 70% restante con el HCl 10 M. Por otro lado, una estructura cíclica como la del tetrahidropiranyl es también atrapada en la resina, y lo mismo sucede con la extensión de las cadenas de hexil y undecanoil.

Cuando los mismos experimentos se realizaron en batch en lugar de columna, los resultados obtenidos fueron idénticos, lo que descarta la importancia del tamaño de las partículas de la resina o de la retención de las moléculas a lo largo de las columnas. Considerando la posibilidad de que ocurra una interacción con las moléculas de divinil benceno-poliestireno, se utilizó entonces una resina Dowex 50-X2, la cual posee un porcentaje menor de entrecruzamiento que la Dowex 50-X8, y vimos que tanto el Undecanoil-ALA como el He-ALA son igualmente retenidos, mientras que los ésteres de ALA con cadenas cortas o cíclicas como el Me-ALA y el THP-ALA, eluyen respectivamente un 100% y un 70 % con el acetato de sodio 1 M (datos no mostrados). Este incremento de liberación en las fracciones de acetato de sodio, refuerza la hipótesis que la longitud de cadena del derivado resulta determinante en la interacción con la resina.

Empleando una línea celular como la del adenocarcinoma mamario LM3, fue posible diferenciar el ALA de sus derivados Hexil y THP, y se observó que estos ésteres se

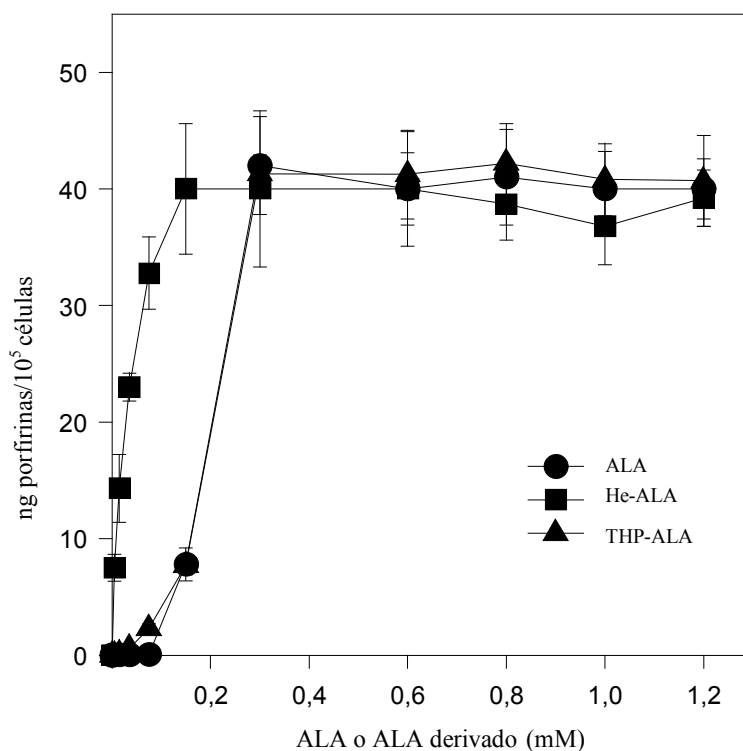
hidrolizan parcialmente dentro de la célula, lo que demuestra las limitaciones de las esterasas celulares en este proceso. No fue posible utilizar este método para separar ALA y Me-ALA debido a la superposición de los perfiles de elución.

Este método permitió separar y cuantificar ALA de sus derivados ésteres, de manera tal que se pudo emplear en determinaciones en extractos celulares. En las células LM3 utilizadas en este trabajo, donde la síntesis de porfirinas alcanza un plateau con 0,6 mM de ALA o derivados de ALA, hay de un 20 a un 40% de conversión de los ésteres de ALA en ALA, y la cantidad intracelular de ésteres de ALA es lo suficiente alta como para ser detectada por este método. Hay que tener en cuenta sin embargo que, de acuerdo a la literatura, diferentes líneas celulares alcanzan el plateau de síntesis de porfirinas con diferentes concentraciones de ALA. Además, la actividad de las esterasas depende del tipo celular y consecuentemente, podría eventualmente necesitarse una mayor cantidad de células para ajustar el límite de detección del método desarrollado.

## II- Terapia fotodinámica. Regulación de la síntesis de porfirinas e hidrólisis de ésteres de ALA.

### II-1. Síntesis de porfirinas en células, a partir de ALA y sus derivados.

Se incubaron células de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM 3, con diferentes concentraciones de ALA, He-ALA y THP-ALA, durante 3 hs, al cabo de las cuales se cuantificaron las porfirinas como se detalla en Materiales y Métodos.



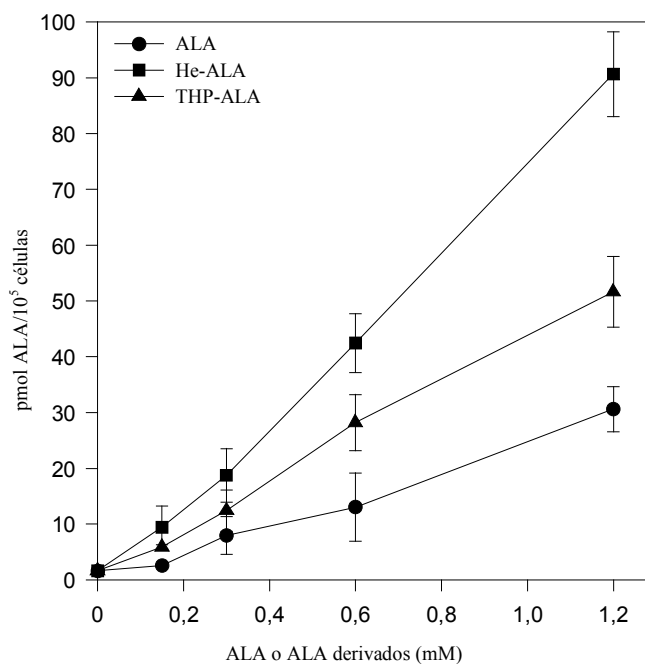
**Figura II-1:** Síntesis de porfirinas en función de la concentración de ALA y derivados de ALA

Se incubaron células de la línea LM3 durante 3 h en presencia de ALA, THP-ALA y He-ALA en placas de 24 pocillos, a las concentraciones indicadas. Al cabo de ese tiempo se cuantificaron las porfirinas intracelulares fluorométricamente y se normalizaron por número de células.

Como puede observarse en la Figura II-1, el perfil de porfirinas intracelulares acumuladas con THP-ALA es similar al obtenido con ALA, mientras que el He-ALA induce una significativa síntesis de porfirinas a una concentración 2 veces menor. Sin embargo la cantidad de porfirinas alcanzadas en el plateau es similar para los tres compuestos.

## II-2. Incorporación de ALA y derivados de ALA en las células.

Para estudiar la incorporación de ALA y los derivados de ALA en las células LM3, se incubaron las mismas con diferentes concentraciones de los compuestos durante 3 horas. Al cabo de ese tiempo, se determinó la cantidad de ALA y derivados de ALA, obteniéndose los resultados graficados en la Figura II-2.



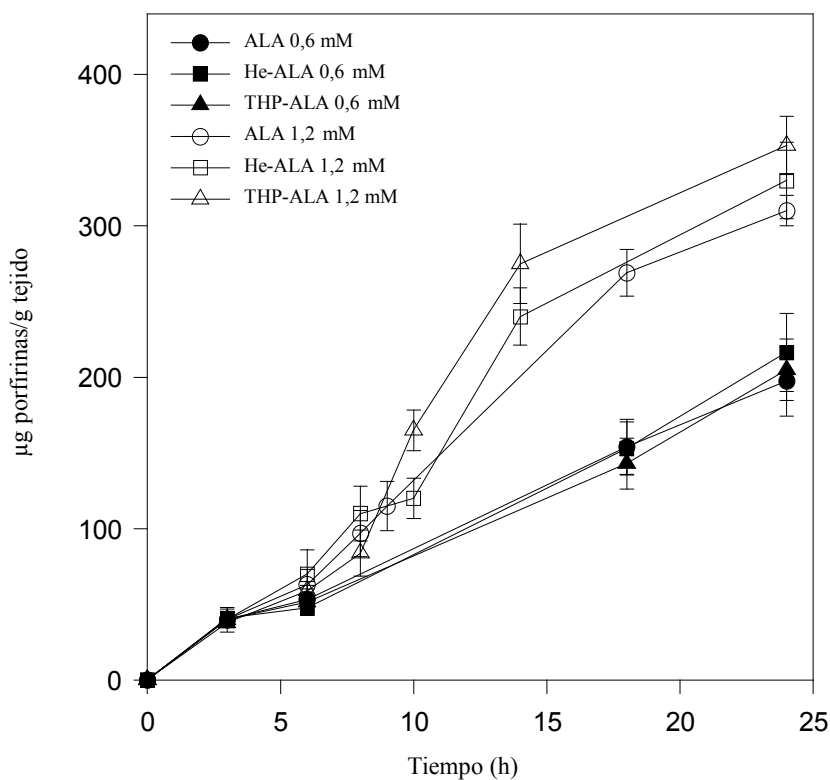
**Figura II-2:** Incorporación de ALA y derivados de ALA en células de la línea LM3 en función de la concentración

Las células se incubaron 3 horas en presencia de diferentes cantidades de ALA y sus derivados en placas de Petri de 100 mm. La cantidad ALA/ALA derivados acumulados en las células se determinó como se describe en *Materiales y Métodos*, y se normalizó por el número de células.

En todo el rango de concentraciones estudiado, la cantidad de compuesto incorporado en las células fue mayor con He-ALA, seguido por THP-ALA y ALA.

### II-3. Síntesis de PBG y porfirinas en función del tiempo de incubación.

Se analizó la formación de porfirinas en función del tiempo de incubación con dos concentraciones de ALA y sus derivados: 0,6 y 1,2 mM. Los resultados se grafican en la Figura II-3. Se observó que, para ambas concentraciones, tanto ALA como sus derivados alcanzan un valor de plateau similar.

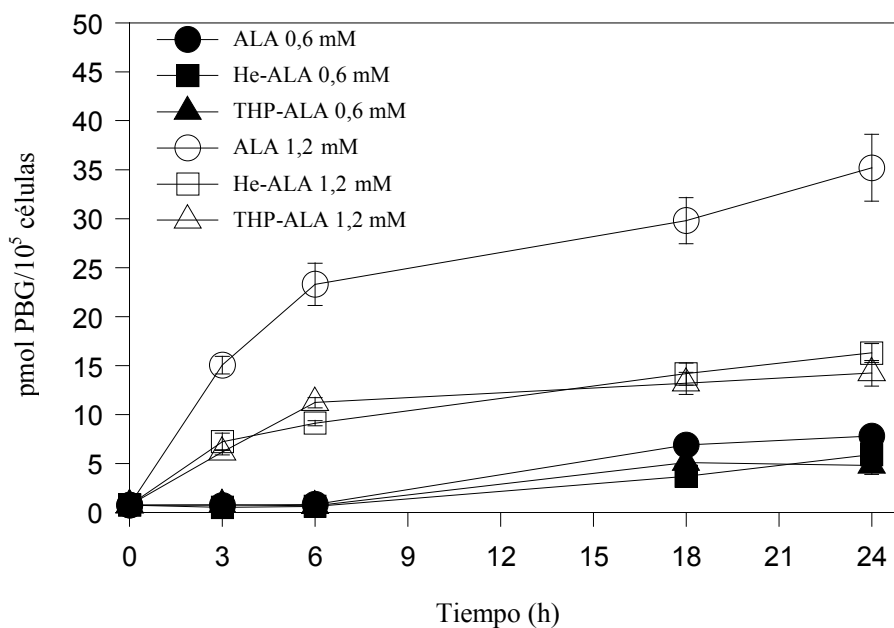


**Figura II-3:** Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación en presencia de ALA y derivados de ALA bajo condiciones saturantes de concentración

Las células se incubaron con 0,6 o 1,2 mM de ALA, THP-ALA y He-ALA en placas de 24 pocillos. A los tiempos indicados se extrajeron y cuantificaron las porfirinas como se describe en Materiales y Métodos y se normalizaron por el número de células.



En cambio la síntesis de PBG en el rango de tiempos estudiado es diferente para ALA y los derivados (Figura II-4). Utilizando una concentración 0,6 mM, la cantidad de PBG acumulada es muy baja, sobrepasando los valores basales sólo con períodos de incubación de más de 18 horas, tanto para ALA como para sus ésteres. Pero cuando la concentración de los compuestos se eleva a 1,2 mM, el ALA induce una acumulación de PBG significativamente mayor que los derivados éster, durante todo el rango de período de tiempo estudiado.



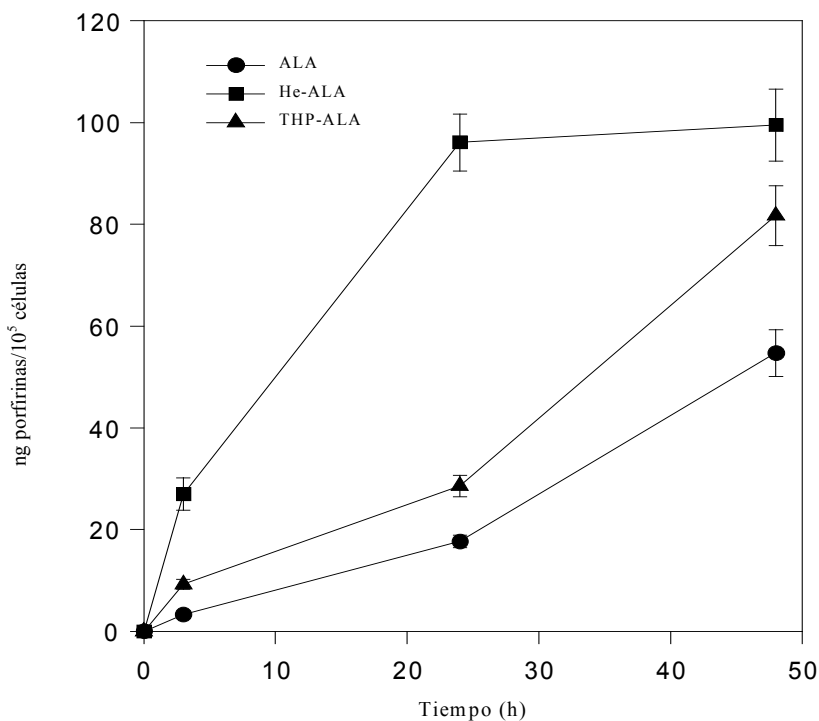
**Figura II-4:** Acumulación intracelular de PBG a partir de ALA y derivados de ALA

Las células se incubaron con 0,6 o 1,2 mM de ALA, THP-ALA y He-ALA en placas de Petri de 100 mm. A los tiempos indicados se determinó la cantidad de PBG intracelular como se indica en *Materiales y Métodos* y se normalizó por el número de células

#### II-4. Consumo intracelular de ALA y derivados de ALA.

Con el fin de evaluar si la disponibilidad de ALA o los derivados de ALA hidrolizados intracelularmente y el consumo de los mismos ocurren en la misma proporción, se incubaron las células con una concentración baja y no saturante de ALA y de

sus derivados, durante tiempos de incubación prolongados, de manera tal que los compuestos se consuman completamente. A las 48 h se observó (Figura II-5) que los niveles de porfirinas formados a partir de He-ALA y THP-ALA fueron 2 y 1,5 veces mayor que la cantidad de porfirinas formadas a partir de ALA. Estas experiencias no pudieron completarse debido al alto grado de muerte celular.



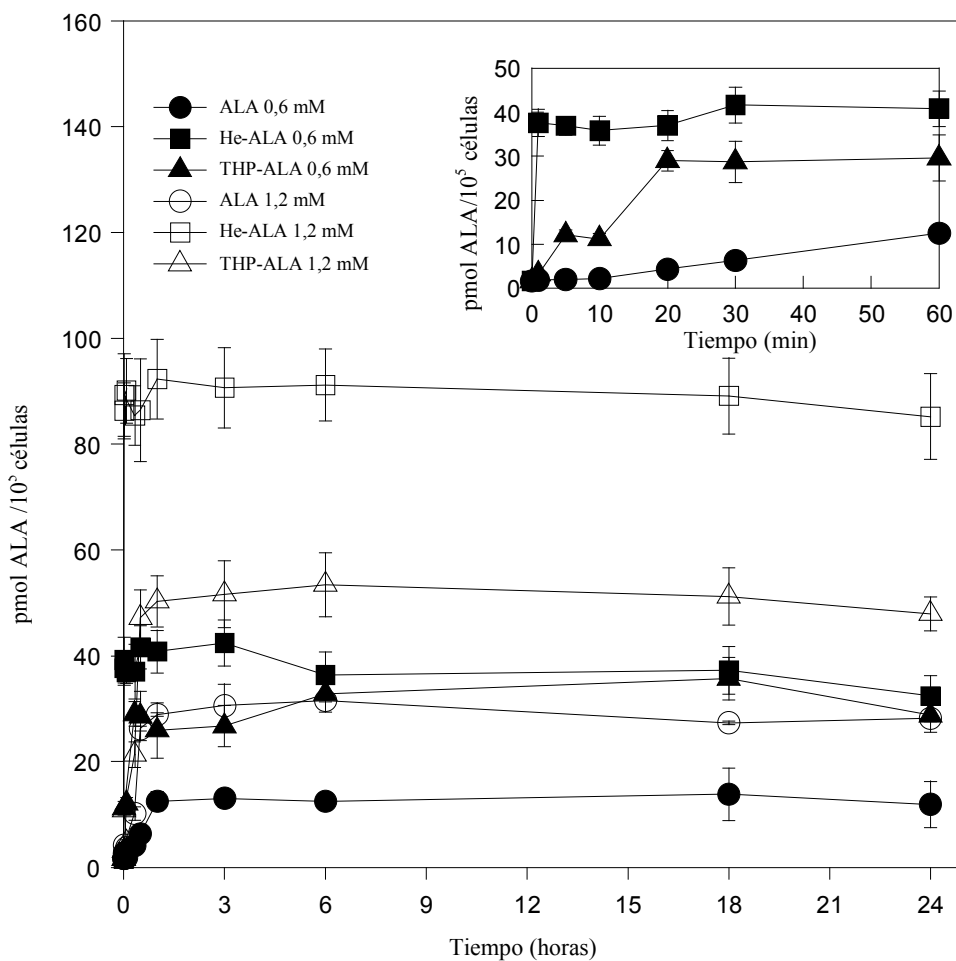
**Figura II-5:** Síntesis de porfirinas en función del tiempo en presencia de bajas concentraciones de ALA y derivados de ALA.

Las células fueron incubadas con ALA, THP-ALA y He-ALA 0,05 mM en placas de 24 pocillos. A los tiempos indicados se extrajeron y cuantificaron las porfirinas como se describe en Materiales y Métodos y se normalizaron por el número de células.

### II-5. Cinética de incorporación de ALA y derivados de ALA.

La Figura II-6 muestra la cinética de incorporación del ALA y de los derivados de ALA. Empleando ALA o ésteres de ALA a una concentración 0,6 mM, las velocidades de incorporación son 0,13 pmol/min/10<sup>5</sup> células para ALA, 1,5 pmol/min/10<sup>5</sup> células para

THP-ALA y 23,5 pmol/min/10<sup>5</sup> células para el He-ALA. Mientras que He-ALA difunde rápidamente dentro de las células y alcanza un plateau luego de 1 min, tanto ALA como THP-ALA se incorporan más lentamente, alcanzando los valores de plateau a los 30 min de incubación. Estos mismos tiempos de plateau se encontraron empleando una concentración 1,2 mM.



**Figura II-6:** Incorporación de ALA y derivados de ALA en las células en función del tiempo de incubación.

Las células se incubaron en presencia de 0,6 o 1,2 mM de ALA y sus derivados en placas de Petri de 100 mm. A diferentes tiempos se determinó la cantidad de ALA/ derivados de ALA intracelular como se describió en Materiales y Métodos y se normalizó por el número de células.

Los estudios de eflujo realizados a 4°C y 37°C mostraron que tanto el ALA como sus ésteres se traslocan desde las células rápidamente y en grado proporcional a la

concentración intracelular. Las diferencias encontradas en las experiencias a 4°C y 37°C indican que el proceso está mediado por difusión (datos no mostrados).

## II-6. Hidrólisis intracelular de los derivados de ALA.

La Tabla II-1 muestra la cantidad de ALA intracelular hidrolizado al emplear diferentes concentraciones de derivados.

**Tabla II-1:** ALA intracelular a partir de diferentes concentraciones de derivados de ALA en células LM3

		pmoles ALA/derivado de ALA/10 <sup>5</sup> células <sup>1</sup>	pmoles ALA/10 <sup>5</sup> células <sup>2</sup>	% ALA <sup>2</sup>
ALA	0,3 mM	7,96 ± 0,61	7,96 ± 0,61	100
	0,6 mM	13,05 ± 0,90	13,05 ± 0,90	100
	1,2 mM	30,59 ± 4,06	30,59 ± 4,06	100
He-ALA	0,3 mM	18,74 ± 1,37	4,76 ± 0,34	25,4
	0,6 mM	42,41 ± 6,20	8,48 ± 1,24	20,0
	1,2 mM	90,64 ± 7,60	11,78 ± 0,99	13,1
THP-ALA	0,3 mM	12,42 ± 2,61	6,73 ± 1,41	54,2
	0,6 mM	28,20 ± 2,76	11,81 ± 1,15	41,9
	1,2 mM	51,62 ± 6,32	16,93 ± 2,07	32,8

Las células se sembraron en placas de 100 mm y se incubaron 3 h con ALA y los derivados de ALA

<sup>1</sup> Concentraciones intracelulares de ALA + derivados de ALA. Se determinaron según se describe en Materiales y Métodos.

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

Puede verse que a mayor concentración del éster mayor es la cantidad de ALA incorporado. Sin embargo, el porcentaje hidrolizado de ALA decrece con el aumento de las concentraciones de los derivados de ALA, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación por esterasas. Se realizaron controles de los ésteres de ALA incubando en un

medio sin suero, en los que se observó que la hidrólisis es insignificante. El grado de hidrólisis de los ésteres no se modificó cuando se incubó por períodos prolongados de hasta 24 horas (datos no mostrados).

## II-7. Acción de la inhibición de la síntesis de porfirinas.

La succinil acetona (SA) es un compuesto estructuralmente similar al ALA, y como tal, un inhibidor competitivo de la enzima ALA Dehidrasa (Tschudy et al, 1981). Se trataron las células con este compuesto con el fin de inhibir la síntesis de porfirinas, y estudiar la regulación de la acumulación de ALA y la hidrólisis de los ésteres de ALA.

**Tabla II-2:** Acumulación intracelular de ALA y derivados de ALA bajo condiciones de inhibición de síntesis de porfirinas.

	pmoles ALA o ALA derivado/10 <sup>5</sup> células <sup>1</sup>	pmoles ALA /10 <sup>5</sup> células <sup>2</sup>	% ALA <sup>2</sup>
Control	1,62 ± 0,07	1,62 ± 0,07	100
Control + SA	1,68 ± 0,10	1,68 ± 0,10	100
ALA	13,05 ± 0,90	13,05 ± 0,90	100
ALA + SA	39,40 ± 5,15	39,40 ± 5,15	100
He-ALA	42,41 ± 6,20	8,48 ± 1,24	20
He-ALA + SA	48,15 ± 7,85	9,93 ± 2,19	28
THP-ALA	28,20 ± 2,76	11,28 ± 1,10	40
THP-ALA + SA	32,15 ± 6,31	12,86 ± 4,55	36

Las células se sembraron en placas de 100 mm y se incubaron 3 h con 0,6 mM de ALA o derivados de ALA, en presencia y en ausencia de succinil acetona (SA) 0,5 mM. Los controles corresponden a niveles basales de células no tratadas.

<sup>1</sup> Las concentraciones de ALA + ALA derivado intracelular se determinaron como se describe en Materiales y Métodos.

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

La Tabla II-2 muestra que la acumulación de ALA intracelular a partir de ALA es tres veces mayor en presencia de SA, pero ni la cantidad de los derivados He-ALA o THP-ALA, ni la cantidad de ALA hidrolizado se modifica significativamente.

## **II-8. Discusión.**

Se estudió la regulación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA y ésteres de ALA en una línea celular epitelial. La incorporación de ALA y los derivados de ALA en función de las concentraciones no se correlaciona con los perfiles de acumulación de porfirinas ( Figuras II-1 y II-2). A bajas concentraciones, el grado de incorporación de He-ALA es mayor que el de ALA y THP-ALA. En esas condiciones, la baja incorporación de ALA y THP-ALA podría estar limitando los niveles de porfirinas, sin embargo la mayor disponibilidad de THP-ALA respecto del ALA, no conduce a una mayor producción de porfirinas, lo que sugiere que la hidrólisis del éster está limitando probablemente la eficacia del THP-ALA a bajas concentraciones.

La cinética de incorporación de ALA y de los derivados de ALA muestra que el He-ALA ingresa en la células a una velocidad 180 veces mayor que el ALA y 15 veces más rápido que el THP-ALA, lo que conduce a una rápida saturación del sistema para alcanzar el plateau al minuto de incubación. Estos resultados concuerdan con otras observaciones según las cuales el mecanismo principal de incorporación del He-ALA en las células LM3 es la difusión, no así para el ALA o para el THP-ALA. Por otro lado, el eflujo desde las células es del mismo orden tanto para ALA como para sus ésteres, siendo el proceso una difusión pasiva (datos no mostrados).

A partir de ALA 0,3 mM, se alcanza un plateau en la síntesis de porfirinas, mostrando que la biosíntesis de porfirinas y no la incorporación de ALA, es limitante en la producción de tetrapirroles.

La eficacia relativa de los derivados de ALA depende fuertemente de las condiciones experimentales. Cuando se incuban las células con una concentración baja y no saturante de ALA o de los ésteres de ALA durante períodos prolongados, como para que sean consumidos completamente, observamos que los niveles de porfirinas formados a partir de He-ALA y THP-ALA son 2 y 1,5 veces mayores que los acumulados con ALA. Esto significa que mientras el ALA es consumido, los derivados continúan siendo hidrolizados.

La cinética de acumulación de las porfirinas y el PBG son similares para ALA y para los derivados de ALA, empleando concentraciones 0,6 mM. A esta concentración, aparentemente casi no hay regulación presente, excepto por una intervención menor de la porfobilinogenasa a largos períodos de incubación. Con una concentración 1,2 mM, la acumulación de PBG es 3 veces mayor para el ALA que para los derivados éster, sugiriendo que en esas condiciones la regulación de la conversión de ALA a porfirinas está gobernada por la porfobilinogenasa. Esta enzima es responsable de la conversión del PBG a porfirinas y se ha propuesto que es regulatoria, manteniendo un bajo nivel de porfirinas (Hoffman et al, 2003). No obstante, para los derivados de ALA, son las esterasas las que regulan la hidrólisis de los ésteres, y no la porfobilinogenasa, y como consecuencia de ello los valores de PBG se mantienen bajos.

La regulación de la hidrólisis por medio de las esterasas no es dependiente de las porfirinas (Tabla II-1). El porcentaje de ALA hidrolizado, decrece con la concentración del derivado, aunque bajo condiciones de saturación del camino del hemo, la cantidad de porfirinas sea la misma. Esto quiere decir que, aunque la concentración de porfirinas es la misma, el grado de hidrólisis podría ser diferente. El proceso de hidrólisis está regulado por los productos de hidrólisis, como se ha observado para otras esterasas (Kraemer & Shen, 2002).

La acumulación de ALA intracelular a partir de ALA es 3 veces mayor en presencia del inhibidor del ALA dehidrasa, SA, que inhibe la conversión de ALA a PBG y en consecuencia la síntesis de porfirinas. En trabajos anteriores (Correa García et al, 2003) se demostró que la SA no modifica la incorporación de ALA a las células. En este trabajo no se han observado cambios en la acumulación intracelular de He-ALA y de THP-ALA, o en la cantidad de ALA hidrolizado, en presencia de la SA. Estos resultados sugieren nuevamente que la hidrólisis de ALA está regulada por las esterasas, y cuando se inhibe el consumo de ALA, la reacción de equilibrio de la hidrólisis se desplaza para mantener bajos los niveles de producto. Por otra parte, los derivados de ALA no se acumulan como consecuencia de un desplazamiento del equilibrio, indicando que los niveles de los derivados de ALA se mantienen constantes por una regulación del flujo y el eflujo. Este último tipo de regulación no actuaría aparentemente sobre el ALA, de manera tal que el ALA mantendría su ingreso a las células a pesar de la diferencia de consumo y los altos niveles de ALA intracelular.

Se puede decir entonces que a bajas concentraciones la propia síntesis de porfirinas a partir de ALA y del He-ALA es la que regula la incorporación de los compuestos en las células, en tanto que para el THP-ALA sería su grado de hidrólisis.

Con el ALA, una vez llegado al nivel de saturación, sería la enzima porfobilinogenasa la que regula la síntesis porfirínica.

En cambio para los derivados ésteres, el primer paso en la regulación sería el control de la hidrólisis. Este control es realizado por las esterasas a través de una regulación por producto final, en el cual no están involucradas las porfirinas.



### **III- Estudios *in vivo*. Síntesis de porfirinas en tejidos de ratones a partir de los derivados de ALA.**

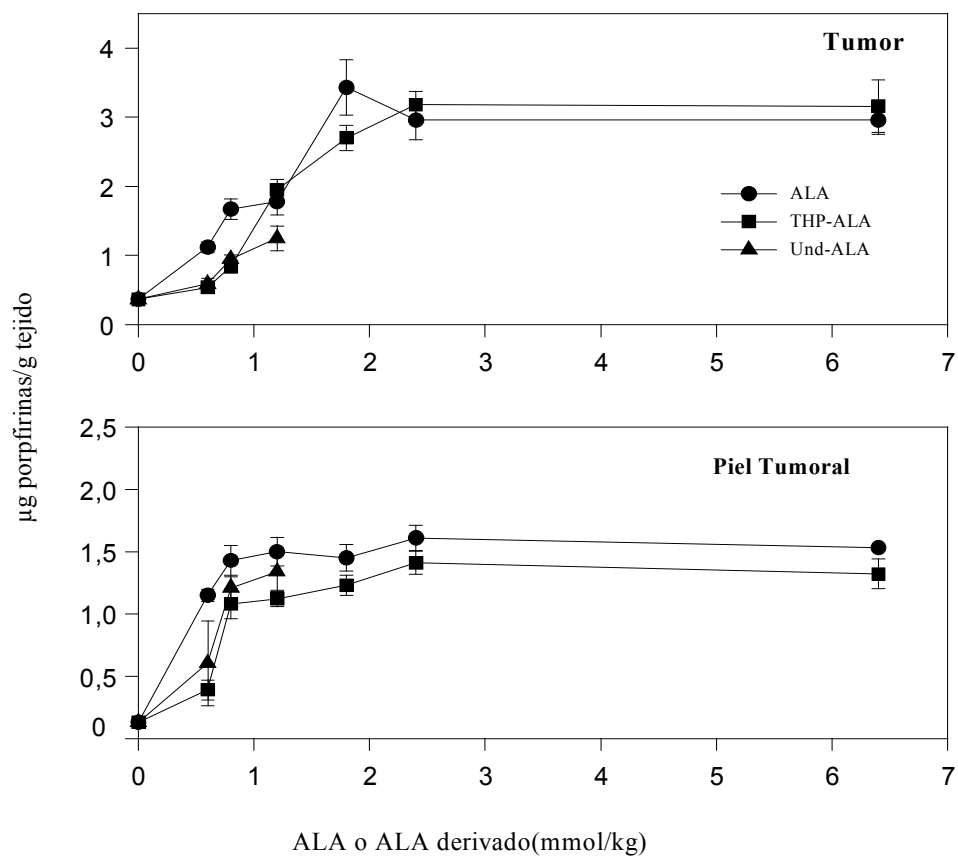
#### **III-1. Síntesis de porfirinas en piel y piel tumoral luego de la administración intraperitoneal.**

Se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c portadores del adenocarcinoma mamario LM3, para estudiar la síntesis de porfirinas luego de la administración i.p. de los derivados de ALA THP-ALA y Und-ALA, en diferentes tejidos.

En la Figura III-1 puede observarse que en el tumor y en la piel adyacente al mismo (Piel Tumoral=PT), tanto THP-ALA como Und-ALA inducen, a concentraciones menores a 1,2 mmol/kg, una síntesis de porfirinas significativamente menor comparada con las porfirinas producidas por ALA. A concentraciones iguales o mayores que 1,2 mmol/kg los tres compuestos inducen una síntesis de porfirinas similar, si bien es de destacar que la dosis de Und-ALA no pudo incrementarse por encima de dicha cantidad debido a su toxicidad.

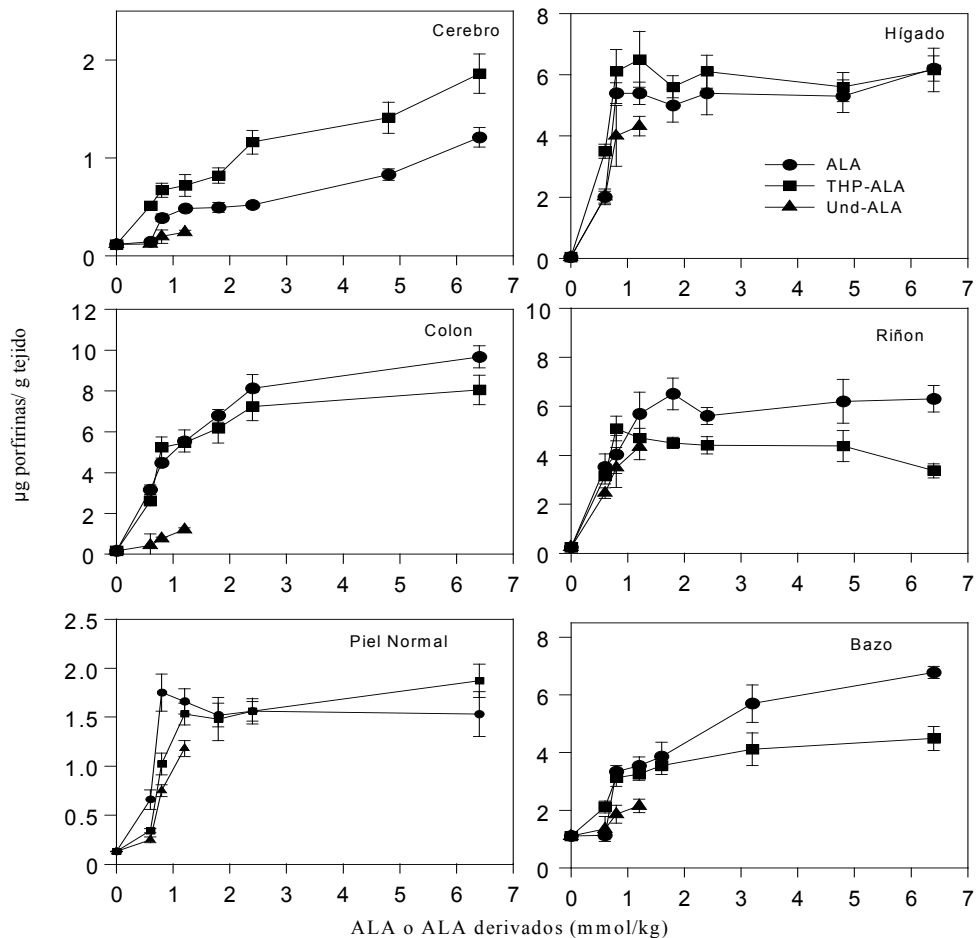
#### **III-2. Síntesis de porfirinas en otros tejidos.**

La Figura III-2 muestra que en la mayoría de los tejidos estudiados, la síntesis de porfirinas a partir de THP-ALA es igual a la obtenida a partir de ALA, exceptuando riñón y bazo, tejidos en los que los niveles de porfirinas son significativamente menores para altas dosis de THP-ALA. Por el contrario, el cerebro es el único tejido que sintetiza una cantidad significativamente mayor de porfirinas a partir de THP-ALA comparado con ALA. En el rango de concentraciones estudiado, tanto hígado como riñón y piel normal muestran una síntesis de porfirinas similar a partir de Und-ALA y de ALA.



**Figura III-1:** Síntesis y acumulación de porfirinas en tumor y piel tumoral luego de la administración i.p. con dosis crecientes de ALA y derivados de ALA

Se inyectaron por vía i.p. diferentes dosis de ALA, THP-ALA y Und-ALA en ratones de la cepa Balb/c. Luego de 3 horas, se sacrificaron los animales y se extrajeron las porfirinas de los tejidos como se detalló en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Las barras de error muestran los desvíos estándar.

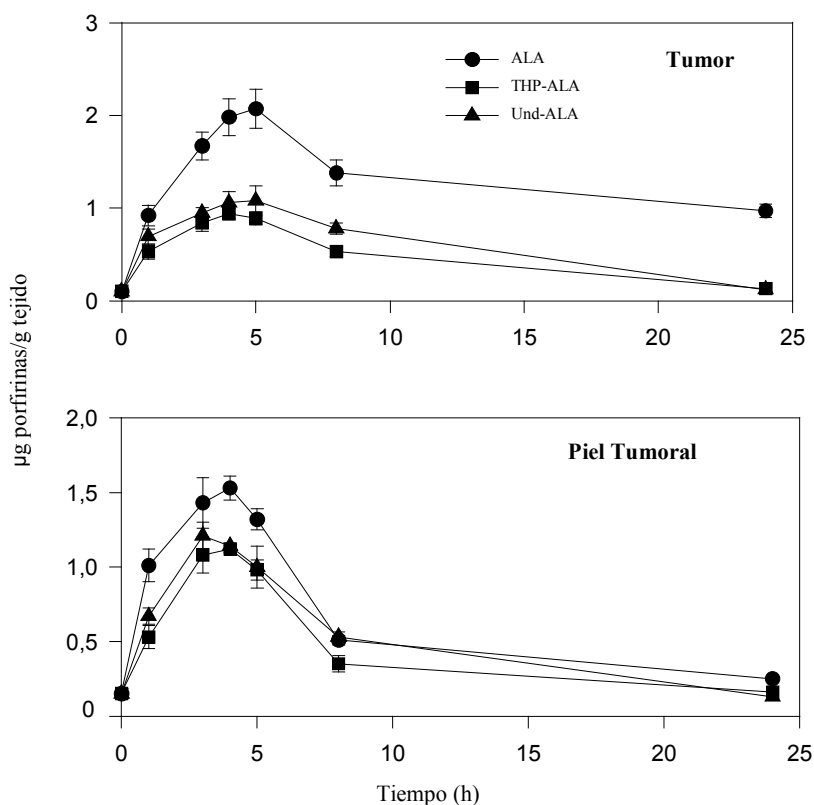


**Figura III-2:** Síntesis y acumulación de porfirinas en cerebro, colon, piel normal, hígado, riñón y bazo luego de administración i.p. con dosis creciente de ALA o derivados de ALA. Cantidades diferentes de ALA, THP-ALA o Und-ALA fueron inyectados i.p. a ratones. Luego de 3 horas, se sacrificaron los animales y se extrajeron las porfirinas de los tejidos como se detalló en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Las barras de error muestran los desvíos estándar.

### III-3. Cinética de síntesis de porfirinas luego de la administración intraperitoneal.

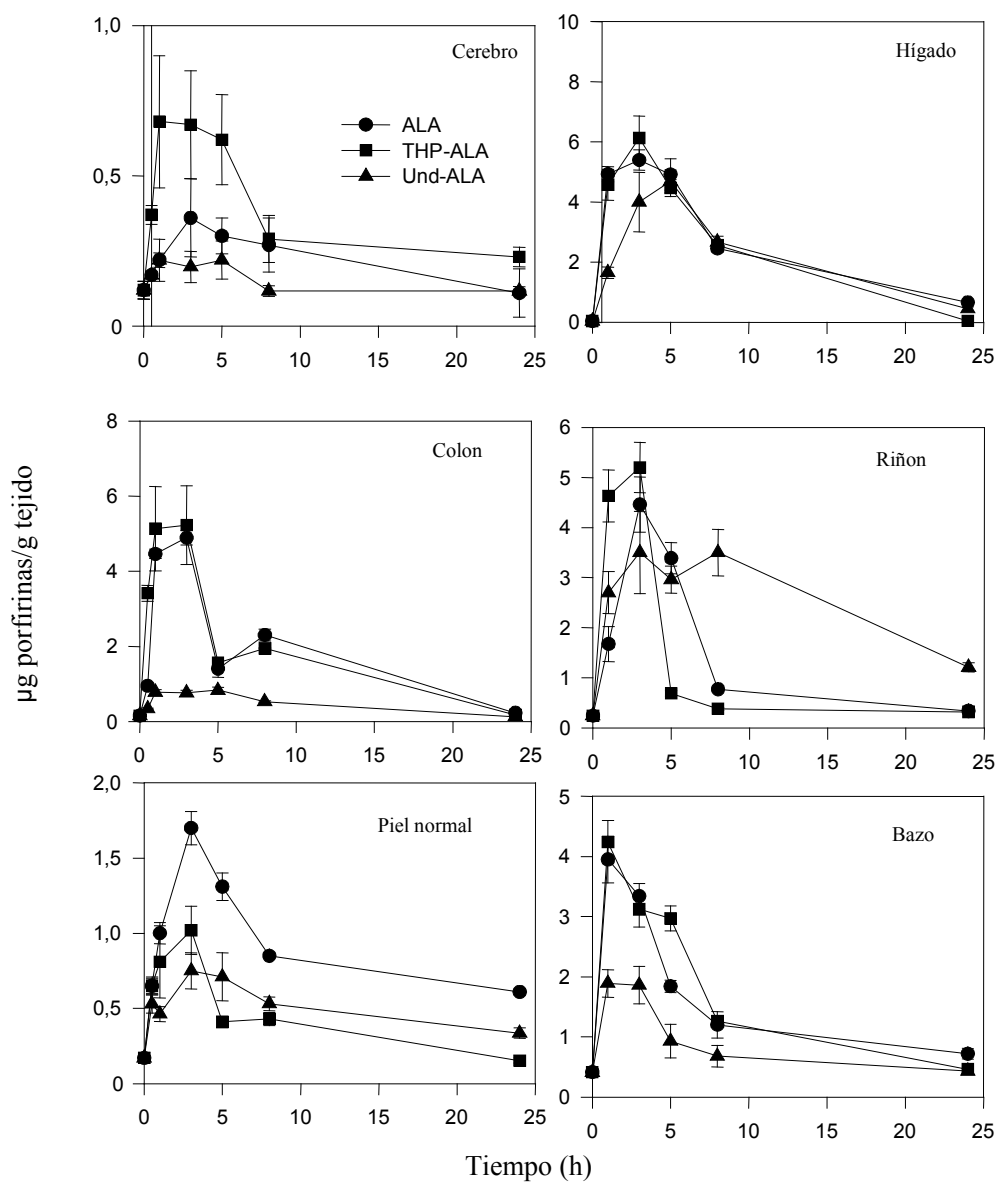
Se administró por vía i.p. a ratones de la cepa Balb/c una dosis de 0,8 mmol/kg de ALA, THP-ALA y Und-ALA, y se cuantificó la cantidad de porfirinas sintetizadas en los diferentes tejidos, a distintos tiempos luego de la administración de los compuestos.

Las Figuras III-3 y III-4 muestran que los tres compuestos estudiados inducen una máxima síntesis de porfirinas en todos los tejidos, entre 2 y 5 h después de la administración. La excepción es para el Und-ALA en el riñón, donde se obtiene una síntesis máxima a las 8 h.



**Figura III-3:** Síntesis de porfirinas a partir de ALA y derivados de ALA en tumor y piel tumoral en función del tiempo

Se inyectó por vía i.p. una dosis de 0,8 mmol/kg de ALA, THP-ALA y Und-ALA. A diferentes tiempos, se sacrificaron los animales y se extrajeron las porfirinas de los tejidos como se detalla en *Materiales y Métodos*. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Las barras de error muestran los desvíos estándar.



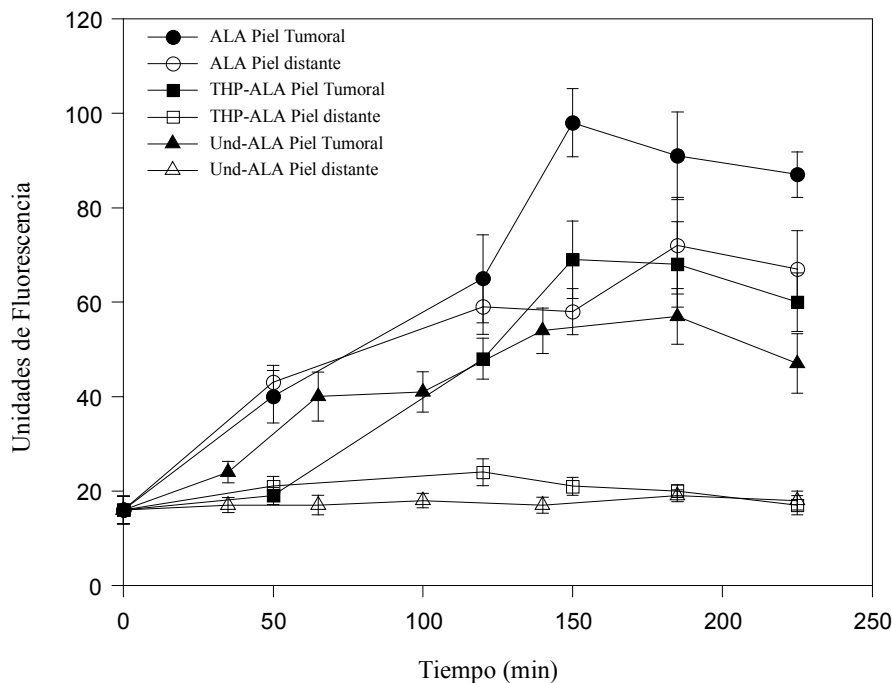
**Figura III-4:** Síntesis de porfirinas a partir de ALA o derivados de ALA acumuladas en cerebro, colon, piel normal, hígado, riñón y bazo en función del tiempo

Los ratones fueron inyectados i.p. con una dosis de 0,8 mmol/kg de ALA, THP-ALA o Und-ALA. A diferentes tiempos, se sacrificaron los animales y se extrajeron las porfirinas de los tejidos como se detalla en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Las barras de error muestran los desvíos estándar.

### III-4. Cinética de síntesis de porfirinas luego de la administración tópica.

Se administró a ratones de la cepa Balb/c, concentraciones equimolares de ALA, THP-ALA y Und-ALA mediante topicación sobre el tumor implantado subcutáneamente.

La Figura III-5 muestra la cinética de acumulación de las porfirinas en piel tumoral, y en piel normal distante. Para ambos tejidos, los tres compuestos exhiben una máxima síntesis de porfirinas entre las 3 y 4 h luego de la aplicación. Sin embargo, ni el THP-ALA ni el Und-ALA alcanzaron el nivel de porfirinas inducido por el ALA. En piel distante, la síntesis de porfirinas alcanza valores significativos sólo para el ALA, en tanto que para los dos ésteres de ALA no llega supera los niveles basales.



**Figura III-5:** Síntesis de porfirinas en piel tumoral y piel distante luego de la aplicación tópica de ALA y derivados de ALA

El ALA y los derivados de ALA fueron aplicados tópicamente en concentraciones equimolares (5 mg ALA; 7,85 mg THP-ALA y 9,55 mg Und-ALA) sobre la piel peritumoral. A diferentes tiempos luego de la aplicación, se midió la fluorescencia utilizando una fibra óptica acoplada a un espectrofluorómetro. Las determinaciones fueron realizadas sobre la piel tumoral y la piel distante. Se utilizaron 3 ratones por tratamiento y se muestra el promedio de 3 determinaciones.

### III-5. Síntesis de porfirinas luego de la administración tópica.

La Tabla III-1 muestra la cantidad de porfirinas acumuladas en tumor, piel peritumoral, y piel distante luego de la aplicación tópica de ALA, THP-ALA y Und-ALA. Mientras en el tumor la síntesis de porfirinas a partir de THP-ALA no es significativamente diferente que la obtenida con ALA, en PT es apreciablemente más baja ( $p= 0,026$ ). Tanto en tumor ( $p= 0,03$ ) como en PT ( $p= 0,001$ ) Und-ALA induce una menor síntesis de porfirinas comparado con ALA. En la piel distante se acumulan  $0,64 \pm 0,11$   $\mu\text{g}$  porfirinas/g a partir de ALA mientras que con THP-ALA y Und-ALA el nivel de porfirinas se mantiene en los valores basales.

**Tabla III-1:** Acumulación de porfirinas en tumor, piel tumoral y piel distante, luego de la aplicación tópica de ALA y derivados de ALA.

	Control	ALA	THP-ALA	Und-ALA
Tumor	$0,36 \pm 0,025$	$1,10 \pm 0,25$	$0,78 \pm 0,17$	$0,59 \pm 0,11$
Piel tumoral	$0,12 \pm 0,002$	$1,17 \pm 0,11$	$0,75 \pm 0,18$	$0,46 \pm 0,06$
Piel distante	$0,12 \pm 0,002$	$0,64 \pm 0,11$	$0,15 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,04$

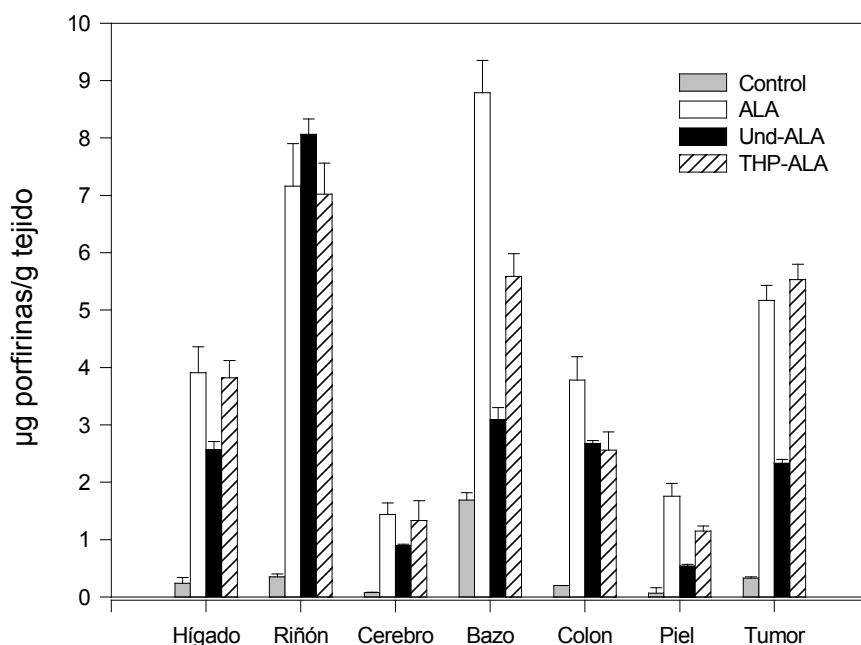
Se topicaron concentraciones equimolares de ALA (5 mg), THP-ALA (7,85 mg) y Und-ALA (9,55 mg) sobre la piel tumoral. Luego de 4 h se sacrificaron los animales y se extrajeron las porfirinas de los tejidos indicados. Los resultados se expresan como  $\mu\text{g/g}$  tejido. Los controles corresponden a niveles basales de porfirinas.

### III-6. Síntesis de porfirinas en explantes de órganos.

Se incubaron explantes de diferentes tejidos provenientes de ratones de la cepa Balb/c portadores del adenocarcinoma mamario LM3, con ALA y los derivados THP-ALA y Und-ALA.

La Figura III-6 muestra la síntesis de porfirinas en los explantes de órganos a partir de ALA y los derivados de ALA a la concentración del plateau (0,6 mM). En todos los tejidos excepto en riñón, la síntesis de porfirinas a partir de Und-ALA es significativamente menor comparada con ALA. Por otro lado, en hígado, riñón y cerebro la cantidad de

porfirinas sintetizadas a partir de THP-ALA, es similar a la obtenida a partir de ALA, mientras que en bazo, colon y piel es significativamente menor, sólo en tumor la síntesis de porfirinas fue mayor al utilizar THP-ALA con respecto a ALA. Cuando se usaron concentraciones no saturantes (0,2 mM) tanto de ALA como de sus derivados, los patrones obtenidos en todos los tejidos fueron semejantes (datos no mostrados).



**Figura III-6:** Síntesis de porfirinas a partir de explantes de tejidos incubados con ALA, Und-ALA y THP-ALA

Los explantes fueron incubados con ALA/ derivados de ALA 0,6 mM, durante 3 h. Al cabo de ese tiempo, se extrajeron y cuantificaron las porfirinas como se describe en Materiales y Métodos. Los controles corresponden a niveles basales de porfirinas en tejidos.

### III-7. Acumulación de THP-ALA en cerebro.

La Tabla III-2 muestra que luego de 5 min de la inyección i.p., la acumulación de THP-ALA en cerebro es significativamente mayor que la acumulación de ALA ( $p < 0.005$ ),



pero es 3,5 veces menor que la obtenida para He-ALA según trabajos previos de Perotti et al (2002).

**Tabla III-2:** Niveles de ALA, THP-ALA y He-ALA en cerebro

	nmol ALA o THP-ALA/g cerebro
Control	17 ± 3
ALA	60 ± 5
THP-ALA	101 ± 12
He-ALA	404 ± 10*

*Se administró por vía i.p. a ratones de la cepa Balb/C 2,4 mmol/kg de ALA, THP-ALA o He-ALA. Luego de 5 min, los animales fueron sacrificados y se cuantificó ALA y ésteres de ALA acumulados en cerebro como se describe en Materiales y Métodos. Los controles corresponden a niveles basales de ALA en ratones no tratados.*

*\* Tomado de un trabajo previo (Perotti et al, 2002).*

### **III-8. Afinidad de ALA y derivados de ALA por los tejidos.**

La Tabla III-3 muestra la afinidad del ALA y sus derivados Und-ALA, THP-ALA y He-ALA por diferentes homogenatos de tejidos. Se observa que Und-ALA es el compuesto que presenta una mayor afinidad por todos los tejidos, siendo el cerebro, el tumor y el riñón los tejidos que más retienen el Und-ALA en las membranas destruidas. Tanto ALA como THP-ALA y He-ALA pudieron recuperarse de todos los tejidos en un 100%, con la excepción del cerebro.

Mientras que el ALA y el THP-ALA fueron recuperados en su totalidad en el primer lavado, con el He-ALA se recuperó el 70-80% en el primer lavado y el resto en el segundo y tercer lavados (datos no mostrados). De acuerdo a estos resultados, la afinidad del He-ALA por los tejidos es mayor que la del ALA o la del THP-ALA. Es de aclarar que se utilizó una relación fija tejido: buffer de 10% p/v, y al incrementar esta relación se obtuvo una mayor retención de Und-ALA y He-ALA en todos los tejidos, aunque es de observarse que la afinidad de los derivados de ALA difiere según el tejido.

**Tabla III-3:** Afinidad de tejidos por ALA y derivados de ALA

	ALA	THP-ALA	Und-ALA	He-ALA
Hígado	100 ± 5,3	100 ± 4,6	47,7 ± 9,6	100 ± 10,2
Cerebro	100 ± 3,1	82,3 ± 6,3	18,2 ± 3,2	83 ± 8,9
Tumor	100 ± 10,4	100 ± 4,5	35,7 ± 10,2	100 ± 12,1
Riñón	100 ± 4,6	100 ± 6,3	34,4 ± 5,3	100 ± 9,5
Piel	100 ± 3,8	100 ± 7,6	66,4 ± 7,3	100 ± 7,6
Piel Tumoral	100 ± 5,8	100 ± 8,6	59 ± 6,5	100 ± 11,2
Bazo	100 ± 6,3	100 ± 6,7	45,2 ± 3,5	100 ± 10,9
Colon	100 ± 4,1	100 ± 8,4	54,3 ± 9,6	100 ± 13,2

*El ALA y los derivados de ALA fueron incubados con los homogenatos de los diferentes tejidos durante 30 min a temperatura ambiente y luego se procedió como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentajes de recuperación y se calcularon con respecto a controles de derivados incubados sin tejidos*

### **III-9. Lipofilicidad de ALA y sus ésteres.**

La Tabla III-4 muestra la lipofilicidad del ALA y los ésteres de ALA calculados según la medición de los valores de  $\log P$ , siendo  $P$  el coeficiente de partición aparente entre octanol y PBS. El valor de  $\log P$  para ALA es negativo, lo que indica su hidrofiliicidad, mientras que los ésteres empleados en este trabajo al ser hidrofóbicos, presentan un  $\log P$  positivo, y el orden de lipofilicidad creciente es: THP-ALA < He-ALA < Und-ALA.

**Tabla III-4:** Valores de Log *P* para ALA y ésteres de ALA.

	Log <i>P</i>
ALA	-1,520
THP-ALA	1,010
He-ALA	1,838 *
Und-ALA	3,262

(\*referencia de literatura- Uehlinger et al, 2000).

*P* es el coeficiente de partición aparente entre octanol y PBS (Uehlinger et al, 2000).

### III-10. Discusión

La cantidad de porfirinas acumuladas en cerebro a partir de THP-ALA es 1,5-2 veces mayor que la obtenida a partir de concentraciones equimolares de ALA, indicando que este derivado de ALA atraviesa la barrera hemato-encefálica. Como se ha demostrado previamente para el He-ALA (Perotti et al, 2002), la estructura de la barrera hemato-encefálica permite que moléculas lipofílicas extravasen y alcancen el cerebro, y en el caso del He-ALA, este compuesto induce una mayor cantidad de porfirinas en cerebro que el THP-ALA. El log *P* de THP-ALA, es 1,010 y de acuerdo a Uehlinger et al (2000), el log *P* para He-ALA es 1,838, esto significa que si bien el THP-ALA es menos lipofílico que el He-ALA, posee una lipofilidad suficiente como para cruzar la barrera hemato-encefálica.

Esta ampliamente reconocido el rol de la lipofilidad en el sistema nervioso central (SCN). Se ha demostrado que los compuestos más potentes que actúan sobre el SNC poseen un valor de log *P* de  $2 \pm 0,5$  (Hansch et al, 1987). El Und-ALA, tiene un log *P* de 3,262 por lo cual sería lo suficientemente lipofílico como para cruzar la barrera hemato-encefálica, pero es probable también que las moléculas sean retenidas en la membrana en el caso en que logren atravesarla. Recordemos que este compuesto resultó ser tóxico por encima de 1,2 mmol/kg, por lo que no fue posible determinar su acumulación en cerebro.

Con la excepción del cerebro, la síntesis de porfirinas a partir de Und-ALA y THP-ALA en los tejidos analizados, no fue mayor que la obtenida a partir de ALA. Previamente, se había sugerido que la baja eficacia en la síntesis de porfirinas en tumor luego de la administración sistémica de los ésteres de ALA, se debía a la retención de los derivados de

ALA en las vesículas sanguíneas en la fase inicial de distribución y/o en los capilares del tumor (Perotti et al, 2004). Los estudios de afinidad permitieron elucidar que los tejidos son responsables de la retención de los ésteres de ALA.

La afinidad de los derivados de ALA por las membranas alteradas es mayor para aquellos derivados más lipofílicos, como el Und-ALA y He-ALA, que para THP-ALA o ALA. Sin embargo, el THP-ALA se une a las estructuras destruidas del cerebro, mostrando una correlación entre afinidad y ubicación de las porfirinas. Perotti et al (2002) mostraron que el He-ALA induce una importante síntesis de porfirinas en cerebro y los datos presentados aquí también muestran una mayor afinidad de este compuesto por los homogenatos de cerebro. Esto sugiere que los estudios de afinidad pueden llegar a predecir el nivel de síntesis de porfirinas en cerebro, donde no existe una correlación con los demás tejidos.

De acuerdo a estos estudios de afinidad se puede decir que el Und-ALA no es retenido en las vesículas sanguíneas o capilares de los tejidos, pero si lo es a membranas celulares o proteínas en general por simple afinidad. Kloek et al (1998) reportaron que largas cadenas de ésteres de ALA tienden a permanecer en las membranas celulares por lo cual la síntesis de PpIX es menor. Además, son también posibles las uniones a albúmina, lipoproteínas, endotelio o matriz extracelular de tejidos (Roberts & Hasan, 1992).

Empleando cultivos de explantes de órganos, en términos de síntesis de porfirinas, no se encontró una completa correlación con los resultados *in vivo*. La síntesis de porfirinas en explantes a partir de THP-ALA es menor o igual que a partir de ALA, excepto en tumor donde fue mayor. Los resultados *in vivo* no son coincidentes para cerebro donde la síntesis de porfirinas es mayor a partir de THP-ALA que a partir de ALA y en tumor donde la mayor producción de porfirinas se produce a partir de ALA. De manera similar, la cantidad de porfirinas obtenidas en explantes de órganos a partir de Und-ALA es menor que con ALA, excepto riñón. Con este compuesto no es posible realizar una total comparación con los resultados *in vivo*, ya que debido a la toxicidad, el Und-ALA no pudo administrarse por encima de 1,2 mmol/kg, y a esa dosis, no se alcanza el plateau de porfirinas, sin embargo puede estimarse que la cantidad de porfirinas obtenidas a partir de ALA sería mayor.

Como se ha demostrado previamente para tumor (Perotti et al, 2004) los resultados obtenidos en los sistemas de explantes de órganos para todos los tejidos estudiados, se asemejan a los sistemas *in vitro* y no a los sistemas *in vivo*.

La cinética de síntesis de porfirinas luego de la administración i.p. y tópica de Und-ALA y THP-ALA, es bastante similar a la observada para ALA, sugiriendo que una vez dentro del organismo, los ésteres se hidrolizan y las moléculas de ALA son liberadas, y este proceso no afecta la síntesis de tetrapirroles. Los estudios de estabilidad llevados a cabo en PBS y medio mínimo esencial empleando cromatografía de intercambio iónico (Di Venosa et al, 2004) muestran que ni el Und-ALA ni el THP-ALA se hidrolizan espontáneamente, durante un período de 6 h a pH 7,4 (datos no mostrados), confirmando que la hidrólisis es llevada a cabo enteramente por las esterasas.

Por el contrario, Moan et al (2003) encontraron que la cinética de síntesis de porfirinas en piel a partir del éster Metil-ALA luego de la administración i.p., fue diferente que para ALA. En ese trabajo, el pico de porfirinas se produjo a partir de 1 h de la administración, mostrando que la PpIX inducida por Metil-ALA parece tener una vida media más corta en los tejidos que la PpIX inducida por ALA, probablemente debido a la alta estabilidad de ALA en tejidos. Por el contrario, los ésteres empleados en el presente trabajo parecen ser tan estables como ALA, ya que la cinética de síntesis de porfirinas a partir de ALA y de los derivados evaluados es similar.

Previamente se había observado que el He-ALA aplicado en forma tópica, inducía la formación de porfirinas confinadas en el sitio de aplicación (Moan et al, 2001; Casas et al, 2001; Perotti et al, 2003). En este caso, THP-ALA y Und-ALA también exhiben una alta selectividad por el sitio de aplicación tópica, sugiriendo que este hecho es general para los ésteres de ALA. Es probable que la hidrólisis intracelular de los ésteres de ALA ocurra en el sitio de aplicación y el ALA hidrolizado no difunda a los sitios distantes. La cinética de formación de porfirinas en PT a partir de los derivados de ALA es similar a la obtenida con ALA. Sin embargo, la cantidad de PpIX formada es significativamente menor. Por otro lado, en tumor se sintetiza la misma cantidad de porfirinas tanto a partir de ALA como de THP-ALA. Probablemente THP-ALA difunde fácilmente a través de la piel, conduciendo a valores elevados de porfirinas en tumor. Alternativamente, las esterasas podrían estar hidrolizando velozmente el THP-ALA retenido en la piel, favoreciendo así la captación de ALA por el tumor, aunque en este caso sería de esperar una mayor cantidad de porfirinas en sitios distantes.

La baja eficacia del He-ALA para alcanzar el tejido tumoral luego de la aplicación tópica fue atribuida a la retención de moléculas lipofílicas en el estrato córneo (Perotti et al, 2003) y el mismo razonamiento es aplicable para el Und-ALA, que posee un valor de log *P*

mayor que el He-ALA, aunque las moléculas retenidas no son hidrolizadas para dar un contenido mayor de porfirinas.

Se puede decir entonces que el THP-ALA podría ser útil para el tratamiento de tumores de cerebro luego de una administración sistémica, mientras que ambos, THP-ALA y Und-ALA podrían ser utilizados para tratamientos superficiales de tumores debido a su alta selectividad.

#### IV- Dendrimeros como transportadores moleculares para la distribución de la prodroga ALA: estudios *in vitro* e *in vivo* con el dendrón 3m-ALA.

Recientes avances en la química de polímeros permite la síntesis de estructuras definidas y polímeros hiper ramificados (o dendrimeros) los cuales pueden conjugarse con moléculas de drogas (Liu y Frechet; 1999). La estructura mínima de un dendrimer es el dendrón, que constituye la sub-unidad de cada ramificación unida a la macromolécula. El dendrón aminometano tris-metil ALA (3m-ALA), contiene tres residuos ALA acoplados al corazón central de la molécula vía uniones esterés.

##### IV-1. Coeficientes de partición.

Como ya se explicó anteriormente, una manera de definir el grado de hidrofobicidad de un compuesto, es establecer su coeficiente de partición ( $P$ ) entre octanol y una solución acuosa (Uehlinger et al, 2000).

La Tabla IV-1 muestra los coeficientes de partición ( $P$ ) medidos para ALA, Me-ALA y 3m-ALA (cuyas estructuras se muestran en las Figuras 1 y 2 de Materiales y Métodos), entre octanol y PBS. A modo comparativo, se incluye el valor de literatura para el éster de hexil ALA (Uehlinger et al, 2000). Los valores de  $\log P$  para ALA y Me-ALA están en buena concordancia con aquellos determinados por Uehlinger et al (2000). El dendrimer 3m-ALA, posee un valor bajo y negativo de  $P$  (-0,11), que es intermedio entre los indicados para ALA y He-ALA. De acuerdo a estos resultados, el dendrón es más lipofílico que ALA y Me-ALA, y más hidrofílico que el He-ALA.

**Tabla IV-1:** Valores de  $\log P$  para ALA, Me-ALA , 3m-ALA y He-ALA\*, en octanol vs. PBS a pH 7,4 y 25° C.

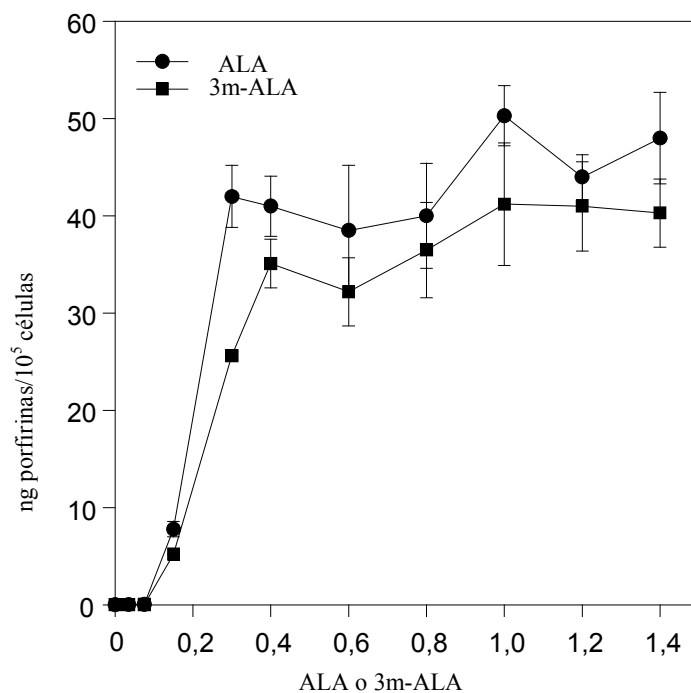
Compuesto	$\log P$
ALA	-1,52 ± 0,02
Me-ALA	-0,85 ± 0,07
3m-ALA	-0,11 ± 0,02
He-ALA	1,84*

(\*referencia de literatura - Uehlinger et al, 2000)

## IV-2. Síntesis de porfirinas.

Se incubaron las células LM3, con el dedrímero 3m-ALA y cantidades equimolares de ALA y se comparó la cantidad de porfirinas sintetizadas a partir de cada uno de los compuestos.

La Figura IV-1 muestra que 3m-ALA en cantidades equimolares al ALA induce una formación de porfirinas similar en todo el rango de concentraciones, con la diferencia de que las porfirinas formadas a partir de ALA alcanzan un valor constante a partir de una concentración 0,3 mM, en tanto que las porfirinas sintetizadas a partir del 3m-ALA muestran un valor constante de 0,4 mM en adelante.



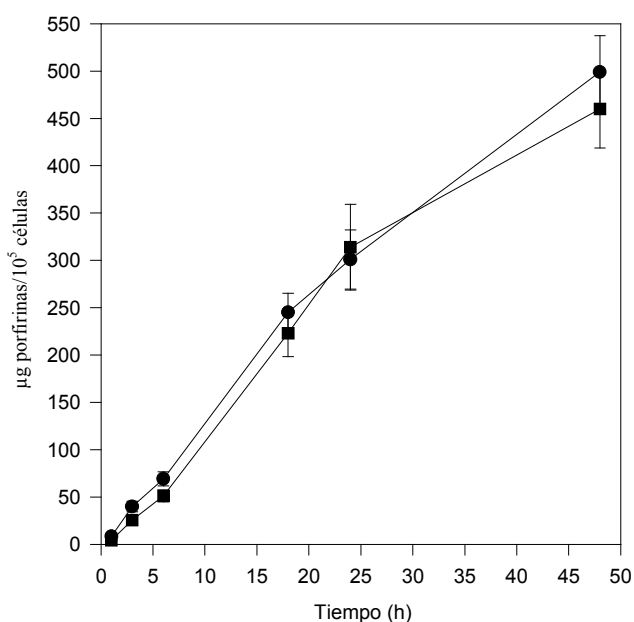
**Figura IV-1:** Síntesis de porfirinas a partir de ALA y 3m-ALA

Las células LM3 fueron incubadas 3 horas en presencia de diferentes cantidades de ALA o 3m-ALA. Los niveles intracelulares de porfirinas fueron determinados fluorométricamente y normalizados por el número de células presentes al comienzo de la experiencia.



### IV-3. Cinética de la síntesis de porfirinas.

La Figura IV-2 muestra la síntesis y acumulación de porfirinas en función del tiempo, para células LM3 incubadas con ALA y 3m-ALA 0,8 mM. Podemos observar que ambos compuestos presentan una cinética similar, con un ligero decrecimiento en la formación de porfirinas a las 48 h para el dendrímero 3m-ALA, debido a la toxicidad de este compuesto.



**Figura IV-2:** Síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación en presencia de 3m-ALA

Las células LM3 fueron incubadas durante diferentes períodos de tiempo en presencia de ALA y 3m-ALA, en una concentración 0,8 mM. Los niveles intracelulares de porfirinas fueron determinados fluorométricamente y normalizados por el número de células presentes al comienzo del experimento.

### IV-4. Acumulación intracelular de ALA, 3m-ALA y PBG.

La Tabla IV-2 muestra que cuando las células son incubadas 3 h con 3m-ALA 0,6 mM, la acumulación total de ALA/3m-ALA es un 20% mayor que cuando se incubaba con

una concentración equimolar de ALA (primer columna); y algo similar ocurre con la acumulación de PBG. Mediante una cromatografía de intercambio iónico, se cuantificaron los niveles de ALA y 3m-ALA separadamente. Luego de 3 h de exposición a 3m-ALA, el porcentaje del contenido de ALA respecto del total eluido en la forma de ALA y 3m-ALA fue de un 34% (segunda columna). Estos resultados indican que en la célula sólo se produce una liberación parcial de ALA a partir del 3m-ALA. En trabajos previos efectuados con la misma línea celular, también se había observado una liberación incompleta de ALA a partir de He-ALA (Perotti et al, 2004).

**Tabla IV-2:** Acumulación de ALA y PBG en células LM3 luego de 3 h de exposición a ALA o 3m-ALA. 0,6 mM.

	pmoles de ALA (más derivado)/10 <sup>5</sup> cels <sup>1</sup>	Porcentaje molar de ALA <sup>2</sup>	pmoles de PBG/10 <sup>5</sup> cels
Control	1,62 ± 0,07	N.D.	0,75 ± 0,03
ALA	13,05 ± 0,90	100 %	1,50 ± 0,11
3m-ALA	16,57 ± 0,50*	34 %	1,85 ± 0,19*

Las concentraciones de ALA y PBG fueron determinadas como se describe en Materiales y Métodos.

<sup>1</sup> las mediciones corresponden a ALA y 3m-ALA sin distinción entre ALA y derivado (formas no hidrolizadas e hidrolizadas).

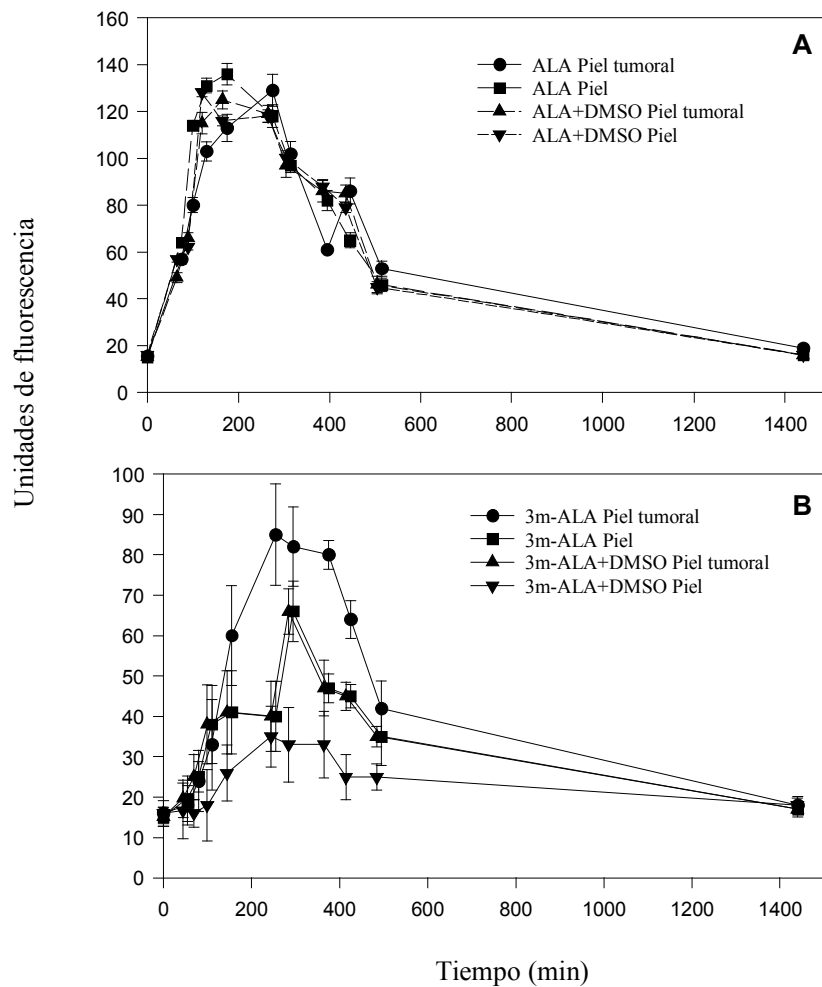
<sup>2</sup> porcentaje de ALA con respecto a las especies totales de ALA, comprendiendo ALA y 3m-ALA en sus formas hidrolizadas y no hidrolizadas, determinado por cromatografía de intercambio iónico.

\**p* < 0.05 comparado con ALA

El control corresponde a niveles basales intracelulares de ALA y PBG.

#### IV-5. Cinética de la síntesis de porfirinas *in vivo*.

Se topicaron ratones de la cepa Balb/c portadores del adenocarcinoma mamario LM3, con cantidades equimolares de 3m-ALA y ALA, y se siguió la síntesis y acumulación de porfirinas en piel, tumoral y distante al tumor, mediante espectroscopia de fluorescencia, utilizando una fibra óptica acoplada a un fluorómetro.



**Figura IV-3:** Síntesis de porfirinas en tumor y piel distante luego de aplicación tópica de ALA y 3m-ALA

ALA (A) y 3m-ALA (B) fueron aplicados tópicamente sobre la piel tumoral de ratones de la cepa Balb/c portadores del tumor LM-3 en concentraciones equimolares (3 y 16 mg respectivamente). A diferentes tiempos de aplicación, se monitoreó la fluorescencia de las porfirinas con una fibra óptica acoplada a un espectrofotómetro de fluorescencia. Las determinaciones fueron realizadas sobre piel tumoral y sobre un área de piel. Se utilizaron 3 ratones por tratamiento.

La Figura IV-3 muestra la cinética de porfirinas, en la piel tumoral y en la piel distante. El espectro obtenido fue consistente con la formación de PpIX, exhibiendo un pico a 636 nm. Las dosis de ALA empleadas se basaron en trabajos previos (Perotti et al, 2003).

El pico máximo de porfirinas a partir de ALA se observa entre 2 h y 5 h luego de la aplicación, mientras que con 3m-ALA el máximo se produce entre las 4 h y 7 h. La adición de DMSO no incrementa la formación de porfirinas. En forma similar a lo observado previamente para otros ésteres de ALA, comparada con el compuesto parental, la fluorescencia obtenida a partir de 3m-ALA parece estar más confinada al sitio de aplicación, hecho consistente con su mayor lipofilia.

#### **IV-6. Síntesis de porfirinas *in vivo*.**

Con el objeto de correlacionar los datos espectroscópicos con la concentración de porfirinas en los tejidos, se realizó una aplicación tópica de 3m-ALA y ALA sobre piel tumoral y al cabo de 4h 30 min se cuantificaron los niveles de porfirinas en tumor, piel tumoral y piel distante, mediante una extracción química. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV-3.

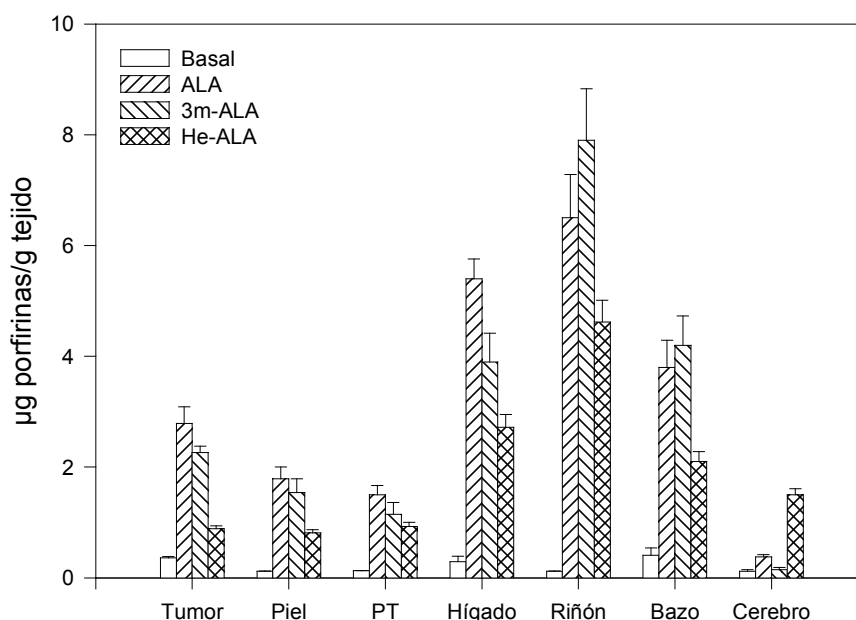
**Tabla IV-3:** *Acumulación de porfirinas en tumor, piel tumoral y piel distante del sitio de aplicación*

	ALA	ALA/DMSO	3m-ALA	3m-ALA/DMSO
Tumor	0,61 ± 0,05	0,43 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,42 ± 0,03
Piel tumoral	0,85 ± 0,08	0,76 ± 0,06	0,42 ± 0,03	0,36 ± 0,04
Piel distante	0,45 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,05 ± 0,002	0,05 ± 0,003

*Se aplicaron tópicamente concentraciones equimolares de 3m-ALA y ALA (16 y 3 mg respectivamente) sobre la piel peritumoral de ratones de la cepa Balb/c portadores del adenocarcinoma mamario LM3. Se emplearon lociones en solución fisiológica, con y sin el agregado de DMSO 10 %. Luego de 4h 30 min, se extrajeron químicamente las porfirinas acumuladas en el tumor, la piel peritumoral y piel distante. Los resultados se expresan en µg/porfirinas/g tejido*

Las porfirinas acumuladas a partir de 3m-ALA en los tres tejidos resultó ser significativamente menor que los niveles de porfirinas obtenidos con ALA en concentración equimolar. Como se ve en la Figura IV-4 para las pieles, la adición simultánea de DMSO y 3m-ALA no aumenta la formación de tetrapirroles en los tumores. Comparado con los resultados obtenidos con He-ALA, el dendrón induce en el tumor una cantidad de porfirinas significativamente mayor ( $p=0,03$ ) pero no así en pieles.

La Figura IV-4 compara la síntesis de porfirinas a partir de ALA, 3m-ALA y He-ALA, inyectados i.p. en concentraciones equimolares en ratones Balb/c portadores del adenocarcinoma mamario LM3. La dosis de 3m-ALA no pudo ser incrementada debido a que resultaba letal para los ratones. La toxicidad limitante del dendrón trajo como consecuencia una disminución de las dosis respecto a las planeadas.



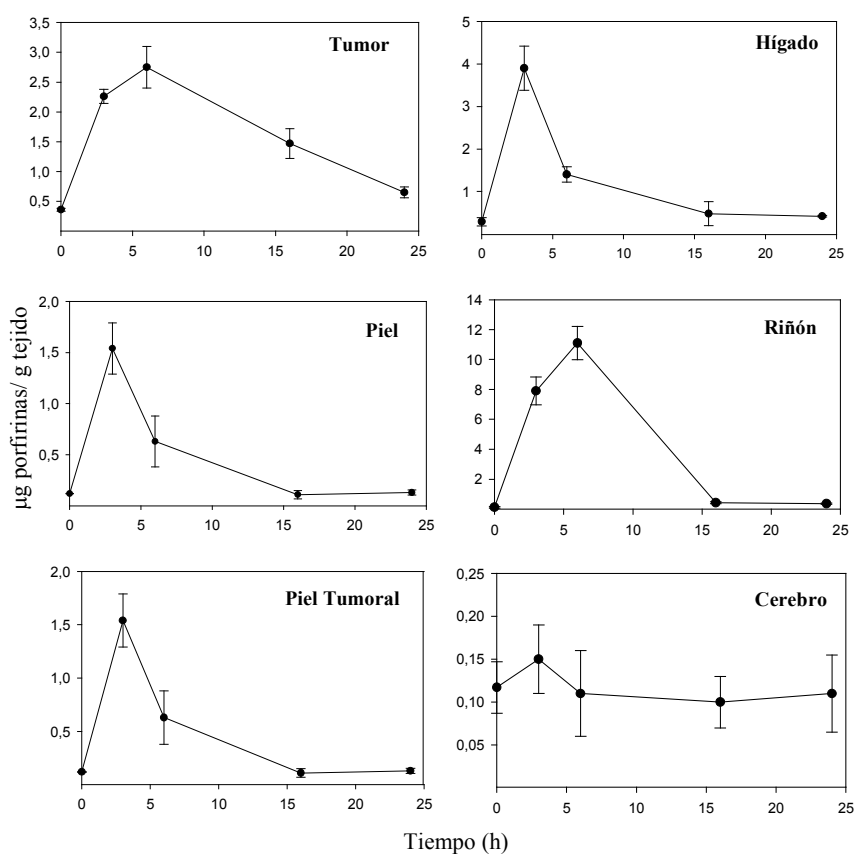
**Figura IV-4:** Síntesis de porfirinas en diversos tejidos luego de la administración i.p. de ALA, He-ALA y 3m-ALA

Ratones de la cepa Balb/c portadores del adenocarcinoma mamario LM3 fueron inyectados i.p. con concentraciones equimolares de ALA, He-ALA y 3m-ALA (3; 4,5 y 16 mg respectivamente). Luego de 3 h, las porfirinas fueron extraídas de los diferentes tejidos y cuantificadas como se detalla en Materiales y Métodos. PT: Piel tumoral.

En todos los tejidos, ALA indujo significativamente más porfirinas que 3m-ALA, pero a su vez, el dendrón indujo más porfirinas que He-ALA, con excepción del cerebro. En tumor, los niveles de porfirinas inducidos por 3m-ALA fueron más del doble que los inducidos por He-ALA.

#### IV-7. Cinética de síntesis de porfirinas *in vivo*, determinada por extracción química.

La Figura IV-5 muestra la cinética de la síntesis de porfirinas en varios tejidos luego de la administración i.p. de 3m-ALA.



**Figura IV-5:** Cinética de síntesis de porfirinas en tejidos luego de la administración i.p. de 3m-ALA

Ratones de la cepa Balb/c portadores del adenocarcinoma mamario LM3 fueron inyectados i.p. con 12 mg de 3m-ALA y a diferentes tiempos, se extrajeron y cuantificaron las porfirinas de los diferentes tejidos.

En hígado y piel, el 3m-ALA induce máxima síntesis de porfirinas a tiempos cortos, luego de la administración. Tumor y riñón muestran un pico de porfirinas entre 3 y 6 h, con niveles medibles y persistentes en tumor luego de 25 h. En piel, la concentración de porfirinas, vuelve a su nivel basal luego de 15 h.

#### **IV-8. Discusión.**

Los dendrímeros son moléculas sintéticas que a causa de su gran tamaño, son generalmente impermeables a las membranas celulares y consecuentemente, incapaces de atravesar las barreras de transporte de los sistemas biológicos. En virtud de esa impermeabilidad, muchas macromoléculas han sido exitosamente usadas como transportadores de drogas, permitiendo una rápida evacuación a la circulación, o una liberación sostenida cuando son implantados en los tejidos, e incluso han mostrado una selectividad tumoral (Robinson et al., 1996). Otra aplicación basada en esta estrategia, es el diseño de macromoléculas pro-drogas que pueden ser transportadas o retenidas selectivamente dentro de las células.

Battah et al (2001) lograron sintetizar dendrímeros que contienen 18 residuos ALA, y demostraron que algunos de esos dendrímeros son capaces de inducir una síntesis de porfirinas suficiente como para causar fotodaño celular.

En nuestro caso, estudiamos el dendrón amino metano tris metil ALA (3m-ALA), que contiene tres residuos ALA, en cuanto a su eficacia tanto en células como en un modelo animal, en liberar las moléculas de ALA e inducir consecuentemente la formación de porfirinas

Los resultados obtenidos muestran que el dendrón 3m-ALA es captado por las células (Tabla IV-2) y puede inducir la síntesis y acumulación de porfirinas intracelulares en niveles comparables a las que se obtienen a partir de ALA (Figuras IV-1 y IV-2). 3m-ALA es ligeramente más lipofílico que ALA y más hidrofílico que He-ALA (Tabla IV-1), y se infiere que la incorporación por difusión pasiva sería significativamente menor comparada con el He-ALA. Debido al pequeño tamaño relativo del dendrón 3m-ALA y su estructura compacta de tres moléculas de ALA con el segmento dendrítico, es posible también que ocurra otro mecanismo de endocitosis, y resultados recientes sugieren que la pro-droga 3m-ALA podría

ser incorporada en células mamarias, vía transportadores BETA y PEPT-2 (Rodríguez et al, 2006).

*In vivo* el dendrón 3m-ALA induce la acumulación de porfirinas en tumor y en tejidos normales tanto luego de la administración tópica como sistémica. Luego de la topicación del dendrón, el pico máximo de niveles de porfirinas se retrasa 1 h, respecto del que se obtiene al aplicar ALA, como se muestra en la Figura IV-3. Este retraso puede deberse a una mayor retención del dendrón, más lipofílico, en el estrato córneo del sitio de aplicación. También en el caso del He-ALA, la baja eficacia del derivado en inducir la formación de porfirinas luego de la topicación utilizando el mismo modelo animal (Perotti et al, 2003), fue atribuida a la retención del derivado lipofílico en el estrato córneo. Del mismo modo, y como ocurriera con el He-ALA, en piel distante a la aplicación tópica, se observó un nivel de acumulación de porfirinas significativamente menor, comparado con el ALA.

Cuando el dendrón se administró por vía sistémica, comparando con He-ALA, se vio una mayor síntesis de porfirinas en todos los tejidos, con la excepción del cerebro (Figuras VI-4 y 5). La cinética de formación de porfirinas luego de la administración i.p. de 3m-ALA a ratones se ve que es comparable con ALA (Perotti et al, 2003), sugiriendo que una vez dentro del organismo, la liberación de las moléculas de ALA mediante la desesterificación no afecta el porcentaje de formación de los tetrapirroles. Se ha propuesto que la baja eficacia obtenida por la administración sistémica de los ésteres de ALA puede deberse a la retención de los derivados en las vesículas sanguíneas en la fase inicial de distribución, y/o en los capilares del tumor (Perotti et al, 2003). Tunstall et al (2002) mostraron que el propil- y el ciclohexil-ALA no inducían acumulación de porfirinas luego de la administración intravenosa a ratones que portaban el adenocarcinoma mamario CaNT. Por el contrario el etil-, butil-, pentil-, hexil- y bencil-ALA indujeron la formación de porfirinas en el tumor, aunque fue menor con respecto a concentraciones equimolares de ALA.

Empleando una cromatografía de intercambio iónico, fue posible estudiar la eficiencia de la liberación de ALA a partir de 3m-ALA una vez incorporado en las células (Tabla IV-3). Aunque la incorporación intracelular de 3m-ALA fue comparable con la del ALA, se observó sólo una liberación parcial de ALA a partir de 3m-ALA, mostrando que la desesterificación es incompleta luego de una exposición de 3 h. Si bien no se hicieron mediciones a tiempos largos, los resultados en cuanto a la acumulación de porfirinas intracelulares mostrados en la Figura IV-2 son también consistentes con una liberación parcial de ALA. Luego de 3 h de incubación, el contenido de ALA es del 34%, por lo que se puede estimar que se hidroliza un



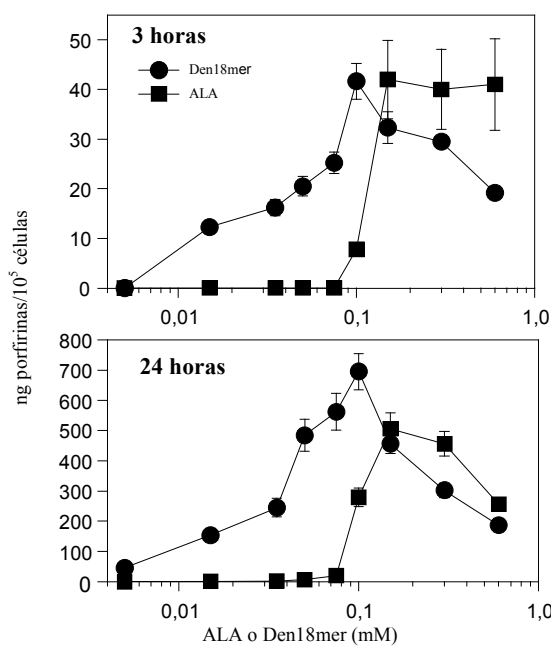
residuo de ALA por molécula de dendrón, en lugar los tres residuos. Resultados similares fueron encontrados por Perotti et al (2004), con las mismas células LM3, que fueron expuestas a He-ALA 0,6 mM y solo el 20% del derivado de ALA fue convertido a ALA libre, indicando que los niveles de esterasas pueden estar limitando la conversión del derivado de ALA a tetrapirroles. Otro factor limitante puede ser la accesibilidad de los residuos de ALA a las esterasas. No obstante, los resultados *in vivo* obtenidos con el 3m-ALA son alentadores y muestran la viabilidad del uso de esta nueva clase de derivados.

## V- Estudios *in vitro* e *in vivo* con el dendrímero Den18mer.

Como se indicó en el capítulo anterior, Battah et al (2001) sintetizaron dendrímeros que contienen 18 moléculas de ALA, y demostraron que algunos de esos dendrímeros son capaces de inducir una síntesis de porfirinas suficientes como para causar fotodaño celular.

### V-1. Síntesis de porfirinas *in vitro*.

La Figura V-1 muestra la síntesis de porfirinas a partir de concentraciones equimolares de ALA y Den18mer.



**Figura V-1:** Síntesis de porfirinas a partir de ALA o Den18mer en células LM3

Las células fueron expuestas a ALA o Den18mer durante 3 o 24 h. Al cabo de ese tiempo, las porfirinas fueron extraídas químicamente y cuantificadas, como se detalla en Materiales y Métodos.

Puede observarse que a bajas concentraciones, el dendrímero de 18 moléculas de ALA indujo una síntesis de porfirinas comparativamente alta respecto del ALA libre, tanto

a tiempos cortos (3 h) como a tiempos largos (24 h). Concentraciones de Den18mer superiores a 0,1 mM fueron tóxicas, y consecuentemente, la formación de porfirinas disminuye. Esta toxicidad fue confirmada mediante el ensayo de MTT (datos no mostrados). Para ambos compuestos, la síntesis de porfirinas aumenta considerablemente a las 24 h de incubación.

## V-2. Acumulación intracelular de ALA y Den18mer.

En la Tabla V-I se puede ver que cuando las células se exponen a ALA o Den18mer a una concentración 0,1 mM, la acumulación intracelular de ALA/Den18mer fue 7,5 veces mayor cuando se incubaba con el dendrímero, lo que se correlaciona con la mayor síntesis de porfirinas observada a dicha concentración. Por otro lado, Den18mer se hidroliza espontáneamente de manera muy rápida en medio sin suero libre de células (Tabla V-II), y este efecto se incrementa marcadamente con el tiempo. El porcentaje de ALA hidrolizado a partir del dendrímero luego de la incubación con células, es comparable con el porcentaje hidrolizado en medio libre de células. La adición de suero al medio, no modifica el grado de hidrólisis.

**Tabla V-1:** Acumulación de ALA y PBG intracelular, luego de la exposición a ALA o Den18mer

	pmoles de ALA+Den18mer /10 <sup>5</sup> células	pmoles PBG /10 <sup>5</sup> células	% de ALA hidrolizado
Control	1,62 ± 0,07	0,75 ± 0,03	100
ALA	13,05 ± 0,90	1,5 ± 0,11	100
Den18mer	97,9 ± 6,20	2,7 ± 1,3	25.6

*Se incubaron las células con ALA o Den18mer 0,1 mM, luego de 3 h se cuantificó la cantidad de ALA y PBG acumulado intracelularmente. ALA, Den18mer y PBG fueron determinados utilizando el reactivo de Ehrlich de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos. El porcentaje de ALA hidrolizado fue determinado luego de separar el dendrímero por cromatografía de intercambio iónico.*

**Tabla V-2:** Estabilidad de Den18mer ALA en medio libre de células

Tiempo (horas)	Den18mer hidrolizado (%)	nmoles de ALA liberados
0	0	0
1	10,8	194,4 ± 12,5
3	29,2	525,6 ± 30,2
24	40,3	725,4 ± 62,5
48	92,3	1661,4 ± 112

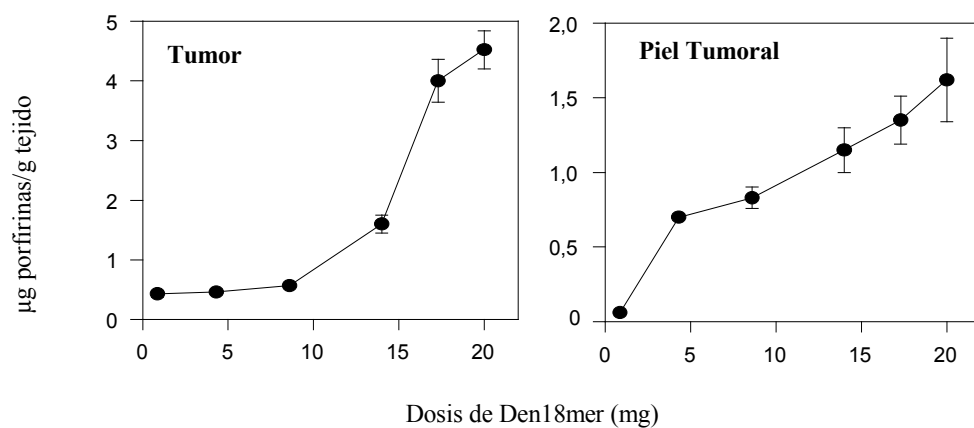
Se incubaron 100 nmoles de Den18mer en 1 ml de medio sin suero y sin células, a 37°C. La hidrólisis de ALA fue determinada por cromatografía de intercambio iónico.

### V-3. Síntesis de porfirinas *in vivo*.

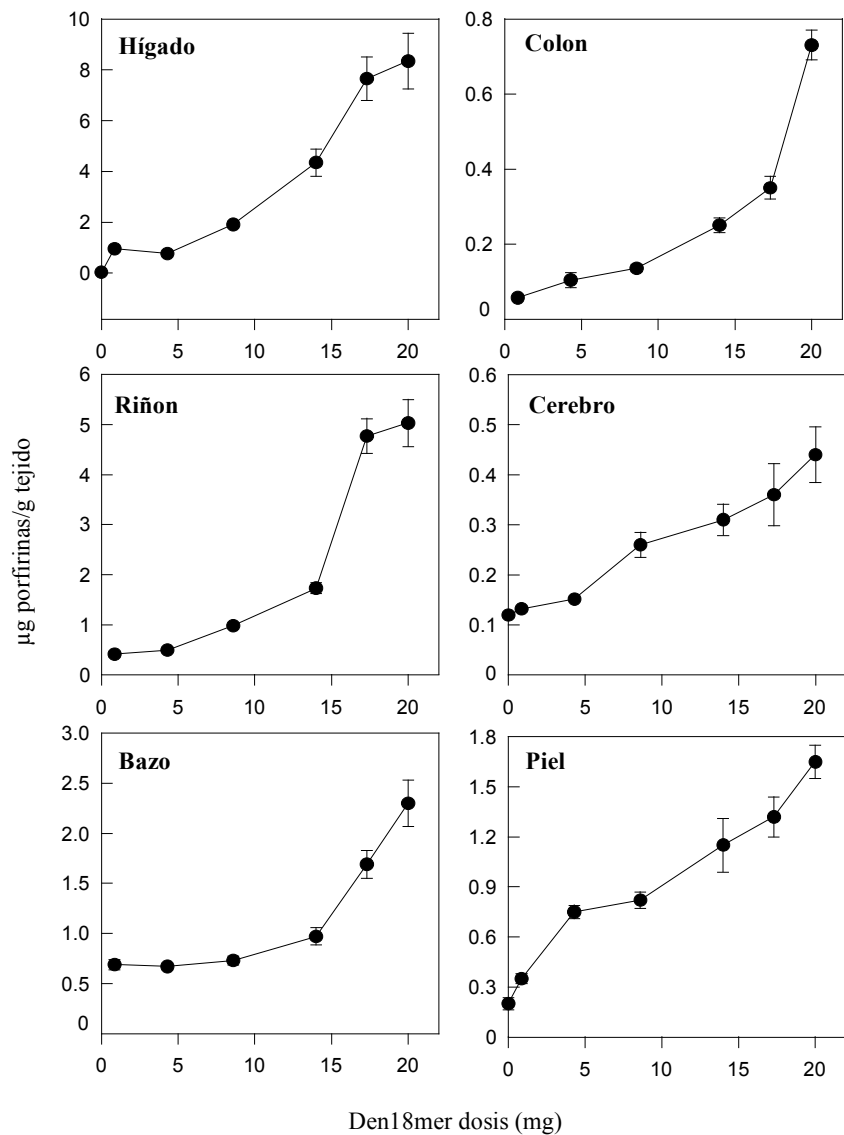
Se inyectaron por vía i.p. ratones de la cepa Balb/c portadores del adenocarcinoma mamario LM3, con diferentes dosis de Den18mer. Luego de 24 h, se extrajeron los diversos tejidos incluyendo el tumor y se cuantificó la cantidad de porfirinas acumuladas. La dosis máxima inyectada por ratón fue de 20 mg, dosis mayores resultaron ser letales. Como puede observarse en las Figuras V-2 y V-3, las porfirinas fueron sintetizadas en todos los tejidos analizados, incluyendo tumor y piel tumoral.

Cuando se comparó la acumulación de porfirinas luego de inyectar i.p. Den18mer y ALA en dosis equimolar o equimolar x 18, se observó que la cinética de aparición de porfirinas a partir de ALA en la mayoría de los tejidos muestra claramente un pico marcado entre las 3 y 4 h. Por el contrario, con Den18mer la producción de porfirinas se mantiene relativamente elevada durante un amplio rango de tiempo, y hacia las 48 h vuelven a su estado basal (Figuras V-4 y V-5). En hígado (Figura V-5), se observa un pico de porfirinas a las 24 h luego de la administración de Den18mer, en el caso del colon el compuesto resultó ser particularmente ineficiente. En esas figuras, si se calculan las áreas bajo las curvas de porfirinas a partir de Den18mer y ALA equimolar x 18, los resultados indican

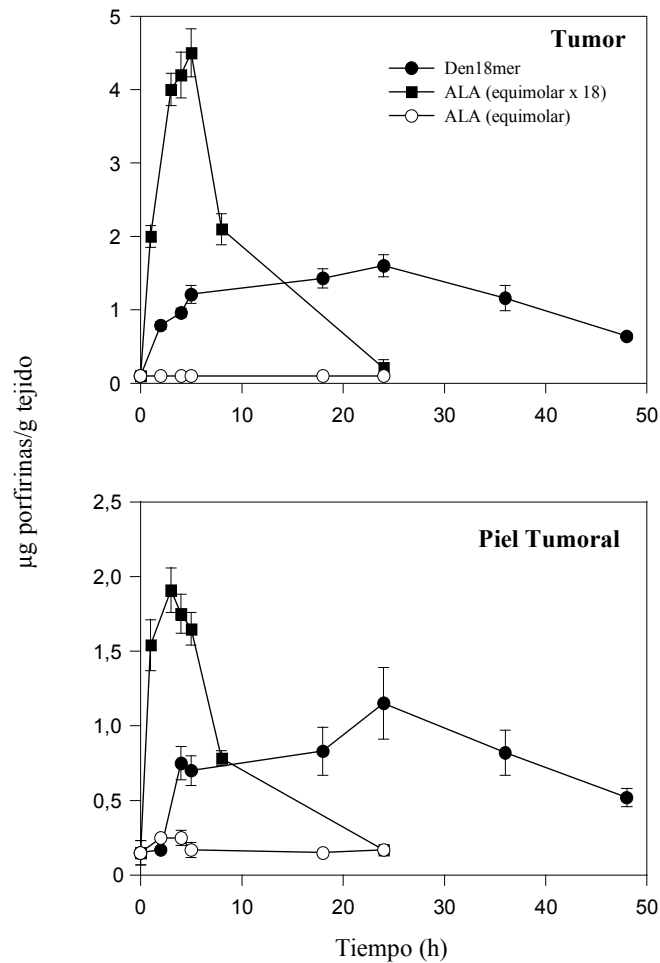
que son comparables para la mayoría de los tejidos excepto para colon. Se puede concluir entonces que todos los residuos ALA son liberados del Den18mer y la producción total de porfirinas es la misma para ambos compuestos, Den 18mer y 18xALA.



**Figura V-2:** Síntesis y acumulación de porfirinas en el tumor LM3 y piel tumoral (PT) luego de la administración i.p. de Den18mer. Los ratones portadores del adenocarcinoma LM3 fueron inyectados i.p. con diferentes cantidades de Den18mer. Luego de 24 h, los animales fueron sacrificados, se homogeneizaron los tejidos y se extrajeron y cuantificaron las porfirinas.

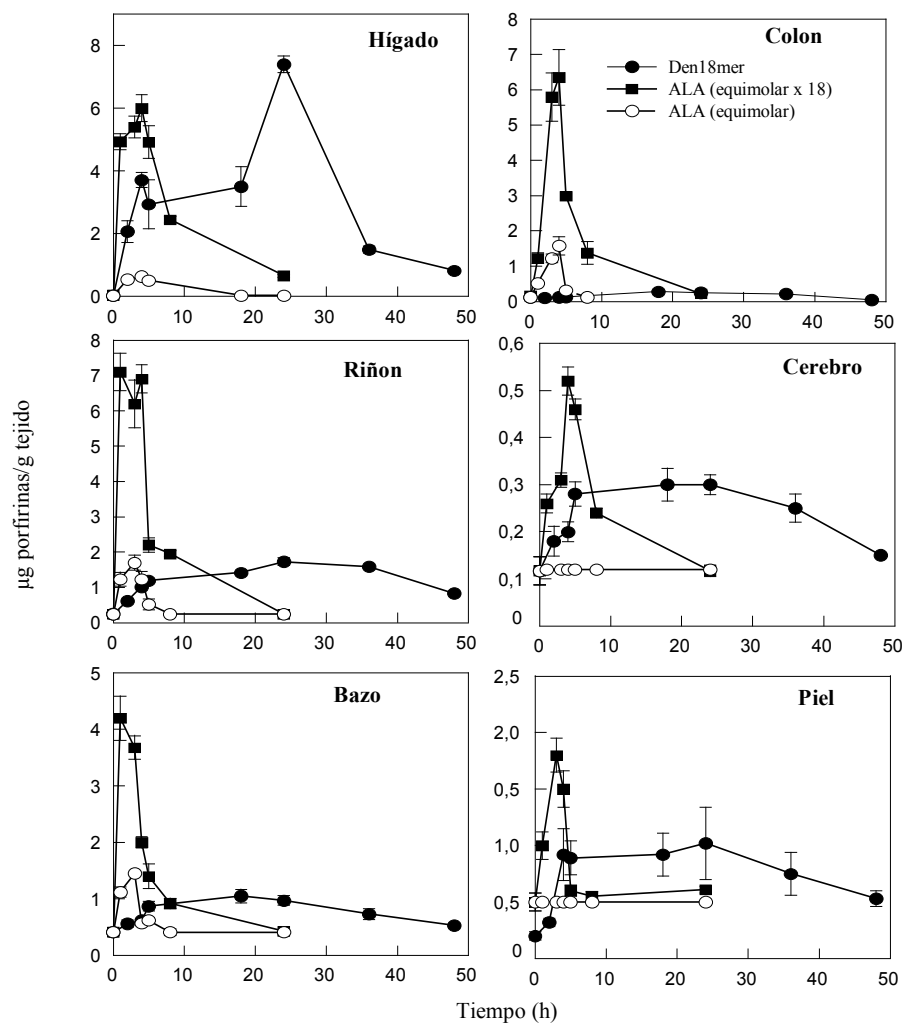


**Figura V-3:** Acumulación de porfirinas en tejidos, luego de la administración i.p. de Den18mer. Los ratones portadores del adenocarcinoma LM3 fueron inyectados i.p. con diferentes cantidades de Den18mer. Luego de 24 h, los animales fueron sacrificados, se homogeneizaron los tejidos y se extrajeron y cuantificaron las porfirinas.



**Figura V-4:** Síntesis de porfirinas a partir de ALA o Den18mer en tumor LM3 y piel tumoral en función del tiempo

Los ratones fueron inyectados i.p. con 14 mg de Den18mer, 7,4 mg de ALA (18 veces la dosis equimolar de Den18mer) o 0,5 mg de ALA (dosis equimolar de Den18mer). A diferentes tiempos, los animales se sacrificaron y se extrajeron los tejidos y cuantificaron las porfirinas.



**Figura V-5:** Síntesis de porfirinas a partir de ALA o Den18mer en diferentes tejidos en función del tiempo incubación.

Los ratones fueron inyectados i.p. con 14 mg de Den18mer, 7,4 mg de ALA (18 veces la dosis equimolar de Den18mer) o 0,5 mg de ALA (dosis equimolar de Den18mer). A diferentes tiempos, los animales se sacrificaron y se extrajeron y cuantificaron las porfirinas de los tejidos.

#### V-4. Discusión.

*In vitro*, el Den18mer empleado a una concentración 0,1 mM resultó más eficiente que el ALA en cuanto a la síntesis de porfirinas, tanto a intervalos de incubación cortos como largos, lo que se correlaciona con una acumulación intracelular elevada de



ALA/Den18mer. Concentraciones de Den 18mer mayores que 0,1 mM fueron tóxicas. Considerando la rápida hidrólisis espontánea del Den18mer, esta elevada síntesis de porfirinas puede deberse a una liberación espontánea de ALA y no a la acción de las esterazas (30% del dendrímero en 3 h).

La hidrólisis espontánea del Den18mer en medio libre de células puede ser relevante en la situación *in vivo*, pues indicaría que a pH fisiológico, el ALA se liberaría en forma continua y gradual desde el dendrímero a la circulación para alcanzar los tejidos, luego de una administración sistémica.

Mientras que la cinética de formación de porfirinas a partir de ALA muestra claramente un pico entre las 3 y 4 h en la mayoría de los tejidos, Den18mer induce una producción elevada y constante de porfirinas, volviendo al valor basal a las 48 h. Comparando las áreas bajo las curvas, se puede concluir que todos los residuos de ALA del Den18mer son liberados y que se alcanzan a sintetizar una misma cantidad de porfirinas tanto a partir de ALA como de Den18mer.

Basado en los experimentos de estabilidad, los datos *in vitro* y la cinética de aparición de PpIX en los diferentes tejidos, resulta aparente que el Den18mer no se incorpora a las células por el mecanismo clásico de endocitosis de macromoléculas (El-Sayed et al, 2003; Jevprasesphant et al 2004; D'Emanuele et al, 2004), sino que lo que se incorporarían serían las moléculas de ALA liberadas espontáneamente.

## **VI- Sensibilidad de células con diferente producción de óxido nítrico a TFD-ALA y resistencia a citotoxicidad a óxido nítrico.**

### **VI-1 Interacciones entre ALA-TFD y Oxido Nítrico.**

Como ya lo hemos comentado, el NO, no sólo controla importantes funciones en la progresión tumoral sino que tiene gran influencia en las terapias contra el cáncer, particularmente aquellas que son mediadas por la generación de especies reactivas de oxígeno.

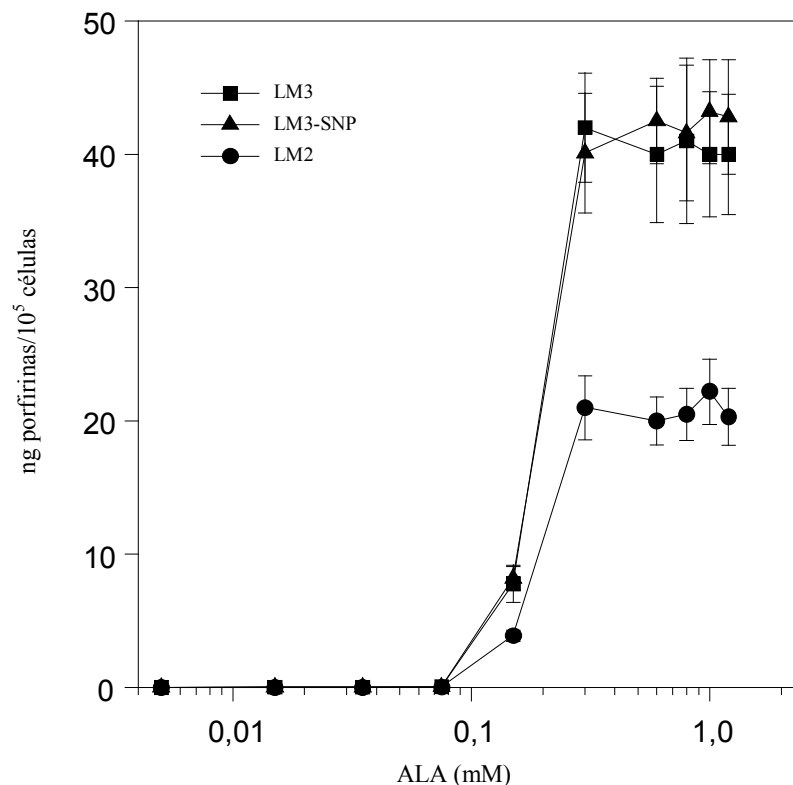
En lo que respecta al ALA- TFD, se ha reportado que tanto *in vitro* como *in vivo* el tratamiento con TFD induce un incremento en la producción de NO (Ogura et al, 1998; Cook et al, 2004)

Las líneas celulares empleadas en el presente trabajo, LM2 y LM3, difieren en cuanto a la producción de NO (Eijan et al, 1998; Galli et al, 1999), por lo que se consideró interesante estudiar las interacciones entre el metabolismo del radical gaseoso y el ALA-TFD.

Para evaluar las interacciones entre el ALA y el oxido nítrico (NO) en la terapia fotodinámica, se emplearon tres líneas celulares de adenocarcinoma murino: LM2, LM3 y LM3-SNP, esta última derivada de LM3 y resistente a NO obtenida por sucesivas exposiciones al dador de NO, nitroprusiato de sodio (SNP).

### **VI-2. Síntesis de porfirinas a partir de ALA.**

La Figura VI-1 muestra la dependencia de la síntesis de porfirinas con la concentración de ALA, y se observa que en las tres líneas celulares los puntos de saturación se alcanzan con ALA 0,3 mM, pero la cantidad de porfirinas acumuladas fue marcadamente menor en la línea LM2. El máximo de porfirinas para las células LM3 y LM3-SNP, fue alrededor de 40 ng/10<sup>5</sup> células, y de 21 ng/10<sup>5</sup> células en la línea LM2.



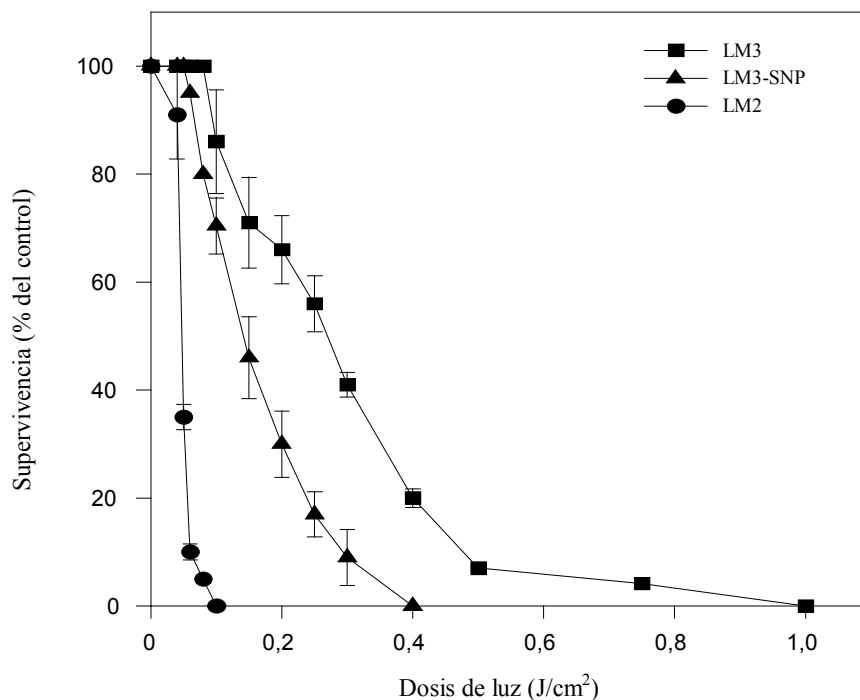
**Figura VI-1:** Síntesis de porfirinas a partir de ALA en células LM2, LM3 y LM3-SNP

Se incubaron  $3,5 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pocillos, en presencia de diferentes cantidades de ALA durante 3 h. Al cabo de ese tiempo, se extrajeron las porfirinas intracelulares, se cuantificaron fluorométricamente y se normalizaron por número de células.

### VI-3. Efecto de la dosis lumínica.

Para investigar el efecto de la dosis lumínica en la TFD, se incubaron las células con una concentración de ALA 0,6 mM.

En la Figura VI-2 se muestra el daño inducido por ALA-TFD en función de las diferentes dosis de luz. Las DL50 son:  $0,27 \text{ J/cm}^2$  para LM3;  $0,10 \text{ J/cm}^2$  para LM3-SNP y  $0,047 \text{ J/cm}^2$  para LM2. La línea celular más sensible fue la LM2, en tanto que LM3 fue la más resistente.



**Figura VI-2:** Supervivencia celular luego de ALA-TFD con diferentes dosis lumínicas en células LM2, LM3 y LM3-SNP

Se incubaron las células con una concentración de ALA 0,6 mM en medio sin suero durante 3 h, en placas de 6 pocillos. Inmediatamente después, las células fueron irradiadas con diferentes dosis de luz e incubadas en medio con suero durante 19 h. La supervivencia celular se determinó mediante el ensayo de MTT y se expresa como porcentaje del control no irradiado incubado en presencia de ALA.

#### VI-4. Producción de NO en las diferentes líneas celulares.

La Tabla VI-1 describe la producción de NO a partir de las diferentes líneas celulares. Las células LM3 y LM3-SNP producen igual cantidad de NO ( $8,5 \text{ nmol NO}^{2-}/10^6$ ), y ambas fueron inducidas significativamente por arginina (Arg), el sustrato para la síntesis de NO. En el caso de las células LM2 bajo ninguna condición fue detectable la producción de NO. L-NAME, inhibidor de la forma constitutiva de la enzima NOS, inhibe significativamente la producción de NO tanto en la línea LM3 como en la LM3-SNP.

El donador de NO, SNP, empleado en concentraciones no tóxicas, induce la liberación de NO independientemente de la producción endógena. Eijan et al (1998), ya habían descripto previamente la producción de NO en función de la concentración de SNP, Arg y L-NAME.

**Tabla VI-1:** Producción de NO a partir de células LM2, LM3 y LM3-SNP

	Control	Arg	L-NAME	SNP
LM2	N.D.	N.D.	N.D.	5,12 ± 0,25
LM3	8,2 ± 0,45	11,3 ± 1,15	5,7 ± 0,67	13,1 ± 1,17
LM3-SNP	8,5 ± 0,51	11,6 ± 1,10	6,1 ± 0,58	14,3 ± 1,36

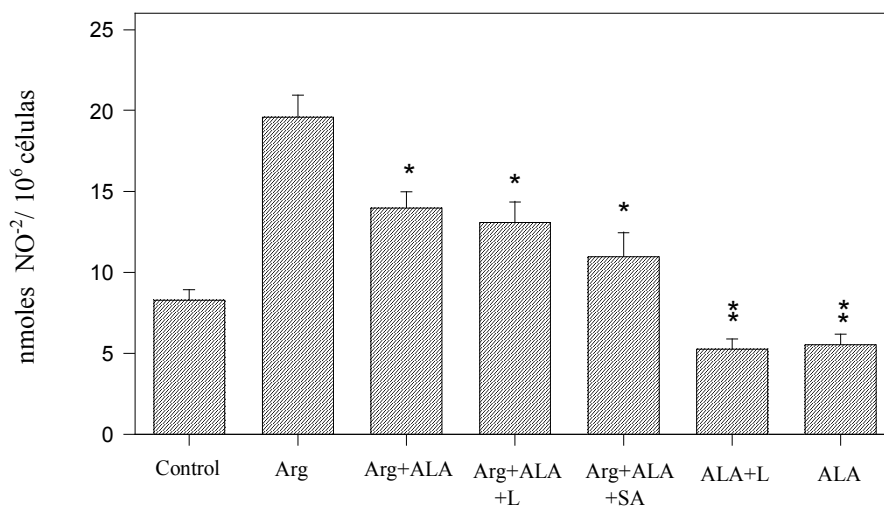
Las células fueron expuestas durante 18 h a Arg 1 mM, L-NAME 1 mM o SNP 0,001 mM. Posteriormente, se cuantificó el NO liberado al medio como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como nmoles  $\text{NO}_2^- / 10^6$  células presentes en el comienzo del experimento. N.D. = no detectable.

Cuando se estudió el efecto de la Arg en el ALA-TFD, se encontró que el agregado de Arg antes, durante o después de la TFD, no modificó la toxicidad del ALA-TFD en ninguna de las tres líneas celulares, y tampoco se encontró incremento de la producción intrínseca de NO luego del ALA-TFD (datos no mostrados).

#### **VI-5. Efecto del ALA en la producción de NO.**

En forma inesperada, se encontró que la adición de ALA modifica la producción de NO a partir de Arg en las células LM3 (Figura VI-3). Luego de 18 h de incubación, en condiciones control, es decir, sin el agregado de Arg, se formaron 8,2 nmoles  $\text{NO}_2^- / 10^6$  células, en tanto que en presencia de Arg se incrementa a 19,6 nmoles  $\text{NO}_2^- / 10^6$  células. El agregado de ALA (Arg + ALA) al medio de incubación, reduce la producción de NO celular, a 14,8 nmoles  $\text{NO}_2^- / 10^6$  células. Esta disminución se observa también en células irradiadas (Arg + ALA + L), demostrando que la dosis de luz no interfiere en este proceso, y dado que el inhibidor del ALA dehidrasa, succinil acetona (SA), no modifica estos resultados, la producción de porfirinas tampoco estaría involucrada. La producción basal de

NO no se modificó por el tratamiento con ALA o ALA-TFD en células no expuestas a Arg, y el medio sin células tratado de la misma manera no mostró alteración alguna en el contenido de NO.



**Figura VI-3:** Producción de NO en células LM3 luego de exposición a ALA y arginina. Células LM3 fueron incubadas 18 h con Arginina 1 mM y luego recibieron los siguientes tratamientos:

*Arg:* incubadas con Arg 1 mM por otras 18 h.

*Arg + ALA:* incubadas con Arg 1 mM y ALA 0,6 mM por 18 h.

*Arg + ALA + L:* incubadas con Arg 1 mM y ALA 0,6 mM por 3 h, irradiadas (0.27 J/cm<sup>2</sup>) y se continuó la incubación en presencia de ALA y Arg por otras 15 h.

*Arg + ALA + SA:* incubadas con Arg 1 mM, SA 0,5 mM y ALA 0,6 mM por 18 h.

*ALA:* incubadas con ALA 0,6 mM por 18 h.

*ALA + L:* incubadas 3 h con ALA 0,6 mM, irradiadas (0.27 J/cm<sup>2</sup>) y expuestas por otras 15 h a ALA.

La cuantificación de NO fue realizada al finalizar el tratamiento y se expresa como nmoles NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /10<sup>6</sup> células presentes al comienzo del experimento.

Controles, valores basales de NO.

\**p* < 0,05 (comparado con la condición de Arg)

\*\**p* < 0,05 (comparado con el Control)

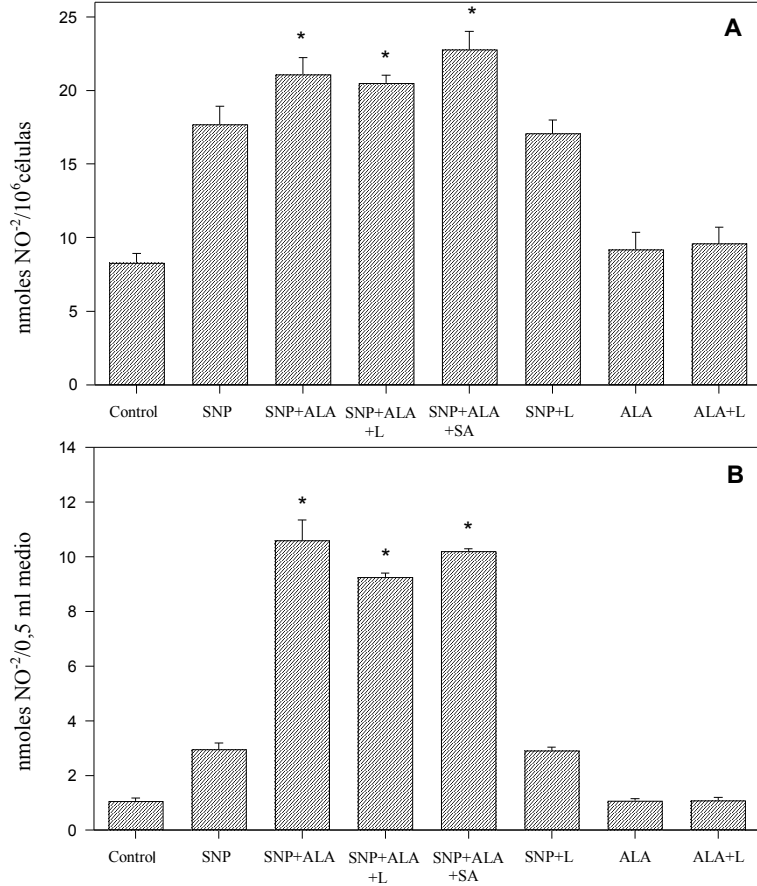
Se observó un comportamiento similar en las células LM3-SNP pero no así en las células LM2, que no producen NO per se (datos no mostrados).

#### **VI-6. Efecto del SNP en la producción de NO.**

El donador de NO, SNP, induce un incremento en la producción de NO tiempo dependiente tanto en células LM3 como en medio sin células (datos no mostrados). En células LM3, una concentración 0,001 mM de SNP libera 13,1 nmoles  $\text{NO}_2^-/10^6$  células luego de 18 h de incubación (Tabla VI-1), y otras 18 h de exposición a SNP producen 17,5  $\text{NO}_2^-/10^6$  células. El agregado de ALA a células tratadas con SNP (SNP + ALA) luego de 18 h induce un significativo aumento de la producción de NO (Figura VI-4A).

En medio con suero, el agregado de ALA 0,6 mM induce un aumento aún mayor de la liberación de NO (Figura VI-4B), de 3,5 veces.

El incremento en la producción de NO, tanto en medio como en células, es independiente del tratamiento lumínico (SNP + ALA + L) y de la acción del inhibidor SA, indicando que ni los efectos fotodinámicos ni las porfirinas interfieren en el proceso. El ALA por sí mismo o al ser irradiado, no modificó el contenido basal de NO, y el SNP no fue afectado por el tratamiento de luz. Se observan patrones similares en las líneas celulares LM3-SNP y LM2 (datos no mostrados).



**Figura VI-4:** Producción de NO en células LM3 y en medio libre de células, luego de exposición a SNP y ALA

A) en células; B) en medio. Se incubaron las células LM3 o el medio con suero sin células, con SNP 0,001 mM por 18 h y luego se continuó con los siguientes tratamientos: SNP: expuesto a SNP 0,001 mM por otras 18 h; SNP + ALA: expuesto a SNP 0,001 mM y ALA 0,6 mM por 18 h; SNP + ALA + L: expuesto a SNP 0,001 mM y ALA 0,6 mM por 3 h, irradiado (0.27 J/cm<sup>2</sup>) y luego se continuó la incubación en presencia de SNP y ALA por otras 15 h; SNP + ALA + SA: expuesto a SNP 0,001 mM, SA 0,5 mM y ALA 0,6 mM por 18 h; SNP + L: expuesto a SNP 0,001 mM, irradiado (0.27 J/cm<sup>2</sup>) y expuesto a SNP por otras 18 h; ALA: expuesto 18 h a ALA 0,6 mM; ALA + L: expuesto 3 h a ALA 0,6 mM, irradiado (0.27 J/cm<sup>2</sup>) e incubado por otras 15 h con ALA.

La cuantificación de NO fue realizada al finalizar los tratamientos. La producción de NO se expresa en nmoles NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup> células presentes al comienzo del experimento, o nmoles NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/0,5 ml de medio. Control de células: producción basal de NO. Control de medio: producción basal de NO en el medio. \*p < 0,05 (comparado con la condición SNP).

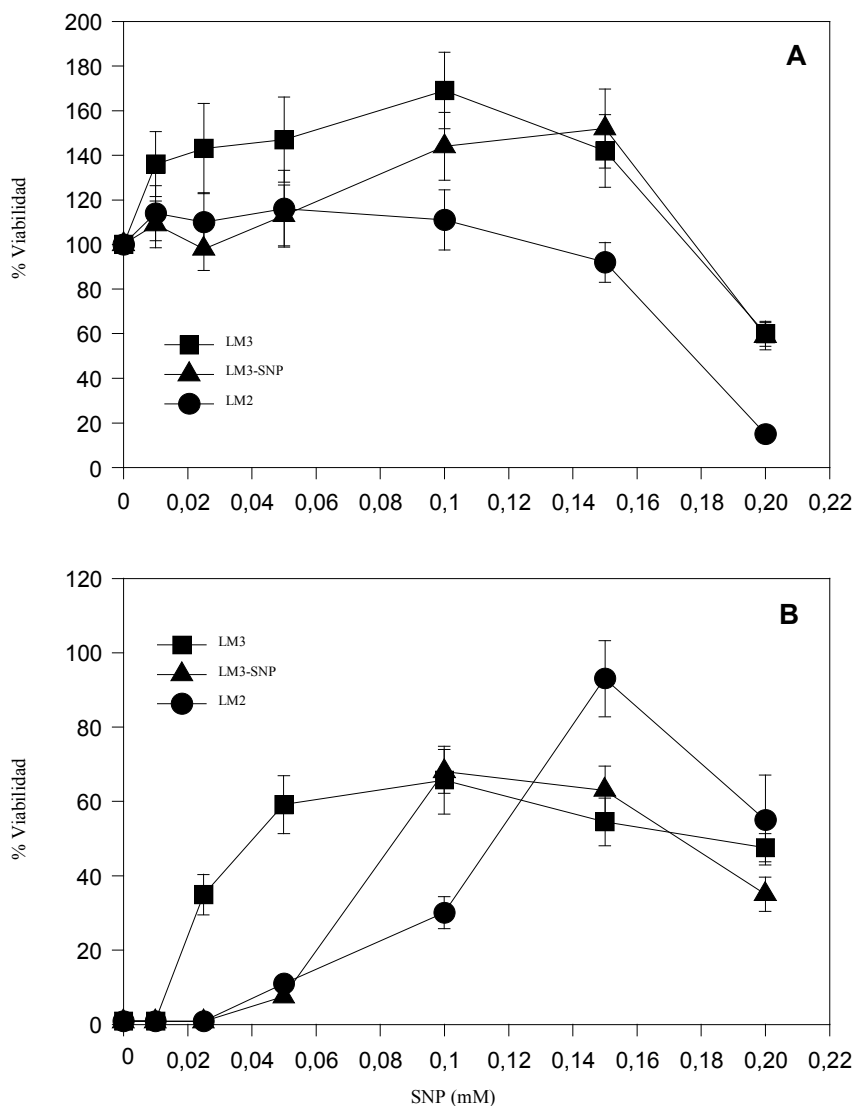


### **VI-7. Efecto de SNP en la TFD.**

El tratamiento de las células LM3, LM2 y LM3-SNP con Arg o L-NAME, no modificó la respuesta a la TFD (datos no mostrados). Sin embargo, el SNP en un cierto rango de concentraciones, tuvo un efecto protector del daño producido por el ALA-TFD (Figura VI-5). Bajas concentraciones de SNP (0,005 a 0,15 mM) indujeron un incremento de alrededor del 40% en la proliferación de células LM3 y LM3-SNP; en células LM2 el incremento fue bajo y no significativo (Figure VI-5A). Concentraciones mayores de SNP resultaron citotóxicas para las tres líneas celulares.

En lo que respecta a la fotosensibilización por ALA-TFD de estas células previamente expuestas a SNP (Figura VI-5B), se observó una disminución de la citotoxicidad dependiente de la concentración de SNP, y dicha protección fue levemente dependiente de la línea celular. Los resultados se confirmaron con el ensayo de formación de colonias (datos no mostrados), descartando así la hipótesis de alguna interferencia del SNP con el ensayo de MTT.

También se encontró que cuanto mayor es la dosis lumínica, mayor es la protección, y esta protección fue ejercida aún a concentraciones tóxicas de SNP (0.2 mM) (datos no mostrados).

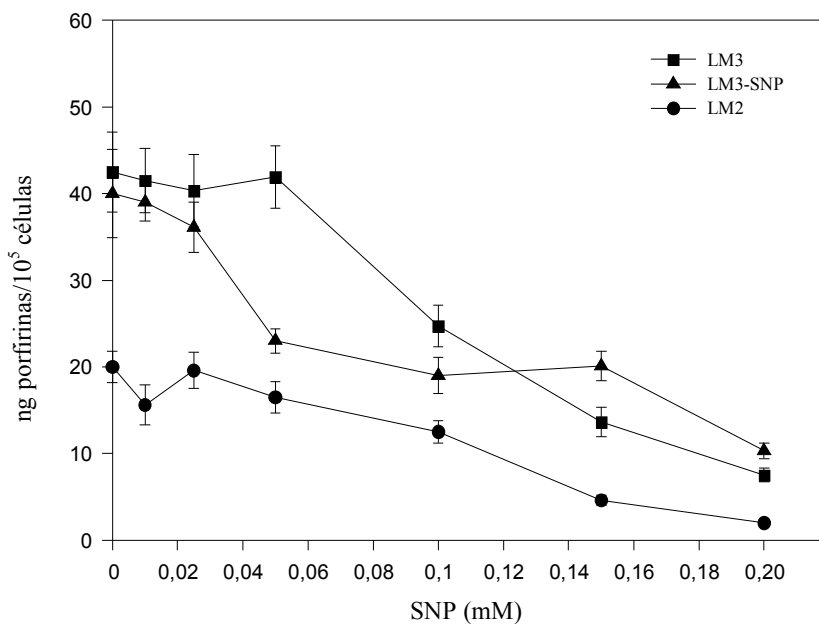


**Figura VI-5:** Efecto del SNP sobre la proliferación celular y protección a la toxicidad de ALA-TFD

Las células fueron preincubadas durante 18 h con diferentes concentraciones de SNP en medio conteniendo suero. Luego A): el medio fue reemplazado por medio sin suero e incubado 21 h, se realizó el ensayo de MTT y se calculó el porcentaje de viabilidad con respecto al control sin SNP: B): el medio fue reemplazado por medio sin suero conteniendo ALA 0,6 mM y luego de 3 h, las células fueron irradiadas con una dosis lumínica que produce el 99% de muerte celular. El ensayo de MTT se realizó luego de 18 h.

## VI-8. Efectos de SNP sobre la síntesis de porfirinas.

Con el fin de investigar la protección del SNP frente al daño de la TFD mediada por ALA, se estudió el efecto del SNP sobre la síntesis de porfirinas (Figura VI-6). Así, encontramos que al pre-incubar con SNP disminuye la síntesis de porfirinas en las tres líneas celulares. Aún en las células LM2, donde los efectos de SNP sobre la proliferación son casi indetectables, se observó una disminución en la acumulación de porfirinas, mostrando que este fenómeno no está relacionado con la densidad celular.



**Figura VI-6:** Síntesis de porfirinas en células expuestas a SNP

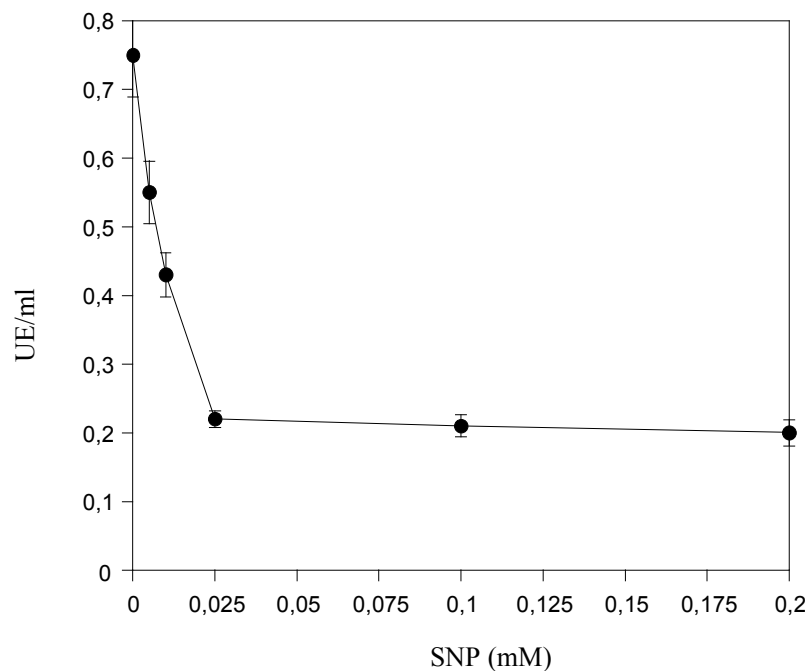
Se preincubaron las células durante 18 h con diferentes concentraciones de SNP en medio con suero. Al cabo de ese tiempo, el medio fue reemplazado por medio sin suero conteniendo ALA 0,6 mM y luego de 3 h se extrajeron las porfirinas con HCl. Los resultados se normalizaron por número de células presentes luego de la inducción de la proliferación con SNP.

Se investigó además si la efectividad de la TFD con PpIX exógeno también se ve afectada por la exposición a SNP, y se observó que el donador de NO no modifica dicha

respuesta a la TFD, (datos no mostrados), reforzando así la hipótesis de que el SNP ejerce su acción a través del deterioro de la síntesis de porfirinas.

#### VI-9. Efecto de SNP sobre las enzimas ALA dehidrasa y/o porfobilinógeno deaminasa.

Otro de los aspectos estudiados fue ver si el SNP es capaz de inhibir las enzimas ALA dehidrasa y/o Porfobilinógeno deaminasa, que catalizan los dos pasos de conversión de ALA a Uroporfirinogeno III, primer tetrapirrol en el camino del hemo. Para estas experiencias se emplearon eritrocitos humanos debido a la alta actividad de las enzimas en esa fuente. Como puede verse en la Figura VI-7, el ALA dehidrasa se inhibió dramáticamente aún a bajas concentraciones de SNP, en cambio la Porfobilinógeno deaminasa (Valor normal:  $70 \pm 10$  unidades/ml) no se inhibió en ese mismo rango de concentraciones (datos no mostrados).



**Figura VI-7:** Actividad de ALA dehidrasa de eritrocitos humanos en presencia de SNP.

Los eritrocitos humanos se incubaron durante 3 h con diferentes concentraciones de SNP, luego se determinó la actividad del ALA dehidrasa, según se detalla en Materiales y Métodos.

## VI-10. Comparación con otro donador de NO.

Además del SNP, estudiamos los efectos de otro donador de NO, el DetaNONOato. Empleando condiciones en que se produce el mismo grado de liberación de NO que el SNP, observamos que el Deta NONOato no protege frente a la toxicidad del ALA-TFD ni tampoco con respecto a la inhibición de síntesis de porfirinas a partir de ALA, mostrando que estos hechos no están relacionados con la producción de NO (datos no mostrados).

## VI-11. Discusión.

El mecanismo por el cual se produce la liberación del NO del SNP no se conoce aún, pero se especula que ocurre espontáneamente, de acuerdo a estudios realizados con tejido vascular luego de la reacción con varios agentes reductores. El mecanismo propuesto es que un electrón es transferido al ligando  $\text{NO}^+$  a partir de otras moléculas, reduciendo el anión SNP. Agentes oxidantes como el yodo inhiben la liberación de NO a partir de SNP, el KCN también bloquea la liberación de  $\text{CN}^-$  y la formación de intermediarios necesarios para la liberación de NO (Bates et al, 1991), mientras que bajo condiciones hipóxicas, la liberación de NO a partir de SNP se vea incrementada (Ioannidis et al, 1996).

En nuestro caso, el ALA aumentó la producción de NO a partir de SNP en células y en medio. Fraga et al (1994) demostraron que el ALA podría comportarse *in vitro* como un pro-oxidante, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno con la oxidación catalizada de hierro a ácido 4,5-dioxovalérico. De acuerdo a nuestros resultados entonces, los agentes oxidantes como el ALA y/o los radicales libres inducidos por el ALA en lugar de inhibir la liberación de NO a partir de SNP, la aumentaron.

En presencia de ALA, la producción de NO a partir de SNP se incrementó en 2,4 nmoles en el medio conteniendo células, pero el incremento en medio libre de células fue mayor aún (7,65 nmoles más que en el control de SNP). Este hecho no está relacionado con la producción de porfirinas en células, ya que las células tratadas con el inhibidor de ALA dehidrasa, SA, muestran un incremento equivalente de NO. Es posible que en el medio condicionado con células se produzca un microambiente de óxido-reducción diferente debido a la pérdida progresiva de vitaminas y aminoácidos, una leve diferencia de pH, o es posible que tengan lugar otras alteraciones que no favorecen la liberación de NO desde el SNP en presencia de ALA.

Dentro de las células, los resultados parecen indicar que el ALA inhibe la conversión de Arg a NO a través de la NOS. Si bien se ha visto que PpIX inhibe las tres isoformas de la NOS (Wolff et al, 1996), de acuerdo a las experiencias realizadas por Correa et al (2003) con SA, en las que se encuentra impedida la formación de porfirinas, se puede descartar la hipótesis de un mecanismo que involucre las porfirinas. Es posible que el ALA actúe a través de una reacción con la Arg consumiendo el sustrato NO, o inhibiendo la actividad de la NOS o alternativamente, aumentando la actividad de la arginasa.

En roedores, se ha encontrado que la inhibición de la producción de NO reduce el diámetro vascular y el flujo sanguíneo en tumores, modulando la permeabilidad vascular e induciendo hipoxia tumoral (Fukumura et al, 1997; Wood et al, 1994), factores que modulan la respuesta a la TFD (Henderson et al, 1999; Korbelik et al, 2000). No obstante, la disminución de los niveles endógenos de NO debido al ALA, puede conducir *in vivo* a un incremento del flujo sanguíneo y la disponibilidad de oxígeno, y consecuentemente la eficacia del ALA-TFD en la cura de tumores podría deberse parcialmente a esta interacción.

Siendo un pobre oxidante en sí mismo, el NO reacciona rápidamente con el anión superóxido ( $O_2^-$ ) para dar el radical peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un agente nitrante y fuerte oxidante (Beckman, 1996). Por otro lado, en un medio biológico, si el NO es más persistente que el  $O_2^-$  podría exhibir propiedades antioxidantes (Wink & Mitchell, 1998). Además, el NO puede también reaccionar con radicales libres, bloqueando así la reacción de propagación de la cadena lipídica (Rubbo et al, 1994), ligarse a complejos pro-oxidantes de hierro (Wink & Mitchell, 1998) o inactivar la inducción de apoptosis vía caspasas por S-nitrosilación (Rossig et al, 1999).

Algunos autores han encontrado que ciertos donores de NO previenen el fotodaño. Según Gomes et al (2002), el agregado de arginina o donores de NO disminuye la muerte celular apoptótica luego de la fotosensibilización de células con ftalocianinas de aluminio. El donador de NO, NONOato-espermina inhibió la lipoperoxidación y el fotodaño necrótico inducido por el ALA-TFD en una línea celular epitelial de cáncer de mama (Niziolek et al, 2003) por el deterioro de las reacciones posteriores a la foto-oxidación. En las líneas celulares utilizadas en este trabajo, ninguno de los donores de NO, SNP y DETA NONOato inhibieron marcadamente el daño celular producido por el ALA-TFD. Se encontró que el SNP protege a las células del ALA-TFD debido a una disminución de la biosíntesis de porfirinas como consecuencia de una inhibición del ALA dehidratasa. Como el Deta-

NONOato no protege contra la toxicidad del ALA-TFD ni inhibe la síntesis de porfirinas a partir de ALA, el efecto observado para el SNP no está relacionado con la producción de NO.

Más aún, la falta de acción del SNP sobre la eficacia de la TFD al utilizar PpIX exógeno, refuerza la hipótesis de que el bloqueo de la síntesis porfirínica es el único factor involucrado en la fotoprotección a ALA-TFD. Los efectos del SNP sobre la actividad del ALA dehidrasa tampoco sorprenden, debido a la naturaleza sulfhidrónica de esta enzima, aunque no han sido descritos previamente. El tratamiento con SNP, a través de la inhibición del ALA dehidrasa, produce una disminución del pool de hemo, y por tanto la síntesis de NOS, y consecuentemente inhibe la síntesis endógena de NO. Dado que el SNP es utilizado clínicamente para el control inmediato del aumento de la presión sanguínea, en fallas congestivas de corazón y el control de sangrado durante las cirugías, la caracterización de dicha inhibición puede ser de interés para futuros estudios.

Las células LM3-SNP y LM3 producen igual cantidad de porfirinas inducidas por ALA, y exhiben una producción similar de NO. Sin embargo, las células LM3-SNP son más sensibles al ALA-TFD y más resistentes a la citotoxicidad inducida por NO. No sólo no se encontró una resistencia cruzada entre NO y TFD, sino que por el contrario, en este caso, una mayor resistencia a NO se relacionó con una mayor sensibilidad a TFD.

Inesperadamente, las células LM2 muestran una mayor sensibilidad al ALA-TFD, siendo menor su síntesis de porfirinas. Se consideró entonces, la posible relevancia de la producción endógena de NO. Sin embargo, ni el incremento de los niveles de NO por exposición a DetaNONOate en las células LM2, ni la modulación de los niveles de NO en células LM3 con arginina o NAME, se modificaron las respuestas al fotodaño producido por la TFD.

## VII- Resistencia no cruzada entre ALA-TFD y óxido nítrico.

### VII-1. Síntesis de porfirinas y resistencia a la TFD.

Se trató de dilucidar si los mecanismos de daño celular producidos por el ALA-TFD y la citotoxicidad por NO, son independientes. Para ello se empleó la línea celular de adenocarcinoma mamario murino LM3 y su variante resistente a NO, LM3-SNP; obtenida luego de sucesivas exposiciones al dador de NO, nitroprusiato de sodio (SNP). Por otra parte, también se indujo resistencia al ALA-TFD en la línea LM3-SNP, a través de múltiples ciclos de tratamiento fotodinámico. De esta manera, se aislaron seis sublíneas, identificadas como Clones 1 a 6, en las cuales se realizaron estudios de síntesis de porfirinas a partir de ALA.

**Tabla VII-1:** Resistencia a ALA-TFD de los clones derivados de LM3-SNP

Línea celular	Síntesis máxima porfirinas (ng/10 <sup>6</sup> células <sup>a</sup> )	DL50 (J/cm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	Índice de resistencia a ALA-TFD <sup>c</sup>
LM3-SNP	40 ± 16	0,10	1,0
LM3	37 ± 12	0,27	2,7
Clon 1	35 ± 10	0,92	9,2
Clon 2	41 ± 6	0,12	1,2
Clon 3	43 ± 9	1,25	12,5
Clon 4	31 ± 7	0,08	0,8
Clon 5	49 ± 12	0,11	1,1
Clon 6	40 ± 12	0,13	1,3

Las células se incubaron con ALA 0,6 mM durante 3 h. Al cabo de ese tiempo, se determinó la cantidad de porfirinas luego de la extracción química con ácido como se describe en Materiales y Métodos. <sup>a</sup> valor ± SD, n = 4; <sup>b</sup> DL50: dosis lumínica que produce el 50% de supervivencia celular medido por el ensayo de MTT. Este parámetro fue utilizado para comparar la resistencia a ALA-TFD entre las líneas celulares en condiciones donde el pro-fotosensibilizador está en exceso ( ALA 0,6 mM); <sup>c</sup>DL50 Clon resistente / DL50 LM3-SNP.



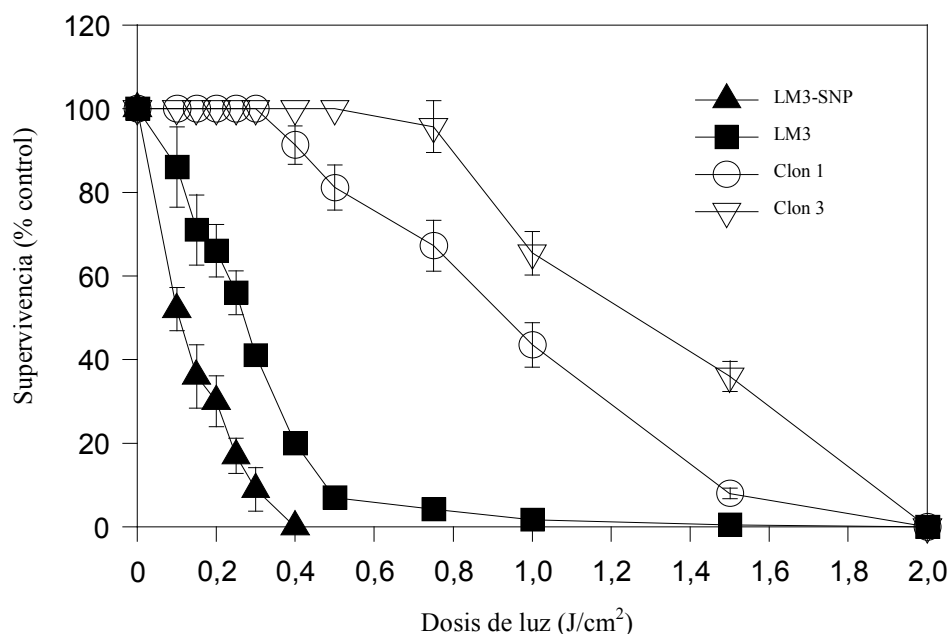
La Tabla VII-1 muestra el máximo de síntesis de porfirinas y el grado de resistencia de las 6 sublíneas obtenidas luego de la clonación de la línea celular heterogénea LM3-SNP11 resistente a ALA-TFD. La síntesis de porfirinas se estudió incubando con ALA en un rango de concentraciones de 0,05 a 1,2 mM.

En todos los clones se llegó a condiciones de saturación con concentraciones de ALA menores a 0,6 mM (datos no mostrados) y la cantidad máxima de porfirinas no fue significativamente diferente con respecto a la línea parental LM3-SNP. En general, los seis clones no mostraron resistencia a ALA-TFD, pero teniendo en cuenta los datos de supervivencia evaluados con el ensayo de MTT, se seleccionaron las dos líneas más resistentes para realizar la caracterización: Clon 1 y Clon 3. El patrón de formación de porfirinas fue idéntico en las cuatro líneas celulares: LM3, LM3-SNP, Clon 1 y Clon 3 (datos no mostrados).

## **VII-2. Respuesta a la TFD.**

La Figura VII-1 muestra la respuesta de las líneas, Clon 1 y Clon 3, derivados de LM3-SNP, a la TFD con ALA. Mientras que la DL50 para LM3-SNP es de 0,10 J/cm<sup>2</sup>, el Clon 1 presenta una DL50 de 0,92 J/cm<sup>2</sup>, y el Clon 3 una DL50 de 1,25 J/cm<sup>2</sup>, por lo que podemos considerar que son 9,2 y 12,5 veces más resistentes, respectivamente.

También puede observarse que las células LM3-SNP (DL50: 0,10 J/cm<sup>2</sup>) son más sensibles a ALA-TFD que la línea parental LM3 (DL50: 0,27 J/cm<sup>2</sup>).

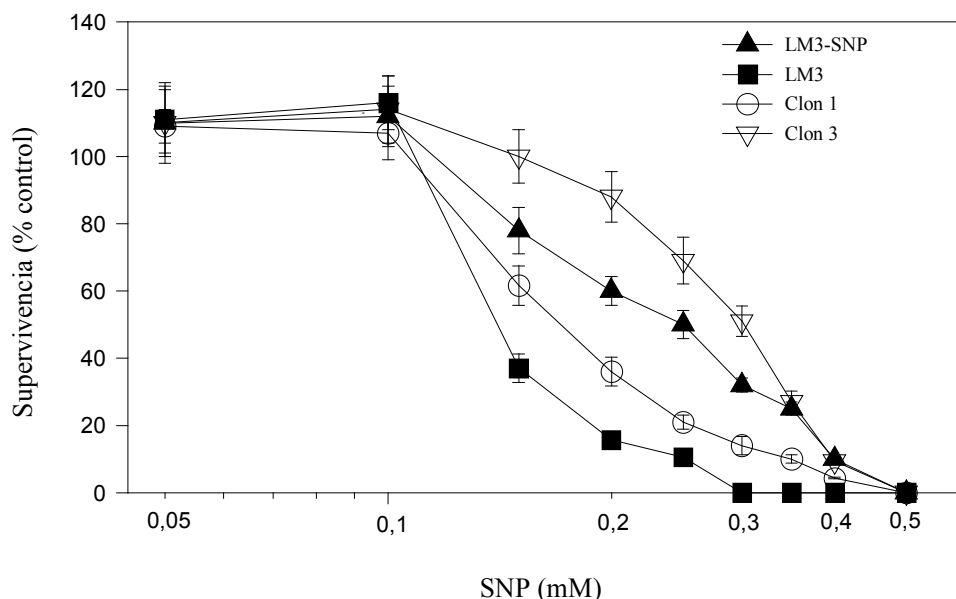


**Figura VII-1:** Supervivencia celular luego de ALA-TFD

Las células se incubaron con ALA 0,6 mM en medio libre de suero durante 3 h en placas de 6 pocillos. Inmediatamente después, las células fueron irradiadas con diferentes dosis lumínicas e incubadas en medio conteniendo suero por otras 19 h. La supervivencia celular fue determinada mediante el ensayo del MTT, y se expresa como el porcentaje del control no irradiado en presencia de ALA.

### VII-3. Sensibilidad a SNP.

La Figura VII-2 muestra la sensibilidad de las diferentes líneas celulares a la citotoxicidad inducida por el donador de NO, SNP. Para las células LM3 la SNP-DL50 es 0,120, mientras que la sublínea LM3-SNP es dos veces más resistente (DL50: 0,250). El Clon 1 es menos resistente (DL50: 0,175) que la línea parental LM3-SNP, en tanto que el Clon 3 es más resistente (DL50: 0,301) (ver Tabla VII-1 para los índices de resistencia). A bajas concentraciones de SNP se observó un ligero incremento de la viabilidad en todas las líneas celulares.

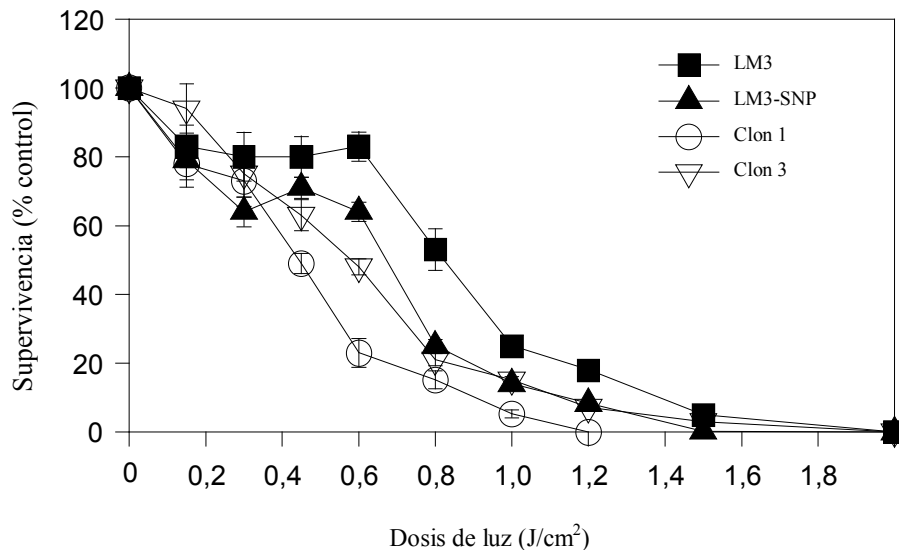


**Figura VII-2: Resistencia a SNP**

Las células fueron incubadas durante 18 h con diferentes concentraciones de SNP. Al cabo de ese tiempo se determinó la supervivencia mediante el ensayo de MTT y se expresa como el porcentaje de células control.

#### VII-4. Respuesta a TFD con PpIX exógeno.

La Figura VII-3 muestra la respuesta de las células a la TFD realizada con el agregado exógeno de PpIX. La resistencia a PpIX-TFD de los Clones 1 y 3 con respecto a LM3-SNP es menor que la resistencia a ALA-TFD. Además, las células LM3-SNP son también más resistentes a PpIX-TFD que la línea parental LM3, hecho observado previamente para ALA-TFD.



**Figura VII-3:** Supervivencia celular luego de TFD con PpIX exógeno

Las células se incubaron con PpIX 1  $\mu\text{M}$  durante 2 h y luego se iluminaron con dosis de luz crecientes (0,1 a 2  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Al cabo de 19 h, se realizó el ensayo de MTT para determinar la supervivencia celular, la cual se expresa como porcentaje del control no tratado.

#### VII-5. Caracterización de las líneas celulares.

La Tabla VII-2 muestra que todas las líneas celulares tienen similar contenido de proteínas, actividad MTT y de GSH transferasa. De todas maneras, el contenido de GSSG es marcadamente menor en LM3-SNP, Clon 1 y Clon 3 en comparación con la línea parental LM3 ( $p=0,0007$ ), y consecuentemente, la relación GSH/GSSG es mayor.

La producción de NO en los clones resistentes a ALA-TFD no es significativamente diferente comparando con las células parentales LM3-SNP.

**Tabla VII-2:** Caracterización de las líneas celulares

	LM3	LM3-SNP	Clon 1	Clon 3
SNP-LD50 <sup>a</sup>	0,120	0,250	0,175	0,301
Índice de resistencia a SNP <sup>b</sup>	1	2,08	1,45	2,5
Contenido de proteínas (pg/cell)	22,6 ± 2,5	20,1 ± 1,8	18 ± 2,3	21 ± 1,5
Actividad MTT <sup>c</sup> /10 <sup>5</sup> células	0,109 ± 0,016	0,115 ± 0,010	0,102 ± 0,012	0,120 ± 0,015
µg GSH/10 <sup>5</sup> células	10,23 ± 2,15	13,06 ± 1,18	11,69 ± 2,10	10,14 ± 1,95
µg GSSG/10 <sup>5</sup> células	0,51 ± 0,035	0,36 ± 0,022*	0,36 ± 0,027*	0,30 ± 0,029*
Relación GSH/GSSG	20,0	36,3	32,4	33,2
GSH transferasa <sup>d</sup>	37,5 ± 3,9	43,5 ± 6,2	46,3 ± 11,5	46,8 ± 12,7
NO <sup>e</sup>	13,1 ± 1,1	14,3 ± 1,3	12,8 ± 2,1	13,6 ± 1,6

<sup>a</sup> SNP-DL50: dosis de SNP (mM) que produce el 50% de muerte celular

<sup>b</sup> DL50 Clon resistente /DL50 LM3

<sup>c</sup> A<sub>560</sub>

<sup>d</sup> nmol producto/10<sup>6</sup> células, min

<sup>e</sup> nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /10<sup>6</sup> células

\*  $p < 0.05$  comparado con LM3

Contenido de proteína, actividad MTT, GSH, GSSG, GSH transferasa y NO : expresados como valor ± SD,  $n = 3$

## VII-6. Discusión.

Luego de repetidos ciclos de irradiación, fue posible aislar a partir de células de la línea LM3-SNP, líneas celulares resistentes a ALA-TFD. Las células fueron 10 veces más resistentes que la línea parental, y este grado de resistencia fue similar al obtenido con los clones derivados de la línea LM3 (Casas et al, 2006), lo que demuestra que la resistencia al NO no interfiere con el desarrollo a resistencia a TFD.

Por otra parte, se encontró una resistencia no cruzada entre la citotoxicidad a NO y el ALA-TFD, observándose que las células LM3-SNP (DL50=0,10 J/cm<sup>2</sup>) resultaban ser más sensibles que las parentales LM3 (DL50=0,27 J/cm<sup>2</sup>). Cuando las células resistentes a NO fueron inducidas a la resistencia a ALA-TFD, su sensibilidad a SNP decreció en el

Clon 1 (SNP-DL50=0,175 mM) y aumentó en el Clon 3 (SNP-DL50=0,301 mM) comparado con la línea parental LM3-SNP (SNP-DL50=0,250 mM).

En el capítulo VI se demostró que tanto las células LM3 como LM3-SNP, expuestas a concentraciones no tóxicas de SNP (0,01 a 0,1 mM), quedan protegidas de los daños provocados por la TFD, debido a una menor síntesis de porfirinas a través de una inhibición de la enzima ALA-dehidrasa, que convierte el ALA en porfobilinógeno. Las células LM3-SNP que han recibido múltiples exposiciones a SNP no mostraron resistencia cruzada con ALA-TFD debido a la inhibición de esta enzima.

Se ha demostrado (Casas et al, 2006) que las líneas celulares resistentes a ALA-TFD exhiben una mayor sensibilidad a daños como la hipertermia, UV y TFD con otros fotosensibilizadores. En el presente trabajo, vemos que la resistencia a ALA-TFD no siempre conduce a un aumento de la resistencia a NO, por el contrario, podría conducir a un incremento de la sensibilidad. Esto refuerza la hipótesis de que los mecanismos de daño celular producidos por el NO y la TFD son independientes.

Se encontró además que los Clones 1 y 3 son más sensibles al tratamiento de TFD con PpIX exógeno, por lo tanto el mecanismo que induce a la resistencia debe ser diferente si la PpIX se genera endógenamente o es administrada exógenamente. Sin embargo Casas et al (2006) observaron que dos líneas celulares independientes resistentes a ALA-TFD eran ligeramente resistentes a la PpIX exógena. Esto demuestra la complejidad y la variedad de factores involucrados en los mecanismos de resistencia a TFD.

La similitud en los contenidos de porfirinas totales en las células resistentes a ALA-TFD, muestra que la causa de la resistencia no está relacionada con este factor. Estas características fueron también observadas en células resistentes a ALA-TFD derivadas de la línea LM3 (Casas et al, 2006). De manera similar, la mayoría de las células resistentes aisladas por otros autores, acumulan cantidades semejantes de fotosensibilizador (Luna & Gomer, 1991; Singh et al, 1991; Mayhew et al, 2001).

En concordancia con lo demostrado por Eijan et al (1998), se vio un ligero incremento de proliferación celular en las líneas celulares expuestas a bajas concentraciones de SNP. Empleando concentraciones mayores, el SNP resultó ser tóxico. Este efecto dual de la citotoxicidad del NO derivado del SNP ha sido previamente observado *in vivo* (Jenkins et al, 1995).

Se ha demostrado también que la mayor producción de NO se correlaciona con una mayor resistencia a NO (Yang et al, 2002; Wenzel et al, 2003; Eijan et al, 1998). Sin

embargo cuando la resistencia a NO es inducida exógenamente como por ejemplo por medio de SNP, la producción de NO no aumenta (Galli et al, 1999). De hecho, las células resistentes a TFD que se han estudiado en este trabajo, no muestran ninguna modificación en la producción de NO.

En cuanto al rol del GSH sobre la citotoxicidad inducida por el NO, es un aspecto que ha sido ampliamente estudiado y los resultados obtenidos indican que el balance entre antioxidantes y especies reactivas de oxígeno que modulan el estado oxido-reducción intracelular, determina la respuesta de las células expuestas a NO (Boggs et al, 1998; Zhao et al, 1997; Kim et al, 2001; Loscalzo, 2002). Comparadas con las células LM3 parentales, las células LM3-SNP poseen un menor contenido de GSSG, lo que conduce a una mayor relación GSH/GSSG. Sin embargo, esta alteración del estado oxidativo intracelular no interfirió en la resistencia a ALA-TFD, y en los Clones 1 y 3 resistentes a ALA-TFD dicha relación se mantuvo constante.

Las líneas celulares resistentes a apoptosis inducida por el donador de NO, NONOato de espermina, tienen menores niveles de GSH y un mayor estado oxidativo que las células parentales, y el bloqueo de la producción de GSH resulta en una abrogación de la apoptosis (Boggs et al, 1998). Por otro lado, en células vasculares de músculo, se encontró que los niveles de GSH también decrecen cuando se exponen a donores de NO, pero la adición de GSH a las células previene la apoptosis inducida por NO (Zhao et al, 1997).

El NO es inestable en presencia de oxígeno. La interacción del NO con  $O_2$  conduce a la formación de RNOS (especies reactivas de NO), las cuales son conocidas por causar importantes reacciones oxidativas con las proteínas de los tejidos. Además, bajo condiciones de stress, el NO puede combinarse con  $O_2^-$  para formar peroxinitrito, el cual es un potente RNOS nucleofílico. Enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa de Cu-Zn, GSH-peroxidasas, catalasa y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, pueden inactivar las RNOS (Loscalzo, 2002). También los niveles intracelulares de GSH modifican la citotoxicidad del NO (Kim et al, 2001).

Por otro lado, el efecto fotodinámico inicial es la formación de especies activas de oxígeno, principalmente oxígeno molecular singulete (Spikes, 1988), por catálisis lumínica. Entre los radicales libres involucrados en el efecto fotosensible, los más importantes son los radicales de oxígeno, el radical hidroxilo y el anión superóxido (Bonnert et al, 1983). Una vez iniciado el daño fotodinámico, intervienen los mecanismos celulares de protección primaria, como el secuestro del  $O_2^-$  mediante la acción de la superóxido dismutasa y la

catalasa (Girotti, 2001). Algunos compuestos secuestrantes de radicales libres protegen las células del fotodaño (Perotti et al, 2002). Luego ocurre una detoxificación secundaria por remoción de grupos oxidantes que dañan los sitios de acción primaria, continuando con procesos de reparación, como las que realizan la GSH-peroxidasa y la GSH-S-transferasa mediando la reparación de lesiones de peroxidación lipídica (Girotti, 2001). Además, el GSH puede interaccionar con el oxígeno singulete y con el radical anión superóxido (Evans et al, 1997), y se encontró que la depleción del GSH sensibiliza a las células al daño fotodinámico (Miller & Henderson, 1986).

Sin embargo, a pesar de sus sistemas de detoxificación compartidos, podemos decir que la citotoxicidad del NO y el fotodaño producido por ALA-TFD no presentan mecanismos cruzados.

Según Gupta et al (1998) el NO posee una acción de retardo en el desarrollo de resistencia a drogas como la ciclofosfamida. Aunque los autores no lograron explicar este hecho, sugirieron que ese efecto podría estar relacionado con una inactivación de transferasas por las RNOS. Estudios realizados *in vitro* sugieren que los niveles intracelulares de NO determinan la susceptibilidad de las células a los agentes antineoplásicos (Wenzel et al, 2003, Yang et al, 2002) y en la mayoría de los casos, se ha observado que una mayor producción de NO aumenta la resistencia a las drogas (Eijan et al, 1998; Yang et al, 2002; Wenzel et al, 2003). En el capítulo anterior se ha demostrado que una mayor producción de NO no se correlaciona con una mayor resistencia a la TFD. Más aún, los resultados refuerzan la hipótesis de que *in vitro* no hay una interacción entre la producción de NO y el ALA-TFD.

El NO produce tanto efectos citostáticos como citotóxicos, y en ambos están involucrados mecanismos de apoptosis y necrosis. El que ocurra uno u otro evento, puede estar determinado por la cantidad intracelular de hierro no hémico, el que, según se ha visto, puede proteger de la muerte por necrosis (Lala & Chakraborty, 2001). De los posibles determinantes genéticos que hacen que una célula sea resistente o no a NO, el *p53* parece ser el principal agente. La resistencia al NO también puede ser conferida por varios mecanismos de protección, tales como la activación de ciclooxigenasa (COX-2), la cantidad de superóxido dismutasa funcional, una regulación positiva de proteínas heat-shock y la concentración de GSH. Además, la resistencia puede también conducir a una dependencia de NO (Lala & Chakraborty, 2001).



Por lo expuesto, podemos decir que no existe una clara interacción entre la citotoxicidad de los derivados de NO y la fototoxicidad de ALA-TFD, ya que los diferentes grados de resistencia a NO en los tumores no se correlacionaron con la resistencia a la TFD. Además, ninguna interacción *in vivo* puede estar exclusivamente relacionada con la modulación del flujo sanguíneo.

## REFERENCIAS

Bates J, Baker M, Guerra R, Harrison D (1991) Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. *Biochem. Pharmacol.* 42: 157-165.

Battah S, Chee C, Nakanishi H, Gerscher S, MacRobert A, Edwards C (2001) Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for Photodynamic Therapy. *Biocon. Chem.* 12: 980-988.

Beckman J (1996) Oxidative damage and tryrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 836-844.

Boggs S, McCormick T, Lapetina E (1998) Glutathione levels determine apoptosis in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 229-233.

Bonnett R, Lambert C, Land E, Scourides P, Sinclair R, Truscott T (1983) The triplet and radical species of hematoporphyrin and some of its derivatives. *Photochem. Photobiol.* 38: 1-8.

Casas A, Perotti C, Fukuda H, Rogers L, Butler A, Batlle A (2001) ALA and ALA hexyl ester-induced porphyrin synthesis in chemically induced skin tumours: the role of different vehicles on improving photosensitisation. *Br. J. Cancer* 85: 1740-1800.

Casas A, Perotti C, Ortel B, Di Venosa G, Saccoliti M, Batlle A, Hasan T (2006) Induction of murine tumour cell lines resistant to ALA-mediated Photodynamic Therapy. *Int. J. Oncol.* (en prensa).

Cook T, Wang Z, Alber S, Liu K, Watkins S, Vodovotz Y, Billiar T, Blumberg D (2004) Nitric oxide and ionizing radiation synergistically promote apoptosis and growth inhibition of cancer by activating p53. *Cancer Res* 64: 8015-8021.

- Correa Garcia S, Casas A, Perotti C, Batlle A, Bermudez Moretti M (2003) Mechanistic studies on 5-aminolevulinic acid uptake and efflux in a mammary adenocarcinoma cell line. *Br. J. Cancer* 89:173-77.
- D'Emanuele A, Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D (2004) The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. *J. Control Release* 95: 447-453.
- Di Venosa G, Fukuda H, Perotti C, Batlle A, Casas A (2004) A simple method for separating ALA from ALA derivatives using ionic exchange chromatography. *J. Photochem. Photobiol. B* 75: 157-163.
- Eijan A, Davel L, Rueda H, Rozenberg G, Lustig E, Jasnis M (1998) Differential nitric oxide release and sensitivity to injury in different murine mammary tumour cell lines. *Int. J. Mo. Med.* 2: 625-630.
- El-Sayed M, Rhodes C, Ginski M, Ghandehari H (2003) Transport mechanism(s) of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 265:151-157.
- Evans P, Whiteman M, Tredger M, Halliwell B (1997) Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. *Free Rad. Biol. Med.* 23: 1002-1008.
- Fraga C, Onuki J, Lucesoli F, Bechara E, Di Mascio P (1994) 5-aminolevulinic acid mediates the *in vivo* and *in vitro* formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis* 15: 2241-2244.
- Fukumura D, Yuan F, Endo M, Jain K (1997) Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. *Am. Pathol.* 150: 713-725.
- Galli S, Davel L, Jasnis M, Sales M, Lustig E, Eijan A (1999) Selección de una línea de células tumorales resistente a la citotoxicidad por óxido nítrico. *Medicina Buenos Aires* 59: 631.

Girotti A (2001) Photosensitised oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol.* 63: 103-113.

Gomes W, Almeida R, Carvalho P, Duarte C (2002) Nitric oxide modulates tumor cell death induced by photodynamic therapy through a cGMP-dependent mechanism. *Photochem. Photobiol.* 76: 423-430.

Gupta S, Ahmad N, Mukhtar H (1998) Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 58: 1785-1788.

Hansch C, Bjorkroth J, Leo A (1987) Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *J. Pharm. Sci.* 76: 663-687.

Henderson B, Sitnik-Busch T, Vaughan L (1999) Potentiation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent. *Photochem. Photobiol.* 70: 64-71.

Hoffman M, Góra M, Rytka J (2003) Identification of rate-limiting steps in yeast haem biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310(4): 1247-1253.

Ioannidis I, Batz M, Thomas P, Korth H-G, Sustmann R, de Groot H (1996) Enhanced release of nitric oxide causes increased cytotoxicity of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and sodium nitroprusside under hypoxic conditions. *Biochem. J.* 318: 789-795.

Jenkins S, Charles I, Thomsen L, Moss D, Holmes L, Baylis S, Rhodes P, Westmore K, Emson P, Moncada S (1995) Roles of nitric oxide in tumour growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4392-4396

Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D, D'Emanuele (2004) A. Transport of dendrimer nanocarriers through epithelial cells via the transcellular route. *J. Control Release* 97: 259-267.

Kim P, Zamora R, Petrosko P, Billiar T (2001) The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1421-1441.

Kloek J, Akkermans W, Beijersbergen van Henegouwen G (1998) Derivatives of 5-Aminolevulinic acid for Photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochem. Photobiol.* 67:150-154.

Korbelik M, Parkins C, Shibuya H, Cecic I, Stratford M, Chaplin D (2000) Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* 82: 1835-1843.

Kraemer F, Shen W-J (2002) Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* 43: 1585-1594.

Lala P, Chakraborty C (2001) Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression, *Lancet Oncol.* 3: 149-156.

Liu M, Frechet J (1999) Designing dendrimers for drug delivery. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2: 393-401

Loscalzo J (2002) Oxidative stress in endothelial cell dysfunction and thrombosis. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 32: 359-360.

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

Mauzerall M, Granick S (1956) The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* 219: 435-437.

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

Miller A, Henderson B (1986) The influence of cellular glutathione content on cell survival following photodynamic treatment *in vitro*. *Radiat. Res.* 107: 83-94.

Moan J, Ma L, Iani V (2001) On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *Int. J. Cancer* 92: 139-143.

Moan J, Ma L, Juzeniene A, Iani V, Juzenas P, Apricena F, Peng Q (2003) Pharmacology of Protoporphyrin IX in nude mice after application of ALA and ALA esters. *Int. J. Cancer* 103: 132-135.

Niziolek M, Korytowski W, Girotti A (2003) Nitric oxide inhibition of free radical-mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 997-1005.

Ogura T, De George G, Tatemichi M, Esumi H (1998) Suppression of anti-microtubule agent-induced apoptosis by nitric oxide: a possible mechanism of a new drug resistance. *Int. J. Cancer Res.* 89: 199-205.

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: 790-795.

Perotti C, Casas A, Fukuda H, Sacca P, Batlle A (2003) Topical application of ALA and ALA hexyl ester on a subcutaneous murine mammary adenocarcinoma: tissue distribution. *Br. J. Cancer* 88: 432-437

Perotti C, Fukuda H, Casas A, Batlle A (2002) Scavengers protection of cells against ALA-based Photodynamic Therapy induced damage. *Lasers Med. Sci.* 17: 229-229.

Perotti C, Fukuda H, Di Venosa G, MacRobert A, Batlle A, Casas A (2004) Porphyrins synthesis from ALA derivatives for photodynamic therapy. *In vitro* and *in vivo* studies. *Br. J. Cancer* 90: 1660-1665.

Roberts W, Hasan T (1992) Role of neovascular and vascular permeability on the tumor retention of photodynamic agents. *Cancer. Res.* 52: 924-930.

Robinson M, Watts C, Zerial M (1996) Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* 84: 13-21.

Rodríguez L, Batlle A, Di Venosa G, MacRobert A, Battah S, Daniel H, Casas A (2006) (2006) Study of the mechanisms of uptake of 5-aminolevulinic acid derivatives by PEPT1 and PEPT2 transporters as a tool to improve photodynamic therapy of tumours. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 1530-1539.

Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher A, Mulsch a, Dimmeler G (1999) Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J. Biol. Chem.* 274: 6823-6826.

Rubbo H, Radi M, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman B (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 269: 26066-26075.

Shriner R, Fuson R, Curtin D (1980) *Aplicación de test de clasificación. En: Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Manual de laboratorio.* Ed. Limusa, México. Grupo Noriega Editores.

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

Spikes J (1988) Photochemotherapy: molecular and cellular processes involved. *Proc. SPIE* 997: 92-100.

Tschudy D, Hess R, Frykholm B (1981) Inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydrase by 4,6-dioxoheptanoic acid. *J. Biol. Chem.* 256: 9915-9923.

Tunstall R, Barnett A, Schofield J, Griffiths J, Vernon D, Brown S, Roberts D (2002) Porphyrin accumulation induced by 5-aminolaevulinic acid esters in tumour cells growing in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* 87: 246-250

Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N (2000) 5-aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J. Photochem. Photobiol.* 54:72-80.

Wenzel U, Kuntz S, Daniel H (2003) Nitric oxide levels in human preneoplastic colonocytes determine their susceptibility toward antineoplastic agents. *Mol. Pharmacol.* 64: 1494-1502.

Wink D, Mitchell J (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 434-456.

Wolff D, Naddelman A, Lubeskie A, Saks D (1996) Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by porphyrins. *Arch. Biochem. Biophys.* 333: 27-34.

Wood P, Sansom S, Butler a, Stratford I, Cole S, Szabo C, Thiemermann C, Admas G (1994) Induction of hypoxia in experimental murine tumors by the nitric oxide synthase inhibitor, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine. *Cancer Res.* 54: 6458-6463.

Yang D, Yin J, Mishra S, Hsu C (2002) NO-mediated chemoresistance in C6 glioma cells. *Ann N Y Acad. Sci.* 962: 8-17.

Zhao Z, Francis C, Welch G, Loscalzo J, Ravid K (1997) Reduced glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscles. *Biochim. Biophys. Acta* 1359: 143-152.



## CONCLUSIONES GENERALES

- Se ha desarrollado un método simple para separar ALA de sus derivados ésteres utilizando cromatografía de intercambio iónico, su sensibilidad permite su aplicación en determinaciones de extractos celulares. Una limitación del método es que no se puede utilizar para separar el ALA de su derivado Me-ALA debido a la corta cadena de este derivado y a la superposición de ambos compuestos en el perfil de elución de las columnas de intercambio iónico. En los extractos celulares, fue posible diferenciar ALA de sus derivados Hexil y THP, lo que permitió establecer que estos ésteres se hidrolizan parcialmente dentro de las células, evidenciando el rol de las esterasas en este proceso.
- *In vitro*, se estudió detalladamente la regulación de la síntesis de porfirinas a partir de ALA y ésteres de ALA. A bajas concentraciones, la incorporación del ALA y He-ALA estaría limitada por la propia síntesis de porfirinas mientras que en el caso del THP-ALA, la regulación estaría relacionada con el grado de hidrólisis. A los valores del plateau, la porfobilinogenasa regula la síntesis porfirínica. Sin embargo, esto es verdad sólo para ALA, ya que el primer paso en la regulación de los derivados de ALA es el control de la hidrólisis. Este control está mediado por las esterasas a través de una regulación feed-back por producto final, en el cual no están involucradas las porfirinas. Se puede concluir que el uso de derivados de ALA estaría limitado a bajas concentraciones donde no ocurre regulación de la hidrólisis.
- *In vivo*, se estudió la retención de los ésteres de ALA en los diferentes órganos y se observó que el THP-ALA induce una mayor acumulación de porfirinas en cerebro que el ALA, indicando que este derivado de ALA atraviesa la barrera hemato-encefálica, por lo cual podría ser útil para el tratamiento de tumores de cerebro luego de su administración sistémica. En cuanto a la administración tópica, tanto THP-ALA como Und-ALA, exhiben una alta selectividad por el sitio de aplicación, sugiriendo que podrían utilizarse para tratamientos superficiales de tumores.
- Se evaluó la eficacia del dendrón, aminometano tris-metil ALA, se encontró que se incorpora en forma eficiente a las células, liberando ALA para las síntesis de tetrapirroles. *In vivo*, tanto la administración sistémica como la tópica, inducen mayores niveles de porfirinas

en la mayoría de los tejidos, con respecto a los derivados ésteres. Los resultados de nuevos estudios de accesibilidad y regulación de esterasas podrían proveer información para un mejor diseño de dendrímeros de ALA.

- Recientemente se ha descrito una mejora de la TFD mediante la administración continua de bajas dosis de luz y fotosensibilizadores. Se han desarrollado varios métodos de distribución de luz para este uso, como así también diferentes estrategias para la administración continua del fotosensibilizador. Los resultados obtenidos con Den18mer permiten proponer el uso de dendrímeros de ALA para la TFD así como también el empleo de dosis de luz múltiples y bajas.
- Se investigó la acción del SNP, donador de NO, en tres líneas celulares; LM2, LM3 y LM3-SNP, observándose una sorpresiva disminución en la síntesis de porfirinas. Por otro lado, se observó interacción entre ALA y arginina, con una consecuente caída en la producción de NO. Si bien esta modulación no modificó la respuesta al ALA-TFD *in vitro*, es posible que *in vivo* las interacciones del ALA con arginina exógena puedan contribuir a la destrucción de tumores a través de una modulación del flujo sanguíneo.
- De los resultados obtenidos empleando las líneas celulares resistentes a la citotoxicidad inducida por NO y a la TFD, puede concluirse que no existe una clara interacción entre la citotoxicidad de los derivados de NO y la fototoxicidad del ALA-TFD. Esto sugiere que las diferentes grados de resistencia a NO en tumores, no estarían relacionados con la resistencia a la TFD.

## **CONCLUSIÓN FINAL**

Teniendo en cuenta que una de las limitaciones más destacadas del ALA-TFD está relacionada con una baja incorporación del ALA a las células debido a su hidrofiliidad, se trató de optimizar dicha terapia investigando la acción de distintos derivados de ALA, los que por a su mayor lipoficilidad verían favorecido su ingreso a las células, logrando de esta manera una mayor síntesis de porfirinas y en consecuencia una mayor muerte celular al aplicar la dosis lumínica.

Los estudios realizados permiten concluir que el uso de derivados de ALA, ésteres o dendrímeros, puede llegar a ser más efectivo que el ALA libre, aventurando entonces, un futuro promisorio para esta terapia. Es de destacar sin embargo, que el uso de estos pro-fotosensibilizantes, está limitado al tipo y la localización tumoral, observándose que en algunos casos, dichos compuestos pueden llegar a optimizar la TFD en dosis menores a las utilizadas con ALA.

En lo que se refiere a la interacción del NO con el ALA-TFD, se concluye que no hay una interacción directa entre la citotoxicidad del NO y sus derivados, y la fototoxicidad del ALA-TFD. Los diferentes grados de resistencia al NO en los tumores, no estarían relacionados con la resistencia a la TFD.

## **INDICE**

Agradecimientos.....	2
Abreviaturas.....	5
Introducción.....	7
I- Las porfirinas y el camino metabólico del hemo.....	8
I-1. Las porfirinas. Generalidades.....	8
I-2. Biosíntesis del hemo.....	9
II- Terapia fotodinámica del cáncer.....	12
II-1. Introducción.....	12
II-2. Su historia.....	14
II-3. Fotoquímica.....	14
II-4. Las porfirinas en la fotodetección de tumores y su uso como fotosensibilizantes..	16
II-5. Mecanismos de acumulación de las porfirinas en los tumores.....	18
II-6. Sitios celulares y subcelulares blancos de la TFD.....	19
II-7. Otras Aplicaciones de la TFD empleando diversos fotosensibilizantes.....	21
III- Terapia fotodinámica a partir de ALA.....	24
III-1. Introducción.....	24
III-2. Selectividad de tejidos por la PPIX inducida a partir de ALA.....	25
III-3. Vías de administración.....	25
III-3.1. Penetración del ALA a través de la piel.....	26
III-4. Usos del ALA en la TFD y en la fotodetección.....	28
IV- Derivados de ALA.....	31
IV-1. Introducción.....	31
IV-2. La membrana celular como factor limitante en la penetración de los derivados de ALA.....	33
IV-3. La piel como barrera para la absorción de ALA y sus derivados.....	34
IV-4. Usos de derivados de ALA en la fotodetección y la TFD en cáncer de vejiga.....	38
IV-5. Actividad específica de esterasas.....	38
IV-6. Actividad de amino peptidasas en el clivaje de derivados.....	41
V- Óxido nítrico.....	43
V-1. Introducción.....	43

V-2. Óxido nítrico y su relación con la terapia fotodinámica.....	43
Referencias.....	45
Objetivos.....	65
Materiales y Métodos.....	67
I- Reactivos.....	68
II- Síntesis de derivados de ALA.....	68
II-1. Síntesis orgánica de ésteres de ALA.....	68
II-2. Síntesis orgánica de dendrímeros de ALA.....	69
III- Caracterización de los derivados de ALA.....	72
III-1. Determinación de PBG y ALA.....	72
III-2. Validación de la cuantificación de los derivados de ALA.....	72
III-3. Caracterización de los productos de los derivados de ALA, luego de la condensación y la reacción de Ehrlich.....	73
III-4. Separación de ALA a partir de derivados de ALA por cromatografía de intercambio catiónico.....	73
III-5. TLC de ALA y derivados de ALA.....	74
III-6. Determinación de coeficientes de partición.....	74
IV- Experiencias <i>in vitro</i> .....	76
IV-1. Líneas celulares y cultivo celular.....	76
IV-2. Determinación del número de células.....	76
IV-3. Ensayo de viabilidad de MTT.....	76
IV-4. Tratamiento de TFD.....	77
IV-5. Tratamiento lumínico.....	77
IV-6. Inducción de resistencia a ALA-TFD.....	77
IV-7. Sensibilidad de las líneas celulares tumorales a la citotoxicidad inducida por SNP.....	78
IV-8. Resistencia a PpIX exógena.....	78
IV-9 Determinación de proteínas celulares.....	79
IV-10. Producción de NO.....	79
IV-11. Medición de Glutation.....	79
IV-12. Actividad de la GSH S-transferasa.....	80
IV-13. Determinación intracelular de ALA, derivados de ALA y PBG.....	80

IV-14. Separación de ALA y derivados utilizando columnas cromatográficas de intercambio iónico.....	81
IV-15. Medición de síntesis de porfirinas, luego de extracción química.....	81
V- Experiencias con eritrocitos.....	82
V-1. Ensayo de ALA dehidrasa en eritrocitos.....	82
V-2. Ensayo de Porfobilinogeno Deaminasa en eritrocitos.....	82
VI- Experiencias <i>in vivo</i> .....	83
VI-1. Animales.....	83
VI-2. Administración de ALA y derivados.....	83
VI-3. Espectroscopía de fluorescencia.....	84
VI-4. Extracción de porfirinas en tejidos.....	84
VI-5. Determinación de ALA en cerebro.....	85
VI-6. Afinidad de ALA y derivados de ALA por los tejidos.....	85
VII- Cultivo de explantes de órganos.....	86
VIII- Análisis estadístico.....	87
Referencias.....	88
Resultados y discusiones.....	91
I- Separación de ALA y los derivados de ALA mediante cromatografía de intercambio iónico.....	92
I-1. Validación del método de cuantificación de los derivados de ALA.....	92
I-2. Elución de ALA y derivados de ALA por cromatografía de intercambio iónico.....	93
I-3. Separación de mezclas de ALA y derivados de ALA.....	96
I-4. Determinación de ALA, derivados de ALA y PBG en células.....	96
I-5. Discusión.....	97
II- Terapia fotodinámica. Regulación de la síntesis de porfirinas e hidrólisis de ésteres de ALA.....	100
II-1. Síntesis de porfirinas en células, a partir de ALA y sus derivados.....	100
II-2. Incorporación de ALA y derivados de ALA en las células.....	101
II-3. Síntesis de PBG y porfirinas en función del tiempo de incubación.....	102
II-4. Consumo intracelular de ALA y derivados de ALA.....	103
II-5. Cinética de incorporación de ALA y derivados de ALA.....	104
II-6. Hidrólisis intracelular de los derivados de ALA.....	106
II-7. Acción de la inhibición de la síntesis de porfirinas.....	107

II-8. Discusión.....	108
III- Estudios <i>in vivo</i> . Síntesis de porfirinas en tejidos de ratones a partir de los derivados de ALA.....	111
III-1. Síntesis de porfirinas en piel y piel tumoral luego de la administración intraperitoneal.....	111
III-2. Síntesis de porfirinas en otros tejidos.....	111
III-3. Cinética de síntesis de porfirinas luego de la administración intraperitoneal.....	114
III-4. Cinética de síntesis de porfirinas luego de la administración tópica.....	116
III-5. Síntesis de porfirinas luego de la administración tópica.....	117
III-6. Síntesis de porfirinas en explantes de órganos.....	117
III-7. Acumulación de THP-ALA en cerebro.....	118
III-8. Afinidad de ALA y derivados de ALA por los tejidos.....	119
III-9. Lipofilicidad de ALA y sus ésteres.....	120
III-10. Discusión.....	121
IV- Dendrímeros como transportadores moleculares para la distribución de la prodroga ALA: estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con el dendrón 3m-ALA.....	125
IV-1. Coeficientes de partición.....	125
IV-2. Síntesis de porfirinas.....	126
IV-3. Cinética de la síntesis de porfirinas.....	127
IV-4. Acumulación intracelular de ALA, 3m-ALA y PBG.....	127
IV-5. Cinética de la síntesis de porfirinas <i>in vivo</i> .....	128
IV-6. Síntesis de porfirinas <i>in vivo</i> .....	130
IV-7. Cinética de síntesis de porfirinas <i>in vivo</i> , determinada por extracción química..	132
IV-8. Discusión.....	133
V- Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con el dendrímero Den18mer.....	136
V-1. Síntesis de porfirinas <i>in vitro</i> .....	136
V-2. Acumulación intracelular de ALA y Den18mer.....	137
V-3. Síntesis de porfirinas <i>in vivo</i> .....	138
V-4. Discusión.....	142
VI- Sensibilidad de células con diferente producción de óxido nítrico a TFD-ALA y resistencia a citotoxicidad a óxido nítrico.....	144
VI-1 Interacciones entre ALA-TFD y Oxido Nítrico.....	144
VI-2. Síntesis de porfirinas a partir de ALA.....	144

VI-3. Efecto de la dosis lumínica.....	145
VI-4. Producción de NO en las diferentes líneas celulares.....	146
VI-5. Efecto del ALA en la producción de NO.....	147
VI-6. Efecto del SNP en la producción de NO.....	149
VI-7. Efecto de SNP en la TFD.....	151
VI-8. Efectos de SNP sobre la síntesis de porfirinas.....	153
VI-9. Efecto de SNP sobre las enzimas ALA dehidrasa y/o porfobilinógeno deaminasa.....	154
VI-10. Comparación con otro donador de NO.....	155
VI-11. Discusión.....	155
VII- Resistencia no cruzada entre ALA-TFD y óxido nítrico.....	158
VII-1. Síntesis de porfirinas y resistencia a la TFD.....	158
VII-2. Respuesta a la TFD.....	159
VII-3. Sensibilidad a SNP.....	160
VII-4. Respuesta a TFD con PpIX exógeno.....	161
VII-5. Caracterización de las líneas celulares.....	162
VII-6. Discusión.....	163
Referencias.....	168
Conclusiones generales.....	175
Conclusión final.....	176