

MILLA SANABRIA, LAUR
Rislamiento y caract

2012

71196

71196

MFN:
Clasif:
T-758



71156



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Biología Molecular

**AISLAMIENTO Y
CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS
DE CARCINOMA ESCAMOSO
RESISTENTES A TERAPIA
FOTODINÁMICA**



Laura N. Milla Sanabria

2012

La presente tesis doctoral se realizó en el departamento de Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas.

Tesista: Laura N. Milla Sanabria



Directora: Dra. Viviana A. Rivarola



Co-directora: Dra. Ángeles Juarranz de La Fuente

Jurados:

Dra. Adriana Casas

Dr. César Casale

Dr. Mario Guido



AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por darme los mejores ejemplos de vida, por su cariño infinito y su apoyo en la educación que me brindaron. A mis hermanos, por la unidad que nos caracteriza y por todos los momentos compartidos.

A Vivi, por ser una experta generadora de alegría y entusiasmo, por su excelencia como directora y como persona, y por permitirme formarme en esta carrera.

A todo el grupo del laboratorio 14, por su gran compañerismo, por todas sus enseñanzas, por los experimentos y protocolos compartidos, por la alegría en las jornadas de trabajo y principalmente por la amistad.

A Ángeles, por su apoyo en el desarrollo de esta tesis, por su experiencia, su constancia y por abrirme las puertas en su laboratorio. A su grupo de trabajo, por el apoyo que me brindaron.

A Andrés, por compartir la vida de manera incondicional y a toda su familia.

A Vicky Juarez, por su ayuda y su bondad.

A todos los amigos que me acompañaron en estos años.

A los jurados de esta tesis, por su dedicación y sus sugerencias.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y al CONICET.

RESUMEN

La terapia fotodinámica (TFD) es un novedoso tratamiento contra el cáncer. Este se basa en la activación de un fotosensibilizador, con luz visible de una longitud de onda específica, el cual interacciona con el oxígeno molecular para generar oxígeno singlete y otras especies reactivas del oxígeno, las que conducen a la muerte de las células tumorales.

La TFD empleando ácido metil 5-aminolevulínico (Me-ALA), como un precursor del fotosensibilizador protoporfirina IX (PpIX), es usada para el tratamiento del cáncer cutáneo no-melanoma. Sin embargo, uno de los problemas de la TFD, como así también de otras terapias anticancerígenas, es la aparición de células resistentes.

El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar poblaciones de células de carcinoma escamoso de la línea SCC-13 resistentes a la TFD con Me-ALA.

La población de células SCC-13 parentales fue sometida a sucesivos ciclos de TFD, obteniéndose así hasta diez poblaciones de células resistentes. Las células resistentes fueron caracterizadas morfológica, molecular y funcionalmente, realizando comparaciones con las células parentales. Para ello, se analizó la morfología celular (azul de toluidina), el contenido intracelular de PpIX (citometría de flujo) y su localización subcelular (microscopía de fluorescencia), la expresión de proteínas de adhesión célula-célula (E-cadherina y β -catenina), proteínas de adhesión célula-sustrato (β 1-integrinas, vinculina y FAK), proteínas del citoesqueleto (F-actina), proteínas del shock térmico (HSP 60, 70 y 90) y proteína inhibidoras de apoptosis (survivina) (inmunofluorescencia indirecta y Western blot), la capacidad de migración y proliferación (ensayo de cierre de heridas y ensayo clonogénico), la resistencia cruzada a la droga quimioterapéutica doxorubicina (MTT) y la capacidad tumorigénica en ratones inmunodeprimidos.

Los resultados obtenidos indicaron que las células resistentes presentaron una morfología más fibroblástica, menor contenido del fotosensibilizador PpIX, mayor número de fibras de estrés, mayor expresión de proteínas de adhesión célula-sustrato de la vía de las integrinas, mayor expresión de HSps y mayor activación de survivina, mayor capacidad de migración y proliferación, mayor sensibilidad a la doxorubicina y mayor capacidad tumorigénica, comparando con las células parentales.

Estas características distintivas de las células resistentes podrían proveer información con el objetivo de aumentar la eficacia de las aplicaciones del Me-ALA en dermatología clínica.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a novel cancer treatment. It involves the activation of a photosensitizer with light of specific wavelength, which interacts with molecular oxygen to generate singlet oxygen and other reactive oxygen species that lead to tumor cell death. PDT employing methyl 5-aminolevulinic acid (Me-ALA), as a precursor of the photosensitizer protoporphyrin IX (PpIX), is used for the treatment of non-melanoma cutaneous cancer. However, one of the problems of PDT, and of other therapies, is the apparition of resistant cells. The aim of this study was to isolate and characterize squamous carcinoma cells SCC-13 resistant to PDT with Me-ALA. The SCC-13 parental population was submitted to successive cycles of Me-ALA-PDT and ten resistant populations were finally obtained.

In parental and resistant cells there were analyzed the cell morphology (toluidine blue), the intracellular PpIX content (flow cytometry) and its subcellular localization (fluorescence microscopy), the expression of cell-cell adhesion proteins (E-cadherin and β -catenin), cell-substrate adhesion proteins (β 1-integrins, vinculin and phospho-FAK), cytoskeleton proteins (F-actin), heat shock proteins (HSP 60, 70 and 90), the inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin (indirect immunofluorescence and Western blot), the migration and proliferation capacity (scratch wound assay and clonogenic assay), the cross resistance to the chemotherapeutic drug doxorubicin (MTT) and the tumorigenic capacity.

The results obtained indicate that resistant cells showed a more fibroblastic morphology, lower intracellular content of the photosensitizer, higher number of stress fibers, higher expression of cell-substrate adhesion proteins of the integrin via, higher expression of HSPs and higher activation of survivin, higher capacity of migration and proliferation, higher sensibility to doxorubicin and higher tumorigenic capacity, comparing with parental cells.

These distinctive features of the resistant cells can provide decisive information to enhance the efficacy of Me-ALA applications in clinic dermatology.

ABREVIATURAS

ALA: ácido 5-aminolevulínico.

Brcp: proteína de resistencia al cáncer de mama (del inglés: breast cancer resistance protein).

CaCo-2: línea celular de cáncer de colon humano.

CAM-DR: quimio-resistencia mediada por la adhesión celular (del inglés: cell adhesion molecules-drug-resistance).

CAM-RR: radio-resistencia mediada por la adhesión celular (del inglés: cell adhesion molecules-radio-resistance).

CCB: carcinoma de células basales.

CCE: carcinomas de células escamosas.

CCNM: cáncer cutáneo no melanoma.

DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco.

DMSO: dimetilsulfóxido.

FAK: quinasa de adhesión focal (del inglés: focal adhesion kinase).

FS: fotosensibilizador.

FCEV: factor de crecimiento del endotelio vascular.

5FU: 5-fluorouracilo.

G: generación de células resistentes a la terapia fotodinámica.

HaCaT: línea celular de queratinocitos humanos.

He-ALA: hexil- ácido 5-aminolevulínico.

HIF: factor inducible por hipoxia (del inglés: hypoxia inducible factor).

HSP: proteína del shock térmico (del inglés: heat shock protein).

IAP: proteína inhibidora de apoptosis (del inglés: inhibitor apoptosis protein).

Me-ALA: metil-ácido 5-aminolevulínico.

MEC: matriz extracelular.

MDR: resistencia a múltiples drogas (del inglés: multidrug resistance).

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide

P: células SCC-13 parentales.

Pgp: glicoproteína P (del inglés: P-glycoprotein).

PpIX: protoporfirina IX.

RTK: receptor tirosina quinas.

SCC-13: línea celular de carcinoma escamoso humano.

SW-480: línea celular de cáncer de colon humano.

TFD: terapia fotodinámica.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: EL CÁNCER

El cáncer	1
1.1. Epidemiología del cáncer	1
1.2. Nomenclatura de los tumores	1
1.2.1. Tumores benignos	1
1.2.2. Tumores malignos	1
1.3. Características de las células cancerosas	2
1.3.1. Angiogénesis y metástasis	2
1.4. Cáncer de piel	3
1.4.1. Clasificación del cáncer cutáneo	3
1.4.2. Epidemiología del cáncer de piel	3
1.4.2.1. Melanoma maligno	4
1.4.2.2. Cáncer cutáneo no melanoma	4
1.4.2.2.1. Carcinoma de células basales	4
1.4.2.2.2. Carcinoma de células escamosas	4
1.4.3. Tratamientos del cáncer de piel no melanoma	4
1.4.3.1 Tratamientos quirúrgicos	5
1.4.3.2 Tratamientos no quirúrgicos	5
Referencias	6

CAPÍTULO 2: LA TERAPIA FOTODINÁMICA

La terapia fotodinámica	7
2.1. Aplicaciones de la terapia fotodinámica	7
2.2. Ventajas de la terapia fotodinámica	7
2.3. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica	7
2.4. Fotosensibilizadores	8
2.4.1 Características de los fotosensibilizadores	9
2.4.2. Ácido delta 5-aminolevulínico	9
2.4.3. Metil-ácido delta 5-aminolevulínico	10
2.4.3.1. Aplicación de la terapia fotodinámica con Me-ALA en crema	10
2.4.3.2. Eficacia terapéutica del Me-ALA	10
Referencias	12

CAPÍTULO 3: MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA

Mecanismos de resistencia a la terapia fotodinámica	14
3.1. Mecanismos intracelulares de resistencia a la terapia fotodinámica	14
3.1.1. Disminución de la acumulación intracelular del fotosensibilizador: proteínas de resistencia a múltiples drogas	14
3.1.2. Enzimas antioxidantes	15
3.1.3. Proteínas de la familia Bcl-2	15
3.1.4. Survivina	15

3.1.5. Proteínas del shock térmico	16
3.2. Mecanismos extracelulares de resistencia a la terapia fotodinámica	16
3.2.1. Matriz extracelular y adhesión celular	16
3.2.2. Vasculatura tumoral e hipoxia	16
Referencias	18

CAPÍTULO 4: ADHESIÓN CELULAR

Adhesión celular	20
4.1. Uniones estrechas	20
4.2. Uniones de anclaje	20
4.2.1. Las uniones adherentes	21
4.2.1.1. Las cadherinas	22
4.2.1.2. Las cateninas	22
4.2.1.2.1. β -catenina	23
4.2.1.2.2. α -catenina	23
4.2.2. Contactos focales	23
4.2.2.1. Integrinas	24
4.2.2.2. FAK	25
4.2.2.3. Vinculina	25
Referencias	26

HIPÓTESIS

27

OBJETIVOS

Objetivo general	28
Objetivos específicos	28

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales	29
5.1.1. Medios de cultivo	29
5.1.2. Tripsina- EDTA	29
5.1.3. Reactivos	29
5.1.4. Marcador de peso molecular	29
5.1.5. Compuesto fotosensibilizador	29
5.2. Métodos	30
5.2.1. Estudios <i>in vitro</i>	30
5.2.1.1. Cultivos celulares	30
5.2.1.2. Obtención de células resistentes a la terapia fotodinámica	30
5.2.1.3. Análisis de la viabilidad celular por MTT	30
5.2.1.4. Aparato de irradiación	31
5.2.1.5. Detección del contenido de PpIX intracelular	31
5.2.1.6. Localización celular de la PpIX	31
5.2.1.7. Evaluación de las características morfológicas	31
5.2.1.7.1. Tinción con azul de toluidina	31
5.2.1.7.2. Tamaño celular	31
5.2.1.8. Análisis del contenido de ADN celular	32
5.2.1.9. Ensayo clonogénico	32
5.2.1.10. Capacidad de migración y proliferación celular	32

5.2.1.11. Estudios de la expresión y distribución de proteínas	33
5.2.1.11.1. Determinaciones por fluorescencia	33
5.2.1.11.1.1. Inmunofluorescencia indirecta	33
5.2.1.11.1.2. Tinción de actina	
5.2.1.11.2. Electroforesis de proteínas y análisis por Western Blot	33
5.2.1.11.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	34
5.2.1.12. Adhesión a sustratos de la matriz extracelular	34
5.2.1.13. Inhibición de β 1-integrinas	34
5.2.1.14. Resistencia cruzada a doxorrubicina	35
5.2.1.14.1. Localización subcelular de doxorrubicina	35
5.2.2. Estudios <i>in vivo</i>	35
5.2.2.1. Capacidad tumorigénica	35
5.2.3. Análisis estadísticos	35
Referencias	35

RESULTADOS

6.1. Estudios <i>in vitro</i>	36
6.1.1. Obtención de células resistentes a la terapia fotodinámica	36
6.1.2. Detección del contenido de PpIX intracelular	37
6.1.3. Localización subcelular de la PpIX	38
6.1.4. Evaluación de las características morfológicas	41
6.1.4.1. Morfología celular	41
6.1.4.2. Morfología nuclear	42
6.1.5. Análisis del contenido de ADN celular	44
6.1.6. Ensayo clonogénico	44
6.1.7. Capacidad de migración y proliferación	45
6.1.8. Estudios de la expresión y distribución de proteínas	47
6.1.8.1. Proteínas de adhesión célula-célula	47
6.1.8.2. Proteínas de adhesión célula-sustrato	41
6.1.8.3. Proteínas del citoesqueleto	48
6.1.8.3.1. F-actina	49
6.1.8.3.2. α -tubulina	50
6.1.8.4. Proteína inhibidora de apoptosis: survivina	51
6.1.8.5. Proteínas del shock térmico	53
6.1.9. Adhesión a sustratos de la matriz extracelular	54
6.1.10. Inhibición de β 1-integrinas	54
6.1.11. Resistencia cruzada a doxorrubicina	56
6.1.11.1. Localización subcelular de doxorrubicina	56
6.1.11.2. Expresión de la proteína de resistencia a múltiples drogas Pgp	58
6.2. Estudios <i>in vivo</i>	59
6.2.1. Crecimiento tumoral	59

DISCUSIÓN

7.1. Estudios <i>in vitro</i>	60
7.1.1. Obtención de células resistentes a la terapia fotodinámica	60
7.1.2. Detección del contenido de PpIX intracelular y su localización subcelular	60
7.1.3. Evaluación de las características morfológicas	61
7.1.3.1. Morfología celular	61
7.1.3.2. Morfología nuclear	62

7.1.4. Proliferación celular	62
7.1.5. Capacidad de migración celular	63
7.1.6. Adhesión célula-sustrato	63
7.1.7. Adhesión célula-célula	64
7.1.8. Proteína inhibidora de la apoptosis: survivina	64
7.1.9. Proteínas del shock térmico	65
7.1.10. Resistencia cruzada a doxorrubicina	66
7.2. Estudios <i>in vivo</i>	67
7.2.1. Capacidad tumorigénica	67
Referencias	68
CONCLUSIONES	69

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

EL CÁNCER

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la pérdida de control de la división celular y por la capacidad de invadir otros órganos. El tejido canceroso presenta una estructura atípica en comparación con los tejidos y órganos normales de los que se origina y sus células poseen una capacidad incontrolable de reproducción. A medida que las células del cáncer crecen y se multiplican, forman una masa de tejido, llamada tumor. Puede desarrollarse a partir de cualquier tejido dentro de cualquier órgano. El cáncer puede ser causado tanto por factores externos (químicos, radiación, microorganismos, virus) como internos (mutaciones hereditarias, hormonas, condiciones inmunes).¹

1.1. Epidemiología del cáncer

La incidencia del cáncer y su mortalidad se incrementan en el mundo debido al aumento de la población mundial, la elevación de la esperanza de vida (lo que implica envejecimiento) y una mayor exposición a factores de riesgo. Según los datos de GLOBOCAN, en el año 2.008 se registraron cerca de 12,7 millones de casos de cáncer y 7,6 millones de muertes debidas al cáncer. El 56 % de esos casos y el 64 % de las muertes ocurrieron en países en desarrollo. A nivel mundial, el cáncer de mama es el más frecuente y la principal causa de muerte por dicha enfermedad en las mujeres, representando el 23 % de los casos y el 14 % de las muertes. El cáncer de pulmón es el de mayor incidencia entre los hombres y representa el 17 % de los casos y el 23 % del total de muertes debidas al cáncer. Después del cáncer de pulmón en los hombres, siguen en orden de incidencia el de próstata, colon-recto y estómago y en las mujeres, luego del de mama, se ubican los de colon-recto, cérvix y pulmón.²

Aunque las tasas de incidencia del cáncer en los países en desarrollo son la mitad comparando con los países desarrollados, las tasas de mortalidad son similares. La supervivencia es menor en los países en desarrollo debido a una combinación de diagnósticos tardíos y limitado acceso a los tratamientos.³

1.2. Nomenclatura de los tumores

Los tumores son descriptos con un nombre genérico, el cual especifica el tejido general de origen (epitelio, mesénquima o sistema reticuloendotelial) y si el tumor es benigno o maligno.⁴

1.2.1. Tumores benignos

Los **tumores benignos** son aquellos no invasivos. Usualmente están separados del tejido normal circundante por una cápsula de tejido conectivo. Si bien los tumores benignos no invaden el tejido que los rodea, pueden causar serios problemas porque dañan a las células normales, ejercen presión sobre los nervios o pueden producir cantidades excesivas del producto que normalmente secretan las células que le dan origen.

Los tumores benignos de origen epitelial pueden tener un crecimiento papilar (papiloma). Los que provienen de tejido glandular se denominan adenomas, por ejemplo: el adenoma papilar de tiroides. Los de origen mesenquimático se clasifican en fibromas (provenientes de fibrocitos), lipomas (de adipocitos), osteomas (de osteocitos), condromas (de condrocitos), leiomiomas (de músculo liso), rabdomiomas (de músculo estriado), hemangiomas o angiomas (del endotelio de los vasos sanguíneos) y linfangiomas (del endotelio de los vasos linfáticos).⁴

1.2.2. Tumores malignos

Los **tumores malignos** están constituidos por células anormales que invaden los tejidos circundantes, no tienen una cápsula bien definida y sus células crecen mucho más desorganizadas que en un tumor benigno. Estos se denominan de la siguiente manera:

- Carcinomas: derivan de células epiteliales.

- Sarcomas: derivan de tejido mesenquimático. Estos pueden ser: fibrosarcomas, liposarcomas, osteosarcomas, condrosarcomas, leiomiomas, rhabdomiomas, hemangiosarcomas y linfangiosarcomas.
- Leucemias: se originan a partir de las células sanguíneas (glóbulos blancos y rojos). Las células tumorales se desarrollan de células precursoras en la médula ósea y pasan a la circulación sanguínea.
- Linfomas: son tumores sólidos que afectan al sistema linfático, como por ejemplo a los nódulos linfáticos.
- Neuroblastomas: son tumores malignos de las células nerviosas.⁵

1.3. Características de las células cancerosas

Dentro de las características de las células malignas o cancerosas, podemos destacar:

- Inmortalidad: escapan a la muerte celular programada o apoptosis.
- Independencia: no responden a señales de muerte o supervivencia por parte de otras células.
- Invasión y movilidad: tienen la propiedad de invadir los tejidos circundantes y además, tienen la capacidad de abandonar su lugar inicial e invadir nuevos lugares del cuerpo, mediante el proceso de metástasis.
- Subversión: son capaces de inhibir el sistema inmune e influir sobre las células normales a fin de crear un ambiente propicio para el desarrollo del tumor.
- Anaplasia: es la pérdida de la diferenciación morfológica y funcional que ocurre en las células cancerosas. Los cánceres varían desde bien diferenciados a indiferenciados o anaplásicos.
- Inestabilidad: originan diversos subclones que acumulan aún más mutaciones aberrantes en el genoma.
- Inducción de angiogénesis: poseen la capacidad de inducir el crecimiento de vasos sanguíneos que nutren y favorecen el crecimiento de los mismos.⁶

1.3.1. Angiogénesis y metástasis

Las células tumorales pueden adquirir la capacidad de atravesar los vasos sanguíneos, infiltrarse en los tejidos normales y formar un nuevo tumor en un sitio diferente al que se originó inicialmente. Este proceso se conoce como metástasis. Los pilares sobre los que se asienta la metástasis son:

- Cambios en la adhesión celular: las células cancerosas poseen moléculas de adhesión que permiten la unión célula-célula y célula-matriz extracelular. Algunas de estas moléculas de adhesión pueden disminuir su expresión en las células cancerosas, lo cual aumenta su habilidad de separarse de las células vecinas para poder moverse y migrar. Por el contrario, otras moléculas de adhesión aumentan, permitiendo anclar la célula maligna a la matriz extracelular a medida que esta va migrando.
- Proteólisis: consiste en la destrucción de la matriz extracelular mediante la secreción de enzimas proteolíticas, con lo cual las células cancerosas pueden abrirse camino entre estas estructuras.
- Movilidad: es la migración de las células malignas a través de la matriz extracelular para llegar a un vaso sanguíneo (o linfático), intravasarse, ser transportado por la corriente sanguínea hasta lechos capilares distantes, extravasarse y migrar una cierta distancia para iniciar la formación de una nueva colonia de células cancerosas o metástasis.
- Angiogénesis o neovascularización: es la capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Las células tumorales producen (o inducen la producción por parte de las células cercanas) factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV), los cuales estimulan la formación de vasos sanguíneos. Los nuevos vasos son indispensables para la nutrición, el intercambio gaseoso y la eliminación de desechos de las células tumorales.⁷

Los tumores metastásicos pueden interferir con las funciones de los órganos involucrados y pueden dar como resultado la muerte. La diseminación de células tumorales es un proceso de profundo significado clínico dado que la metástasis hace fracasar los tratamientos, como el quirúrgico, que eliminan el tumor primario. La diseminación metastásica es la responsable de una gran proporción de las muertes por cáncer (entre el 50 y el 66 por ciento).⁷

1.4. Cáncer de piel

El cáncer de piel es una enfermedad causada por el desarrollo de células cancerosas en la epidermis. En este trabajo de tesis se han empleado células de cáncer cutáneo para estudiar la problemática de la resistencia de las células cancerosas a un nuevo tratamiento antineoplásico, por lo que en los siguientes apartados se detallan algunas características de este tipo de cáncer.

1.4.1. Clasificación del cáncer cutáneo

El cáncer cutáneo se clasifica según las células de la piel que le dan origen. Así, existen básicamente dos tipos de cáncer de piel: melanoma (proviene de los melanocitos) y no melanoma (proviene de otros tipos de células epidérmicas que no son melanocitos). El cáncer cutáneo no melanoma puede ser de tipo basocelular (proviene de las células basales de la epidermis) o escamoso (también llamado espinocelular, ya que se origina a partir del estrato espinoso de la epidermis).⁸ La epidermis se divide en estratos denominados basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo. La figura 1.1 muestra los estratos de la epidermis y los correspondientes tipos de cáncer cutáneo a los que dan origen.

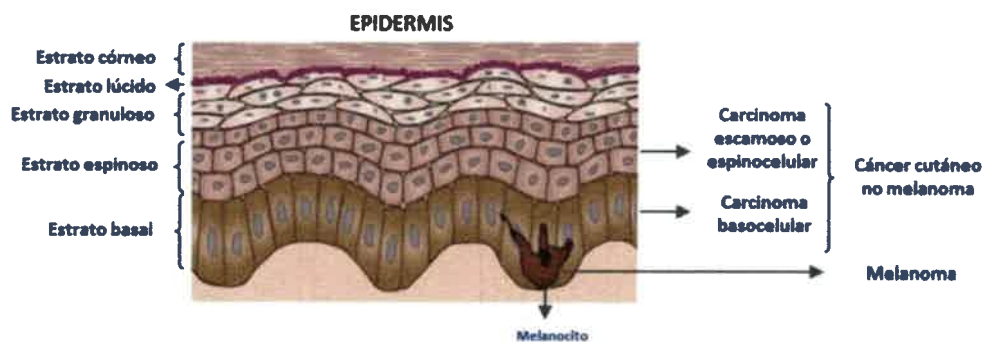


Figura 1.1. Estratos de la epidermis y los correspondientes tipos de cáncer cutáneo a los que dan origen.

1.4.2. Epidemiología del cáncer de piel

La incidencia del cáncer de piel ha aumentado durante las últimas décadas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de piel es la neoplasia maligna más frecuente en EE. UU. y en muchos otros países del mundo. Se presentan anualmente entre 2 y 3 millones de casos de cáncer no melanoma y por lo menos 132.000 casos de melanoma en todo el mundo.⁹ Las tasas de incidencia varían entre las diferentes zonas geográficas, registrándose las tasas más altas a nivel mundial en Australia. Entre los factores de riesgo se encuentran la exposición a la luz solar (radiación UV), tez blanca, presencia de quemaduras o cicatrices, exposición a arsénico, inmunosupresión, etc.¹⁰

1.4.2.1. Melanoma maligno



Figura 1.2. Melanoma.

El melanoma (figura 1.2) es la forma más peligrosa de cáncer de piel, ya que tiende a reproducirse o extenderse a otras zonas del cuerpo formando metástasis. Sin embargo, si se detecta a tiempo tiene más de un 90% de posibilidad de tratamiento exitoso. El melanoma puede aparecer súbitamente o puede crecer sobre un lunar.¹¹

1.4.2.2. Cáncer cutáneo no melanoma

El cáncer cutáneo no melanoma (CCNM) es el tipo de cáncer de piel de mayor incidencia. Raramente es mortal, pero si no se trata puede dañar a órganos y estructuras cercanas, llegando a ser mortal. Su incidencia es 18-20 veces mayor que la del melanoma maligno. El CCNM incluye al carcinoma de células basales y al carcinoma de células escamosas.¹¹

1.4.2.2.1. Carcinoma de células basales



Figura 1.3. Carcinoma de células basales.

El carcinoma de células basales (CCB), también llamado basocelular (figura 1.3), se origina de las células basales de la epidermis. Es la forma de cáncer de piel no melanoma más frecuente. Alrededor del 75% de todos los CCNM son carcinomas de células basales. Su tasa de incidencia se ha incrementado un 20% en las últimas 2 décadas.¹²

Su crecimiento es lento y rara vez se extiende a otras partes del cuerpo, por lo que es menos agresivo que el carcinoma de células escamosas. Sin embargo, si no se realiza un tratamiento, con el tiempo, el CCB puede convertirse en una lesión peligrosa.¹¹ Las metástasis son excepcionales, con un rango de 0,0028 a 0,1 %, y se presentan en tumores de gran tamaño o ulcerados.¹²

1.4.2.2.2. Carcinoma de células escamosas



Figura 1.4. Carcinoma de células escamosas.

El 25 % de los CCNM son carcinomas de células escamosas (CCE) (figura 1.5). El porcentaje anual de incidencia de los CCE aumentó considerablemente en los últimos diez años, variando de acuerdo a los diferentes países, sexos y razas.¹²

Como en el caso de CCB, la principal causa de aparición de la enfermedad es la acumulación de exposiciones solares a lo largo de los años. Sin embargo, el CCE es más peligroso que el CCB porque es más metastásico. Puede originarse a partir de lesiones precancerosas, tales como la queratosis actínica. Se estima que entre un 0.25% y un 20% de las queratosis actínicas se convierten en CCE.¹¹ El potencial metastásico del CCE que aparece sobre las queratosis actínicas es del 3-4 % y aumenta del 18 al 31 % en tumores que asientan sobre dermatitis por radiación, cicatrices de quemaduras y fistulas de osteomielitis crónica.¹²

1.4.3. Tratamientos del cáncer de piel no melanoma

Existen diferentes tipos de tratamiento para pacientes con cáncer de la piel no melanoma y queratosis actínica, los cuales pueden clasificarse en quirúrgicos y no quirúrgicos.

1.4.3.1 Tratamientos quirúrgicos

- **Cirugía convencional:** consiste en la extirpación quirúrgica del tumor y de una porción de piel peritumoral aparentemente sana.
- **Cirugía micrográfica de Mohs:** se diferencia de la cirugía convencional porque efectúa la resección de los tumores en forma de capas horizontales, y la metodología empleada permite el examen histológico del 100% de los márgenes de la sección.
- **Electrodesección y curetaje:** se efectúa el raspado enérgico del tumor con una cureta y la posterior electrodesección.
- **Criocirugía:** consiste en el uso de nitrógeno líquido para congelar y destruir el tejido anormal.
- **Láser de CO₂:** el láser de CO₂ se emplea como un electrobisturí en una cirugía convencional, pero con los beneficios de producir fotocoagulación, sellado de terminales nerviosas y de vasos linfáticos.¹²

1.4.3.2 Tratamientos no quirúrgicos

- **Radioterapia:** es un tratamiento para el cáncer el cual utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para eliminar células cancerosas. Actúa por daño directo sobre el ADN celular.
- **Terapia biológica:** utiliza el sistema inmunológico del paciente para controlar el cáncer. Se emplean sustancias producidas por el cuerpo o sintéticas para estimular, dirigir o restaurar las defensas naturales del cuerpo contra el cáncer. En cáncer de piel se utiliza el Interferón- α , el cual produce apoptosis de las células tumorales y tiene efecto antiproliferativo, es inmunomodulador y antiangiogénico. También se emplea imiquimod, que modifica la respuesta inmune local a través de la inducción de distintas citoquinas.
- **Quimioterapia:** consiste en la aplicación de una droga que mata a las células cancerosas. Para el tratamiento de cáncer de piel se utiliza 5-fluorouracilo.¹²
- **Terapia fotodinámica:** es un nuevo tratamiento que utiliza drogas fotosensibilizadoras y la luz para inducir la muerte de las células cancerosas.¹³
En esta tesis se estudia la resistencia de células de cáncer de piel a la terapia fotodinámica y se hablará de este tratamiento con más detalle en el capítulo 2.

Referencias

- ¹ Cancer Facts and Figures. 2012. American Cancer Society.
- ² Ferlay J., Shin H., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*. 127:2893–2917.
- ³ Jemal A., Bray F., Center M., Ferlay J., Ward E., Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 61(2):69–90.
- ⁴ Cancer: Nomenclature of malignant tumours. 2012. Encyclopaedia Britannica. (<http://www.britannica.com>).
- ⁵ Varricchio C. G. 2004. *A cancer source book for nurses*. Boston: Jones and Bartlett Publishers. p. 229. ISBN 0-7637-3276-1.
- ⁶ Characteristics and Properties of Cancer Cells. 2011. *Cancer Basics and Facts*.
- ⁷ McDonnell K., Wellstein A. M. 2006. *Cancer Metastasis*. Oncology. Springer Ed. 244-253.
- ⁸ Ricotti C., Bouzari N., Agadi A., Cockerell C. J. 2009. Malignant skin neoplasms. *Med. Clin. North Am.* 93:1241–1264.
- ⁹ Robyn L. Solar Ultraviolet Radiation Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. World Health Organization Public Health and the Environment. 2006, Geneva. (<http://www.who.int/cancer/en/index.html>).
- ¹⁰ Statistics and Facts on Skin Cancer. 2008, EE.UU. American Cancer Society (ACS), American Academy of Dermatology (AAD), Centers for Disease Control (CDC), Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) and the Skin Cancer Foundation. (<http://www.binasss.sa.cr/incidenciacancer.pdf>).
- ¹¹ Velasco M., Martínez L. 2000. Terapia fotodinámica con metil aminolevulinato crema. Nuevo e innovador tratamiento para el cáncer del piel no melanoma. Dossier informativo Galderma.
- ¹² Consenso sobre carcinoma basocelular-carcinoma espinocelular. Guía de recomendaciones 2005. Sociedad Argentina de Dermatología.
- ¹³ Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., Foster T. H., Girotti A. W., Gollnick S. O., Hahn S. M., Hamblin M. R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik A., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B. C., Golab J. 2011. Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J Clin.* 61:250-81.

CAPÍTULO 2

LA TERAPIA FOTODINÁMICA

La terapia fotodinámica (TFD), también llamada fotoquimioterapia, es un tratamiento de tumores malignos que involucra la administración de una droga, llamada fotosensibilizador, seguida de su activación por medio de luz visible. Cada uno de estos elementos (fotosensibilizador y luz) son inocuos por sí mismos, pero cuando se combinan en presencia de oxígeno, producen agentes citotóxicos que causan la muerte de las células irradiadas. Luego de la administración del fotosensibilizador al paciente (por vía endovenosa, intraperitoneal o tópica), se procede a irradiar la zona afectada. La luz activa al fotosensibilizador y esto provoca la muerte de las células tratadas (figura 2.1).¹

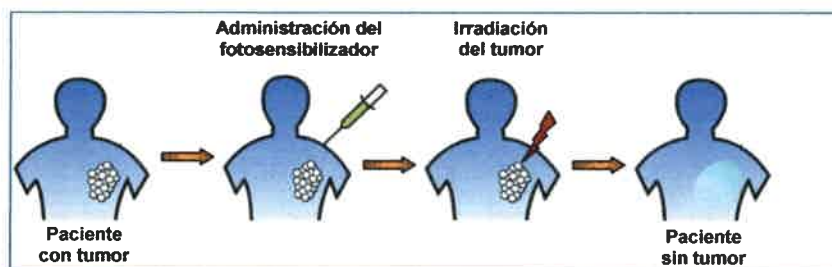


Figura 2.1. Esquema de la aplicación de terapia fotodinámica.

2.1. Aplicaciones de la terapia fotodinámica

La TFD se emplea para el tratamiento de diferentes cánceres y también otras enfermedades, tales como psoriasis, la queratosis actínica y la degeneración macular relacionada con la edad. Un requisito para aplicar este tratamiento es que el órgano a tratar tenga acceso a la luz, ya sea directamente (como la piel) o indirectamente por vía endoscópica (tales como las vías respiratorias y urinarias, la mucosa genital y el aparato digestivo).² Sin embargo, actualmente se están desarrollando protocolos para la aplicación de la TFD en órganos internos macizos.³

2.2. Ventajas de la terapia fotodinámica

- Es un tratamiento fácil de aplicar y no resulta agresivo para el paciente.
- Provoca destrucción selectiva del tumor.
- Se puede aplicar a pacientes no aptos para cirugía.
- El paciente puede ser ambulatorio.
- Puede combinarse con otras terapias.
- El tratamiento puede ser reiterado.
- Si no hay acumulación cutánea del fotosensibilizador, no es necesario evitar la exposición solar.
- Las aplicaciones repetidas no producen toxicidad acumulativa.¹

2.3. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica

Durante la iluminación, el fotosensibilizador es excitado desde su estado elemental (S^0) al primer estado excitado singlete (S^1). Este puede decaer al estado basal emitiendo fluorescencia o se transforma al estado triplete (S^3) por conversión de spin electrónico (ISC) (Figura 2.2). El fotosensibilizador en estado triplete puede actuar según dos mecanismos, Tipo I y Tipo II, dependiendo de la estructura química del agente, de la clase de átomo metálico central y del medio en que se lleva a cabo la reacción.⁴

En el mecanismo de Tipo I, el fotosensibilizador excitado en estado triplete, bajo condiciones anóxicas reacciona directamente con sustratos orgánicos (A) por intercambio electrónico, produciendo un estado oxidado (A^+) y un fotosensibilizador reducido (S^-). En condiciones hipóxicas, el fotosensibilizador reducido puede reaccionar con oxígeno para producir aniones superóxidos (O_2^-), los cuales luego pueden formar la especie altamente reactiva del radical hidroxilo (OH^*). El fotosensibilizador excitado S^3 puede también reaccionar con radicales superóxidos, los que luego pueden dar lugar a la formación del radical hidroxilo.⁵

El mecanismo de Tipo II consiste en la transferencia de energía desde el estado S^3 al oxígeno molecular en estado elemental, generando oxígeno singlete (1O_2) extremadamente reactivo que puede interactuar con un gran número de sustratos biológicos, induciendo daño oxidativo y por último muerte celular.⁵

En síntesis, el mecanismo Tipo I involucra la generación de radicales libres, mientras que el Tipo II lleva a la producción de oxígeno singlete. El mecanismo Tipo II es el más frecuente entre los fotosensibilizadores estudiados y por lo tanto el oxígeno singlete es el principal responsable de la destrucción tumoral.⁵

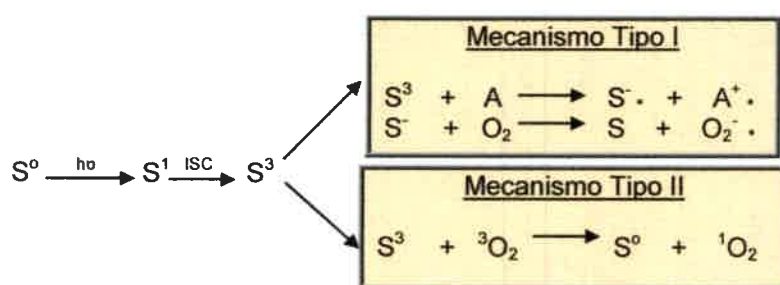


Figura 2.2. Mecanismos de acción de los fotosensibilizadores.

2.4. Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores son compuestos capaces de absorber luz a una longitud de onda específica y transformarla en energía útil. En el caso de la TFD, esta energía involucra la producción de agentes citotóxicos.⁵

Photofrin®, fotosensibilizador de primera generación, fue aprobado para su uso en el tratamiento de tumores gástricos, de esófago, pulmón, y vejiga.⁶ La administración sistémica de esta sustancia, produce una fotosensibilización cutánea durante varias semanas, lo que constituye uno de los principales inconvenientes del tratamiento. Además, la débil absorción relativa a 630 nm (longitud de onda empleada en el tratamiento), no permite una utilización óptima de la luz para esta terapia. Por esto, se ha iniciado la búsqueda de nuevos y mejores fotosensibilizadores para ser empleados en los ensayos clínicos. Los nuevos fotosensibilizadores de segunda generación incluyen porfirinas, clorinas, ftalocianinas y naftalocianinas. Estos se han estudiado con profundidad y se están aplicando actualmente en ensayos clínicos. Dentro de estas nuevas drogas de aplicación en TFD se encuentra el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA o ALA) y sus derivados (ésteres hidrocarbonados), entre los que se encuentra el derivado metilado (Me-ALA). Los nuevos compuestos derivados del ALA permiten una mayor optimización de la TFD.⁷

La tabla 2.1 lista los fotosensibilizadores que se emplean actualmente en clínica y su empresa fabricante.

Tabla 2.1. Fotosensibilizadores disponibles actualmente¹

Compuesto	Droga	Sustancia	Empresa
Porfirina	Photofrin®	HpD	Axcan Pharma, Inc.
Porfirina	Levulan®	ALA	DUSA Pharmaceuticals, Inc.
Porfirina	Metvix®	Me-ALA	Photocure ASA
Porfirina	Visudyne®	Vertiporfin	Novartis Pharmaceuticals
Texafirina	Antrin®	Lutexafirina	Pharmacylics
Clorina	Foscan®	Temoporfirina	Biolitec Pharma Ltd.
Clorina	Photochlor	HPPH	RPCI
Colorante	Photosens®	Ftalocianina	General Physics Institute

2.4.1 Características de los fotosensibilizadores

Para que un fotosensibilizador sea eficiente para ser aplicado en TFD debe poseer idealmente las siguientes propiedades:

- Ser un compuesto químicamente puro, cuyo proceso de síntesis pueda reproducirse.
- Ser retenido preferentemente en el tumor.
- Ser rápidamente excretado del cuerpo e inducir baja toxicidad sistémica.
- Poseer una toxicidad mínima en oscuridad y sólo ser citotóxico en presencia de luz.
- Tener alta reactividad fotoquímica, con gran producción de estados tripletes de largo tiempo de vida para producir efectivamente oxígeno singlete y otras especies reactivas del oxígeno.
- Tener fuerte absorbancia a longitudes de onda alta (mayores de 600 nm), donde la penetración de la luz en el tejido es máxima, mientras continúa siendo energéticamente capaz de producir oxígeno singlete.
- Carecer de potencial mutagénico.⁸

2.4.2. Ácido delta 5-aminolevulínico

Kennedy y colaboradores establecieron los actuales protocolos de TFD tópica utilizando un precursor de la protoporfirina IX (fotosensibilizador), el 5-ALA como profármaco, que a diferencia de las grandes moléculas de porfirinas incapaces de penetrar la piel, es capaz de atravesar fácilmente la capa córnea alterada.

El 5-ALA se forma a partir de la glicina y el succinil coenzima A en el interior de la mitocondria (figura 2.3). La formación del 5-ALA es el primer paso de la vía biosintética del grupo hemo. Al final de dicha vía se encuentra la protoporfirina IX (PpIX), a la cual se le incorpora el hierro gracias a la acción de la enzima ferroquelatasa.⁹

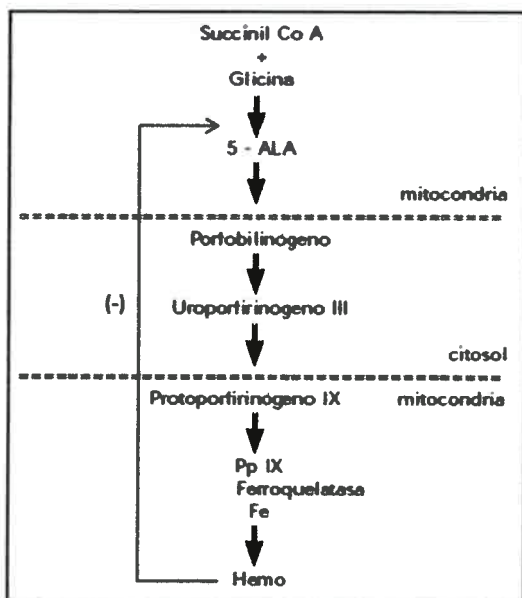


Figura 2.3. Biosíntesis celular del grupo hemo.

La administración de ALA, estimula la vía de síntesis del grupo hemo dentro de la célula, produciendo una acumulación de porfirinas endógenas, principalmente de PpIX. Este acúmulo intramitocondrial de PpIX es debido a que la capacidad de la ferroquelatasa es limitada, y a que se consigue sobrepasar el mecanismo de retroalimentación negativa que produce la concentración del grupo hemo sobre la síntesis de ALA. El fenómeno de sobreproducción de PpIX tras la administración de ALA, se manifiesta en mayor medida en las células tumorales que en los tejidos sanos circundantes, lo que supone cierta selectividad por los tejidos neoplásicos. Al irradiar los tejidos cargados con PpIX con una luz en su espectro de absorción entre 585-720 nm en presencia de oxígeno molecular, se produce la liberación de especies reactivas del oxígeno que llevan finalmente a la muerte de las células tumorales.¹⁰

En esta tesis se ha empleado como precursor del fotosensibilizador PpIX al metil-ácido delta 5-aminolevulínico, un derivado del ALA.

4.2.3. Metil-ácido delta 5-aminolevulínico

A causa de su hidrofobicidad el ALA difunde lentamente a través de las membranas celulares. Por lo tanto, una gran cantidad de ALA debe ser aplicada a la piel para asegurar una acumulación adecuada en el tejido a tratar. Con el objetivo de aumentar su tasa de difusión, se han desarrollado derivados del ALA que poseen mayor lipofiliidad, como por ejemplo los derivados metil-ALA (Me-ALA) y hexil-ALA (He-ALA). La prodroga derivada del ALA entra más rápidamente a las células y es hidrolizada enzimáticamente a ALA, conduciendo a la formación de PpIX.¹⁰ Además, el ALA y sus derivados pueden ser aplicados para el fotodiagnóstico de tumores (mediante fluorescencia), los cuales pasarían inadvertidos con las técnicas diagnósticas convencionales si son de pequeño tamaño.²

El derivado metilado del ALA formulado en crema, Metvix®, tiene como principio activo al metiléster del ácido aminolevulínico. Está autorizado y comercializado en Europa, Australia, Nueva Zelanda y Brasil para el tratamiento de carcinoma basocelular superficial y nodular,¹¹ para tratar queratosis actínicas pequeñas y no pigmentadas y para la enfermedad de Bowen (un tipo de CCE *in situ*).¹

4.2.3.1. Aplicación de la terapia fotodinámica con Me-ALA en crema

El tratamiento de TFD con Me-ALA consta de dos sesiones, con un intervalo de una semana entre ellas. Después de preparar la lesión, retirando las posibles costras y escamas, se aplica sobre ésta una capa de crema (160 mg/g de Me-ALA) de 1 mm de espesor y se cubre con un vendaje oclusivo. A las tres horas se retira el apósito, se limpia la zona con solución salina y se expone inmediatamente a luz roja (570-670 nm) con una dosis de 75 J/cm². En una misma sesión pueden tratarse las lesiones múltiples. La respuesta de la lesión al tratamiento se evalúa a los tres meses.¹²

4.2.3.2. Eficacia terapéutica del Me-ALA

Para valorar la eficacia de la TFD empleando Me-ALA se realizaron ensayos en un número de 59 pacientes con un total de 350 lesiones de carcinoma basocelular^{13,14,15,16,17,18} y en 452 pacientes con un total de 1.939 lesiones de queratosis actínica.^{19,20}

El tratamiento de TFD con Me-ALA produjo una respuesta completa (es decir, desaparición completa) hasta en el 97 % de los carcinomas basocelulares y hasta en el 91 % de las lesiones de queratosis actínicas a los 3 meses del tratamiento. Luego de un período de seguimiento a largo plazo de 24-48 meses (media: 35 meses), el 11 % de los carcinomas basocelulares, en las que se había obtenido una respuesta completa, reaparecieron.¹⁵

Con respecto a las tasas de respuesta de las lesiones, la TFD con Me-ALA fue superior a la TFD con placebo (tanto en queratosis actínica como en carcinoma basocelular) y tan eficaz como la crioterapia (tanto en queratosis actínica como en carcinoma basocelular) o como la escisión quirúrgica (en carcinoma basocelular). La figura 2.4 muestra los datos

referentes a la eficacia comparativa de la TFD con Me-ALA, la TFD con placebo, la cirugía y la criocirugía, en el tratamiento de carcinoma basocelulares. El resultado cosmético obtenido fue de excelente a bueno en la gran mayoría de los pacientes y según los investigadores fue mejor que el obtenido con crioterapia (tanto en queratosis actínica como en carcinoma basocelular) o con cirugía (en carcinoma basocelular). La figura 2.5 muestra los datos de los resultados cosméticos en pacientes con carcinoma basocelular luego de la TFD con Me-ALA y tras cirugía.¹⁸

En la enfermedad de Bowen, o el carcinoma *in situ*, la tasa de curación se acerca al 100 % con una tasa de recidiva que varía entre el 0-20 %. En contrapartida, en carcinomas infiltrantes la tasa de curación es de sólo el 8 % con una recurrencia de más del 82 %. Por ello debe reservarse la TFD con Me-ALA o ALA en el tratamiento de carcinomas escamosos sólo a aquellos pacientes que no puede someterse a un procedimiento quirúrgico. Además, esta técnica debe indicarse exclusivamente en lesiones estrictamente superficiales debido al riesgo implícito de metástasis de este tumor y al alto poder infiltrativo que posee. El uso de TFD en la enfermedad de Bowen representa una buena opción para destruir las células malignas en forma selectiva, con pocos efectos adversos y un excelente resultado estético. En estudios comparativos con 5-fluorouracilo (5FU) aplicado durante 4 semanas, criocirugía y TFD con ALA o MAL se observó una mejor respuesta clínica al término del tratamiento con TFD (88 %) en comparación con 5FU (69 %) y criocirugía (67 %). La tasa de curación a 12 meses fue de 82 %, 48-69 % y 67 % respectivamente. El mejor resultado estético a los 3 meses fue de 94 % con TFD, 66 % con criocirugía y 76 % con 5FU.²¹

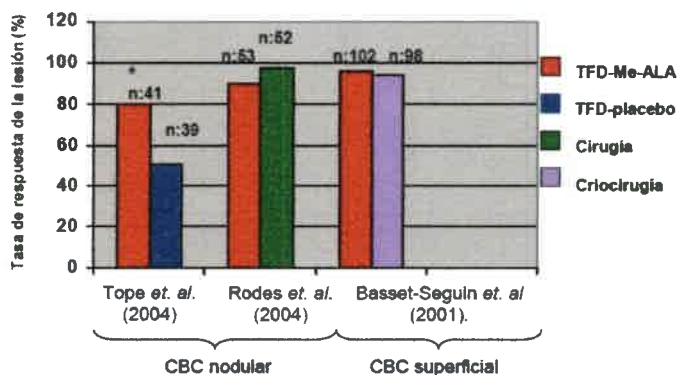


Figura 2.4. Eficacia comparativa de la terapia fotodinámica (TFD) con Me-ALA en el tratamiento de carcinoma basocelular (CBC). Tasas de respuesta clínica completa de las lesiones (desaparición completa de la lesión) en tres ensayos prospectivos, aleatorizados, comparativos con placebo¹⁶ con cirugía¹³ o con criocirugía,¹⁴ multicéntricos, en pacientes con lesiones de CBC nodular^{13,16} o superficial.¹⁴ (n: número de lesiones; * p < 0,001 frente a TFD-placebo).

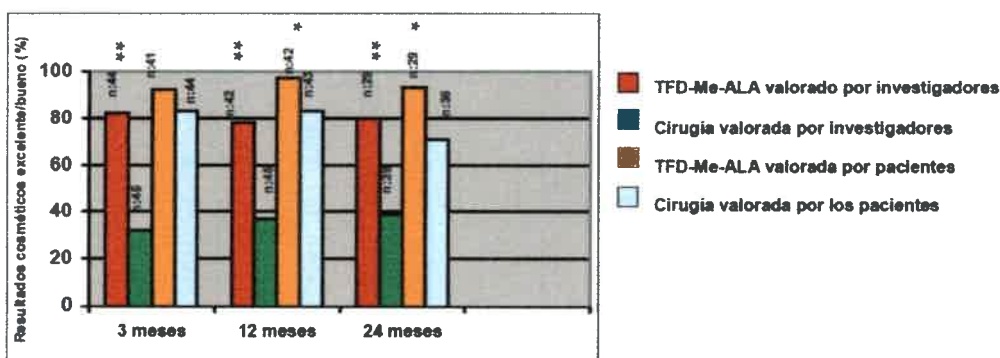


Figura 2.5. Resultados cosméticos en pacientes con carcinoma basocelular (CBC) luego de la terapia fotodinámica (TFD) con Me-ALA y de la cirugía. Porcentaje de pacientes con un resultado cosmético excelente o bueno, según la evaluación realizada por los investigadores y por los pacientes en un ensayo clínico multicéntrico y aleatorizado, en visitas de seguimiento realizadas a los 3, 12 y 24 meses del último tratamiento.¹³ (*p<0,005; **p<0,001 frente a la cirugía).

Referencias

- ¹ Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., Foster T. H., Girotti A. W., Gollnick S. O., Hahn S. M., Hamblin M. R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik A., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B. C., Golab J. 2011. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.* 61:250-81.
- ² Gilaberte Y., Serra Guillén C., de las Heras M. E., Ruiz Rodríguez R., Fernández Lorente M., Benvenuto Andrade C., González Rodríguez S., Guillén Barona C. 2006. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermosifiliogr.* 97(2):83-102.
- ³ Swartling J., Axelsson J., Ahlgren G., Kälkner K., Nilsson S., Svanberg S., Svanberg K., Andersson-Engels S. 2010. System for interstitial photodynamic therapy with online dosimetry: first clinical experiences of prostate cancer. *J. Biomed. Optics* 15(5):1-9.
- ⁴ Bergendahl L. T., Paterson M. J. 2012. Computational Modeling of the Steps Involved in Photodynamic Therapy. *Molecular Photochemistry – Various Aspects.* 8:161-192.
- ⁵ Josefsen L. B., Boyle R. W. 2008. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met. Based Drugs* 2008:1-24.
- ⁶ Dougherty T. 1993. Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* 58:895-900.
- ⁷ Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Xin-Hua Hu, Childs C. J., Sibata C.H. 2004. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 1, 27-42.
- ⁸ Pushpan S. K., Venkatraman S., An V. G. and Sankar J., Parmeswaran D., Ganesan S., Chandrashekar T. K. 2002. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents.* 2(2): 187-207.
- ⁹ Wachowska M., Muchowicz A., Firczuk M., Gabrysiak M., Winiarska M., Wanczyk M., Bojarczuk K., Golab J. 2012. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules.* 16(5):4140-4164.
- ¹⁰ Vena F., Turchiello R., Laville I., Pigaglio S., Blais J. and Tedesco A. 2004. 5-Aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line. *Laser Med. Scien.* 19: 119-126.
- ¹¹ Szeimies R. M. 2007. Methyl aminolevulinic acid-photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Dermatol. Clin.*, 25(1): 89-94.
- ¹² Ibbotson S., Valentine R., Hearn R. 2012. Is the pain of topical photodynamic therapy with methyl aminolevulinic acid any different from that with 5-aminolevulinic acid? *Photoderm. Photoimmun. Photomed.* 28(5):272-273.
- ¹³ Rhodes L., de Rie M., Enström Y. et al. 2004. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinic acid vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch. Dermatol.* 140(1):17-23.
- ¹⁴ Basset-Seguín N., Ibbotson S., Emtestam L et al. 2001. Photodynamic therapy using Metvix is as efficacious as cryotherapy in BCC, with better cosmetic results (poster) 10th Congreso of the European Academy of Dermatology and Venereology. Oct 10-14. Munich.
- ¹⁵ Soler A., Warloe T., Berner A. and Giercksky K.E. 2001. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinoma treated with methyl 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br.J.Dermatol.* 145(3):467-71.
- ¹⁶ Tope W., Menter A., El-Azhary R. et al. 2004. Comparison of topical methylaminolevulinic acid photodynamic therapy versus placebo photodynamic therapy in nodular basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 50(suppl 3):123.
- ¹⁷ Horn M., Wolf P., Wolf H. et al. 2003. Topical aminolevulinic acid photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with conventional treatment. *Br. J. Dermatol.* 149(6):1242-9.
- ¹⁸ Siddiqui M., Perry C, y Scout L. 2004. Aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Am. J. Clin. Dermatol.* 5(2):127-137.
- ¹⁹ Freeman M., Vinciullo C., Francis D. et al. 2003. A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinic acid (Metvix®) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective randomized study. *J. Dermatol. Treat.* 14(2):99-106.
- ²⁰ Szeimies R., Karrer S., Radakovic-Fijan S. et al. 2002. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinic acid compared with cryotherapy for actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47(2):258-62.
- ²¹ Moreno Arias G., Eng Luna A., Alvarado Delgado A., Camps Fresneda A. 2007. Terapia fotodinámica. *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.* 35(6):255-268.

CAPÍTULO 3

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA

El problema más difícil que enfrentan las terapias anticancerígenas es la resistencia de las neoplasias, que limita y finalmente impide su efecto terapéutico. Cualquier circunstancia que dificulte la muerte de la célula tumoral luego de un tratamiento puede ser causa de resistencia.¹

La resistencia de las células tumorales se define como la falta de sensibilidad a los tratamientos anticancerígenos. Si todas las células sobreviven luego de la aplicación del tratamiento antineoplásico se dice que hay una resistencia total; si algunas células sobreviven, la resistencia es parcial.¹ La resistencia, independientemente de los mecanismos que la producen, puede clasificarse en innata o adquirida. La resistencia innata es la que presentan los tumores sin haber tenido un contacto previo con el tratamiento. La resistencia adquirida es aquella que aparece en el tumor luego de aplicarse la terapia.²

Con el objetivo de amplificar los cambios bioquímicos asociados con la resistencia celular e identificar así blanco terapéuticos sobre las células sobrevivientes, pueden realizarse ciclos repetidos del tratamiento seguidos de recrecimiento celular. La inducción de la resistencia en una población de células cancerosas se ha empleado para estudiar los mecanismos que la producen ante los tratamientos anticancerígenos, incluyendo a la TFD. La exposición de las células a altas dosis de TFD es una presión selectiva fuerte que permite sobrevivir únicamente a las células más resistentes. Es posible obtener células resistentes a la TFD incrementando la dosis del fotosensibilizador,³ el tiempo de exposición al fotosensibilizador⁴ o la dosis de irradiación.⁵

El fenómeno de resistencia fue estudiado primero en terapias antibacterianas. En el año 1.943 Luria y Delbruck quienes demostraron que la resistencia de bacterias a la fagocitosis resultaba de mutaciones genéticas. En 1.979 Goldie y Coldman adaptaron los estudios de procariontas a eucariotas y crearon las bases del concepto de selección clonal de resistencia a drogas de las células tumorales. Siguiendo este concepto, la alta frecuencia de mutaciones genéticas en las células tumorales conduce a la aparición de clones tumorales que poseen una variada sensibilidad a la acción de agentes anticancerígenos. Así, los agentes citotóxicos causan la muerte de las células que son más sensibles a su acción, pero no tiene efecto sobre las células resistentes. Esto resulta en cambios considerables en la composición celular de un tumor con una dominación de las subpoblaciones resistentes.¹

Además de los mecanismos de resistencia intracelulares, actualmente la resistencia tumoral se estudia considerando al tumor entero, con su estructura de órgano y su vascularización.⁶ Los mecanismos intracelulares de resistencia a la TFD se relacionan con la inactivación de las especies reactivas de oxígeno por enzimas antioxidantes, la disminución de la acumulación del fotosensibilizador dentro de las células, fallo en las proteínas que regulan la muerte por apoptosis y la alteración de proteínas de adhesión. Los mecanismos de resistencia extracelulares están relacionados con la matriz extracelular y la vasculatura tumoral (figura 3.1).

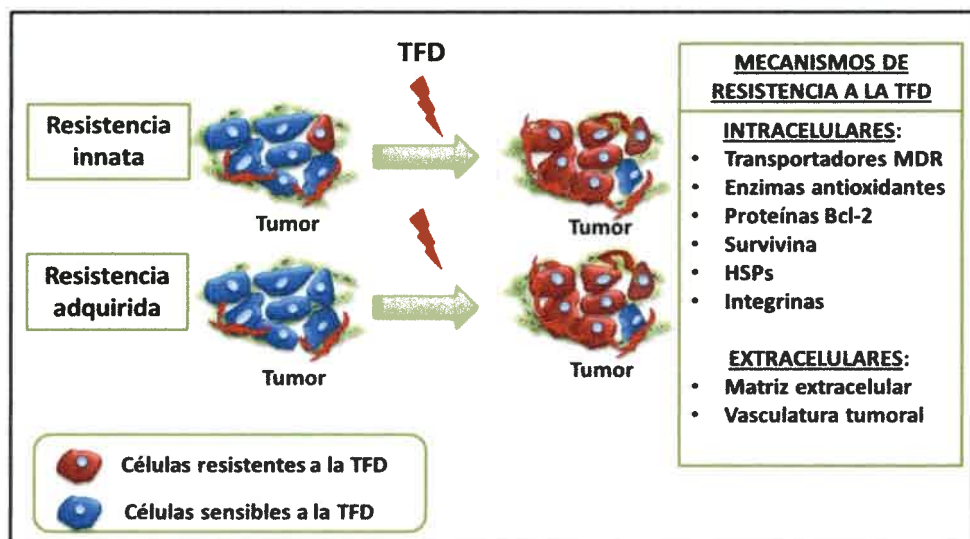


Figura 3.1. Mecanismos de resistencia de células de cáncer a la terapia fotodinámica.

3.1. Mecanismos intracelulares de resistencia a la terapia fotodinámica

3.1.1. Disminución de la acumulación intracelular del fotosensibilizador: proteínas de resistencia a múltiples drogas

La familia de los transportadores ABC (ATP-binding cassette) son un grupo de proteínas que median el fenómeno de la resistencia a múltiples drogas o MDR (multidrug resistance). Estas son ATP-asas localizadas en la membrana celular que actúan como “bombas de expulsión”, disminuyendo la acumulación intracelular de varias sustancias (figura 3.2). Estas proteínas poseen una función de detoxificación en tejidos normales, tales como el epitelio del riñón, páncreas, pulmón y tracto gastrointestinal. En tejidos tumorales se encuentran sobreexpresadas y expulsan drogas anticancerígenas al exterior de las células malignas, siendo responsables de la disminución en la efectividad de los tratamientos. Ejemplos de estas proteínas son Pgp (P-glycoprotein) y Bcrp (Breast cancer resistance protein), entre otras.⁷ El transportador Bcrp, también llamado ABCG2, disminuye la acumulación intracelular de derivados porfirínicos, tales como protoporfirina, hematoporfirina y feoforbide, en células de cáncer y por lo tanto afecta la eficacia de la TFD. Se han propuesto inhibidores de esta ATP-asa, incluyendo a imatinibmesylate y gefitinib, para potenciar la actividad fotodinámica.⁸ Se ha descrito la presencia de Pgp en algunos carcinomas de células escamosas,⁹ pero hasta el momento no se ha estudiado su relación con los resultados fototerapéuticos.

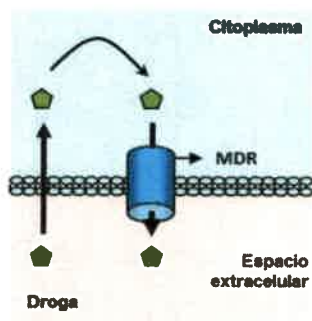


Figura 3.2. Expulsión de drogas desde el citosol hacia el espacio extracelular a través de transportadores MDR.

3.1.2. Enzimas antioxidantes

La TFD produce la muerte de las células tumorales por medio de la generación de especies reactivas del oxígeno. El daño ulterior puede ser antagonizado por la acción de mecanismos de defensa antioxidantes, tales como el sistema glutatión, las catalasas y superóxido dismutasas.¹⁰

Muchos estudios *in vitro* describen la relación entre la acción de enzimas antioxidantes y la supervivencia de las células de cáncer. Cuando células de cáncer de mama fueron transfectadas con el gen de glutatión-peroxidasa, éstas fueron protegidas del daño fotodinámico por medio de la remoción de hidroperóxidos lipídicos.¹¹ La apoptosis mediada por la TFD en células malignas fue disminuida cuando se empleó un análogo de catalasa que se localizó en peroxisomas.¹² La apoptosis luego de la TFD también fue reducida en células Jurkat de leucemia humana que sobreexpresaron superóxido dismutasas.¹³

3.1.3. Proteínas de la familia Bcl-2

La familia Bcl-2 de proteínas controlan si las células mueren o continúan viviendo a través de la vía apoptótica mitocondrial. Esta familia se divide en dos grupos funcionales. Uno de estos grupos está constituido por los miembros anti-apoptóticos: Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w y Mcl-1. El otro grupo corresponde a las proteínas pro-apoptóticas: Bax, Bak y la subfamilia sólo BH3 (Bim, Bid, Bad, Bik, Bmf, NOXA y PUMA).¹⁴ El balance entre los miembros pro y anti- apoptóticos de esta familia influye de manera significativa en la susceptibilidad de las células de cáncer a la apoptosis luego de la TFD.¹⁵

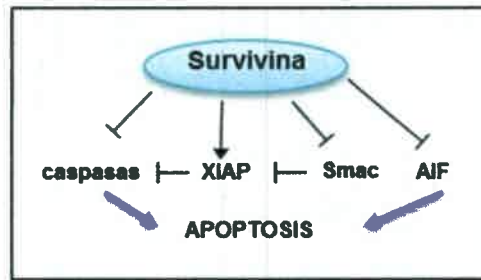
La activación de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 se ha observado tempranamente después de aplicar la TFD, siendo un mecanismo que se alteraría en las células resistentes. La reducción de los niveles de la proteína Bcl-2 por medio de oligonucleótidos antisentido sensibilizó a las células tumorales a la apoptosis inducida por TFD.¹⁶ Además, la transfección de células cancerosas con genes Bcl-2 y Bcl-xl disminuyó la apoptosis luego de la TFD.^{17,18} Se ha demostrado también que Bcl-2 se fosforila rápidamente, reduciendo así la apoptosis temprana de las células fotosensibilizadas.¹⁹ En células de cáncer de próstata Bax-negativas no se observó liberación de citocromo c, lo cual indica que la expresión de Bax es necesaria en las primeras etapas de la vía mitocondrial apoptótica.²⁰

3.1.4. Survivina

Survivina pertenece a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). Esta regula dos procesos celulares esenciales: inhibe la apoptosis y promueve la división celular. Los mecanismos de inhibición de la apoptosis mediados por survivina incluyen el secuestro de procaspasas 3 y 7, Smac/Diablo²¹ y AIF (figura 3.3).²²

Survivina no se expresa en los tejidos adultos normales, a excepción de la piel y el timo. Sin embargo, su expresión es sobre-regulada en la mayoría de los cánceres. Debido a su alta expresión en tumores y su rol en la inhibición de la apoptosis, tanto como en la proliferación, survivina ha sido propuesta como un nuevo marcador de cáncer y un blanco para el tratamiento del mismo. Altos niveles de survivina correlacionan con un pronóstico pobre, apoptosis disminuida, angiogénesis incrementada, quimio-resistencia^{23,24} y radio-resistencia.²⁵

Se ha demostrado que la TFD incrementa la expresión y la activación) por fosforilación de survivina en células de cáncer y que la manipulación de las vías anti-apoptótica mantenidas por survivina puede mejorar la eficacia de la TFD.^{26,27}



3.3. Mecanismos de acción de survivina como inhibidor de apoptosis.

3.1.5. Proteínas del shock térmico

Las proteínas del shock térmico (HSPs) son inducidas por señales de estrés celular y tienen un rol muy importante en la citoprotección ya que regulan la degradación de proteínas dañadas luego de una injuria. La sobreexpresión de numerosas HSPs correlaciona con un pronóstico pobre para el cáncer.²⁸

La TFD induce estrés celular, lo cual puede promover la reparación o tolerancia al daño,²⁹ con la consecuente resistencia celular. Muchos estudios han demostrado que las HSPs son inducidas por la TFD, tales como HSP34, HSP60, HSP70, HSP90 y HSP110, las cuales están involucradas en la citoprotección.¹⁰ Células de cáncer de colon y fibrosarcoma resistentes a la TFD presentaron una alta expresión de HSP60 comparando con células no resistentes.³⁰ La transfección estable de células cancerosas con HSP27 produjo una supervivencia incrementada luego de la TFD, lo que sugiere que esta proteína participa en la resistencia al tratamiento.³¹ En contraste a su acción reparadora, algunas HSPs actúan como adyuvantes endógenos que estimulan la respuesta inmune ante la TFD.^{32,33}

3.2. Mecanismos extracelulares de resistencia a la terapia fotodinámica

3.2.1. Matriz extracelular y adhesión celular

La matriz extracelular (MEC) es una compleja red de macromoléculas secretadas por las células. Está compuesta por carbohidratos y proteínas, tales como fibronectina, vitronectina, laminina y colágeno. Las integrinas son proteínas de intermembrana que contactan a las células con proteínas de la MEC. Además de su función en la adhesión, estas median señales del espacio extracelular dentro de las células a través de moléculas adaptadoras, tales como FAK (focal adhesion kinase), ILK (integrin-linked kinase), PINCH (particularly interesting new cysteine-histidine rich protein) y Nck2 (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2). Por medio de estas moléculas, las integrinas interactúan cooperativamente con las señales de receptores tirosina quinasa de factores de crecimiento, regulando la supervivencia, proliferación, migración y diferenciación.³⁴ Las señales de las integrinas otorgan resistencia celular a agentes anticancerígenos, tales como la radiación ionizante y la quimioterapia, a través de la vía de supervivencia de PI3K/Akt³⁵ y la inhibición de caspasa-8.³⁶

Muchos autores han descrito alteraciones en la MEC y daños a las proteínas de adhesión causados por la TFD,^{37,38} pero su implicancia en la resistencia celular aún no ha sido completamente dilucidada.

3.2.2. Vasculatura tumoral e hipoxia

La efectividad de la TFD depende, en gran medida, de la disponibilidad de oxígeno en el tumor. El aumento de la oxigenación tumoral puede resultar en una mayor eficacia del tratamiento.³⁹ La hipoxia subsecuente al daño vascular, junto con el consumo de oxígeno por la TFD pueden limitar los resultados terapéuticos. Además, el daño a la vasculatura puede favorecer la progresión de la malignidad por selección y expansión clonal de células resistentes

a la falta de nutrientes y la hipoxia.¹⁰ Luego de la TFD, el daño vascular y la hipoxia pueden causar la estabilización del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) y la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por la vía de HIF-1 α .⁴⁰ Así, la TFD puede promover la angiogénesis tumoral, aumentar la proliferación y supervivencia. La alta expresión de HIF-1 α y Bcl-2 en estadios tempranos de cáncer de esófago en pacientes correlaciona con una respuesta pobre ante la TFD.⁴¹ El tratamiento de tumores de mama de ratón con agentes que disminuyen la expresión de VEGF resultó en una mayor respuesta luego del tratamiento fotodinámico.⁴²

Referencias

- ¹ Solyanik G. I. 2010. Multifactorial nature of tumor drug resistance. *Experimental Oncology* 32(3):181–185.
- ² Liu F. 2009. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy- a quick review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 48(3):239-244.
- ³ Mayhew S., Vernon D., Schofield J., Griffiths J., Brown S. 2001. Investigation of cross-resistance to a range of photosensitizers, hyperthermia and UV light in two radiation-induced fibrosarcoma cell strains resistant to photodynamic therapy in vitro. *Photochem. Photobiol.* 73:39-46.
- ⁴ 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.
- ⁵ Casas A., Perotti C., Ortel B., Di Venosa G., Saccoliti M., Batlle A., Hasan T. 2006. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int. J. Oncol.* 29:397-405.
- ⁶ Hazlehurst L. A., Landowski T. H., Dalton W. S. 2003. Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene* 22:7396–7402.
- ⁷ Ullah M. F. 2008. Cancer multidrug resistance: a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 9:1-6
- ⁸ Ishikawa T., Nakagawa H., Hagiya Y., Nonoguchi N., Miyatake S., Kuroiwa T. 2010. Key role of human ABC transporter ABCG2 in photodynamic therapy and photodynamic diagnosis. *Advances in Pharmacological Sciences* 2010:1-13.
- ⁹ Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín J M, Barros-Angueira F, Diz P G, Rey J M, García-García A. 2010. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: the role of vacuolar ATPases. *Cancer Letters.* 295(2):135-143.
- ¹⁰ Casas A., Di Venosa G., Hasan T., Batlle A. 2011. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry* 18:2486-2515.
- ¹¹ Wang H., Qian S., Schafer F., Domann F., Oberley L., Buettner G. 2001. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy. *Free Radicals Biology & Medicine.* 30:825-835.
- ¹² Price M., Terlecky S. R., Kessel D. 2009. A Role for hydrogen peroxide in the pro-apoptotic effects of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 85(6):1491–1496.
- ¹³ Dolgachev V, Oberley LW, Huang T T, Kraniak J M, Tainy M A, Hanada K, Separovic D. 2005. A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 332: 411-417.
- ¹⁴ Chipuk J. E., Moldoveanu T., Liambi F., Parsons M. J., Green D. R. 2010. The Bcl-2 family reunion. *Molecular Cell.* 37:299-310.
- ¹⁵ Nowis D., Makowski M., Stoklosa T., Legat M., Issat T., Golab J. 2005. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica* 52(2):339–352.
- ¹⁶ Srivastava M., Ahmad H., Gupta S., Mukhtar H. 2001. Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:15481-15488.
- ¹⁷ He J., Agarwal M. L., Larkin H. E., Friedman L. R., Xue L. Y., Oleinick N. L. 1996. The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene BCL-2. *Photochem. Photobiol.* 64:845-852.
- ¹⁸ Carthy C. M., Granville D. J., Jiang H., Levy J. G., Rudin C. M, Thompson C. B., McManus B. M., Hunt D. W. 1999. Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with a porphyrin-derived photosensitizer: Bcl-2 and Bcl-xL overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress caspase activity. *Laboratory Investigation* 79: 953-965.
- ¹⁹ Vantieghem A., Xu Y., Assefa Z., Piette J., Vandenneede J. R., Merlevede W., De Witte P. A., Agostinis P. 2002. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1- mediated signal and delays the onset of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37718-37731.
- ²⁰ Usuda J., Chiu S. M., Azizuddin K., Xue L. Y., Lam M., Nieminen A. L., Oleinick N. L. 2002. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on Bax. *Photochem. Photobiol.* 76:217-223.
- ²¹ Yamamoto H., Yee Ngan C., Monden M. 2008. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Science* 99(9):1709–1714.
- ²² Liu T., Brouha B., Grossman D. 2004. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in survivin targeted melanoma cells. *Oncogene.* 23: 39–48.
- ²³ Altieri D. C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic agent. *Nature Reviews Cancer* 3:46-54.
- ²⁴ Zhen H. N., Zhang X., Hu P. Z. 2005. Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer.* 104:2775-2783.
- ²⁵ Rodel F., Hoffmann J., Distel L., Herrmann M., Noisternig T., Papadopoulos T., Sauer R., Rodel C. 2005. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res.* 65: 4881–7.
- ²⁶ Ferrario A., Rucker N., Wong S., Luna M., Gomer C. J. 2007. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res.* 67:4989-4995.
- ²⁷ Cogno I. S., Rumie Vittar N. B., Lamberti M. J., Rivarola V. 2011. Optimization of photodynamic therapy response by survivin gene knockdown in human metastatic breast cancer T47D cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 104:434–443.

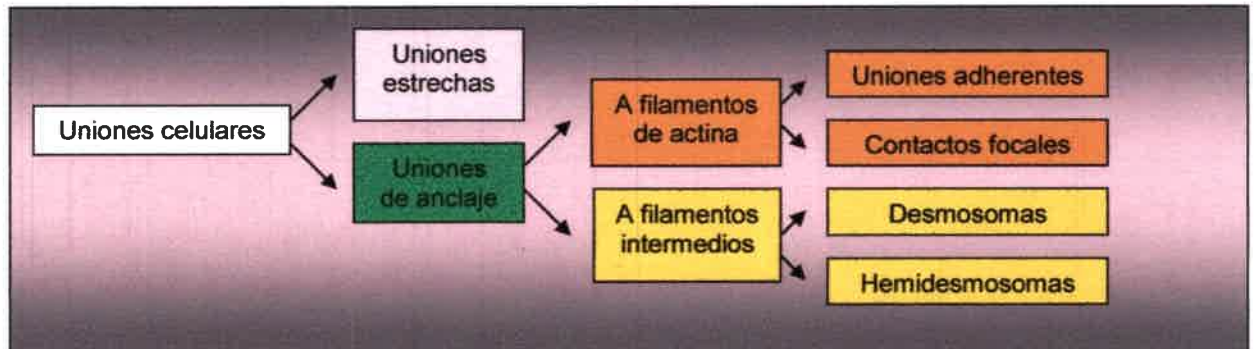
- ²⁸ Bauer K., Nitsche U., Slotta-Huspenina J., Drecoll E., von Weyhern C., Rosenberg R., Höfler H., Langer R. 2012. High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer. *Cellular Oncology*. 35(3): 197-205.
- ²⁹ Oleinick N. L., Morris R. L., Belichenko I. 2002. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sciences* 1:1-2.
- ³⁰ Hanlon J., Adams K., Rainbow A., Gupta R., Singh G. 2001. Induction of HSP60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J.Photochem. Photobiol.* 64:55-61.
- ³¹ Kim J., Jung H., Lim W., Kim S., Ko Y., Karna S., Kim O., Choi Y., Choi H., Kim O. 2012. Down-regulation of heat-shock protein 27-induced resistance to photodynamic therapy in oral cancer cells. *J. Oral Path. Med.* DOI: 10.1111/j.1600-0714.2012.01155.x.
- ³² Jalili A., Makowski M., Switaj T., Nowis D, Wilczynski GM, Wilczek E, Chorazy-Massalska M, Radzikowska A, Masiński W, Biały L, Sienko J, Sieron A, Adamek M, Basak G, Mroz P, Krasnodebski IW, Jakobisiak M, Gołab J. 2004. Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin.Cancer Res.* 10:4498-4508.
- ³³ Korbelik M., Sun J., Cecic I. 2005. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response. *Cancer Res.* 65(3):1018-1026.
- ³⁴ Hehlhans S., Haase M., Cordes N. 2007. Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim. Biophys. Acta* 1775:163-180.
- ³⁵ Velling T., Nilsson S., Stefansson A., Johansson S. 2004. Beta1-integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO Report* 5:901-905.
- ³⁶ Estrugo D., Fischer A., Hess F., Scherthan H., Belka C., Cordes N. 2007. Ligand bound beta1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. *PLoS One* 3:e269.
- ³⁷ Uzdensky A. B., Juzeniene A., Kolpakova E., Hjortland G. O., Juzenas P., Moan J. 2004. Photosensitization with protoporphyrin IX inhibits attachment of cancer cells to a substratum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 322:452-457.
- ³⁸ Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. 2007. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1776:86-107.
- ³⁹ Gołab J., Olszewska D., Mroz P., Kozar K, Kaminski R, Jalili A, Jakobisiak M. 2002. Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin. Cancer Res.* 8: 1265-1270.
- ⁴⁰ Almeida R. D., Manadas B. J., Carvalho A. P., Duarte C. B. 2004. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1704:59-86.
- ⁴¹ Koukourakis M. I., Giatromanolaki A., Skarlatos J., Corti L., Blandamura S., Piazza M., Gatter K. C., Harris A. L. 2001. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res.* 61: 1830-1832.
- ⁴² Ferrario A., von Tiehl K. F., Rucker N., Schwarz M. A., Gill P. S., Gomer C. J. 2000. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 60: 4066-4069.

CAPÍTULO 4

ADHESIÓN CELULAR

Las uniones celulares son modificaciones especializadas de la membrana plasmática en los puntos de contacto célula-célula y célula-matriz extracelular. Se encuentran en todos los tejidos, siendo especialmente abundantes en el tejido epitelial. Están constituidas por proteínas de transmembrana que se unen al citoesqueleto a través de proteínas adaptadoras. El cuadro 4.1 muestra la clasificación de las uniones celulares típicas de un tejido epitelial.¹

Cuadro 4.1. Clasificación de las uniones celulares en el tejido epitelial.



4.1. Uniones estrechas

Las **uniones estrechas** son los contactos más íntimos entre células. Estas uniones están compuestas de bandas de proteínas integrales de membrana (claudina y ocludina) que circundan una célula y contactan con bandas similares sobre células adyacentes (figura 4.1). Previenen la difusión de moléculas a través de los espacios entre células de una lámina epitelial y la migración lateral de glucolípidos y proteínas de la membrana.¹

4.2. Uniones de anclaje

Las **uniones de anclaje** permiten la adhesión entre células y entre células y la matriz extracelular. Estas pueden contactar, en la región citoplasmática, con filamentos de actina o con filamentos intermedios (figura 4.1).¹ Entre las uniones de anclajes se encuentran:

- Las **uniones adherentes**, las cuales median contactos célula-célula a través de proteínas transmembrana llamadas cadherinas clásicas. Los dominios extracelulares de las cadherinas interaccionan con cadherinas de células adyacentes. Por otro lado, el dominio citoplasmático interacciona con el citoesqueleto de actina indirectamente, a través de su unión con β -catenina y α -catenina.¹
- Los **contactos focales**, en los que proteínas transmembrana de la familia de las integrinas establecen la unión de la célula a la matriz extracelular. Proteínas como talina, paxilina, α -actinina, vinculina, tensina o FAK (focal adhesion kinase) se encuentran mediando la unión entre integrinas y filamentos de actina.¹
- Los **desmosomas** cuya función es permitir la unión célula-célula a través de cadherinas desmosómicas (desmogleína y desmocolina). Las cadherinas desmosómicas, en contraposición a las cadherinas clásicas de las uniones adherentes, pueden establecer interacciones entre tipos celulares diferentes con cadherinas de células adyacentes. Intracelularmente conectan con la red de filamentos intermedios a través de las proteínas adaptadoras placoglobina y desmoplaquina.¹

d) Los **hemidesmosomas**, los cuales son morfológicamente similares a los desmosomas. Conectan los filamentos intermedios de las células epiteliales con la lámina basal (tipo de matriz extracelular) sobre la que yacen. Las proteínas transmembrana de los hemidesmosomas son principalmente integrinas, como por ejemplo integrina $\alpha 6 \beta 4$. La proteína adaptadora que permite contactar las integrinas de los hemidesmosomas con los filamentos intermedios es la plectina.¹

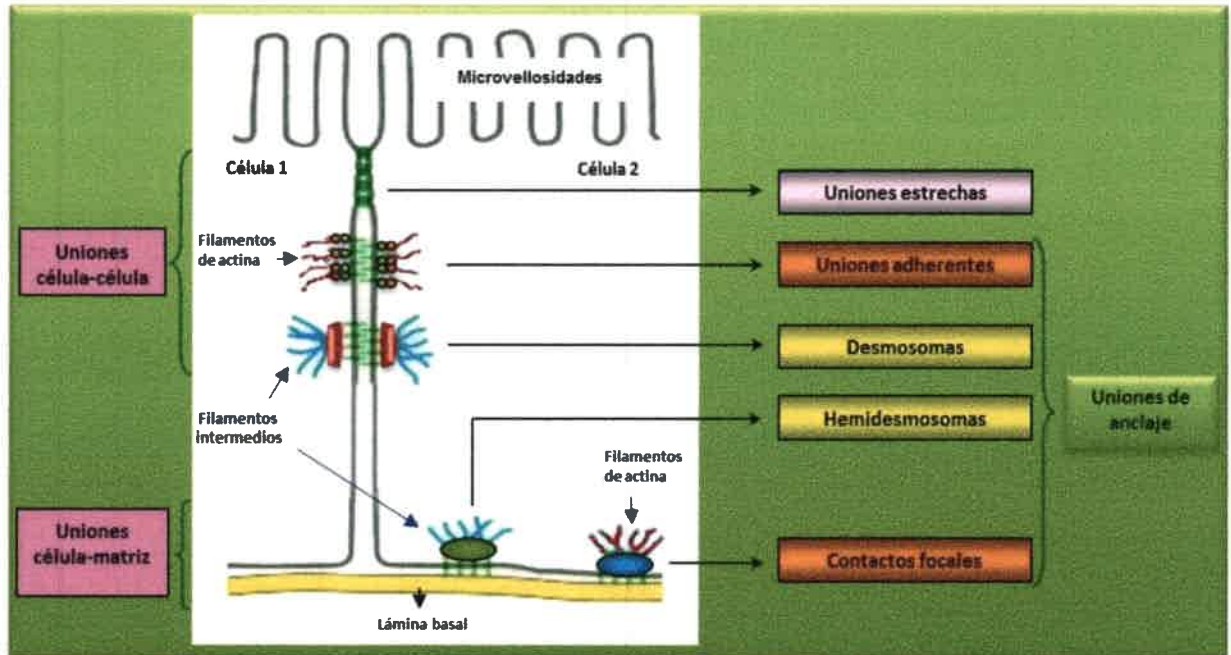


Figura 4.1. Principales tipos de uniones celulares que conectan las células epiteliales del intestino.

En este capítulo se describirán particularmente los tipos de uniones de interés para el desarrollo experimental de este trabajo, el cual incluye el estudio de las uniones adherentes y los contactos focales en una línea de células epiteliales neoplásicas.

4.2.1. Las uniones adherentes

Las uniones adherentes se establecen entre células adyacentes para poner en contacto sus citoesqueletos y así conferir resistencia mecánica al tejido. Son contactos puntuales o lineales dispuestos alrededor de las células.² En la figura 4.2 se esquematiza una unión adherente.

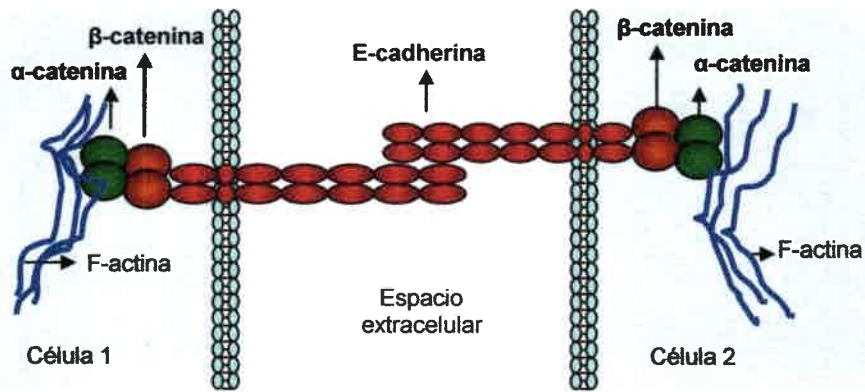


Figura 4.2. Representación esquemática de una unión adherente.

4.2.1.1. Las cadherinas

Las cadherinas median la adhesión célula-célula en todos los tejidos sólidos del cuerpo. La adhesividad de las cadherinas depende de la presencia de calcio extracelular, la propiedad que da origen a su nombre (adherencia de calcio). Se caracterizan por ser glicoproteínas de 750-900 aminoácidos con un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático y uno extracelular. El dominio extracelular forma la mayor parte de la cadena polipeptídica y se estructura en cinco subdominios. Las cadherinas de una célula forman dímeros paralelos, los cuales establecen uniones con los dímeros de cadherina de células vecinas.³

La E-cadherina es la cadherina mejor caracterizada y la primera en ser descrita. Se concentra en las uniones adherentes de las células epiteliales maduras. Su dominio citoplasmático, contiene el lugar de unión a la proteína adaptadora β-catenina, con la que interacciona en proporción 1:1. La β-catenina, a su vez, actúa de puente entre la E-cadherina y la α-catenina. La α-catenina interacciona directamente con componentes del citoesqueleto como la actina y la α-actinina.³

La regulación de la expresión de la E-cadherina es un proceso controlado que se lleva a cabo durante el desarrollo, la formación de tejidos y la organogénesis. Sin embargo, la regulación de su expresión también juega un rol esencial en procesos patológicos, tales como la progresión tumoral.⁴ La pérdida de expresión o de la función de esta proteína es un evento importante para la invasión de células epiteliales tumorales. Los mecanismos moleculares involucrados en la disminución de la expresión de esta proteína durante la progresión tumoral incluyen cambios genéticos, epigenéticos y transcripcionales. Se han encontrado alteraciones en el locus de E-cadherina en carcinomas de mama y carcinomas gástricos. Los procesos epigenéticos incluyen la hipermetilación del promotor de E-cadherina. La sobreexpresión de represores transcripcionales de E-cadherina, pertenecientes a la familia Snail, podría actuar como inductora del proceso de invasión.⁵

4.2.1.2. Las cateninas

En las uniones adherentes, por lo menos dos tipos de cateninas (α y β) median la interacción, de forma no covalente, del dominio citosólico de la E-cadherina con componentes del citoesqueleto de actina. β-catenina interaccionan directamente con E-cadherina, mientras que α-catenina interacciona con β-catenina por un lado y elementos del citoesqueleto por otro. La participación de las cateninas es imprescindible para el mantenimiento de las adhesiones entre células y son un importante punto de regulación de los complejos de adhesión. Defectos en la expresión o función de estas proteínas se asocian con pérdida de adhesión y metástasis.⁶

4.2.1.2.1. β -catenina

La β -catenina es una proteína de 92 KDa. Hasta el momento ha sido encontrada en tres compartimentos celulares distintos: en membrana (formando parte del complejo de adhesión celular cadherina-cateninas), en el citoplasma (en forma libre o asociado a otras proteínas como APC, axina y GSK3 β) o en el núcleo (unida a factores de transcripción de la familia LEF-Tcf).⁷

Conocida primero por su implicación en la funcionalidad de la E-cadherina, se llegó con posterioridad al descubrimiento del rol de β -catenina como coactivador transcripcional de genes implicados en el desarrollo tumoral, como componente crítico de la vía de señalización de Wnt. La capacidad de β -catenina de translocar al núcleo, depende de los niveles de esta proteína que se encuentran libres en el citosol, no asociados a E-cadherina. El control de los niveles citosólicos de la β -catenina está finamente regulado. Así, en una célula normal de colon, la β -catenina que no se encuentra unida a α -catenina y E-cadherina (en los complejos de adhesiones celulares) se localiza en el citosol, formando un complejo con la quinasa GSK3 β , la axina y APC, entre otros factores. En estas condiciones, la GSK3 β fosforila 4 residuos de la β -catenina, lo cual induce su rápida degradación por el sistema ubiquitin-proteosoma.⁶

4.2.1.2.2. α -catenina

α -catenina es una proteína de 102 KDa. Su sobreexpresión tiene efectos antiproliferativos, inhibiendo básicamente la transcripción mediada por β -catenina; el exceso de α -catenina parece unir β -catenina libre e impedir que ésta interactúe en el núcleo con el factor de transcripción Tcf-4.⁸ En células de la piel se ha observado que la eliminación condicionada del gen de α -catenina induce hiperproliferación.⁹

4.2.2. Contactos focales

Los contactos focales facilitan las interacciones célula-matriz. Por medio de este tipo de unión, los filamentos de actina del citoesqueleto pueden conectarse a los componentes de la matriz extracelular (figura 4.3). Consisten de integrinas y adaptadores asociados a integrinas, tales como talina, paxilina y vinculina.¹⁰

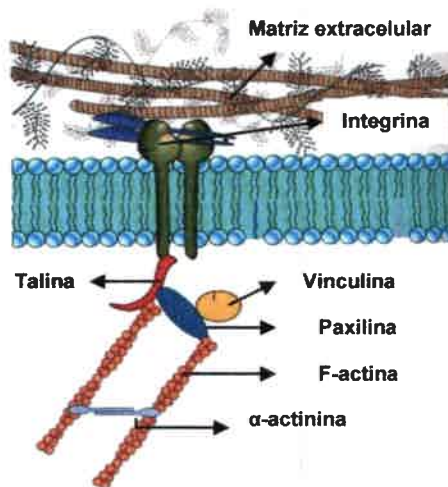


Figura 4.3. Esquema de un contacto focal.

Además de sus funciones puramente estructurales, las integrinas median señales desde el espacio extracelular al interior de las células a través de las moléculas señalizadoras FAK, ILK, PINCH y Nck2 (figura 4.4). Por vía de estas moléculas, las integrinas interaccionan cercanamente y cooperativamente con el receptor tirosina quinasa (RTK) para regular la adhesión, supervivencia, proliferación, forma celular, polaridad, migración y diferenciación.⁹ Se encontró que en células tumorales de diversos orígenes (tales como mama, colon o piel) la función y regulación de dichas proteínas es parcialmente alterada y así puede contribuir al fenotipo maligno y a la resistencia multidroga innata y adquirida. Una variedad de opciones terapéuticas tienen en cuenta la influencia de las integrinas en el crecimiento de las células tumorales, en la metástasis y la resistencia e incluyen inhibidores de quinasas, anticuerpos anti-integrinas o ARN de interferencia.¹¹

Las señales asociadas a integrinas hacen a las células más resistentes a los agentes genotóxicos anticancerígenos, tales como la radiación ionizante y las sustancias quimioterapéuticas, un fenómeno denominado **radio-resistencia/quimio-resistencia mediada por la adhesión celular (CAM-RR y CAM-DR)**. La adhesión de las células a la matriz extracelular mediada por integrinas y las moléculas río abajo de las integrinas pueden ser consideradas como potentes antagonistas de las terapias contra el receptor del factor de crecimiento.⁹

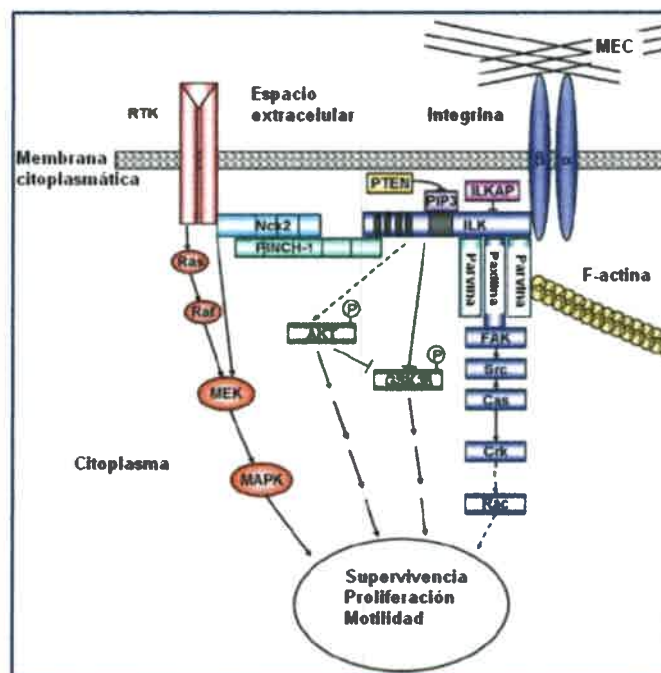


Figura 4.4. Cascada de señalización en una adhesión focal. MEC: matriz extracelular. RTK: receptor tirosina quinasa.

4.2.2.1. Integrinas

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

las integrinas, inducen cambios conformacionales, la activación de cascadas de señales y reclutamiento de complejos multiproteicos a las áreas de adhesión focal.⁹

La sobreexpresión o la pérdida de integrinas contribuyen a muchas enfermedades, incluyendo carcinoma de células escamosas y otros tumores. Los cambios en los patrones de expresión de las integrinas afectan de diferente manera a la invasión y la metástasis. Por ejemplo, la sobreexpresión de integrinas $\alpha 6\beta 4$ fue encontrada en tumores de piel, de cabeza y cuello y podría explicar el aumento de la adhesión de las células tumorales en el proceso de metástasis. Por otro lado, la reducción de los niveles de integrinas puede promover la desunión del tumor primario y el crecimiento invasivo. Una expresión reducida de $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ integrinas se puede encontrar en diferentes carcinomas.⁹

4.2.2.2. FAK

FAK es una tirosina quinasa involucrada en mediar las señales de integrinas y RTK para regular la adhesión, la forma, motilidad y supervivencia celular. Esta proteína de 125 KDa consiste de un dominio FERM N-terminal, un dominio quinasa central, tres regiones ricas en prolina y un dominio FAT C-terminal. El dominio FERM media la interacción con RTKs (como por ejemplo EGFR y PDGFR), con ETK (endotelial/epithelial tyrosine kinase) y con una proteína llamada ezrin, que se asocia a actina y a la membrana. Las regiones ricas en prolina cerca del C-terminal de FAK proveen sitios de unión para los dominios SH3. La unión de SH3 de la proteína adaptadora p130 Cas promueve la migración celular a través de la activación de Rac. La región FAT es responsable de la unión de ILK, de proteínas asociadas a integrinas, tales como paxilina y talina, y de la localización de FAK a las adhesiones focales.⁹

La activación de FAK ocurre luego del estímulo externo que activa a integrinas, factores de crecimiento o proteína G y comienza con la autofosforilación de FAK en tirosina 397, de manera inter o intramolecular, seguido por un reclutamiento de la familia de kinasas Src y la unión y fosforilación de p130 Cas y paxilina. La unión de la proteína adaptadora GRB2/SOS a FAK es importante en la vía de pro-supervivencia Ras/Raf/MEK/MAPK.⁹

4.2.2.3. Vinculina

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

La expansión y movimiento celulares ocurren mediante el proceso de unión entre la integrina y las moléculas de la matriz extracelular. La pérdida de vinculina afecta una variedad de funciones celulares, alterando la formación del complejo y evitando la adhesión. Así, la ausencia de esta proteína demuestra una disminución de la expansión celular (medida como el área celular máxima), acompañada por la reducción de la formación de fibras de estrés, presencia de pocas adhesiones focales, e inhibición de la formación de lamelipodios. Se ha descubierto que las células deficientes en vinculina tienen conos de crecimiento que avanzan más lentamente, así como filopodios y lamelipodios menos estables, comparando con células wild type.¹³

Referencias

- ¹ Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky S., Darnell J. 2005. *Biología Celular y Molecular*. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Cap. 6. Integración de células en tejidos. p. 202-209.
- ² Gruffat H., Lupo J., Morand P., Boyer V., Manet E. 2011. The nuclear and adherent junction complex component protein ubinuclein negatively regulates the productive cycle of Epstein-Barr Virus in epithelial cells. *J. Virol.* 85(2):784-794.
- ³ Harrison O. J., Jin X., Hong S., Bahna F., Ahlsen G., Brasch J., Wu Y. 2011. The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins. *Structure.* 19(2):244-256.
- ⁴ Li J., Zhou B. 2011. Activation of β -catenine and AKT pathway by Twist are critical for the maintenance of EMT cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer.* 11(49):1-11.
- ⁵ Peinado H., Ballestar E., Esteller M., Cano A. 2004. Snail Mediates E-Cadherin Repression by the Recruitment of the Sin3A/Histone Deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 Complex. *Molec. Cell. Biol.* 24(1):306-319.
- ⁶ Ratheesh A., Yap A. S. 2012. A bigger picture: classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton. *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* 13:673-679.
- ⁷ Hulsken J., Behrens J. 2000. The Wnt signaling pathway. *J. Cell. Sci.* 113:3545.
- ⁸ Giannini A., Vivanco M., Kipta R. 2000. α -catenine inhibits β -catenin signaling by preventing formation of a β -catenin-T-Cell Factor-DNA complex. *J. Biol. Chem.* 275:21883-8.
- ⁹ Vasioukhin V., Bauer C., Degenstein L., Wise B., Fuchs E. 2001. Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of α -catenine in skin. *Cell.* 104:605-17.
- ¹⁰ Hehlhans S., Haase M., Cordes N. 2006. Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochem. Biophys. Acta.* 1775 (2007) 163-180.
- ¹¹ Alghisi G., Ruegg C. 2006. Vascular integrins in tumor angiogenesis: mediators and therapeutic targets. *Endoth.* 13: 113-135.
- ¹³ Goldmann W., Ingber D. 2001. Intact vinculin protein is require for control of cell shape, cell mechanics, and rac-dependent lamellipodia formation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 290: 749-755.

HIPÓTESIS
OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La resistencia a la terapia fotodinámica empleando Me-ALA en células de carcinoma escamoso humano es conferida por cambios en la expresión de proteínas de adhesión, proteínas del shock térmico (HSPs) y proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los mecanismos de resistencia a la terapia fotodinámica en carcinoma de células escamosas empleando un derivado del ALA (Me-ALA).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obtener poblaciones celulares resistentes a tratamientos repetidos de terapia fotodinámica con Me-ALA en cultivos de células de carcinoma escamoso (SCC-13).
2. Caracterizar morfológica, molecular y funcionalmente los clones resistentes seleccionados, realizando comparaciones con las características de las células parentales (SCC-13) no sometidas a TFD.
 - 2.1. Determinar la localización y el contenido celular del fotosensibilizador PpIX.
 - 2.2. Estudiar la morfología celular.
 - 2.3. Determinar la capacidad de migración y proliferación celular.
 - 2.4. Analizar los patrones de organización y expresión de proteínas de adhesión celular y del citoesqueleto (E-cadherina, β -catenina, β 1-integrina, vinculina, FAK, F-actina y α -tubulina).
 - 2.5. Analizar la expresión y activación de proteínas inhibidoras de la apoptosis (survivina).
 - 2.6. Determinar la expresión de proteínas del shock térmico (HSPs 60, 70 y 90).
 - 2.7. Analizar la capacidad de adhesión sobre diferentes sustratos de la matriz extracelular (fibronectina, colágeno y laminina).
 - 2.8. Determinar el rol de las β 1-integrinas en la resistencia a la TFD.
 - 2.9. Analizar la resistencia cruzada a la droga quimioterapéutica doxorrubicina.
 - 2.10. Determinar la capacidad tumorigénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Medios de cultivo:

- **Medio de crecimiento**

Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con glucosa 1 X (Gibco), suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Gibco), 1 % v/v de glutamina (GlutaMAX™ 100X – Gibco), 1 % v/v de antibiótico-antimicótico (Penicilina G 10 µg/ml - esteptomicina 25 µg/ml - anfotericina B. Gibco) y 1 % v/v de piruvato de sodio (Hyclone®).

- **Medio de congelamiento**

Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con glucosa 1 X (Gibco), suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Gibco), 1 % v/v de glutamina (GlutaMAX™ 100X – Gibco), 1 % v/v de antibiótico-antimicótico (PenicilinaG 10 µg/ml - esteptomicina 25 µg/ml - anfotericina B. Gibco), 1 % v/v de piruvato de sodio (Hyclone®) y 10 % v/v de dimetilsulfóxido (DMSO).

5.1.2. Tripsina- EDTA 0,25% (Gibco).

5.1.3. Reactivos:

- MTT: 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difenilbromuro de tetrazolio (Sigma).
- Anticuerpos: monoclonales anti-survivina (Novus Biologicals), anti-fosfo-survivina (Santa Cruz Biotechnology), anti-β1-integrina (BD Transduction Laboratories), anti-fosfo-FAK y anti-FAK (BD Transduction Laboratories), anti-vinculina (Sigma), anti-E-cadherina y anti-β-catenina (BD Transduction Laboratories), anti-α-tubulina (Sigma), anti-HSP60 y anti-HSP90 (Stressgen), anti-HSP70 (Cell Signaling), anti-MDR-1 o Pgp (Sigma) anticuerpo anti-Ig G HRP contra ratón y conejo y anticuerpo anti-Ig G contra ratón, rata y conejo FRP (Amersham).
- LisoTracker Green, MitoTracker Green, NBD C6-ceramida y naranja de acridina (Invitrogen).

5.1.4. Marcador de peso molecular: Amersham Full-Range Rainbow (12000-225000 Da). Concentración 2 mg/ml.

5.1.5. Compuesto fotosensibilizador

El compuesto utilizado en este estudio fue el derivado metilado del ácido 5-aminolevulínico: Me-ALA (delta-aminoleavulinic acid methyl ester hydrochloride. Sigma). Este se empleó como un precursor del fotosensibilizador PpIX.

Para la realización de los experimentos se utilizó, en todos los casos, Me-ALA a la concentración 1 mM. En primer lugar, se preparó una solución madre de Me-ALA 10 mM en agua deionizada estéril. A partir de esta solución se preparó la solución de trabajo a la concentración 1 mM, empleando medio de cultivo DMEM sin suero.

5.2. MÉTODOS:

5.2.1. Estudios *in vitro*

5.2.1.1. Cultivos celulares

Se empleó la línea celular humana de carcinoma escamoso (SCC-13). En algunos experimentos se utilizaron las líneas de queratinocitos humanos HaCaT y las de cáncer de colon humano CaCo-2 y SW-480.

5.2.1.2. Obtención de células resistentes a la terapia fotodinámica

Las células SCC-13 se incubaron con Me-ALA 1 mM durante 4 horas (figura 5.1). Posteriormente, se expusieron a luz roja (635 nm) durante tiempos variables. Se seleccionaron condiciones de tratamiento que ocasionaron tasas de supervivencia del 5-10%. Las células que sobrevivieron fueron tripsinizadas, resembradas y una vez que proliferaron fueron sometidas a un nuevo tratamiento de TFD.¹ La población final recibió un total de 10 ciclos de TFD. La población inicial de células que nunca recibió el tratamiento fotodinámico se llamó población parental, la que fue sometida a una dosis de TFD se denominó primera generación de resistentes y así sucesivamente se nombraron las demás generaciones de células resistentes. Se obtuvieron finalmente hasta 10 generaciones de SCC resistentes.

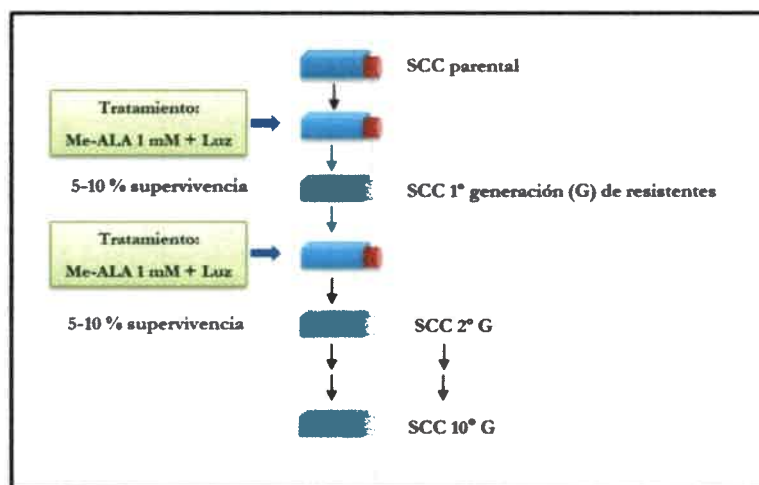


Figura 5.1. Esquema de trabajo empleado para obtener las generaciones de SCC-13 resistentes a TFD. Las células SCC-13 se incubaron con Me-ALA 1 mM durante 4 horas y posteriormente se expusieron a luz roja (635 nm) con dosis de intensidad de luz variables. Se seleccionaron condiciones de tratamiento que ocasionaron tasas de supervivencia del 5-10%. Luego de la proliferación de las células supervivientes, estas fueron sometidas a un nuevo tratamiento. La población final recibió un total de 10 ciclos de TFD.

5.2.1.3. Análisis de la viabilidad celular por MTT

Para conocer el grado de resistencia de las células SCC parentales, de la 1ª, 5ª y 10ª generación de resistentes, se realizó un análisis de la viabilidad celular luego de aplicar TFD a través del ensayo de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide). El método se basa en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. Las células fueron incubadas con Me-ALA 1 mM durante 4 horas a 37° C y luego fueron irradiadas a 7,31 J/cm² (n=8). Se emplearon células controles (n=8), control luz (n=8) y control droga (n=8). Luego de 24 horas del tratamiento, las células fueron incubadas con MTT (0,1 mg/ml en DMEM con 10% suero) por 1 hora y los cristales de formazán fueron disueltos en (DMSO). Las medidas de absorbancia fueron tomadas a una longitud de onda de 540 nm.

5.2.1.4. Aparato de irradiación

Para realizar los experimentos de TFD, las células fueron irradiadas con un aparato dotado de un sistema de iluminación de multiLEDs (luz coherente), con una longitud de onda de 635 nm. La intensidad de irradiación de la lámpara fue de 1,653 mW/cm².

5.2.1.5. Detección del contenido de PpIX intracelular

A través de la citometría de flujo se analizó el contenido de PpIX intracelular sintetizada a partir del Me-ALA en células resistentes de la 5^o y 10^o generación, comparando con las células SCC-13 parentales. Para ello, las células de las distintas poblaciones fueron sembradas en placas P6. Cuando alcanzaron una confluencia del 70 % fueron incubadas con Me-ALA 1 mM durante 1 y 4 horas. Tras la incubación las células fueron lavadas con PBS 2 veces, tripsinizadas y centrifugadas durante 10 minutos a 2.000 rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas y fijadas con una solución de formaldehído al 3,7 % en PBS durante 15 minutos a 25° C. La suspensión celular se centrifugó nuevamente (5 minutos, 2.000 rpm), se eliminó el fijador y se resuspendió en PBS. Las muestras se almacenaron a 4° C en oscuridad durante 24 horas. La medida de emisión de PpIX se llevó a cabo en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA). Se utilizó la línea de excitación de 620 nm y se evaluó la emisión a 670 nm. Se determinaron los valores de fluorescencia de 10.000 células de cada población, realizándose el ensayo por triplicado. Todas las muestras fueron obtenidas y medidas en el mismo momento.

5.2.1.6. Localización celular de la PpIX

Con el objetivo de analizar la localización de la PpIX, las células SCC de las poblaciones parental, quinta y décima generación, fueron cultivadas sobre cubreobjetos. Cuando las células alcanzaron un 70 % de confluencia se incubaron con Me-ALA 1 mM durante 4 y 17 horas a 37° C. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS, montadas sobre portaobjetos y examinadas inmediatamente mediante microscopía de fluorescencia bajo luz de excitación entre 460 y 490 nm.

La localización subcelular del fotosensibilizador se analizó comparando la señal fluorescente emitida por la PpIX con la obtenida utilizando diferentes sondas fluorescentes de acumulación subcelular selectiva: MitoTracker Green para mitocondrias, naranja de acridina y Lisotracker Green para lisosomas y NBD C6-ceramida para Aparato de Golgi. La co-localización de PpIX con Mitotracker y Misotracker Green fue realizada incubando las células con Me-ALA 1 mM por 17 horas. Luego el medio con Me-ALA fue descartado y las células fueron incubadas durante 15 minutos con Mitotracker o Lisotracker Green 0,10 µM.

5.2.1.7. Evaluación de las características morfológicas

5.2.1.7.1. Tinción con azul de toluidina

La evaluación de las características morfológicas de las células adheridas SCC parental, quinta y décima generación, se realizó utilizando la tinción azul de toluidina (AT). Para ello, las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron en metanol frío (-20° C) durante 10 minutos. Posteriormente, las células se dejaron secar y se tiñeron con AT (0,05 % en agua destilada) durante 30 segundos. Finalmente, las células se lavaron con abundante agua destilada, se dejaron secar y se montaron definitivamente en DePeX. Las preparaciones fueron analizadas en microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplados a una cámara de captura digital Olympus DP50 y fueron observadas en campo claro.

5.2.1.7.2. Tamaño celular

Con el objetivo de analizar el tamaño de las células en suspensión de las poblaciones parental, quinta y décima generación se empleó citometría de flujo. Para ello, las células fueron

despagadas del frasco de cultivo con tripsina y fueron centrifugadas a 1.500 rpm durante 3 minutos. Las células del pellet fueron fijadas con etanol frío (-20°C) al 70 % durante 30 minutos. Luego se retiró el etanol centrifugando las muestras a 1500 rpm durante 3 minutos. Finalmente, el pellet fue resuspendido empleado PBS y las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA).

5.2.1.7.3. Morfología nuclear

Con el objetivo de analizar y comparar la morfología nuclear de las células SCC parentales, de la quinta y décima generación se empleó la técnica de tinción nuclear mediante H₃ (H-33258). Para ello, las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron en formol frío (4° C) al 3,7 % v/v (formol/PBS) durante 30 minutos. Luego de la fijación se añadió tritón al 0,1 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los cubres se lavaron con PBS y se tiñeron con H-33258 durante 3 minutos. Finalmente se montaron con ProLong y se observaron bajo microscopio de fluorescencia.

2.2.1.8. Análisis del contenido de ADN celular

Con la finalidad de conocer si las células resistentes a la TFD poseen diferente capacidad de división celular y de muerte, con respecto a las parentales, se estudió el contenido de ADN celular de las poblaciones SCC parental, 1°, 5° y 10° generación mediante citometría de flujo. Para ello, las células de las distintas poblaciones fueron sembradas en placas P6. Cuando alcanzaron una confluencia del 70 %, fueron tripsinizadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 3 minutos. Las células del pellet fueron fijadas con etanol frío (-20°C) al 70 % durante 30 minutos. Luego se retiró el etanol centrifugando las muestras a 1500 rpm durante 3 minutos. El pellet fue resuspendido empleado la solución del kit PI/RNAase de Immunostep. Luego de 15 minutos el análisis del contenido de ADN se llevó a cabo en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA).

5.2.1.9. Ensayo clonogénico

Para realizar el ensayo clonogénico se emplearon células parentales, de la 5° y 10° generación. Para ello, las células fueron sembradas a una concentración de 200 células por ml sobre placas P35 (con un total de 300 células por placa). Luego de 10 días las células fueron teñidas con azul de toluidina 0,05 %. Todas las colonias fueron contadas para cuantificar la eficiencia de plaqueo (n° total de colonias/ n° de células sembradas x 100). Además, se determinó el porcentaje de colonias con más de 50 células (n° de colonias con más de 50 células/ n° total de colonias x 100).

5.2.1.10. Capacidad de migración y proliferación celular

Con el objetivo de estudiar la capacidad de migración y proliferación de las células resistentes de la quinta y décima generación, con respecto a las parentales, se realizó el ensayo de "cicatrización de heridas".

Para realizar este ensayo se sembraron células en placas multi-pocillos P12 en medio completo (DMEM con 10 % de suero fetal bovino). Cuando los pocillos alcanzaron una confluencia del 90-99 % se practicaron las heridas con una punta de micropipeta. Las heridas consistieron de tres rayas verticales por pocillo. Una vez realizadas las rayas se procedió a cambiar el medio de cultivo. Se tomaron fotografías a distintos tiempos: 0, 4, 8, 12 y 24 horas luego de producirse las heridas sobre los pocillos (n=8). El ancho de las heridas fue medido empleando el programa Image Pro-Plus 7.0.

5.2.1.11. Estudios de la expresión y distribución de proteínas

5.2.1.11.1. Determinaciones por fluorescencia

5.2.1.11.1.1. Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta fue utilizada para la determinación microscópica de los patrones y niveles de expresión de las proteínas α -tubulina (conjuntamente con marcación de centómeros empleando anticuerpo ACA), E-cadherina, β -catenina, vinculina, fosfo-FAK, survivina y fosfo-survivina en las poblaciones de SCC parental, de la quinta y décima generación.

Para determinaciones de la proteína α -tubulina, las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron en metanol frío (-20°C) durante 10 minutos. Luego se permeabilizaron con etanol al 100 %, 96 % y 70 % v/v (etanol/agua destilada) (1 minuto en cada solución de etanol).

Para las proteínas E-cadherina, β -catenina, vinculina, p-FAK survivina y fosfo-survivina las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron en formol frío (4°C) al 3,7 % v/v (formol/PBS) durante 30 minutos. Se procedió a realizar la permeabilización de las células empleando tritón al 0,1 % durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Luego de la permeabilización, los cubres se lavaron con PBS (3 pases de 2 minutos) y se incubaron con el anticuerpo primario en cámara húmeda durante 1 hora a 37°C . La concentración empleada de anticuerpo primario fue de 1:50 en PBS con 0,5 % p/v de BSA. Posteriormente, los cubreobjetos fueron lavados con PBS (3 pases de 2 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario, en las mismas condiciones del primario. La concentración usada de anticuerpo secundario fue de 1:200 en PBS con 0,5 % p/v de BSA. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS, contrateñidas con H-33258, montadas con ProLong y observadas en microscopio de fluorescencia.

5.2.1.11.1.2. Tinción de actina

Los microfilamentos de F-actina se marcaron mediante faloidina acomplejada a rodamina. Para ello, las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron en formol frío (4°C) al 3,7 % v/v (formol/PBS) durante 30 minutos. Luego de la fijación se añadió tritón al 0,1 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los cubres se lavaron con PBS (3 pases de 2 minutos) y se incubaron con faloidina en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente, las células fueron lavadas con PBS (3 pases de 2 minutos) y contrateñidas con H-33258, montadas con ProLong y observadas en microscopio de fluorescencia.

5.2.1.11.2. Electroforesis de proteínas y análisis por Western Blot

El análisis de Western Blot fue realizado para analizar los cambios en la expresión de proteínas de adhesión (E-cadherina, β -catenina, β 1-integrina, FAK, fosfo-FAK y vinculina), una proteína antiapoptótica (survivina y fosfo-survivina) y proteínas del shock térmico (HSP60, HSP70 y HSP90). Se emplearon muestras de SCC parental, de la 1^o, 5^o y 10^o generación. Las células parentales y resistentes a TFD fueron lisadas con buffer tris-tritón (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 1 % Igepal, 1 % triton X-100, 2 mM PMSF, 20 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinina, 1mM Ortovanadato). Los sobrenadantes, conteniendo las proteínas citoplasmáticas y de membrana celular fueron colectados para la detección de E-cadherina, β -catenina, FAK, fosfo-FAK, β 1-integrina, vinculina y α -tubulina. Para la detección de survivina, fosfo-survivina, HSP60, HSP70 y HSP90 las células fueron lisadas con buffer RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0,1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 5 mM EDTA, cocktail inhibidor de proteasas (Sigma)). La concentración de proteínas fue medida empleando el kit BCATM (Thermo Scientific Pierce).

Las proteínas obtenidas fueron separadas en geles de poliacrilamida. Posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de polivinilo (PVDF) o de nitrocelulosa en las que se realizó la inmunodetección con los anticuerpos correspondientes a través de quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

5.2.1.11.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS)

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12 % (para survivina y fosfo-survivina) y al 8% (para las demás proteínas). Se sembraron 40 µg de proteínas por calle. Las muestras (preparadas con buffer muestra) fueron calentadas a 100° C durante 5 minutos y luego, colocadas en hielo durante 5 minutos para lograr su desnaturalización. La corrida electroforética fue realizada a 100 Voltios constantes durante 2 horas. Para la transferencia se emplearon membranas de PVDF previamente tratadas con metanol durante 1 minuto. Esta se realizó a 250 mA constantes durante 60 minutos para survivina y fosfo-survivina y 110 minutos para las demás proteínas.

Incubación con anticuerpos y revelado:

1. Se sumergió la membrana con solución bloqueante (leche descremada al 5% en PBS-Tween 0,1%) durante toda la noche a 4° C, o durante 1 hora a temperatura ambiente, con el motivo de bloquear las fuentes inespecíficas.
2. Se enjuagó la membrana utilizando solución de lavado (PBS- Tween 0,1%) durante 10 min, a temperatura ambiente. Se repitió esta operación 3 veces.
3. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche a temperatura de 4° C o durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Se removió el anticuerpo primario enjuagando la membrana con PBS- Tween 0,1%, durante 10 minutos con agitación y a temperatura ambiente. Esta operación se repitió 3 veces.
5. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave.
6. Se removió el anticuerpo secundario lavando la membrana con la solución de lavado, durante 10 minutos con agitación y a temperatura ambiente. Se repitió esta operación 3 veces.
7. Se reveló la membrana por quimioluminiscencia.

5.2.1.12. Adhesión a sustratos de la matriz extracelular

La adhesión de las células SCC parentales, de la 5° y 10° generación fue estudiada sembrando las células sobre placas conteniendo diferentes proteínas de la matriz extracelular: laminina (10 y 20 µg/ml), colágeno I (10 y 20 µg/ml) y fibronectina (1 y 2,5 µg/ml). Se emplearon placas sin proteínas de matriz como control. El porcentaje de adhesión fue medido considerando el número de células adheridas en relación al número de células sembradas luego de 48 horas.

5.2.1.13. Inhibición de β1-integrinas

Con el objetivo de conocer la importancia de las β1-integrinas en la resistencia de las células SCC a la TFD empleando Me-ALA, se inhibió la acción de estas proteínas mediante el empleo de un anticuerpo anti-β1-integrinas (BD Transduction Laboratories) a la concentración de 10 µg/ml. Células HaCaT y SCC parentales y resistentes de la 10° generación fueron tripsinizadas y sembradas en placas P96. El anticuerpo fue administrado en el momento de sembrar las células. Se utilizaron células controles, control de anticuerpo, control del vehículo del anticuerpo (glicerol 50 %; fosfato de sodio, 20 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM), células tratadas con TFD (Me-ALA 1 mM, 4 h de incubación, 3,10 y 5,57 J/cm² de irradiación) y células con anticuerpo tratadas con TFD (Me-ALA 1 mM, 4 h de incubación, 3,10 y 5,57 J/cm² de irradiación) (n=6). Todos los experimentos se realizaron con las tres poblaciones cultivadas en medio DMEM con 10 % de suero y sin suero para conocer el efecto de la administración del suero al medio de cultivo y su posible interacción con la vía de las integrinas en la supervivencia celular. La

viabilidad celular luego de los tratamientos se midió mediante el ensayo de MTT, tal como se describió anteriormente en el apartado 5.2.1.3.

5.2.1.14. Resistencia cruzada a doxorubicina

La viabilidad de las células HaCaT y SCC parentales, de la 5° y 10° generación de resistentes fue medida luego de la incubación de la droga quimioterapéutica doxorubicina (Ferrer Farma). Células de cáncer de colon de las líneas SW-480 y CaCo-2 también fueron empleadas, con el objetivo de realizar comparaciones entre el tratamiento en cáncer de piel y otras líneas con mayor sensibilidad a la TFD con Me-ALA, como son las de cáncer de colon mencionadas. Las células fueron sembradas en placas P96 y después de 24 horas fueron incubadas con doxorubicina a las concentraciones de 0,30 y 0,60 µg/ml en DMEM 1%. La viabilidad fue medida mediante el ensayo de MTT tal como se describió en el apartado 5.2.3.

5.2.1.14.1. Localización subcelular de doxorubicina

Con el objetivo de analizar la localización de la doxorubicina, las células HaCaT y SCC de las poblaciones parental y décima generación fueron sembradas en P35. Cuando alcanzaron una confluencia del 70 % fueron incubadas con la droga a las concentraciones de 0,60 µg/ml en DMEM 1% a las 3, 5, 18 y 24 horas a 37° C. Luego, el medio fue descartado y las células fueron incubadas durante 15 minutos con Lisotracker Green y Hoechst para analizar la localización de la droga con estos dos marcadores fluorescentes bajo microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss).

5.2.2. Estudios *in vivo*

5.2.2.1. Capacidad tumorigénica

Para la realización de la determinación de la capacidad tumorigénica se emplearon células de las poblaciones de SCC parental, de la 1°, 5° y 10° generación de resistentes. Éstas fueron cultivadas en frascos F75. Cuando alcanzaron una confluencia del 80 %, las células fueron lavadas con PBS 1X estéril y despegadas de la superficie del frasco de cultivo mediante tripsinización con una solución 0,25 % tripsina-EDTA. Una vez que las células se despegaron, se detuvo la tripsinización mediante la adición de medio de cultivo completo (DMEM con 10 % de suero fetal bovino). Se llevó a cabo el recuento de células en cámara de Neubauer para obtener una estimación del número total de las mismas. Se centrifugó la suspensión de células a 1500 rpm durante 3 minutos. El sedimento celular obtenido fue resuspendido en el volumen de PBS necesario para realizar los inóculos, teniendo en cuenta la dosis de células a inyectar. Los inóculos realizados fueron de 5 millones de células cada uno en un volumen de 100 µl de PBS 1X. Para realizar los experimentos se inyectaron las células en los flancos derecho e izquierdo de los ratones en la región dorsal posterior. Se emplearon 6 ratones para la inyección de cada población celular. Los ratones se examinaron periódicamente controlando la aparición de tumores y el tamaño de los mismos.

5.2.3. Análisis estadísticos

Los valores de las figuras y tablas se expresaron como medias \pm errores estándar. El test ANOVA se realizó cuando el tamaño de muestra fue mayor o igual a 8 (Infostat, 2010).

Referencias:

¹ Luna M, Gomer C. 1991. Isolation and characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.* 51: 4243-4249.

RESULTADOS

RESULTADOS

6.1. Estudios *in vitro*

6.1.1. Obtención de células resistentes a la terapia fotodinámica

Con el objetivo de obtener las diferentes generaciones de SCC-13 resistentes a TFD, las células fueron incubadas con Me-ALA 1 mM durante 4 horas. Luego fueron expuestas a luz roja (635 nm \pm 17 nm) bajo dosis de irradiación variables (7-25 J/cm²). Se seleccionaron condiciones de tratamiento que ocasionaron tasas de supervivencia del 5-10%. La figura 6.1 detalla las dosis de irradiación empleadas para la obtención de las distintas generaciones de SCC resistentes.

Para obtener la 1° y 2° generación de SCC resistentes a la TFD, las células se irradiaron con una dosis de luz de 7,31 J/cm². Para la 3° y 4° se requirió una dosis de 11,33 J/cm². Para la 5°, 6° y 7° generación, la irradiación necesaria fue de 14,99 J/cm². Para obtener la 8° y 9° generación de resistentes se requirió una dosis de iluminación de 24,78 J/cm² y para la 10° generación, 25 J/cm².

Con el objetivo de medir el grado de resistencia celular luego de aplicar TFD se determinó la viabilidad celular tras el tratamiento en la población parental, la 1°, 5° y 10° generación empleando el ensayo de MTT. Todas las poblaciones celulares fueron sometidas a iguales condiciones de TFD (Me-ALA 1 mM, 4 horas de incubación, 7,31 J/cm² de irradiación), obteniéndose un 10 % de supervivencia en las células parentales y de la 1° generación, un 85 % en la 5° generación y un 95 % en la 10° generación (con diferencias estadísticamente significativas para ambas generaciones resistentes con respecto a la parental; $p < 0,01$) (Figura 6.2).

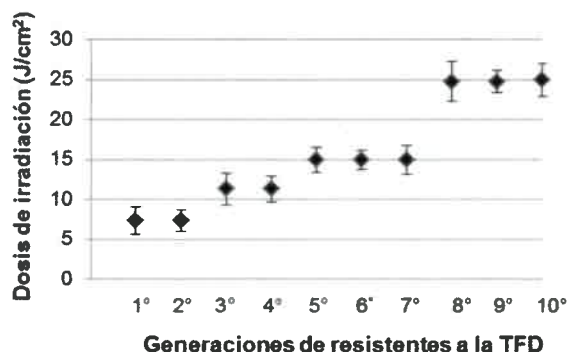


Figura 6.1. Dosis de luz en J/cm² necesarios para obtener las diferentes generaciones de SCC-13 resistentes a la TFD. Se emplearon condiciones de tratamiento que ocasionaron tasas de supervivencia del 5-10 %. El Me-ALA 1 mM fue incubado durante 4 horas y luego las células fueron sometidas a irradiación con luz roja (635 nm \pm 17 nm). Los valores representan los promedios \pm errores estándar ($n=3$).

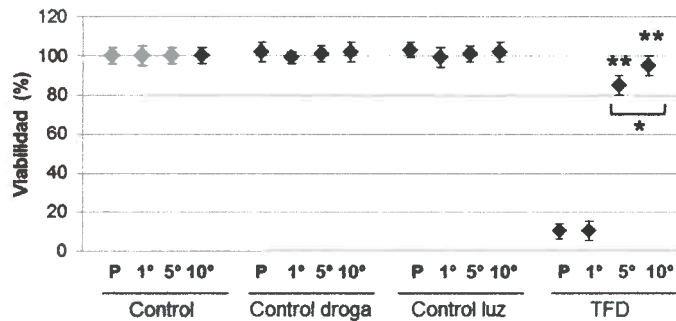


Figura 6.2. Viabilidad celular de las SCC-13 parentales, 1°, 5° y 10° generación luego de la TFD determinada por ensayo de MTT. El Me-ALA 1 mM fue incubado durante 4 horas y las células fueron irradiadas a $7,31 \text{ J/cm}^2$. Los valores representan los promedios \pm errores estándar ($n=8$). * $p < 0,05$ (5°G-TFD vs 10°G-TFD), ** $p < 0,01$ (5°G-TFD vs P-TFD; 10°G-TFD vs P-TFD).

Con el objetivo de facilitar y agilizar los diferentes experimentos realizados en esta tesis, se decidió utilizar, en la mayoría de los casos, únicamente tres poblaciones celulares, ya que el manejo de muchas poblaciones resultaría engorroso e innecesario. Se empleó la población parental, la máxima generación de resistentes obtenida (décima generación) y una generación intermedia (quinta generación). Para el análisis de los niveles de expresión de diferentes proteínas por Western Blot y del ciclo celular por citometría de flujo se incluyó además la primera generación.

6.1.2. Detección del contenido de PpIX intracelular

Ya que la cantidad de PpIX acumulada dentro de las células a partir del Me-ALA podría afectar a la fototoxicidad, se examinó si las células parentales y resistentes contenían diferentes cantidades de PpIX. La intensidad de fluorescencia de la PpIX fue medida mediante citometría de flujo en células SCC parentales, de la 5° y 10° generación luego de 1 y 4 horas de incubación con Me-ALA 1 mM.

En los controles (células sin Me-ALA) no se detectó PpIX a 1 ni a 4 horas de incubación de la droga. Luego de 1 hora de incubación del Me-ALA no se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia del fotosensibilizador entre las generaciones resistentes y las SCC parentales (figura 6.3 y tabla 6.1). Sin embargo, a las 4 horas de incubación de la droga se encontró una intensidad de fluorescencia de la PpIX menor en la 5° ($0,90 \pm 0,16$ unidades arbitrarias (U.A.)) y 10° generación ($1,18 \pm 0,27$ U.A.) con respecto a la población parental ($1,83 \pm 0,16$ U.A.). El tiempo de incubación del Me-ALA empleado para realizar la TFD para obtener las diferentes generaciones de resistentes fue de 4 horas, momento en el cual se han encontrado diferencias en la cantidad de PpIX intracelular.

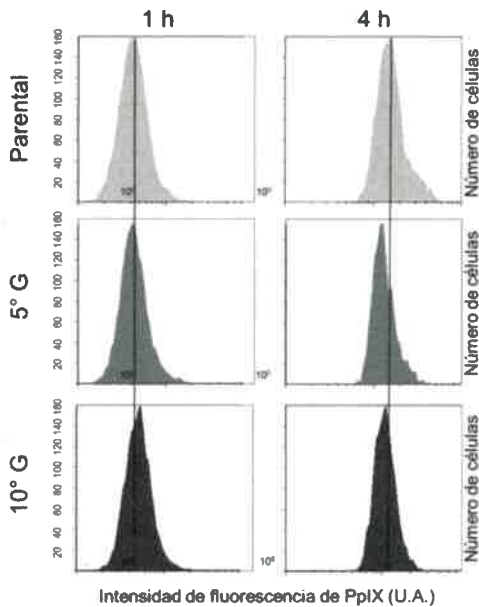


Figura 6.3. Intensidad de fluorescencia de PpIX medida por citometría de flujo (U.A.= unidades arbitrarias). Las células SCC-13 parentales, de la 5° y 10° generación de resistentes a la TFD fueron incubadas con Me-ALA 1 mM durante 1 y 4 horas. Se determinaron los valores de fluorescencia de 10.000 células de cada población, realizándose el ensayo por triplicado. G: generación. P: parental.

Tabla 6.1. Análisis de la fluorescencia de PpIX a través de citometría de flujo en células SCC-13 parentales y resistentes a la TFD.

	P	5°G	10°G
1 h	0,55 ± 0,07	0,54 ± 0,11	0,61 ± 0,04
4 h	1,83 ± 0,36	0,90 ± 0,16	1,18 ± 0,27

Intensidad de fluorescencia de PpIX (U.A.) después de 1 y 4 h de incubación de Me-ALA 1 mM. Medias ± error estándar; n=3; número de eventos: 10.000. G: generación. P: parental.

6.1.3. Localización subcelular de la PpIX

Con la finalidad de determinar la localización de la PpIX en las células SCC parentales, las de la quinta y décima generación, luego de 4 y 17 horas de incubación del Me-ALA 1 mM las diferentes poblaciones fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia. La localización subcelular del fotosensibilizador se analizó comparando la señal fluorescente emitida por la PpIX con la obtenida utilizando diferentes sondas fluorescentes de acumulación subcelular selectiva: MitoTracker Green para mitocondrias, naranja de acridina y Lisotracker Green para lisosomas y NBD C6-ceramida para Aparato de Golgi. Esta técnica no fue empleada para comparar la intensidad de fluorescencia del fotosensibilizador entre poblaciones celulares ya que la luz del microscopio produce un rápido fadeo o fotoblanqueo de la droga.

Empleando luz de excitación de 460-490 nm, las células mostraron autofluorescencia, la cual se observó en color verde, mientras que la droga se observó en color rojo (figura 6.4). A las 4 horas de incubación, la PpIX se encontró localizada en pequeña cantidad en la membrana citoplasmática en todas las poblaciones analizadas (flechas blancas). Por otra parte, en

algunas células de las tres poblaciones se encontró PpIX dentro de lisosomas y mitocondrias. A las 17 horas de incubación de la droga la distribución de PpIX fue la misma que a 4 horas, pero en mayor concentración. Se observó fluorescencia correspondiente al fotosensibilizador en la membrana plasmática (flechas blancas), en lisosomas y mitocondrias tanto en las SCC parentales como en la 5° y 10° generación de resistentes, tal como se determinó por co-localización de PpIX con Mitotracker y Lisotracker Green (figura 6.5).

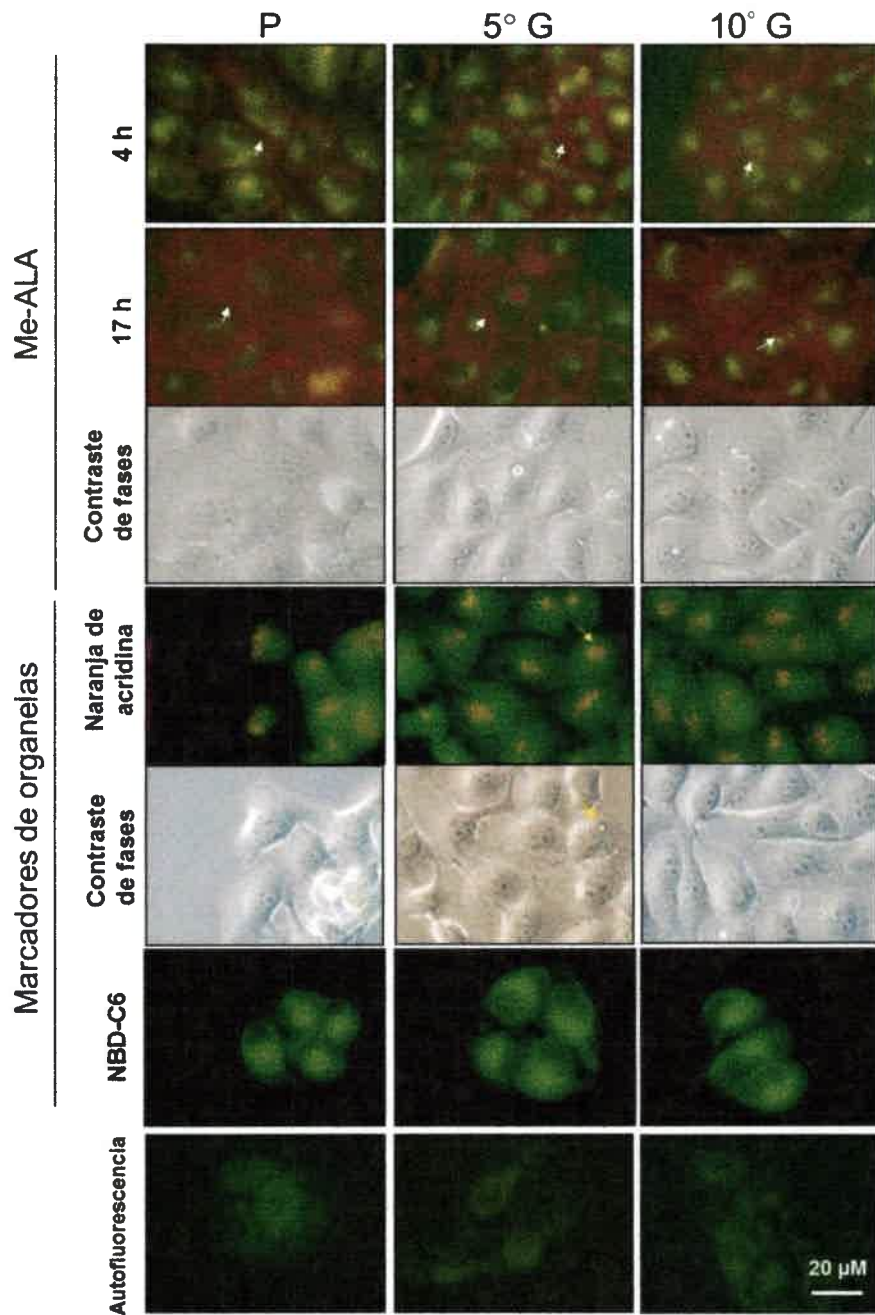


Figura 6.4. Localización celular de la PpIX (fluorescencia en rojo) después de 4 y 17 horas de incubación del Me-ALA 1 mM en las poblaciones de SCC parental, 5° y 10° generación de resistentes, bajo luz de excitación de 460-490 nm. Las flechas blancas indican localización de la droga en la membrana plasmática. Se muestra el patrón de marca de lisosomas mediante naranja de acridina y de aparato de Golgi a través del empleo de NBD C6-ceramida. La autofluorescencia de las células sin droga se observa en color verde. G: generación. P: parental. Escala: 20 μ m.

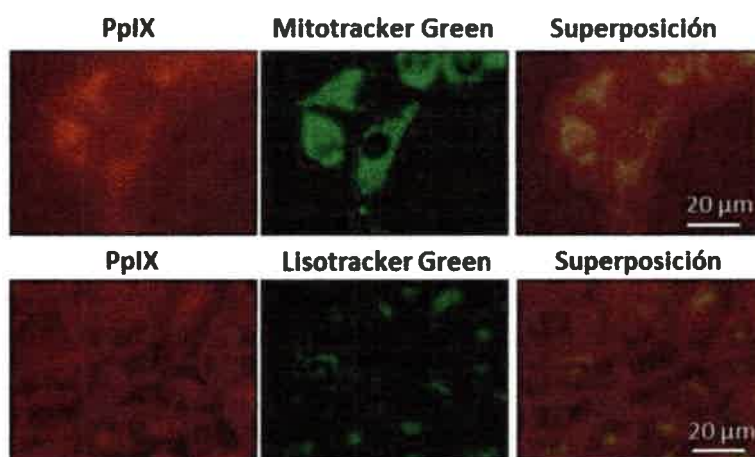


Figura 6.5. Co-localización de PpIX (en rojo) con Mitotracker (en verde) y Lisotracker (en verde) en células SCC-13 parentales. El Me-ALA a la concentración de 1mM fue incubado durante 17 horas. Se observó co-localización tanto entre PpIX y Mitotracker como entre PpIX y Lisotracker. Escala: 20 µm.

6.1.4. Evaluación de las características morfológicas

6.1.4.1. Morfología celular

Con el objetivo de analizar y comparar la morfología de las células SCC de las poblaciones parental, quinta y décima generación, adheridas sobre cubreobjetos, se empleó la técnica de tinción con azul de toluidina. Además, el análisis se completó mediante estudios de tamaño y complejidad de las células en suspensión de las poblaciones parental, quinta y décima generación, a través de citometría de flujo.

Las células adheridas de todas las poblaciones presentaron morfologías diversas, desde poliédricas hasta fibroblásticas con largas prolongaciones. Sin embargo, las células de la 5° y 10° generación de SCC resistentes mostraron una mayor proporción de formas fibroblásticas (indicadas por flechas, figura 6.6 A y C) y formaron colonias más expansivas (figura 6.6 B) con respecto a las parentales. Comparando entre la 5° generación y la 10°, se encontraron más prolongaciones fibroblásticas en la 5° generación. Esto indicaría que cuando se aplicaron hasta 5 ciclos de TFD, las formas con largas prolongaciones citoplasmáticas, en conjunto con ciertas proteínas de supervivencia y la capacidad de acumular menos PpIX, fueron favorecidas, pero con más ciclos del tratamiento no únicamente las formas fibroblásticas fueron seleccionadas, sino también células que presentaron otras proteínas de supervivencia y no tenían la forma con largas proyecciones celulares. Las SCC parentales formaron colonias más cerradas y presentaron mayor proporción de células poliédricas que las de la 5° y 10° generación.

Esas diferencias morfológicas nos llevaron a pensar que las células resistentes podrían tener distinta adhesividad y por lo tanto diferente expresión de proteínas de adhesión, con respecto a las células SCC-13 parentales.

Cuando se analizó el tamaño de las células en suspensión, no se encontraron diferencias entre las poblaciones parentales y resistentes (figura 6.7), lo que indicaría que este parámetro no estaría influyendo en la resistencia de las células a la TFD.

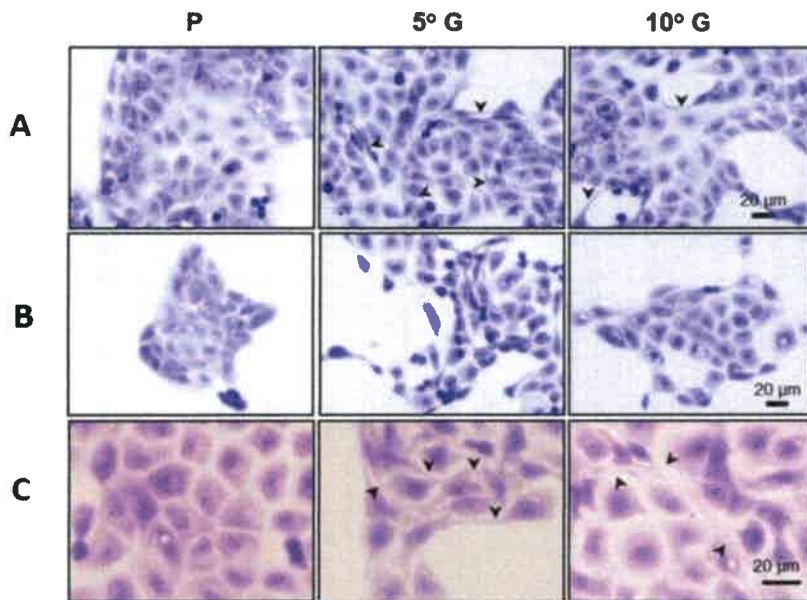


Figura 6.6. Análisis de la morfología celular mediante tinción con azul de toluidina en las células SCC parentales y de la 5° y 10° generación de resistentes. A) Poblaciones celulares observadas con aumento del objetivo de 20 X. B) Colonias celulares observadas con aumento del objetivo de 20 X. C) Poblaciones celulares observadas con aumento del objetivo de 40 X. Las flechas indican prolongaciones fibroblásticas. G: generación. P: parental. Escala 20 µm.

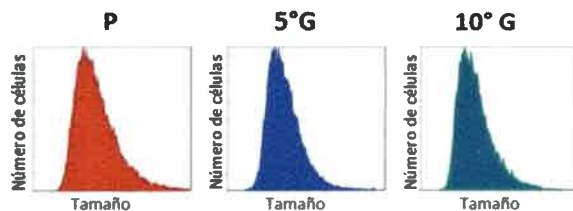


Figura 6.7. Tamaño celular determinado a través de citometría de flujo en células SCC parentales y de la 5° y 10° generación de resistentes a la TFD. G: generación. P: parental.

6.1.4.2. Morfología nuclear

Para realizar el análisis de morfología nuclear de las células SCC parentales, de la quinta y décima generación, se empleó la técnica de tinción nuclear mediante Hóecht (H-33258).

En las tres poblaciones de SCC estudiadas se encontró un marcado pleomorfismo nuclear, con formas redondeadas, ovaladas y arriñonadas (figura 6.8 A). Algunos núcleos presentaron una perforación en el centro, tomando forma de "rosquilla" (figura 6.8 B). También se observaron con regularidad puentes nucleares conectores, en forma de hilos, entre dos núcleos correspondientes a dos células que se han dividido (figura 6.8 C). En general, se encontraron divisiones celulares normales en las tres poblaciones estudiadas. Sin embargo, también se presentaron células en anafase o telofase anormales, donde puede verse claramente material cromosómico que no migra hacia ningún polo, quedando en medio de los dos polos de migración, principalmente en la 5° y 10° generación (figura 6.8 D). Además, se encontró un

incremento en el número de micronúcleos en la 5° ($6,00 \pm 1,30 \%$) y 10° generación ($12,00 \pm 2,80 \%$) con respecto a las células parentales ($3,00 \pm 1,30 \%$) (figura 6.8 A, flechas). Los micronúcleos corresponden a segmentos cromosómicos que no fueron incorporados en el núcleo durante la anafase. Además, en la quinta y décima generación de SCC resistentes se encontraron esporádicamente aberraciones mitóticas, con núcleos tripolares en división, lo cual no se observó en las SCC parentales (figura 6.8 E).

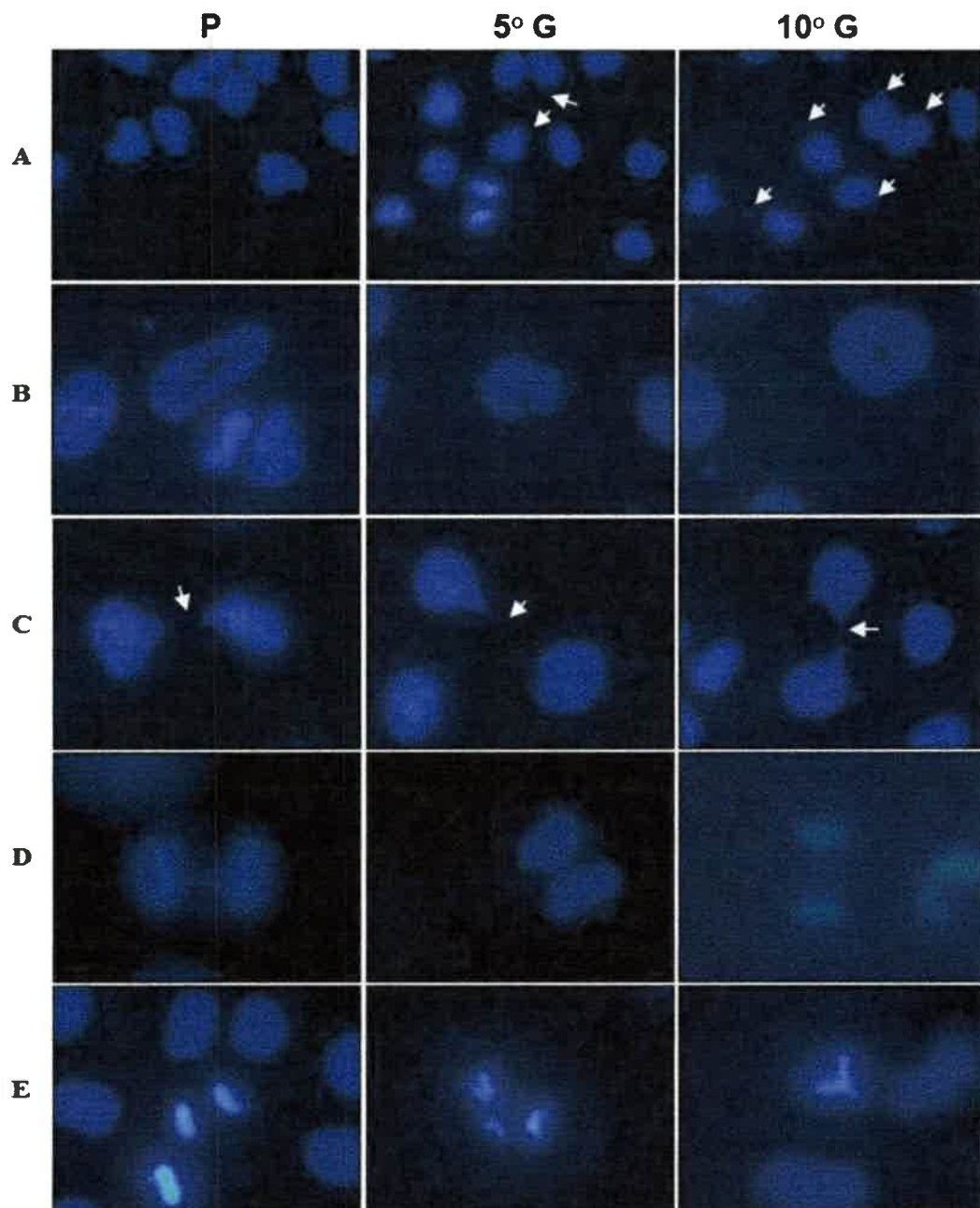
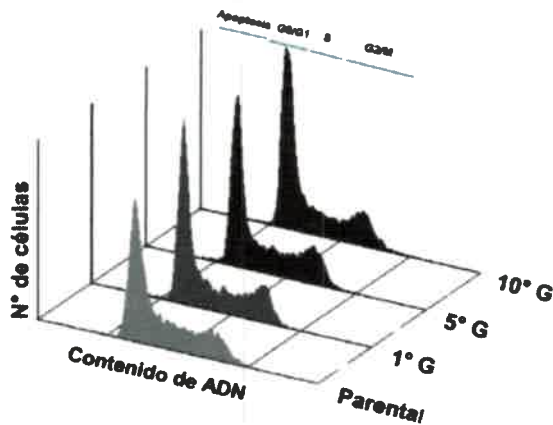


Figura 6.8. Morfología nuclear de las poblaciones de SCC-13 parental, quinta y décima generación de resistentes observada mediante tinción con Hœchst bajo microscopio de fluorescencia con luz de excitación de 365 nm. A) Morfología nuclear general. Las flechas indican micronúcleos (60 X). B) Núcleos "perforados" (120 X). C) Puentes nucleares (indicados por flechas) (120 X). D) Núcleos en telofase (120 X). E) División celular normal (SCC parental) y tripolares (quinta y décima generación) (120 X). G: generación. P: parental.

6.1.5. Análisis del contenido de ADN celular

Con la finalidad de conocer si las células resistentes a la TFD poseen diferente capacidad de división celular y distinto porcentaje de muerte, con respecto a las células parentales, se analizó el contenido de ADN de las poblaciones SCC parental, 1°, 5° y 10° generación mediante citometría de flujo empleando yoduro de propidio. Las células presentaban un 70 % de confluencia.

No se encontraron diferencias en el ciclo celular entre las cuatro poblaciones estudiadas. La figura 6.9 muestra los valores, en porcentajes, de células que se encontraron en las diferentes etapas del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) y de células apoptóticas.



	Muerte celular		Ciclo celular	
	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
SCC parental	1 %	55,7 %	25,5 %	17,4 %
SCC 1° G	1,8 %	56 %	25,3 %	16,9 %
SCC 5°G	1,5 %	51,3 %	28,2 %	19,3 %
SCC 10°G	1,1	59,4 %	21 %	18,4 %

Figura 6.9. Análisis del contenido de ADN celular. El contenido de ADN fue determinado mediante citometría de flujo empleando yoduro de propidio en las SCC-13 parentales, de la 1°, 5° y 10° G de resistentes a la TFD (10.000 células por población). En la tabla se detallan los valores en porcentajes de células que se encontraron en las diferentes etapas del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) y de células apoptóticas.

6.1.6. Ensayo clonogénico

Con el objetivo de profundizar el análisis de la proliferación de las células resistentes se realizó un ensayo clonogénico de las células parentales, de la 5° y 10° generación. No se encontraron diferencias en la eficiencia de plaqueo entre las poblaciones resistentes ($87,66 \pm 4,50$ % en la 5° generación, $87,33 \pm 3,00$ % en la 10° generación) y entre estas y las células parentales ($86,33 \pm 3,20$ %) (tabla 6.2). Además, la 10° generación presentó una mayor proporción de colonias con más de 50 células ($95 \pm 2,00$ %) comparando con las parentales ($88,20 \pm 3,00$ %) y la 5° generación ($90,30 \pm 4,30$ %).

Tabla 6.2. Eficiencia de plaqueo y formación de colonias en células SCC-13 parentales, de la 5° y 10° generación de resistentes a la TFD.

	P	5° G	10° G
Eficiencia de plaqueo	86,33±3,20 %	87,66 ±4,50 %	87,33 ±3,00 %
Formación de colonias con más de 50 células	88,20 ± 3,00 %	90,30± 4,30 %	95,00± 2,00 %

6.1.7. Capacidad de migración y proliferación celular

Con el objetivo de estudiar la capacidad de migración y/o proliferación de las células resistentes de la 5° y 10° generación en relación a las parentales se realizó un ensayo de cierre de heridas.

A las 4 y 8 horas luego de realizadas las heridas, ninguna de las tres poblaciones estudiadas mostraron proliferación ni migración. A las 12 horas luego de la apertura de las heridas, las células resistentes mostraron mayor capacidad de cierre de las mismas comparando con las células SCC parentales (6.10 A y B). Más aún, en la 10° generación se observaron heridas más angostas que en la 5° ($p < 0,05$; 5° G vs parentales; $p < 0,01$; 10° G vs parentales). A las 24 horas las heridas de las dos poblaciones resistentes se cerraron completamente, mientras que las de las parentales aún se encontraban con algunos espacios abiertos ($p < 0,05$; 5° G vs parentales y 10° G vs parentales).

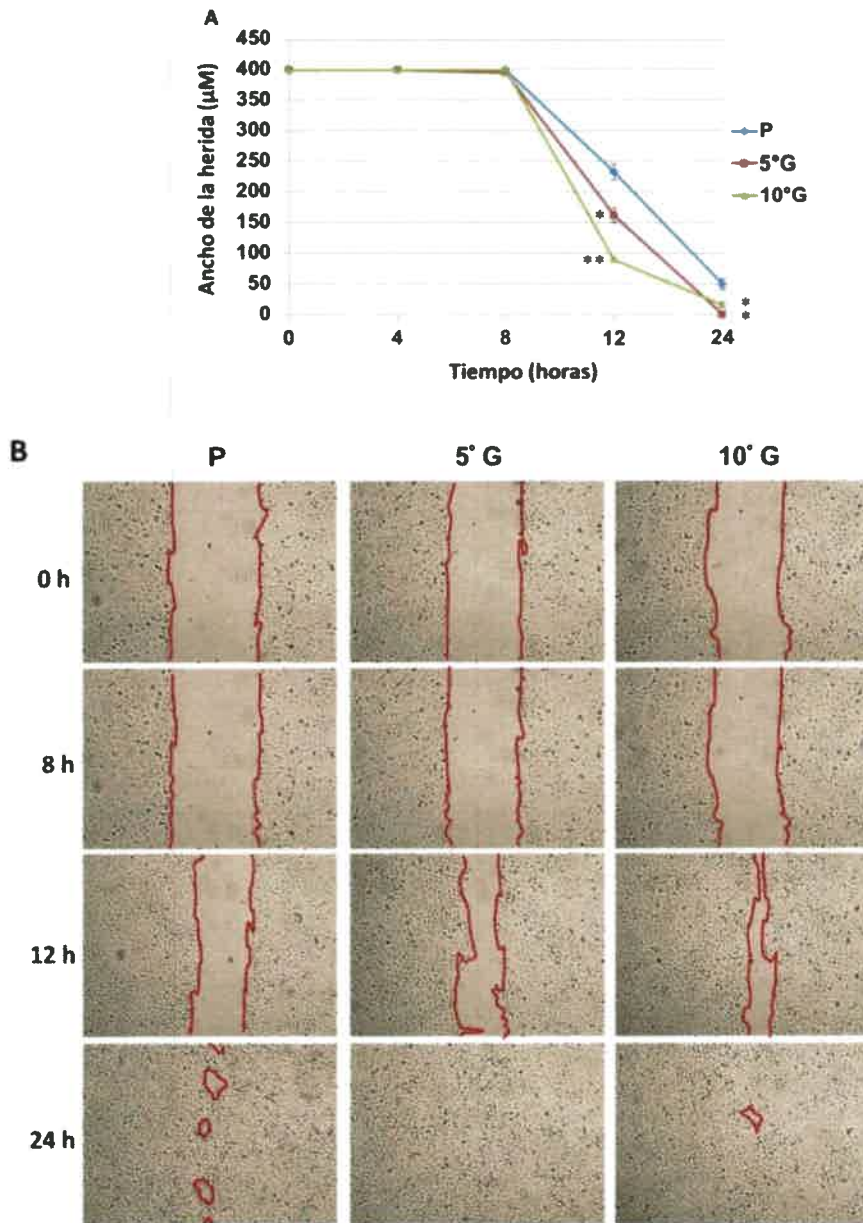


Figura 6.10. Capacidad de cierre de heridas. A) El ancho de las heridas fue medido en células SCC parentales, de la 5° y 10° generación de resistentes a 4, 8, 12 y 14 horas luego de que las heridas fueron realizadas. Los valores representan los promedios \pm errores estándar; $n=8$. * $p < 0,05$ (5° G-12 h vs P-12 h; 5° G-24 h vs P-24 h; 10° G-24 h vs P-24 h). ** $p < 0,01$ (10° G 12 h vs P 12 h). B) Fotografías de las heridas en SCC parental, 5° y 10° generación a las 0, 8, 12 y 14 horas después de la apertura de las mismas. Las líneas rojas delimitan los bordes de las heridas. G: generación. P: parental.

6.1.8. Estudios de la expresión y distribución de proteínas

6.1.8.1. Proteínas de adhesión célula-célula

La expresión de proteínas de adhesión célula-célula que constituyen las uniones adherentes fue analizada a través de inmunofluorescencia indirecta y Western blot. No se encontraron diferencias en los patrones y niveles de expresión de E-cadherina ni β -catenina entre células resistentes y parentales (figura 6.11 A y B). Se encontró una fuerte marca de E-cadherina y β -catenina en la membrana plasmática, la cual permitió distinguir claramente bordes celulares con pequeñas y abundantes proyecciones en forma de zig-zag en las zonas de unión entre células. También se observaron ambas proteínas en pequeños agregados en el citoplasma en las tres poblaciones de SCC estudiadas. E-cadherina también se localizó en el núcleo.

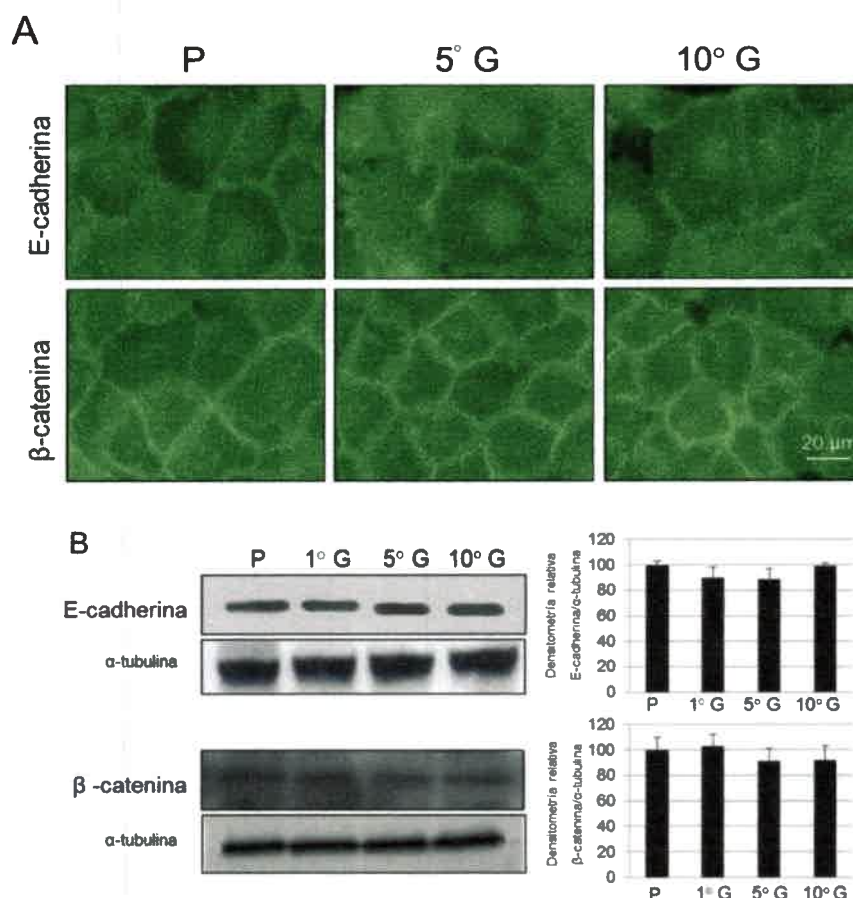


Figura 6.11. Patrones de distribución y niveles de expresión de proteínas de adhesión célula-célula. A) Inmunofluorescencia indirecta de E-cadherina y β -catenina en células SCC-13 parentales, de la 5° y 10° generación de resistentes. Escala: 20 μ m. B) Western blot de E-cadherina y β -catenina en SCC-13 parental, 1°, 5° y 10° generación. α -tubulina fue empleada como control de carga de proteínas. Los valores representan la media \pm errores estándar. n = 3. G: generación. P: parental.

6.1.8.2. Proteínas de adhesión célula-sustrato

Se analizaron los niveles de expresión de β 1-integrina, vinculina, FAK y fosfo-FAK por la técnica de Western blot y se estudiaron los patrones de expresión de vinculina y fosfo-FAK mediante inmunofluorescencia indirecta. En las células resistentes vinculina y fosfo-FAK mostraron una distribución en el centro y en los bordes de las células, mientras que en las células parentales la distribución fue principalmente en los bordes (figura 6.12 A). Las células resistentes de la 5° y 10° generación tuvieron mayor expresión de β 1-integrina, vinculina y fosfo-FAK con respecto a las parentales, mientras que los niveles de FAK total no mostraron diferencias entre resistentes y parentales (figura 6.12 B). La adhesión focal es un punto crítico para la regulación de la organización de la actina. Así, en las generaciones resistentes se observaron conspicuas fibras de estrés, comparando con las parentales, y en el final de dichas fibras se encontró localizada vinculina (figura 6.13).

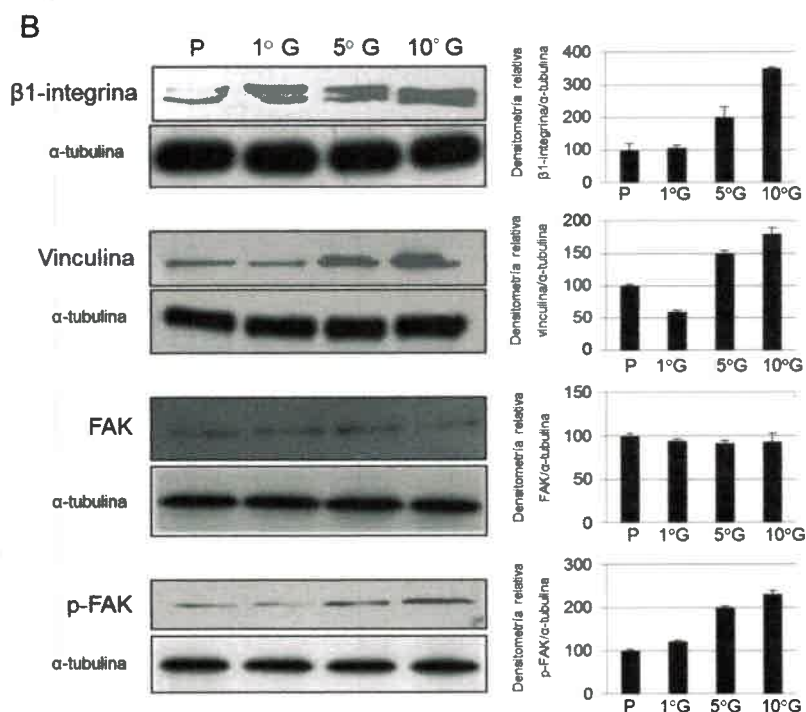
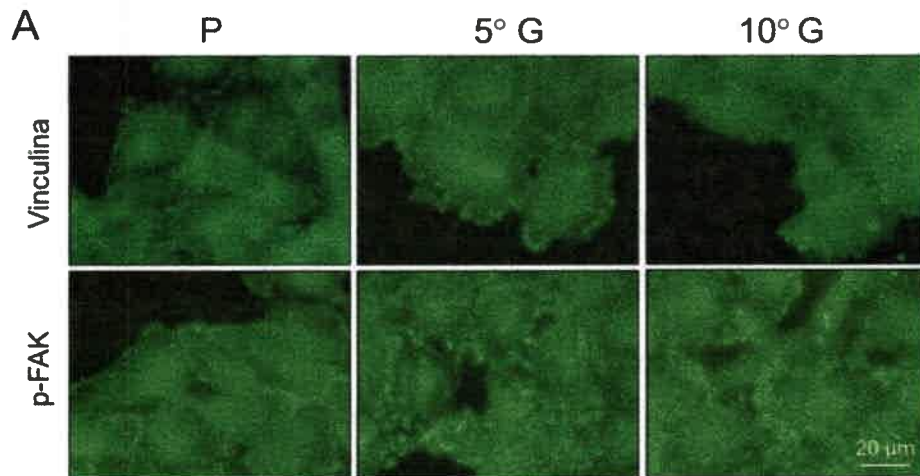


Figura 6.12. Patrones de distribución y niveles de expresión de proteínas de adhesión célula-sustrato. A) Inmunofluorescencia indirecta de vinculina y fosfo-FAK en células SCC-13 parentales, de la 5° y 10° generación de resistentes. Escala: 20 µm. B) Western blot de β1-integrina, vinculina, FAK total y fosfo-FAK en SCC-13 parental, 1°, 5° y 10° generación. α-tubulina fue empleada como control de carga de proteínas. Los valores representan la media ± errores estándar. n = 3. G: generación. P: parental.

6.1.8.3. Proteínas del citoesqueleto

6.1.8.3.1. F-actina

Los microfilamentos de actina se marcaron mediante faloidina acoplada a rodamina y las muestras fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia. En la 5° y 10° generación se

observaron muchas células con fibras de estrés en mayor cantidad que en las parentales (figura 6.13). Estas fibras tomaron una disposición a través de todo o casi todo el citoplasma celular en la 10° generación y fueron más cortas en la 5° generación. Además, en la 5° generación se encontraron muchas fibras corticales de F-actina, es decir en la región de los bordes celulares. En la población de SCC parentales se observaron algunas fibras corticales y algunas fibras de estrés. En el final de las fibras de F-actina se encontró localizada vinculina en las tres poblaciones celulares, demostrándose así la polimerización de la actina en las zonas de contactos focales.

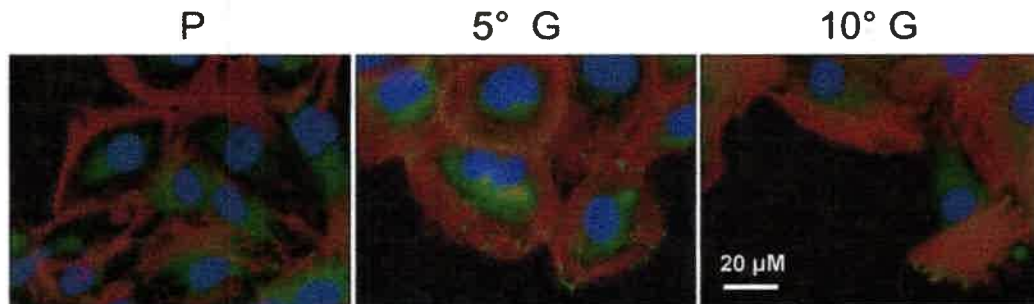


Figura 6.13. Patrón de expresión de F-actina y vinculina en células SCC parentales, de la 5° y 10° generación. Las células fueron teñidas con faloidina acomplejada a rodamina para el marcaje de F-actina (en rojo), fueron marcadas por inmunofluorescencia para la observación de vinculina (en verde) y teñidas con Høechst para la marcación nuclear (en azul). G: generación. P: parental. Escala: 20 μ m.

6.1.8.3.2. α -tubulina

La proteína del citoesqueleto α -tubulina formó largos filamentos y constituyó densos entramados en las células de las poblaciones estudiadas (figura 6.14). En la 5° y 10° generación de SCC resistentes se encontró un mayor número de células con extensas proyecciones citoplasmáticas (formas fibroblásticas) acompañadas de largos filamentos de α -tubulina dispuestos paralelamente, con relación a las células parentales. En la población parental se encontró una gran cantidad de células redondeadas con una densa red de α -tubulina y algunas células con proyecciones citoplasmáticas. Así, el marcaje de α -tubulina reforzó el análisis de morfología celular por tinción con azul de toluidina, ya que en ambos experimentos se evidenció una mayor proporción de células fibroblásticas en las poblaciones resistentes.

Por otro lado, el marcaje de esta proteína y de centrómeros, permitió cuantificar el porcentaje de células en división, ya que α -tubulina constituye los microtúbulos del huso mitótico. El porcentaje de división (cuantificado de un total de 500 células) fue el mismo para las SCC parentales como para las SCC de la 5° y 10° generación (aproximadamente un 5 %), cuando las poblaciones celulares alcanzaron un 90 % de confluencia.

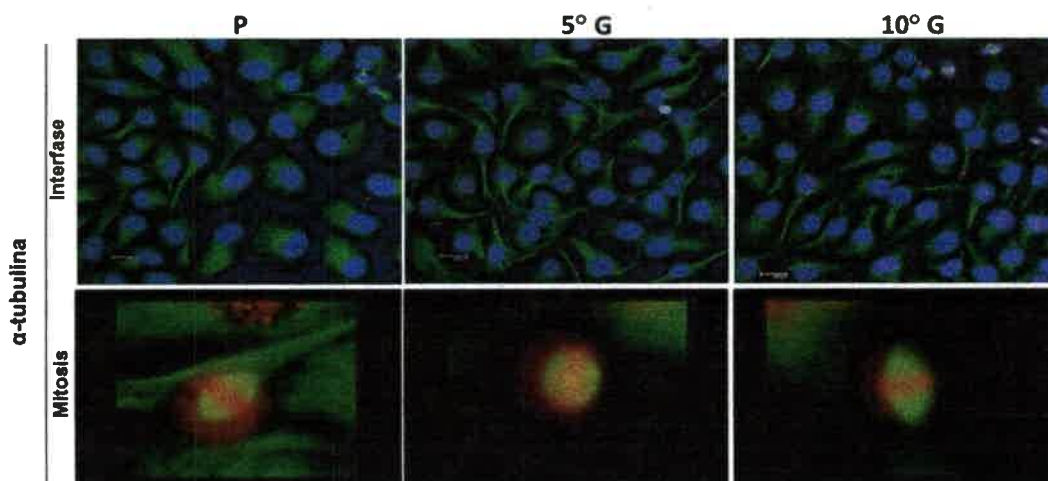


Figura 6.14. Patrón de distribución de α -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta en células SCC-13 parentales, de la 5^ª y 10^ª generación de resistentes. Se muestran células en interfase (microscopía confocal) y en mitosis. G: generación. P: parental. Escala: 20 μ m.

6.1.8.4. Proteína inhibidora de apoptosis: survivina

Con el objetivo de profundizar el análisis de los mecanismos de resistencia de las células SCC-13 a la TFD, se analizó la expresión de un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), survivina a través de inmunofluorescencia indirecta y Western blot. Tanto survivina total como fosfo-survivina se encontraron en núcleo y citoplasma en todas las poblaciones estudiadas (figura 6.15 A). A través de Western Blot, no se encontraron diferencias entre las células resistentes y parentales en los niveles totales de survivina. Sin embargo, las células resistentes tuvieron niveles de survivina activa (fosfo-survivina) marcadamente incrementados con respecto a las parentales y esos niveles fueron mayores a medida que aumentó la resistencia (figura 6.15 B).

En nuestro estudio, encontramos localizada en los cuerpos medios de células en citocinesis y entre dos células que ya han completado totalmente la mitosis, pero quedan contactadas mediante proyecciones citoplasmáticas (y los cuerpos medios aún no desaparecen), tanto en SCC parentales como en resistentes (figura 6.16).

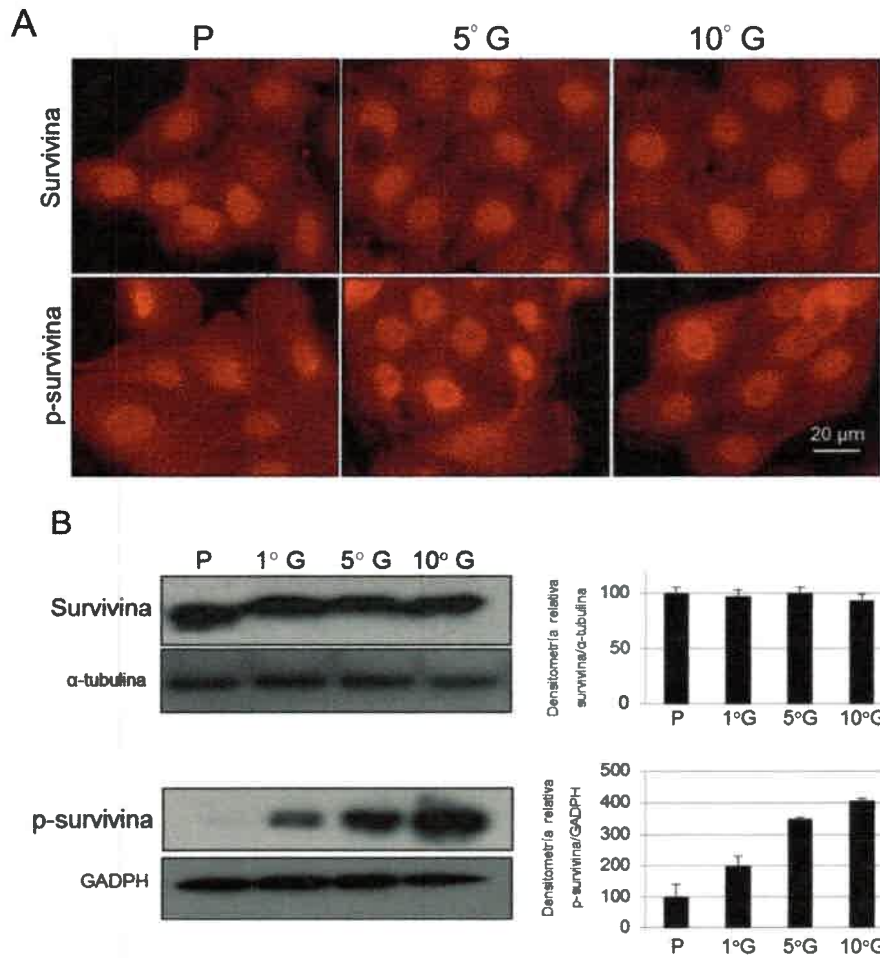


Figura 6.15. Patrones de distribución y niveles de expresión de la IAP survivina. A) Inmunofluorescencia indirecta de survivina total y fosfo-survivina en células SCC-13 parentales, de la 5° y 10° generación de resistentes. Escala: 20 μ m. B) Western blot de survivina total y fosfo-survivina en SCC-13 parental, 1°, 5° y 10° generación. GADPH fue empleada como control de carga de proteínas. Los valores representan la media \pm errores estándar. n = 2. G: generación. P: parental. Escala: 20 μ m.

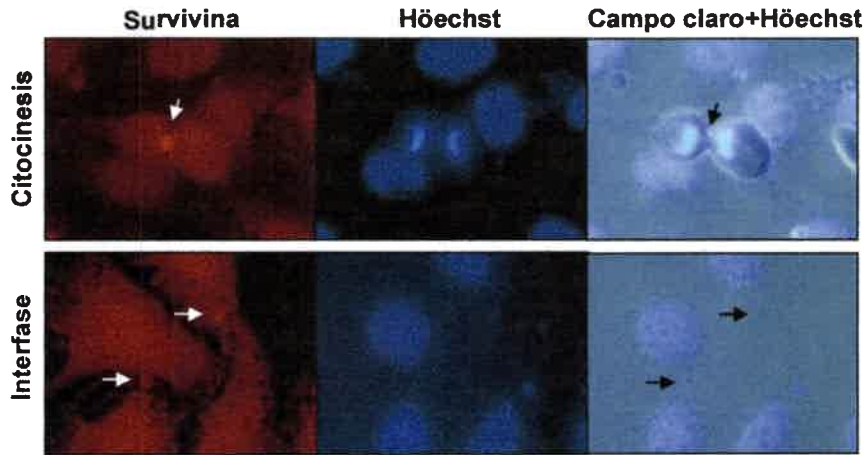


Figura 6.16. Expresión de survivina por inmunofluorescencia indirecta en células SCC-13 parentales. Las flechas blancas indican la localización de survivina en los cuerpos medios (flechas negras) en células en citocinesis y en células en interfase.

6.1.8.5. Proteínas del shock térmico

La expresión de las proteínas HSP60, HSP70 y HSP90 fue estudiada mediante Western blot. Los niveles de expresión de esta tres se encontraron aumentados en las células resistentes en relación a las parentales. Los niveles de HSP70 fueron tres veces mayores en las células de la 1°, 5° y 10° generación comparando con las parentales. Las HSPs 60 y 90 mostraron un incremento gradual a medida que aumentó el grado de resistencia (figura 6.17).

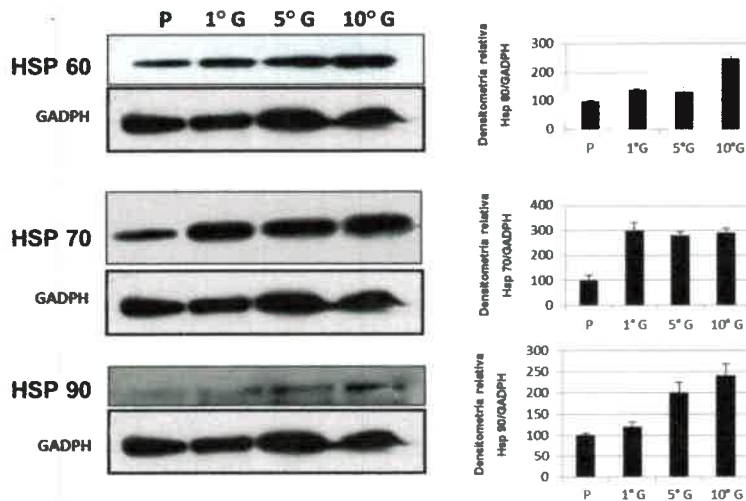


Figura 6.17. Niveles de expresión de HSP 60, HSP 70 y HSP 90, en SCC-13 parental, 1°, 5° y 10° generación determinados por Western blot. GADPH fue empleada como control de carga de proteínas. Los valores representan la media \pm errores estándar. $n = 2$. G: generación. P: parental.

6.1.9. Adhesión a sustratos de la matriz extracelular

Se estudió la adhesión de las células SCC parentales, de la 5° y 10° generación sobre diferentes proteínas de la matriz extracelular. No se observaron diferencias en el porcentaje de adhesión entre las poblaciones analizadas cuando éstas fueron sembradas directamente sobre las placas de plástico (controles). Las células resistentes mostraron mayor adhesión en relación a las parentales sobre todos los sustratos analizados, los cuales son componentes de la matriz extracelular y ligandos de unión de las integrinas (figura 6.18). Además, en la 10° generación se observó mayor adhesión que en la 5° generación cuando las células fueron sembradas sobre fibronectina, tanto a la concentración de 1 como de 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Sobre colágeno y laminina no se encontraron diferencias en el porcentaje de adhesión entre 5° y 10° generación tanto a la concentración de 10 como de 20 $\mu\text{g/ml}$ de ambas proteínas de la matriz.

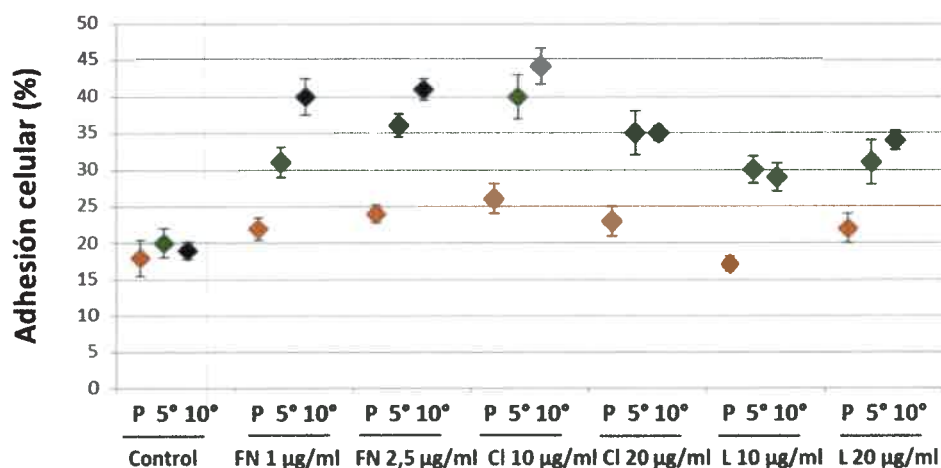


Figura 6.18. Adhesión de células SCC parentales, de la 5° y 10° generación de resistentes a la TFD sembradas directamente sobre placas de plástico (controles), sobre fibronectina (FN), Colágeno I (CI) y Laminina (L). Los valores representan las medias \pm errores estándar ($n=3$).

6.1.10. Inhibición de β 1-integrinas

Con el objetivo de conocer la importancia de las β 1-integrinas en la resistencia de las células SCC a la TFD empleando Me-ALA, se inhibió la acción de las mismas mediante el empleo de un anticuerpo y se midió la viabilidad celular luego del tratamiento fotodinámico. Para este análisis se incluyeron células SCC parentales y resistentes de la 10° generación. Todos los experimentos se realizaron con las tres poblaciones cultivadas en medio DMEM con 10 % de suero y sin suero para conocer el efecto de la administración del suero al medio de cultivo y su posible interacción con la vía de las integrinas en la supervivencia celular.

Las dos poblaciones celulares mostraron una reducción de la viabilidad al inhibir las β 1-integrinas (controles de anticuerpo con suero) (figura 6.19 A). Este efecto fue mayor en las SCC parentales que en la 10° generación de resistentes.

El bloqueo de las β 1-integrinas también tuvo un efecto de reducción de la viabilidad celular luego de aplicar la TFD, tanto a 3,10 como a 5,57 J/cm^2 de irradiación, comparando con las poblaciones celulares tratadas con TFD sin anticuerpo. Las dos poblaciones celulares analizadas cultivadas sin suero (con o sin anticuerpo anti β 1-integrinas), se

encontraron suspendidas en el medio de cultivo y no se adherieron a la placa desde el momento en que se sembraron hasta que finalizó el experimento (figura 6.19 B), por lo que no fue posible comparar su viabilidad por la técnica de MTT con los demás grupos experimentales, según el protocolo empleado. Las células SCC parentales y resistentes sembradas sin suero mostraron una morfología con una gran "vacuola" que ocupó todo el espacio celular (figura 6.19 B, flechas). Algunas células de la 10° generación se encontraron agrupadas (figura 6.19 B, cabezas de flechas), como un indicio de haberse dividido o agregado en ausencia de suero.

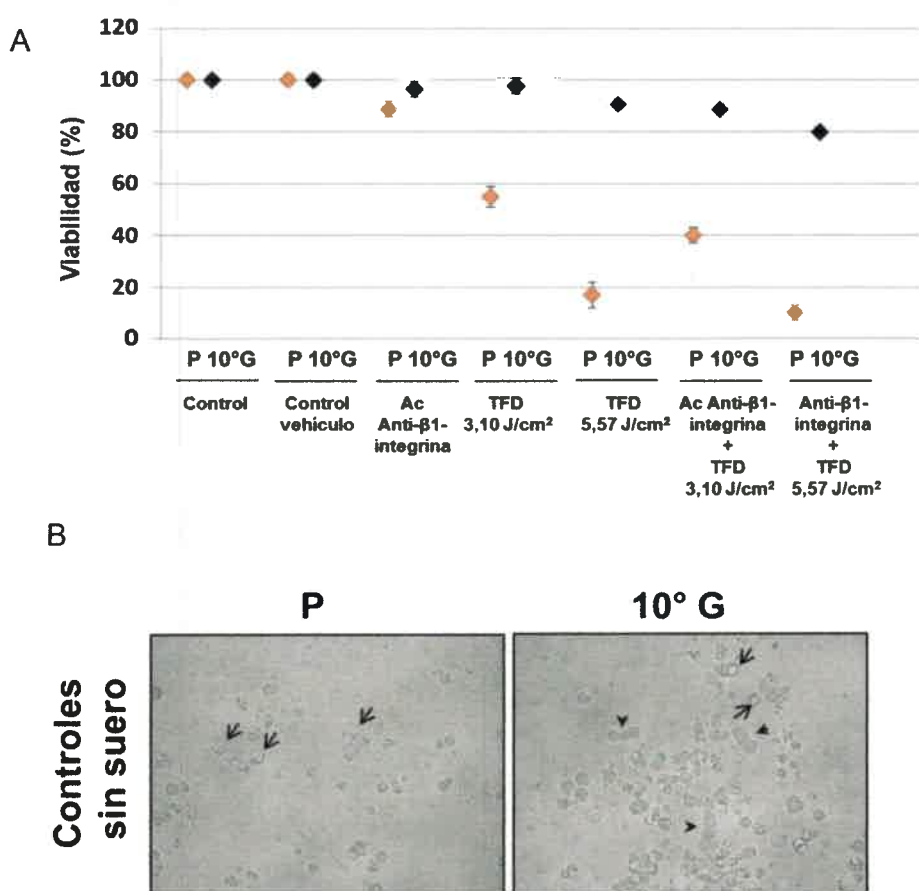


Figura 6.19. Efecto de la inhibición de las β 1-integrinas sobre la viabilidad de células SCC parentales (P) y 10° generación de resistentes (10° G) luego de aplicar TFD. A) Porcentajes de viabilidad celular determinados por MTT en SCC parentales y 10° generación incubadas con DMEM con 10 % de suero, en células controles, controles del vehículo del anticuerpo, células con anticuerpo anti- β 1-integrinas (10 μ g/ml), células tratadas con TFD con Me-ALA 1 mM a 3,10 y 5,57 J/cm² sin anticuerpo y con anticuerpo. Los valores representan las medias \pm errores estándar (n=3). B) Fotografías en campo claro de células SCC parentales y 10° generación incubadas con DMEM sin suero. Las flechas indican "vacuolas" y las cabezas de flechas indican células agrupadas.

6.1.11. Resistencia cruzada a doxorrubicina

Con el objetivo de optimizar los resultados obtenidos con el tratamiento fotodinámico, se midió la viabilidad de las células SCC resistentes a la TFD luego del tratamiento con la droga quimioterapéutica doxorrubicina. Las células resistentes a la TFD de la 5° y 10° generación mostraron una viabilidad reducida luego de incubarlas por 24 horas con doxorrubicina a las concentraciones de 0,30 y 0,60 µg/ml, comparando con las células parentales (figura 6.20). Células de cáncer de colon SW-480 y Caco-2, y queratinocitos de la línea HaCaT tuvieron mayor viabilidad que las tres poblaciones de SCC-13 analizadas. La viabilidad de las SCC parentales empleando la concentración de doxorrubicina de 0,30 µg/ml fue del 63 %, la de la 5° generación fue del 57 % y la de las 10° generación del 55,66 %. Cuando se utilizó la concentración de 0,60 µg/ml de doxorrubicina la viabilidad de las células resistentes disminuyó aún más en relación a las parentales, con valores del 40 % para la 5° generación y del 30,87 % para la 10° generación, en contraste con un 46,26 % para la población parental.

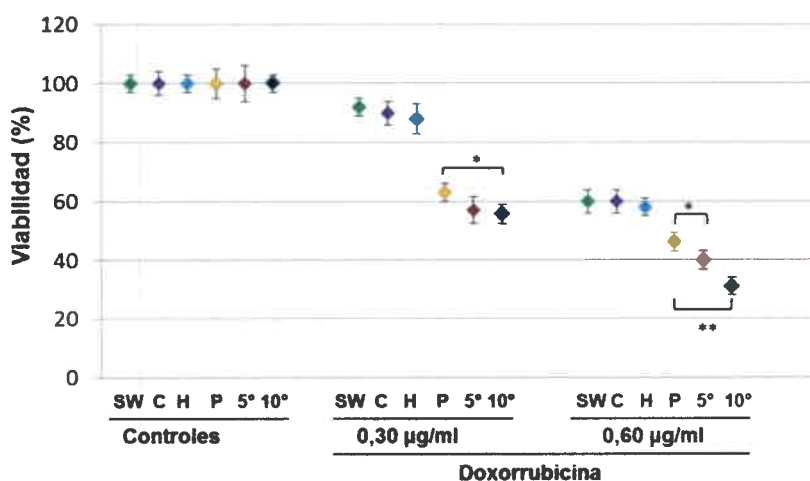


Figura 6.20. Viabilidad de las células SW-480 (SW), CaCo-2 (C), HaCaT (H) y SCC-13 parentales (P), 5° y 10° generación luego de la incubación con doxorrubicina a las concentraciones de 0,30 y 0,60 µg/ml. Los valores representan los promedios ± errores estándar (n=7). * $p < 0,05$ (10°G-doxorrubicina 0,30 µg/ml vs P-doxorrubicina 0,30 µg/ml y 5°G-doxorrubicina 0,60 µg/ml vs P-doxorrubicina 0,60 µg/ml), ** $p < 0,01$ (10°G-doxorrubicina 0,60 µg/ml vs P-doxorrubicina 0,60 µg/ml).

6.1.11.1. Localización subcelular de doxorrubicina

Con el objetivo de conocer si las diferencias de la viabilidad celular entre las células HaCaT, SCC-13 parentales y resistentes luego del empleo de la droga quimioterapéutica doxorrubicina, se deben a diferencias en la localización celular de la misma, se realizó un análisis por microscopía de fluorescencia. Se analizó la co-localización de la droga con Lisotracker Green y con Hoechst luego de 3, 5, 18 y 24 horas de incubación de la misma. No se encontraron diferencias en la localización subcelular del quimioterápico en ninguno de los tiempos analizados. A tiempos cortos de incubación (tanto a las 3 como a las 5 horas), la doxorrubicina se localizó principalmente en lisosomas, tanto en las células HaCaT, como en SCC parentales y resistentes de la décima generación (figura 6.21 A). A

tiempos largos de incubación (18 y 24 horas) la droga se localizó en lisosomas y en núcleo en las tres poblaciones estudiadas (figura 6.21 B).

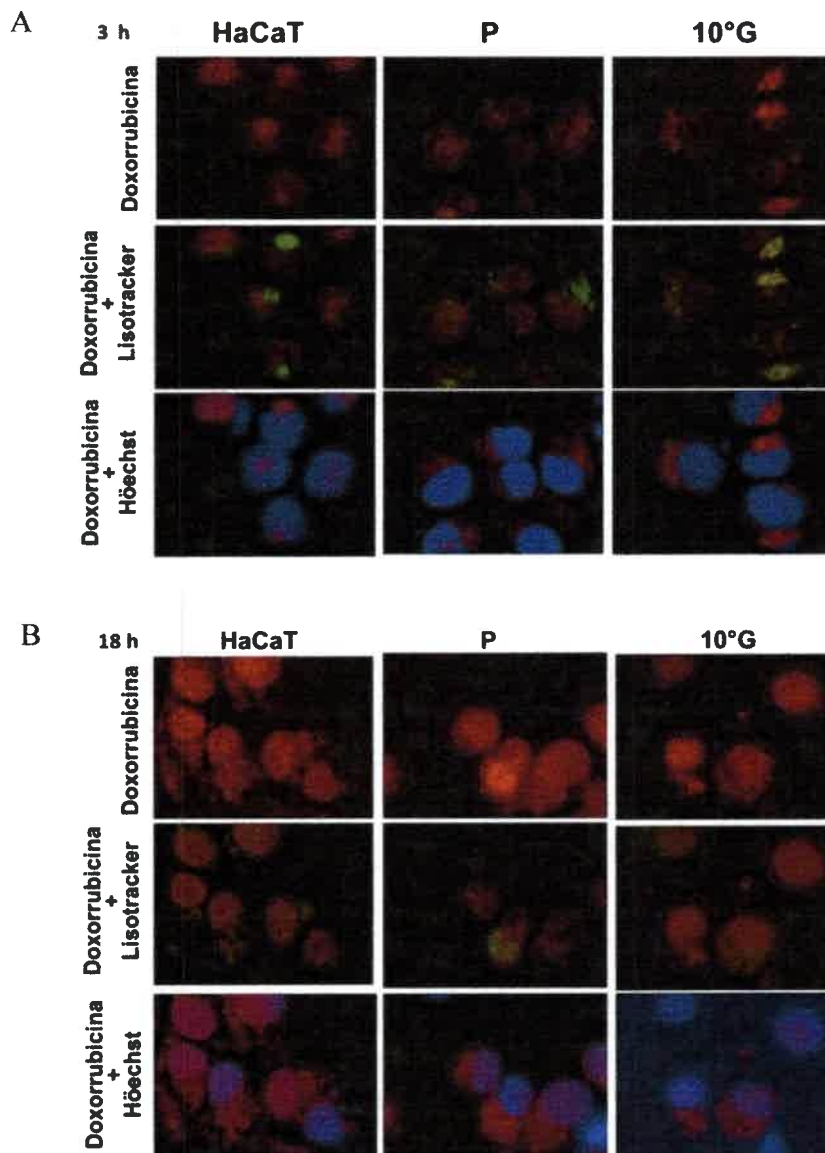


Figura 6.21. Localización subcelular de doxorubicina por microscopía de fluorescencia en células HaCaT, SCC-13 parentales y resistentes a la TFD de la 10° generación. Se analizó la co-localización de la droga con Lisotracker Green y con Hoechst luego de 3, 5, 18 y 24 horas de incubación de la misma. A) Localización de doxorubicina luego de 3 horas de incubación. B) Localización de doxorubicina luego de 18 horas de incubación.

6.1.11.2. Expresión de la proteína de resistencia a múltiples drogas Pgp

Con el propósito de conocer si las diferencias en la viabilidad celular luego de aplicar el tratamiento con doxorubicina, en células HaCaT y SCC-13 parentales y resistentes a la TFD de la 10° generación, se deben a una expresión diferencial de la proteína de resistencia a múltiples drogas Pgp, se analizó la expresión de esta mediante inmunofluorescencia indirecta. Se emplearon como controles positivos a las líneas de cáncer de colon humano SW-480 y CaCo-2. No se observó expresión de Pgp tanto en las células SCC parentales como resistentes. Las líneas de queratinocitos HaCaT, al igual que los controles positivos de las líneas de cáncer de colon expresaron Pgp en la membrana celular (y en núcleo en el caso de HaCaT y SW-480) (figura 6.22).

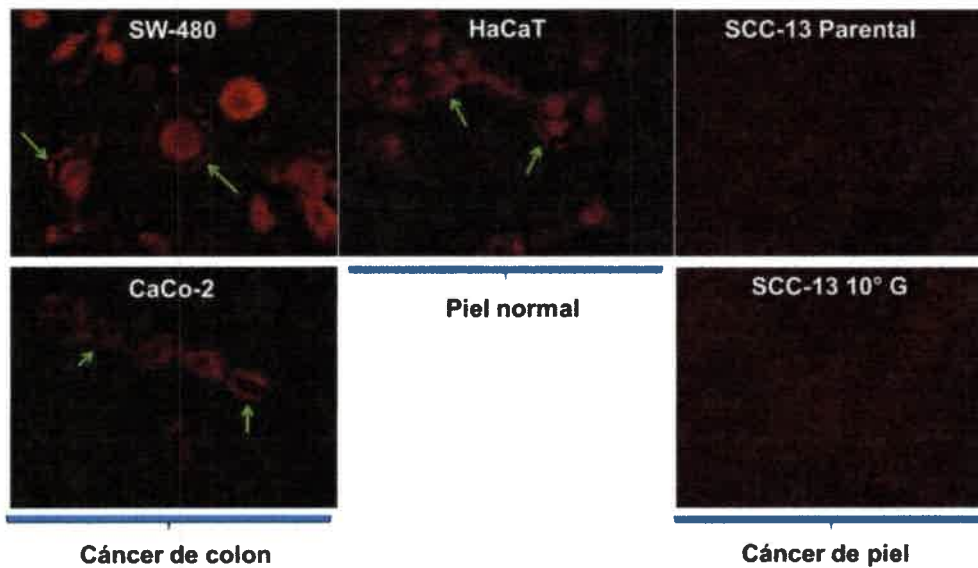


Figura 6.22. Expresión de Pgp por inmunofluorescencia indirecta en células de cáncer de colon SW-480 y CaCo-2 (controles positivos), queratinocitos HaCaT y SCC-13 parentales y de la 10° generación. Las flechas indican la localización de Pgp.

6.2. Estudios *in vivo*

6.2.1. Capacidad tumorigénica

Se evaluó la capacidad tumorigénica y el crecimiento tumoral de poblaciones de células SCC-13 parental, 1°, 5° y 10° generación de resistentes a la TFD en ratones inmunodeprimidos nu/nu. Las cuatro poblaciones de células fueron inyectadas en ambos flancos en los ratones, por lo tanto correspondieron dos sitios de inyección por ratón.

La figura 6.23 A muestra las curvas de crecimiento tumoral de células SCC parentales, de la 1°, 5° y 10° generación de resistentes a la TFD inyectadas en ratones inmunodeprimidos nu/nu, en función del tiempo transcurrido en días luego de la inoculación de las células. Los tumores de la 5° y 10° generación mostraron un crecimiento progresivo a lo largo del tiempo. En contraste, los tumores provenientes de las células parentales y las de la 1° generación regresaron en su mayoría. La figura 6. 23 B muestra los tumores de todas las poblaciones a los 45 días de la inyección, momento en el que se observó 1 tumor en parental, ninguno en 1° generación, 13 tumores en 5° y 10 tumores en 10° generación del total de las 12 inyecciones realizadas por población.

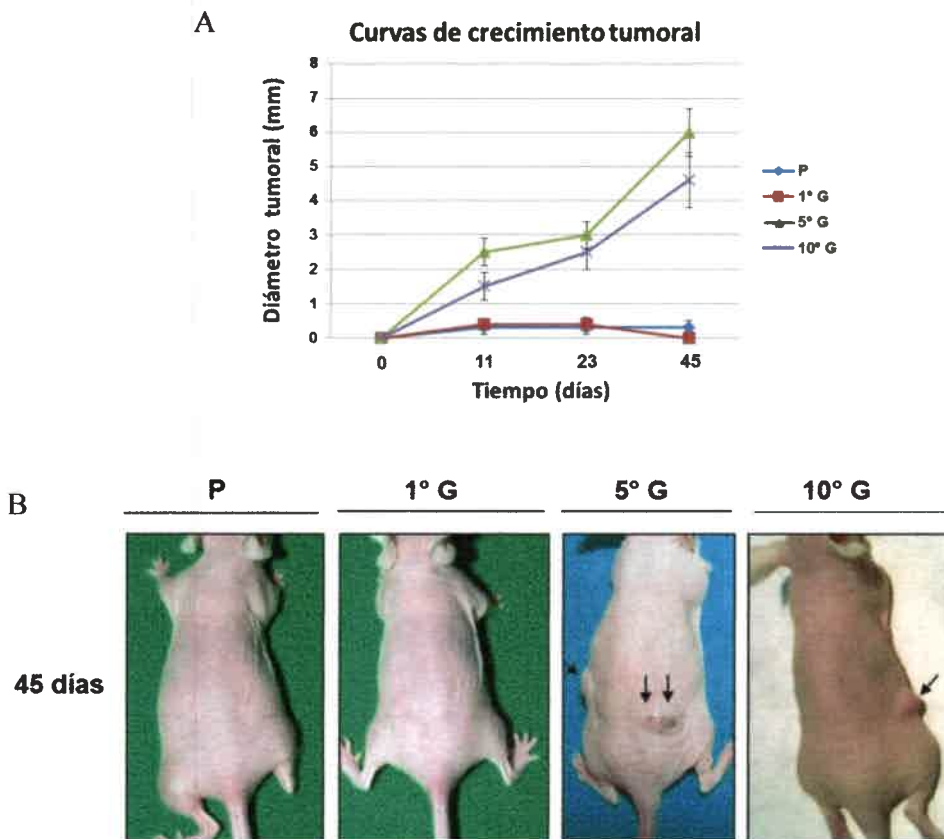


Figura 6.23. Crecimiento tumoral de células SCC parentales, de la 1°, 5° y 10° generación de resistentes a la TFD inyectadas en ratones inmunodeprimidos nu/nu. A) Curvas de crecimiento tumoral de las células SCC parentales, de la 1°, 5° y 10° generación (G) determinadas a 0, 11, 23 y 45 días luego de la inyección. B) Fotografías de ratones a los 45 días de inyectados con células SCC parentales, de la 1°, 5° y 10° generación. Las flechas indican las zonas con tumores.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

7.1. Estudios *in vitro*

7.1.1. Obtención de células resistentes a la terapia fotodinámica

En nuestro modelo de obtención de células resistentes se requirieron dosis de irradiación mayores, para lograr matar al 90-95 % de las células, a medida que se aplicaron más ciclos de TFD. Esto indica que al administrarse mayor número de tratamientos fotodinámicos sobre las células, se logra un mayor grado de resistencia de las mismas. Esto fue corroborado a través de la determinación de viabilidad celular por MTT, luego de someter a las células parentales y resistentes a iguales condiciones de TFD. Se obtuvo un porcentaje de viabilidad de 9,5 veces mayor para la décima generación y de 8,5 veces más para la quinta generación de células resistentes, en relación a las parentales. Estos datos indican que nuestro modelo de obtención de células resistentes es adecuado para estudiar la resistencia celular a la TFD. Se puede hipotetizar que a partir de un grupo heterogéneo de células iniciales (SCC parentales), la TFD selecciona positivamente a aquellas células que poseen mecanismos innatos que otorgan resistencia, mientras que las células que no poseen dichos mecanismos mueren tras el tratamiento. Por otro lado, también se podría pensar que la terapia estaría induciendo una mayor expresión de moléculas que otorgan una resistencia adquirida. Las células que no poseen estos mecanismos, o no los llevan a cabo de manera suficiente, mueren al recibir el tratamiento. Descubrir los mecanismos que otorgan la resistencia al tratamiento fotodinámico empleando Me-ALA en células de carcinoma escamoso humano SCC-13 constituye el desafío de este trabajo.

7.1.2. Detección del contenido de PpIX intracelular y su localización subcelular

Ya que la cantidad de PpIX acumulada dentro de las células a partir del Me-ALA podría afectar a la fototoxicidad, se examinó si las células parentales y resistentes contenían diferentes cantidades de PpIX, a través de la técnica de citometría de flujo. El tiempo de incubación del Me-ALA empleado para realizar la TFD para obtener las diferentes generaciones de resistentes fue de 4 horas, momento en el cual se encontró una menor cantidad de PpIX intracelular en las células resistentes comparando con las parentales. Las células resistentes a la TFD estudiadas en este trabajo presentarían uno o más mecanismos que les permitirían acumular una cantidad intracelular de PpIX menor en relación a las parentales. El ingreso del Me-ALA a las células sería similar entre células parentales y las poblaciones resistentes estudiadas, ya que a 1 hora de incubación la intensidad de fluorescencia detectada fue la misma. Entonces, ingresaría igual cantidad de Me-ALA en células parentales y resistentes, pero estas últimas podrían expulsar la PpIX formada intracelularmente por medio de transportadores, como por ejemplo proteínas MDR, las cuales actúan como ATPasas que expulsan una gran variedad de compuestos al exterior de las células, impidiendo así su acción terapéutica.¹ Se ha reportado que una proteína MDR llamada ABCG2 o BCRP transporta PpIX afectando la eficiencia de la TFD.² Hasta el momento no se ha descrito si la proteína MDR llamada Pgp transporta al fotosensibilizador PpIX. Por otro lado, las células resistentes podrían tener alteraciones en el sistema enzimático que regula la síntesis de PpIX a partir del Me-ALA.

En otros trabajos de TFD con ALA también se observó una reducida cantidad del fotosensibilizador PpIX en células LM3 resistentes al tratamiento, comparando con las parentales, en relación al contenido proteico, ya que se trataba de células resistentes de mayor tamaño.³ En células de adenocarcinoma de pulmón CL1-5 se encontraron, cantidades relativamente reducidas de PpIX, lo que explicaría su relativamente baja fototoxicidad cuando son tratadas con TFD, mientras que en células de carcinoma humano de mama MDA-MB-231 los niveles de PpIX fueron elevados, lo que correlaciona con una alta fototoxicidad.⁴

Los patrones de localización subcelular de PpIX son determinantes importantes de la eficiencia de la terapia fotodinámica.⁵ Aunque la cantidad total de PpIX es la principal determinante de la eficiencia de la TFD, la localización subcelular tiene un efecto adicional en el modo de muerte. Empleando células de carcinoma de colon se determinó que las líneas con localización preferencial de PpIX citosólica y mitocondrial tuvieron pérdida de potencial de membrana luego de la TFD y un subsecuente arresto del crecimiento; mientras que las células con localización de PpIX en membrana plasmática murieron por necrosis.⁶

En este trabajo de tesis, la PpIX se encontró localizada en la membrana citoplasmática, lisosomas y mitocondrias luego de 4 horas de incubación del Me-ALA, en todas las poblaciones analizadas. A las 17 horas de incubación, la localización del fotosensibilizador fue la misma que a 4 horas, pero con una mayor concentración, lo que permitió una mejor visualización de la PpIX.

Se sabe que la PpIX es producida en las mitocondrias, usualmente con una tasa mayor en las células neoplásicas que en las células normales.⁷ Luego de tiempos de incubación más prolongados, la PpIX, un fotosensibilizador lipofílico, es redistribuida desde las mitocondrias hacia el citosol, en general a regiones perinucleares dentro de organelas con gran superficie de membranas, tales como el retículo endoplasmático y a la membrana nuclear, excluyendo el núcleo. También puede ser encontrada en la membrana plasmática y en lisosomas y así ser responsable de diferentes sitios subcelulares de daño luego de la irradiación.⁸ El sitio de localización de la PpIX, su concentración y el protocolo de irradiación determinan en gran parte el tipo de daño causado bajo la fotoactivación del sensibilizador. La localización de las moléculas de PpIX claramente determina el sitio de acción. El oxígeno singlete generado mediante la TFD tiene un radio de acción de 10-20 nm y no puede difundir lo suficientemente lejos como para iniciar daño en otro lugar de la célula.⁹ Los sitios de acción de la PpIX en las células SCC parentales y resistentes de este estudio estarían confinados principalmente en la membrana plasmática, lisosomas y mitocondrias, luego de incubar Me-ALA durante cuatro y diecisiete horas.

7.1.3. Evaluación de las características morfológicas

7.1.3.1. Morfología celular

Con el objetivo de analizar y comparar la morfología de las células SCC de las poblaciones parental, quinta y décima generación, se empleó la técnica de tinción con azul de toluidina. Además, el análisis se completó mediante estudios de tamaño de las células en suspensión a través de citometría de flujo.

Las células resistentes teñidas con azul de toluidina mostraron una mayor proporción de formas fibroblásticas y formaron colonias más expansivas con respecto a las parentales. Este resultado fue corroborado por inmunofluorescencia de α -tubulina. Comparando entre la 5° generación y la 10°, se encontraron más prolongaciones fibroblásticas en la 5° generación. Esto indicaría que cuando se aplicaron hasta 5 ciclos de TFD, las formas con largas prolongaciones citoplasmáticas, en conjunto con ciertas proteínas de supervivencia y la capacidad de acumular menos PpIX, fueron favorecidas, pero con más ciclos del tratamiento no únicamente las formas fibroblásticas fueron seleccionadas, sino también células que presentaron otras proteínas de supervivencia y no tenían la forma con largas proyecciones celulares. Las SCC parentales formaron colonias más cerradas y presentaron mayor proporción de células poliédricas que las de la 5° y 10° generación. Cuando se analizó el tamaño de las células en suspensión, no se encontraron diferencias entre las poblaciones parentales y resistentes, lo que indicaría que este parámetro no estaría influyendo en la resistencia de las células a la TFD. En un trabajo de Casas *et al.*, se observó que clones resistentes al tratamiento fotodinámico con ALA presentaron una

morfología más fibroblástica, formaron colonias más abiertas y además las células fueron de mayor tamaño en relación a las parentales.³

Las diferencias morfológicas encontradas en las poblaciones de nuestro estudio nos llevaron a pensar que las células resistentes podrían tener distinta adhesividad y por lo tanto diferente expresión de proteínas de adhesión, y mayor capacidad de migración con respecto a las células SCC-13 parentales. Las formas fibroblásticas podrían indicar una mayor malignidad, relacionándose con el fenómeno de progresión del cáncer denominado transición epitelio-mesénquima. En éste, las células cancerosas que progresan en su estado de malignidad adquieren formas fibroblásticas, mayor capacidad de migración y menor adhesión entre células.¹⁰ En apartados siguientes de esta tesis se discute la relación entre estas formas celulares, la adhesión y la migración.

7.1.3.2. Morfología nuclear

Para el análisis de morfología nuclear de las células SCC parentales, de la quinta y décima generación se empleó la técnica de tinción nuclear mediante H \ddot{o} chst. En las tres poblaciones de SCC estudiadas se encontró un marcado pleomorfismo nuclear. Las células resistentes mostraron mayor proporción de micronúcleos en relación a las parentales. Los micronúcleos corresponden a segmentos cromosómicos que no fueron incorporados en el núcleo durante la anafase. Además, en generación de SCC resistentes se encontraron esporádicamente aberraciones mitóticas, con núcleos tripolares en división, lo cual no se observó en las SCC parentales. En las células cancerosas, la disminución de los mecanismos apoptóticos puede ser compensada por el proceso de catástrofe mitótica, resultando en mitosis anormales y conduciendo a la formación de células con múltiples micronúcleos. La formación de micronúcleos es estudiada para detectar daños, tanto *in vitro* como *in vivo*, luego de aplicar quimio y radioterapia en tumores sólidos con apoptosis reducida.¹¹ Hasta el momento, no hay estudios donde se analice la relación entre la resistencia a la TFD y el número de micronúcleos. Las células resistentes de nuestro estudio presentan mayor proporción de micronúcleos con respecto a las parentales, indicando una desorganización en el material genético en esas células que muestran una disminución en la muerte luego de aplicar la TFD.

7.1.4. Proliferación celular

Con la finalidad de conocer si las células resistentes a la TFD poseen diferente capacidad de división celular y distinto porcentaje de muerte, con respecto a las células parentales, se analizó el contenido de ADN de las poblaciones SCC parental, 1 $^{\circ}$, 5 $^{\circ}$ y 10 $^{\circ}$ generación, con confluencias del 70 %, mediante citometría de flujo. Además, se cuantificaron las figuras mitóticas por medio del marcaje de husos mitóticos por inmunofluorescencia de α -tubulina y de centrómeros cromosómicos en poblaciones de células resistentes y parentales con confluencias del 80 %. Se realizó un ensayo clonogénico para completar el análisis de proliferación celular.

Cuando las poblaciones parentales y resistentes alcanzaron confluencias celulares altas (70 y 80 %), las células resistentes mostraron ciclos celulares, porcentajes de división y porcentajes de muerte similares a las parentales. En cambio, en el ensayo clonogénico, la 10 $^{\circ}$ generación formó colonias de mayor tamaño comparando con las parentales y la 5 $^{\circ}$ generación.

Los resultados obtenidos indicarían que las células resistentes de la 10 $^{\circ}$ generación poseen mecanismos que le otorgan una mayor capacidad de proliferación cuando son sembradas de manera aislada unas de otras. Cuando alcanzan confluencias altas equiparan su capacidad de división celular a las de las células resistentes de la 5 $^{\circ}$ generación y las parentales.

7.1.5. Capacidad de migración y proliferación celular

Con el objetivo de estudiar la capacidad de migración y también de proliferación de las células resistentes de la 5° y 10° generación en relación a las parentales se empleó el ensayo de cierre de heridas. Luego de 4 y 8 horas de realizadas las heridas, ninguna de las tres poblaciones estudiadas mostraron migración ni proliferación. A las 12 y 24 horas luego de la apertura de las heridas, las células resistentes mostraron mayor capacidad de cierre de las mismas comparando con las células SCC parentales. Más aún, a las 12 horas en la 10° generación se observaron heridas más angostas que en la 5°. A las 24 horas las heridas de las dos poblaciones resistentes se cerraron completamente, mientras que las de las parentales aún se encontraban con algunos espacios abiertos.

Los resultados indicarían que las células resistentes podrían tener una capacidad de migración y/o proliferación mayor que las parentales, lo cual revelaría una mayor malignidad y correlacionaría con su fenotipo más fibroblástico. También, estos resultados podrían indicar que cuando las células resistentes tienen espacio suficiente, como cuando se siembran en bajas densidades en un ensayo clonogénico, o cuando se abre una herida sobre la monocapa celular, estas tienen mayor capacidad de proliferar en relación a las parentales.

7.1.6. Adhesión célula-sustrato

Las adhesiones focales constituyen puntos críticos para la regulación de la organización de la actina y para la motilidad celular.^{12,13,14} En nuestras generaciones resistentes se encontraron niveles de expresión de β 1-integrina, vinculina y fosfo-FAK aumentados en relación a las parentales. Además, en las poblaciones resistentes se observaron conspicuas fibras de estrés, comparando con las parentales, y en el final de dichas fibras se encontró localizada vinculina. En las células resistentes vinculina y fosfo-FAK mostraron una distribución en toda la superficie de adhesión con el sustrato, mientras que en las células parentales la distribución fue principalmente en los bordes celulares.

El incremento en los niveles de β 1-integrinas, vinculina y fibras de estrés en las células resistentes podría contribuir a un aumento en la capacidad de migración de dichas células. Se ha demostrado que la vinculina facilita la invasión en una matriz tridimensional a través del incremento en la transmisión de fuerzas de tracción.¹⁵

Las integrinas permiten conectar a las células con los componentes de la matriz extracelular, tales como laminina, colágeno y fibronectina. Las células SCC resistentes tuvieron mayor adhesión en relación a las parentales cuando estas fueron sembradas sobre los tres sustratos mencionados. Además, en la décima generación se observó mayor adhesión que en la quinta generación cuando las células fueron sembradas sobre fibronectina. La adhesión incrementada de las células resistentes sobre las proteínas de la matriz extracelular, podría estar relacionada con la sobreexpresión de β 1-integrinas.

En un trabajo de resistencia a la TFD con ALA, empleando la línea de adenocarcinoma mamario de la línea LM3, otros investigadores observaron que los clones resistentes tuvieron igual adhesión que las células parentales cuando fueron sembradas sobre laminina y fibronectina, pero la adhesión de los clones resistentes a colágeno I fue mayor que en las células parentales. Al contrario de lo que ocurre en nuestro estudio, estos clones resistentes de LM3 no mostraron sobreexpresión de β 1-integrinas, tuvieron desorganización del citoesqueleto de actina y además presentaron una reducida capacidad de migración en Matrigel.¹⁶

Además de su función en la motilidad celular, las integrinas son actualmente el grupo de moléculas de adhesión mejor documentado por su rol en el crecimiento y supervivencia.¹⁷ Muchos investigadores demostraron que las integrinas, principalmente las β 1-integrinas, de las células tumorales causan resistencia a diferentes agentes citotóxicos, los cuales poseen diferentes mecanismos de acción.^{18,19,20} Con el objetivo de conocer la importancia de las β 1-

integrinas en la resistencia de las células SCC a la TFD empleando Me-ALA, se inhibió la acción de las mismas mediante el empleo de un anticuerpo y se midió la viabilidad celular luego del tratamiento fotodinámico. El bloqueo de las β 1-integrinas tuvo un efecto de reducción de la viabilidad celular luego de aplicar la TFD, comparando con las poblaciones celulares tratadas con TFD sin anticuerpo. En un estudio empleando células de linfoma B se observó que al ser cultivadas conjuntamente con el estroma de la médula ósea, el cual consiste en proteínas de matriz extracelular, redujeron la apoptosis inducida por las drogas etopósido y Ara-C. Este fenotipo de resistencia correlacionó con una reducida activación de caspasa 3, sugiriendo la inhibición de la vía apoptótica. Esta resistencia fue revertida empleando un anticuerpo anti VCAM-1, un ligando de la integrina α 4 β 1.²¹ Los mecanismos a través de los cuales las β 1-integrinas contribuyen a la supervivencia celular incluyen la inhibición de la vía apoptótica extrínseca (mediante la inhibición de caspasa 8)²² e intrínseca^{23, 24} y la inducción de la vía de supervivencia PI3K/AKT.²⁵

Las β 1-integrinas de las células SCC de nuestro estudio podrían contribuir tanto con una función de adhesión y motilidad, como a la supervivencia y resistencia de las células a la TFD a través de las vías mencionadas anteriormente.

7.1.7. Adhesión célula-célula

E-cadherina y β -catenina son proteínas de adhesión entre células que constituyen las uniones adherentes. En general, se ha postulado que la adhesión mediada por E-cadherina actúa como un sistema que suprime la metástasis; por esto, se prevé que la reducción en la expresión de esta molécula aumente la capacidad metastásica.^{26,27,28} Utilizando modelos murinos, se ha demostrado que las células tumorales con baja expresión de E-cadherina y β -catenina incrementan su capacidad de penetrar a la circulación vascular y de generar metástasis.²⁹ En nuestro estudio, no se encontraron diferencias en la expresión ni en la localización de estas proteínas, entre poblaciones resistentes y parentales. Podríamos decir entonces, que la resistencia de las SCC no estaría otorgada por un aumento de adhesión mediada por las uniones adherentes. A pesar de tener un fenotipo más fibroblástico, las células SCC resistentes no poseen la característica descrita en el proceso oncogénico de transición epitelio-mesénquima de reducción en la expresión de E-cadherina y cateninas. Se hipotetizaría que entre las células SCC parentales y resistentes no habrían diferencias en la capacidad metastásica, a juzgar únicamente por los niveles iguales de proteínas de las uniones adherentes. Sin embargo, como se describió en el apartado anterior el aumento de proteínas de uniones focales que facilitan el anclaje, la tracción de las células al sustrato y la motilidad, podrían otorgar una mayor capacidad de migración.

7.1.8. Proteína inhibidora de la apoptosis: survivina

Con el objetivo de profundizar el análisis de los mecanismos de resistencia de las células SCC-13 a la TFD, se analizó la expresión de un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), survivina.

Survivina contribuye a la progresión del cáncer y a la quimio y radio-resistencia.³⁰ Se expresa en carcinomas basocelulares y de células escamosas, contribuyendo a la progresión de los mismos.³¹ En nuestro estudio, la forma activa de esta IAP se encontró incrementada en las células resistentes, y esos niveles fueron mayores a medida que aumentó la resistencia, mientras que los niveles totales permanecieron invariables. La localización de survivina total y de survivina activa no mostró diferencias entre las parentales y resistentes. Una proteína quinasa dependiente de ciclinas, la p34cdc2-ciclina B1, fosforila a survivina en treonina 34 activándola.³² La TFD con Me-ALA podría estar induciendo la expresión o la acción de esta quinasa, promoviendo la activación de survivina, en las células SCC-13 y ésta podría actuar como un

mecanismo de resistencia al tratamiento. Se ha observado que la TFD induce una incrementada expresión y fosforilación de survivina en células cancerosas y tumores murinos y que la manipulación de la vía antiapoptótica regulada por survivina puede ayudar a mejorar el tratamiento fotodinámico.³²

Además de su función como inhibidora de apoptosis (en citoplasma), survivina también facilita la división celular (en núcleo).⁴⁶ Como se ha observado a través del ensayo de cierre de heridas y el ensayo clonogénico, las células SCC-13 resistentes tienen una incrementada capacidad de proliferación, lo cual podría estar relacionado con el incremento en la activación de survivina y/o con otras proteínas de proliferación.

Esta proteína se localiza en los centrómeros durante la profase/metafase y ayuda al anclaje de microtúbulos a los centrómeros. Luego, durante la anafase/telofase se relocaliza en los cuerpos medios entre las células en división y contribuyen a la citocinesis. Survivina, junto con otras proteínas tales como INCENP, forma parte del complejo de proteínas cromosomales pasajeras, que se encuentran transitoriamente en la región del cinetocoro (requerida para la unión de microtúbulos durante la mitosis).³³ En nuestro estudio, encontramos survivina localizada en los cuerpos medios de células en citocinesis y entre dos células que ya han completado totalmente la mitosis, pero quedan contactadas mediante proyecciones citoplasmáticas (y los cuerpos medios aún no desaparecen), tanto en SCC parentales como en resistentes.

7.1.9. Proteínas del shock térmico

Los niveles de expresión de las proteínas HSP60, HSP70 y HSP90, se encontraron aumentados en las células resistentes con respecto a las parentales. Los niveles de HSP70 fueron tres veces mayores en las células de la 1°, 5° y 10° generación comparando con las parentales. Las HSPs 60 y 90 mostraron un incremento gradual a medida que aumentó el grado de resistencia.

Debido a sus funciones anti-apoptóticas las HSPs 60, 70 y 90 pueden jugar un rol en la protección contra la muerte celular inducida mediante TFD y otorgar así resistencia de las células cancerosas al tratamiento. HSP70 impide el reclutamiento de la procaspasa 9 al apoptosoma, mientras que la HSP90 inhibe la formación de un apoptosoma activo.³⁴ Además, HSP60 y HSP90 se relacionan con un mecanismo anti-apoptótico ya que protegen a la proteína inhibidora de apoptosis survivina de su degradación en proteosomas. Por otro lado, HSP60 secuestra a las proteínas pro-apoptóticas Bax y p53³⁵ e inhibe la acción de caspasa 3.³⁶ En nuestro sistema de células SCC-13 resistentes a la TFD, estas tres proteínas del shock térmico podrían estar mediando la resistencia al tratamiento fotodinámico a través de los mecanismos anti-apoptóticos mencionados. Los niveles de expresión de survivina total son iguales en las células resistentes en relación a las parentales, a pesar de la incrementada expresión de HSP60 y HSP90. Sin embargo, estas dos chaperonas podrían estar protegiendo a survivina de su degradación durante la aplicación del tratamiento fotodinámico y a tiempos cortos luego de la terapia, lo cual estaría exacerbado en las células resistentes.

Se ha observado en variantes resistentes a la TFD con Photofrin de líneas celulares humanas de cáncer de colon HT29 y fibrosarcoma RIF-1, un aumento en los niveles basales de la HSP60 con respecto a las poblaciones parentales,³⁷ de modo similar a lo observado en nuestro estudio con la línea celular de cáncer de piel SCC-13. La expresión de la HSP70 mediada por TFD puede variar en función del tipo de fotosensibilizador empleado y las condiciones de incubación. En un estudio de TFD en células de fibrosarcoma humano RIF-1 el tratamiento indujo la expresión de HSP70 cuando se utilizó una purina (SnET2) y una clorina (NPe6), pero no cuando se utilizó una porfirina (Photofrin). Sin embargo, la sensibilidad a la TFD fue similar para todos los fotosensibilizadores.³⁸ La inhibición de HSP90³⁹ y de proteínas asociadas a ésta en diferentes líneas de adenocarcinoma mamario incrementó la eficacia de la TFD.⁴⁰ De modo

similar, la inhibición de una o de estas tres HSPs en nuestras células resistentes a la TFD podría aumentar la eficiencia del tratamiento.

7.1.10. Resistencia cruzada a doxorrubicina

Con el objetivo de optimizar el tratamiento fotodinámico, se midió la viabilidad de las células SCC resistentes a la TFD de la quinta y décima generación, luego del tratamiento con la droga quimioterapéutica doxorrubicina. Las células resistentes mostraron una viabilidad reducida, en relación a las células parentales cuando fueron expuestas a doxorrubicina. Células de cáncer de colon SW-480 y Caco-2, y queratinocitos de la línea HaCaT tuvieron mayor viabilidad que las tres poblaciones de SCC-13 analizadas.

Los resultados obtenidos indicarían que el tratamiento de las células de carcinoma escamoso con TFD podría combinarse con quimioterapia empleando doxorrubicina con el fin de obtener mejores resultados terapéuticos.

La mayor viabilidad de los queratinocitos de la línea HaCaT debe ser analizada teniendo en cuenta que esta línea es inmortalizada a través de una mutación en p53, la cual provoca la falta de funcionalidad de esta proteína, por lo tanto no son consideradas células completamente normales. Dicha mutación podría contribuir al fallo en la apoptosis cuando estas células son sometidas a agentes dañinos, tales como las drogas quimioterapéuticas.

Entre los mecanismos de resistencia de las células a la doxorrubicina se encuentran el secuestro de la droga en vesículas ácidas,⁴¹ la expulsión de ésta a través de las proteínas MDRs ABCB8,⁴² ABCG2 y Pgp⁴³ y la reducción en la permeabilidad del quimioterápico debido a cambios en la composición de lípidos de la membrana celular.⁴⁴ Las células SCC resistentes a la TFD de nuestro estudio podrían presentar una reducción de los mecanismos de resistencia a la doxorrubicina. Por el contrario, las células de cáncer de colon SW-480 y CaCo-2, así como también los queratinocitos de la línea HaCaT presentarían alguna de estas estrategias ante la exposición a la doxorrubicina. Hemos encontrado a través de inmunofluorescencia expresión de la proteína Pgp en SW-480, CaCo-2 y HaCaT, pero no en las células SCC-13 parentales ni resistentes. Esos resultados indicarían que esta proteína MDR podría estar involucrada en la mayor viabilidad de estas líneas celulares, en contraste con las poblaciones de SCC, pero no explicaría el mayor porcentaje de viabilidad de SCC parentales comparando con las resistentes a la TFD. La droga quimioterapéutica tuvo igual localización subcelular a tiempos cortos y largos de incubación en SCC parental y de la décima generación, así como también en queratinocitos HaCaT, encontrándose en núcleo celular y en lisosomas.

La doxorrubicina se aplica de modo sistémico por vía endovenosa y el nivel de toxicidad sobre las células normales es alto. Actualmente se propone el uso de una formulación liposomal, administrada por vía endovenosa, para aumentar la selectividad del quimioterápico hacia las células tumorales.^{45,46} El uso tópico de esta formulación podría resultar en una posibilidad de tratamiento para el cáncer de piel superficial.

A partir de los resultados obtenidos concluimos que otra causa, diferente de la localización subcelular, estaría conduciendo a una menor viabilidad celular de la décima generación de resistentes respecto a las SCC parentales y a los queratinocitos HaCaT, tal como una mayor expresión de la proteína de resistencia a múltiples drogas Pgp, la cual tiene como sustrato a doxorrubicina.⁴⁷

7.2. Estudios *in vivo*

7.2.1. Capacidad tumorigénica

Con el objetivo de analizar el crecimiento tumoral de las células resistentes de la primera, quinta y décima generación, comparando con las células parentales, estas fueron inyectadas en ratones inmunodeprimidos.

Las células resistentes de la quinta y décima generación tuvieron mayor capacidad tumorigénica y un crecimiento tumoral mayor, en relación a las parentales y la primera generación. El incremento en los contactos focales, la mayor activación de survivina y la aumentada capacidad de proliferación de las células resistentes podrían contribuir al crecimiento de los tumores en el sistema *in vivo*.

En contraste con nuestros resultados, clones resistentes a la TFD con ALA tuvieron menores tasas de crecimiento celular, cuando se inyectaron en ratones inmunodeprimidos. Estos clones difieren de nuestras poblaciones resistentes en que no sobreexpresan β 1-integrina. Además, nuestro modelo de resistencia se diferencia de los modelos que analizan clones resistentes en que nosotros estudiamos poblaciones resistentes completas y heterogéneas. Los modelos que analizan clones se basan en la selección de algunos clones resistentes que provienen cada uno de una célula resistente aislada y seleccionada.¹⁶ Nosotros analizamos todos los clones juntos que se obtuvieron luego de ciclos repetidos de TFD.

Referencias

- ¹ Ullah F. M. 2008. Cancer multidrug resistance: a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 9:1-6.
- ² Ishikawa T., Nakagawa H., Hagiya Y., Nonoguchi N., Miyatake S., Kuroiwa T. 2010. Key role of human ABC transporter ABCG2 in photodynamic therapy and photodynamic diagnosis. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2010: 1-13.
- ³ Casas A., Perotti C., Ortel B., Di Venosa G., Saccoliti M., Battle A., Hasan T. 2006. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int. J. Oncol.* 29: 397-405.
- ⁴ Tsai T., Tai Ji H., Chiang P., Chou R., Chang W., Chen C. 2009. ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. *Lasers Surg. Med.* 41:305-315.
- ⁵ Ji Z., Yang G., Vasovic V., Cunderlikova B., Suo Z., Nesland J. M., Peng Q. 2006. Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. *J. Photochem. Photobiol.* 84(3):213-20.
- ⁶ Krieg R. C., Messmann H., Schlottmann K., Endlicher E., Seeger S., Schölmerich J., Knuechel R. 2003. Intracellular localization is a cofactor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study. *Photochem. Photobiol.* 78(4):393-9.
- ⁷ Van Hillesberg R., Van der Berg J., Kort W., Terpstra O., Wilson J. 1992. Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterol.* 103:647-651.
- ⁸ Pottier R., Krammer B., Baumgartner R., Sttep H. 2006. Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook. Ed. Royal Society of Chemistry. Chapter 2. 32-33.
- ⁹ Josefsen L. B., Boyle R. W. 2008. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met. Based Drugs.* 2008:1-24.
- ¹⁰ Grille S. J., Bellacosa A., Upson J., Klein-Szanto A. J., van Roy F., Lee-Kwon W., Donowitz M., Tschlis P. N., Larue L. 2003. The Protein Kinase Akt Induces Epithelial Mesenchymal Transition and Promotes Enhanced Motility and Invasiveness of Squamous Cell Carcinoma Lines. *Cancer Res.* 63: 2172-2178.
- ¹¹ Driessens G., Harsan L., Robaye B., Waroquier D., Browaeys P., Giannakopoulos X., Velu T., Bruyns C. 2003. Micronuclei to detect in vivo chemotherapy damage in a p53 mutated solid tumour. *British J. Cancer* 89:727-729).
- ¹² Defilippi P., Olivo C., Venturino M., Dolce L., Silengo L., Tarone G. 1999. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc. Res. Tech.* 47: 67-78.
- ¹³ Ezzell R. M., Goldmann W. H., Wang N., Parasharama N., Ingber D. E. 1997. Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. *Exp. Cell. Res.* 231: 14-26.
- ¹⁴ Zimmerman B., Volberg T., Geiger B. 2004. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell. Mot. Cytosk.* 58: 143-159.
- ¹⁵ Mierke C. T., Kollmannsberger P., Paranhos Zitterbart D., Diez G., Koch T. M., Marg S., Ziegler W. H., Goldmann W. H., Fabry B. 2010. Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *J. Cell. Biol. Chem.* 285(17):13121-13130.
- ¹⁶ Casas A., Di Venosa G., Vanzulli S., Perotti C., Mamome L., Rodriguez L., Simian M., Juarranz A., Pontiggia O., Hasan T., Battle A. 2008. Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 271:342-351.
- ¹⁷ Hehigans S., Haase M., Cordes N. 2007. Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochem. Biophys. Acta.* 1775: 163-180.
- ¹⁸ Park C. C., Zhang H. J., Yao E. S., Park C J, Bissell M J. 2008. Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 68: 4398-405.
- ¹⁹ Hazlehurst L. A., Dalton W. S. 2001. Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies. *CancerMetast. Rev.* 20: 43-50.
- ²⁰ Mori R., Ishiguro H., Kuwabara Y., Kimura M, Mitsui A, Tomoda K, Mori Y, Ogawa R, Katada T, Harata K, Fujii Y. 2008. Targeting $\beta 1$ integrin restores sensitivity to docetaxel of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 20 1345-1351.
- ²¹ Fortney J. E., Zhao W., Wenger S L, Gibson L F. 2001. Bone marrow stromal cells regulate caspase 3 activity in leukemic cells during chemotherapy. *Leuk. Res.* 25:901-907.
- ²² Estrugo D., Fischer A., Hess F, Scherthan H, Belka C, Cordes N. 2007. Ligand bound beta1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. *PLoS One.* 3:e269.
- ²³ Owens T. W., Valentijn A. J., Upton J. P, Keeble J., Zhang L., Lindsay J., Zouq N. K., Gilmore A. P. 2009. Cell death and differentiation. Apoptosis commitment and activation of mitochondrial Bax during anoikis is regulated by p38MAPK. *Molec. Cancer Res.* 7(4):1551-1562.
- ²⁴ Valentijn A.J., Zouq N, Gilmore A.P. 2004. Anoikis. *Biochem. Soc. Transactions.* 32 (3): 422-425.
- ²⁵ Velling T., Nilsson S., Stefansson A, Johansson S. 2004. Beta1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO Rep.* 5:901-905.

- ²⁶ Comijn J., Berx, G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsvan L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy, F. 2001. The two-handed E box binding zincfinger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell*, 7:1267–1278.
- ²⁷ von Burstin J., Eser S, Paul M, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, Schnieke A, Schmid R., Schneider G, Saur D. 2009. E-Cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterol.* 137(1):361-371.
- ²⁸ Onder T., Gupta P., Mani S, Yang J, Lander E, Weinberg R. 2008. Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Res.* 68(19): 3645-3654.
- ²⁹ Akimoto T., Kawabe S., Grothey A., Milas L. 1999. Low E-cadherin and beta-catenin expression correlates with increased spontaneous and artificial lung metastases of murine carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis.* 17:171-6.
- ³⁰ Yamamoto H, Yee Ngan C, Monden M. 2008. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci.* 99: 1709–1714.
- ³¹ Grossman D, McNiff J M, Li F, Altieri D C. 1999. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab. Invest.* 79: 1121-6.
- ³² Ferrario A., Rucker N., Wong S., Luna M., Gomer C. J. 2007. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res.* 67: 4989–4995.
- ³³ Uren A, Wong L, Pakusch M, Fowler K, Burrows F, Vaux L, Choo K. 2000. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Current Biol.* 10:1319–1328.
- ³⁴ Almeida R. D., Manadas B. J., Carvalho A. P., Duarte C. B. 2004. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1704: 59-86.
- ³⁵ Cohen-Sfady M., Pevsner-Fischer M., Margalit R., Cohen I. R. 2009. Induced from Apoptosis, Spontaneous and Innate Signaling, Protects B Cells. *J. Immunol.* 183:890-896.
- ³⁶ Merendino A. M, Bucchieri F., Campanella C., Marciano V., Ribbene A., David S., Zummo G., Burgio G., Corona D. F., Conway de Macario E., Macario A. J., Cappello F. 2010. Hsp60 Is Actively Secreted by Human Tumor Cells. *5 (2):9247-9247.*
- ³⁷ Hanlon J. G., Adams K., Rainbow A. J., Gupta R. S, Singh G. 2001. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 64:55–61.
- ³⁸ Rucker N, Ferrario A., Gomer C. J. 2001. Constitutive overexpression of HSP-70 in thermal resistant tumor cells does not alter sensitivity to porphyrin-, chlorin-, or purpurin-mediated PDT. *J. Porphyr. Phthalocyan.* 5(2):143-146.
- ³⁹ Ferrario A., Gomer C. J. 2010. Targeting the 90 kDa heat shock protein improves photodynamic therapy. *Cancer Letters* 289:188–194.
- ⁴⁰ Solár P., Chytilová M., Solárová Z., Mojžiš J., Ferenc P, Fedoročko P. 2011. Photodynamic Therapy with Hypericin Improved by Targeting HSP90 Associated Proteins *Pharmaceuticals* 4:1488-1502.
- ⁴¹ Lou P. J., Lai P. S., Shieh M. J., MacRobert A. J., Berg K., Bown S. G. 2006. Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer cells by photochemical internalization. *Int. J. Cancer.* 119(11):2692-2698.
- ⁴² Elliott A. M., Al-Hajj M. A. 2009. ABCB8 Mediates Doxorubicin Resistance in Melanoma Cells by Protecting the Mitochondrial Genome. *Mol. Cancer Res.* 7:79-87.
- ⁴³ Calcagno A. M., Fostel J. M., To K. K., Salcido C. D., Martin S. E., Chewing K. J., Wu C. P., Varticovski L., Bates S. E., Caplen N. J., Ambudkar S. V. 2008. Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes. *Brit. J. Cancer.* 98:1515 – 1524
- ⁴⁴ Peetla C., Bhave R., Vijayaraghavalu S., Stine A., Kooijman E., Labhasetwar V. 2010. Drug resistance in breast cancer cells: biophysical characterization of doxorubicin and interactions with membrane lipids. *Mol. Pharm.* 7(6):2334-48.
- ⁴⁵ Gordon A. N., Fleagle J. T., Guthrie D. 2001. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J. Clin. Oncol.* 19(14):3312-3322.
- ⁴⁶ Macmillan fact sheet 2012: Liposomal doxorubicin.
- ⁴⁷ Sánchez Suárez P., Benítez Bribiesca L. 2006. Procesos biomoleculares de resistencia a drogas. *Cancerología* 1:187-199.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis doctoral se estudiaron los mecanismos de resistencia de células de carcinoma escamoso humano a la terapia fotodinámica (TFD) empleando Me-ALA. A partir de los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- El modelo de obtención de células resistentes empleado en este trabajo de tesis es adecuado para estudiar mecanismos moleculares de resistencia celular a la TFD.
- Un mayor porcentaje de células resistentes mostraron morfología fibroblástica y formaron colonias más expansivas con respecto a las parentales. Este resultado podría indicar que las mismas presentarían mayor grado de malignidad.
- La PpIX, producto del metabolismo del Me-ALA, se localiza en la membrana plasmática, lisosomas y mitocondrias, tanto en las células resistentes como en las parentales. Sin embargo, las células resistentes presentaron una menor acumulación de PpIX con respecto a las parentales, lo cual podría explicar su menor fototoxicidad.
- Las células resistentes a la TFD no mostraron cambios en la adhesión célula-célula con respecto a las parentales.
- Las células resistentes presentaron una mayor expresión de las proteínas de adhesión célula-sustrato de la vía de β 1-integrinas, en relación a las parentales.
- Las células resistentes presentaron mayor expresión de HSPs y mayor activación de survivina, comparando con las células parentales.
- Las células resistentes tuvieron un crecimiento tumoral mayor cuando fueron inyectadas en ratones inmunodeprimidos, en relación a las parentales.

Según los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir que las células de carcinoma escamoso humano resistentes a la terapia fotodinámica con Me-ALA presentan una mayor expresión y/o activación de proteínas de supervivencia tales como β 1-integrinas, HSPs y survivina. Esta terapia podría optimizarse por medio del tratamiento combinado con la inhibición de dichas proteínas.





U N R C
Biblioteca Central



71196

71196