

RESPUESTA DE CÉLULAS HIPOFISARIAS AL ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO POR RIBOFLAVINA EN TERAPIA FOTODINÁMICA

A. V. Juarez ^{a*}, N. Boetto ^a, E. Haggi ^b, P. Pons ^a

^a Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

^b Unidad Académica Río Gallegos. Universidad Nacional de la Patagonia Austral.

*Autor de correspondencia, e-mail: vjuarez@cmefcm.uncor.edu, teléfono-fax: 54-351-4333021, dirección postal: Enrique Barros y Enfermera Gordillo. Pabellón de Biología Celular 1º piso. Ciudad Universitaria. Córdoba 5000.

Recibido: Octubre 2012. Aprobado: Marzo 2013.

Publicado: Mayo 2013.

RESUMEN

Hipótesis: La riboflavina, debido al buen rendimiento cuántico de $O_2(^1\Delta_g)$ podría utilizarse como fotosensibilizador (FS) en terapia fotodinámica (TFD). Objetivos: Analizar la respuesta de células epiteliales a la TFD mediada por riboflavina (RF), estudiando la ultraestructura de las mismas. Identificar las especies reactivas de oxígeno (ERO) involucradas en este mecanismo y determinar el tipo de muerte celular. Materiales y Métodos: Para mejorar la penetración a través de la membrana plasmática, se acetiló la RF obteniendo RF liposoluble (RFL). Con la finalidad de constatar la generación de ERO por ambas RF a longitud de onda (λ) de 460 nm se utilizaron 3-hidroxipiridina y 9-10 dimetilantraceno, drogas que se descomponen en presencia de $O_2(^1\Delta_g)$. Se verificó el daño celular generado por la acción de ambos FS, RF y RFL activados por luz en células dispersas de tejido hipofisario de ratas. Para comprobar las ERO involucradas se inhibió la citotoxicidad utilizando antioxidantes: catalasa (75 U/ml), superóxido dismutasa (100 U/ml) y L-Histidina (10 mM). Se midió la viabilidad celular con azul de tripán y se analizó la respuesta por microscopía electrónica de transmisión y microscopía fotónica de alta resolución. Resultados: Se demostró que ambas RF iluminadas con el prototipo de lámpara de 10 mW/cm² y 460 nm de λ , generan ERO que conducen a la muerte celular por dos mecanismos morfológicamente bien diferenciados, necrosis y apoptosis. Conclusión: La citotoxicidad generada por la activación de ambas RF, nos permite sugerir su utilización como FS en la aplicación de TFD.

Palabras claves: Terapia Fotodinámica, riboflavina, luz, especies reactivas de oxígeno, muerte celular.

PITUITARY CELL RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS PRODUCED BY RIBOFLAVIN IN PHOTODYNAMIC THERAPY

ABSTRACT

Hypothesis: Riboflavin could be used as a photosensitizer (PS) in photodynamic therapy (PDT) because of its high quantum yield of $O_2(^1\Delta_g)$. The aim of our investigation was 1) to evaluate ultrastructural changes of epithelial cells in response to riboflavin (RF)-PDT, 2) to identify if reactive oxygen species (ROS) were produced and 3) to determine if cell death was induced and which type. Materials and methods: RF was acetylated to obtain liposoluble riboflavin (RFL) with improved penetration through the plasmatic membrane. 3-hydroxy pyridine and 9-10 dimethylantracene, compounds that decompose in the presence of $O_2(^1\Delta_g)$ were used to verify the generation of ROS by light activation ($\lambda = 460$ nm) of both RF and RFL. To evaluate the potential damage in rat pituitary cells in culture caused by PDT, cell viability was measured with trypan blue exclusion assay and ultrastructural alterations were analyzed by transmission electron microscopy and photonic high-resolution microscopy. Antioxidants catalase (75 U/ml), superoxide dismutase (100 U / ml) and L-histidine (10 mM) were used to estimate ROS involved in cytotoxicity. Results: both RF and RFL, generate ROS when activated by light (460 nm, 10 mW/cm²), inducing cell death by two morphologically distinct mechanisms, necrosis and apoptosis. Conclusion: The cytotoxicity of irradiated RF or RFL allowed us to propose their effectiveness as PS in PDT application.

Keywords: Photodynamic therapy, riboflavin, light, reactive oxygen species, cell death.

INTRODUCCIÓN

La fotoquimioterapia, combinación de sustancias químicas y luz, es una práctica habitual en el tratamiento de enfermedades cutáneas. Dentro de esta se incluye la terapia fotodinámica (TFD), una modalidad terapéutica basada en la fotooxidación de materiales biológicos inducida por la activación lumínica de un fotosensibilizador (FS) localizado selectivamente en determinadas células o tejidos tumorales [1].

Se requiere de tres elementos esenciales: luz, FS y oxígeno. La conjunción de los mismos involucra la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en especial oxígeno singlete ($O_2(^1\Delta_g)$), radical hidroxilo (OH \cdot), radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), produciendo estrés oxidativo y culminando con la destrucción celular [2]. La TFD induce diversos cambios bioquímicos y morfológicos en las células sobre las que actúa. Desde el punto de vista bioquímico, la peroxidación lipídica y la inactivación de las proteínas son las dianas principales de las ERO producidas en el proceso fotodinámico [3].

Su naturaleza no invasiva, las altas tasas de curación y los excelentes resultados cosméticos son las claves del éxito de esta terapia. Sin embargo, el costo del tratamiento es elevado, lo que limita el acceso a esta terapia solo a un grupo selecto de pacientes. Con el objetivo de aportar algunas soluciones a esta problemática, en nuestro laboratorio hemos desarrollado distintos prototipos de fuentes de irradiación para la aplicación de TFD mediada por ácido δ aminolevulínico (ALA) [4-6].

La búsqueda de la droga fotosensibilizadora ideal sigue siendo un tema de estudio para gran número de investigadores [7]. Un FS es un compuesto que tras la absorción de la luz llega a un estado excitado triplete, cuya vida media es lo suficientemente larga para permitir la interacción con el oxígeno triplete $O_2(^3\Sigma_g^-)$ generando $O_2(^1\Delta_g)$ (mecanismo tipo II) o interactuando directamente

con el sustrato generando radicales intermediarios (mecanismo tipo I).

La riboflavina (RF) es una vitamina hidrofílica que puede ser utilizada como FS de bajo costo en el tratamiento fotodinámico de lesiones dérmicas superficiales. Esta vitamina posee un buen rendimiento cuántico de $O_2(^1\Delta_g)$, esto indica que con menor cantidad de FS se pueden inducir reacciones fotodinámicas. Para aumentar la penetración de la droga a través de las membranas biológicas se ha modificado su estructura, confiriéndole a la molécula un carácter lipofílico.

Dada la importancia de la participación de la muerte celular en los resultados de la TFD, es necesario estudiar por qué mecanismo se produce este proceso. Los tipos de muerte celular generados por la TFD pueden ser principalmente, apoptosis, necrosis y autofagia [8,9]. La apoptosis es un proceso programado que requiere de energía, morfológicamente se caracteriza por la retracción citoplasmática y nuclear, condensación de la cromatina, la escisión del ADN cromosómico en fragmentos y formación de cuerpos apoptóticos sin ruptura de la membrana plasmática [10]. La necrosis, implica un estado irreversible e incontrolable de la célula, dilatación de los orgánulos citoplasmáticos en particular mitocondrias y ruptura de la membrana plasmática produciendo la salida de elementos citoplasmáticos [11]. La autofagia es un proceso en el cual citoplasma y organelas son secuestrados en vesículas con doble membrana celular, liberando su contenido dentro de lisosomas, para su degradación y reciclaje de macromoléculas, se caracteriza especialmente por la vacuolización del citoplasma [12]. Los cambios morfológicos que genera la TFD pueden ser estudiados por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) para caracterizar la respuesta a nivel ultraestructural.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta de las células epiteliales a la TFD mediada por RF, analizando la ultraestructura de las mismas, identificando

las especies reactivas de oxígeno (ERO) involucradas en este mecanismo y determinando el tipo de muerte celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de Luz

Se utilizó una fuente de luz construida en el Centro de Microscopía Electrónica, que consta de emisores diodos de alta potencia que emiten luz incoherente, continua, a λ 460 nm, con densidad de potencia de 10 mW/cm² y 5 cm² de superficie de irradiación.

Acetilación de Riboflavina

Se solubilizó la RF (20 μ g) en 50 ml de piridina y se agregó anhídrido acético gota a gota en proporción 1:1. Se adicionó piridina, catalizador de la esterificación y se dejó reposar 48 h a 4 °C, deteniendo la reacción con hielo molido. Se realizaron 3 extracciones con 25 ml de cloroformo cada una, se le añadió sulfato de cobre el cual forma un complejo con la piridina y precipita, los 3 extractos se lavaron 10 veces con 15 ml de ácido clorhídrico al 10% para eliminar el complejo. Posteriormente se realizaron 3 lavados con bicarbonato de sodio para neutralizar el HCl. Para la deshidratación se agregó sulfato de sodio, se filtró y se dejó en estufa a 60 °C durante 24 h hasta su desecación [13].

Generación de especies reactivas de oxígeno

Para constatar la generación de ERO producida por la activación de ambas RF, se utilizaron compuestos que se descomponen en presencia de O₂(¹ Δ_g). Para estudiar el efecto de RFL se utilizó un compuesto liposoluble, 9-10 Dimetilantraceno (DMA) y para RF uno hidrosoluble, 3-hidroxipiridina (3-OHP) [14]. Se iluminaron con la fuente de luz y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro cada 10 seg hasta 4 min.

Animales de experimentación

Ratas machos de la cepa Wistar de tres meses de edad, mantenidas en condiciones controladas de fotoperiodo (12 h de luz y 12 h de oscuridad) y temperatura (25 \pm 2 °C), con libre acceso a agua y alimento balanceado.

Dispersión de células epiteliales

Con el objetivo de analizar la respuesta de células epiteliales al tratamiento fotodinámico, se dispersaron glándulas adenohipofisarias según el protocolo descrito previamente [15]. Se colocaron las glándulas en medio SMEM (minimum essential medium Eagle) con tripsina (0,4%) y se dispersaron con pipetas Pasteur. Finalmente se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul de tripán. Con posterioridad las células dispersas fueron divididas en los siguientes grupos: Control, células iluminadas durante 30 min (180 J/cm²) (Luz), células con FS mantenidas en oscuridad durante 30 min (FS) y células con FS durante 30 min y posteriormente iluminadas por 30 min (180 J/cm²) (FS-Luz). Los fotosensibilizadores utilizados fueron RF (100 μ M) y RFL (100 μ M). La viabilidad celular se cuantificó 120 min posteriores a la iluminación.

Inhibición de citotoxicidad

Para determinar el tipo de ERO predominante generado por la activación lumínica de RF o RFL, células adenohipofisarias dispersas fueron incubadas con RF o RFL y se les adicionó distintas sustancias antioxidantes durante 30 min. Catalasa (CAT) (75 U/ml) para inhibir la generación de H₂O₂, superóxido dismutasa (SOD) (100 U/ml) para evitar la producción de O₂⁻ o L-Histidina (L-Hist) (10 mM) con gran avidez por el O₂(¹ Δ_g) [1]. Luego las células fueron irradiadas durante 30 min e incubadas por 120 min. Posteriormente se cuantificó la viabilidad celular mediante la coloración con azul de tripán.

Microscopía fotónica y electrónica de transmisión

Los pellets celulares fueron fijados en una solución de glutaraldehído 2% (v/v) y formaldehído 4% (p/v) en buffer cacodilato 0,1 M durante 24 h y postfijados con tetróxido de osmio al 1%, deshidratados en acetonas de graduaciones crecientes e incluidos en araldita. Secciones de 1 micra obtenidas con ultramicrotomo automático Jeol Jum-7 (Nikon, Tokyo, Japón), se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina, las cuales se observaron en microscopio fotónico Leitz Labolux12 equipado con una cámara Zeiss AxioCam ERc 5s. Los cortes finos (100nm) se montaron en grillas de níquel y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación en microscopio electrónico de transmisión Zeiss LEO 906E, equipado con una cámara digital Megaview III (Oberkochen, Alemania).

Análisis estadístico

Los valores de las figuras se expresan como media \pm desviación estándar. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Tukey, para determinar diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ (Infostat). Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado.

RESULTADOS

Riboflavinas

Luego de la acetilación la RF demostró poseer carácter lipofílico, lo que permitió su extracción en un solvente orgánico hidrofóbico, como cloroformo. Realizado el espectro UV-visible de DMA disuelto en cloroformo, se eligió el pico de absorbancia correspondiente a 260 nm de longitud de onda, para observar la respuesta a la iluminación. La absorbancia decayó de 1,42 a 1,34 en 60 seg, disminuyendo solo el 5,64% de su actividad al ser iluminada, mientras que con el agregado de RFL disuelta en cloroformo e iluminado con el prototipo decayó de

1,26 a 0,81 durante el mismo tiempo, lo que corresponde a una pérdida de concentración de más del 35% (Fig. 1).

En la evolución espectral de 3-OHP en presencia de RF al ser iluminada, se observó una disminución en la absorbancia de 2,36 a 1,75 a los 2 min, lo que representa una pérdida de concentración del 25,84% (Fig. 2). Esto demostró que ambas riboflavinas al ser iluminadas con la lámpara de 460 nm, generan ERO que hacen decaer la concentración de los compuestos empleados

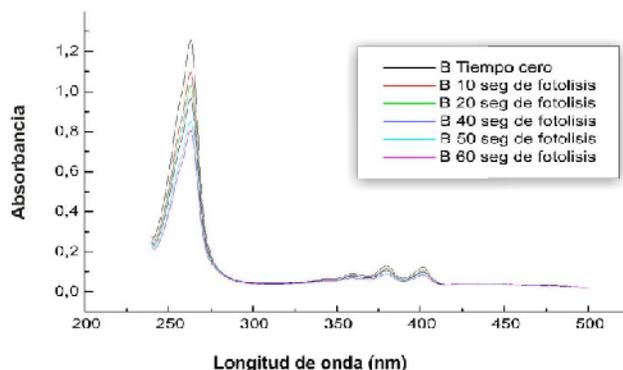


Fig. 1. Espectro UV-Visible de la fotólisis del 9,10 Dimetilantraceno con RFL solubilizada en Cloroformo iluminado con el prototipo de 10 mW/cm² y 460 nm.

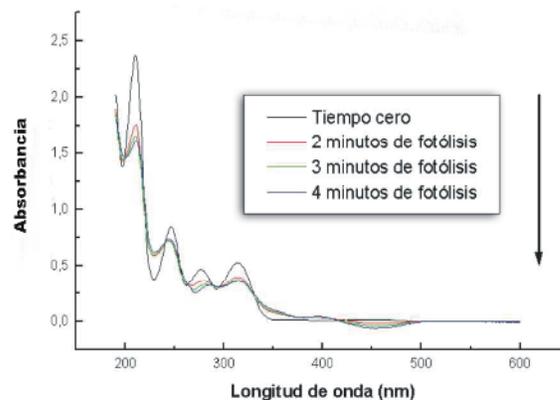


Fig. 2. Espectro de la fotólisis de 3-OHP con RF en solución acuosa, iluminado con el prototipo de 10 mW/cm² y 460 nm.

Viabilidad Celular

La iluminación de las células o la incubación con los FS en estudio mantenidos en oscuridad, no generaron ningún efecto citotóxico, demostrando que por sí solos estos

elementos son inocuos (Luz, RF, RFL). Sin embargo, cuando se incubaron las células con RF o RFL y se las iluminó (RF-Luz, RFL-Luz), la viabilidad celular disminuyó en forma significativa con respecto a los controles.

Estos resultados demuestran que tanto la RF como la RFL, producen la muerte celular al ser excitadas con la lámpara empleada.

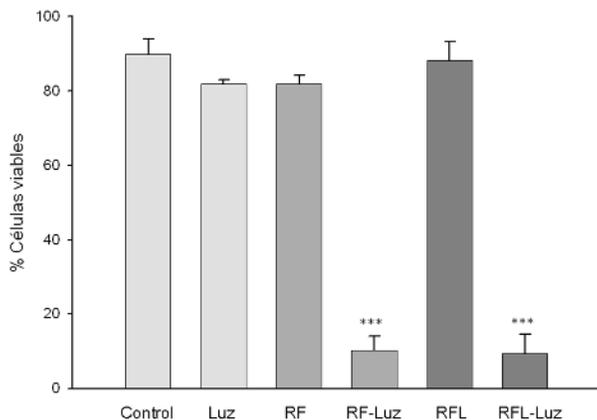


Fig. 3. Porcentaje de células viables. Las células se preincubaron con RF o RFL 30 min y se iluminaron por 30 min (RF-Luz; RFL-Luz). *** p < 0,001 vs Control, Luz, RF y RFL.

Inhibición de la citotoxicidad por antioxidantes

Para identificar si las muertes celulares son producidas por ERO generadas en el tratamiento fotodinámico y constatar si existe un predominio de alguna de ellas, las células se incubaron con los FS y con diferentes sustancias antioxidantes: CAT para identificar el H₂O₂, SOD para reconocer el ion superóxido (O₂⁻) y L-Hist para el oxígeno singlete (O₂^{(1)Δg}). Luego de su activación lumínica se midió la viabilidad celular por la técnica de azul de Tripán.

En los tratamientos con RF y luz (RF-Luz) la presencia de las distintas sustancias antioxidantes revirtió el efecto citotóxico generado por la TFD a valores similares a los controles, sin embargo no se pudo relacionar el daño celular a ningún ERO en particular, debido a que las

mismas se generaron en cantidades similares. Las células tratadas con CAT mostraron una reducción de la citotoxicidad de 36,43% (p<0,001), las tratadas con SOD disminuyeron 30,91% (p<0,001) y las que fueron incubadas con L-Hist redujeron 33,45% (p<0,001) (Fig. 4A), demostrando así que la RF fotoestimulada con el prototipo empleado, genera H₂O₂, O₂⁻ y O₂^{(1)Δg}.

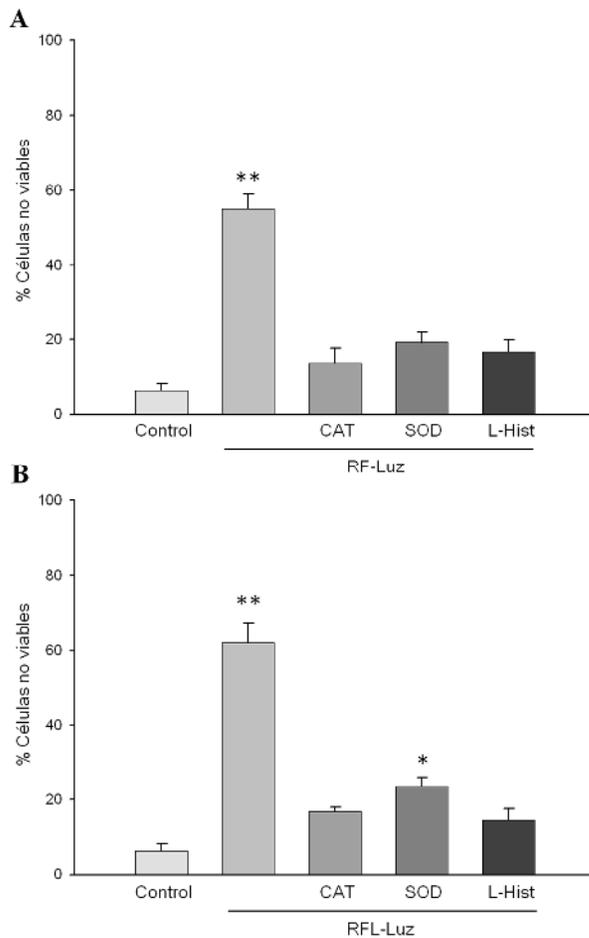


Fig. 4. Efecto protector de los antioxidantes sobre la citotoxicidad inducida por ambos FS iluminados en células adenohipofisarias. Células pre-tratadas con CAT 75U/ml, con SOD 100U/ml y L-Hist 10 Mm. ** p<0,001 vs Control, CAT, SOD y L-Hist. * p<0,05 vs Control, RFL-Luz, CAT y L-Hist.

En células tratadas con RFL y luz (RFL-Luz), la CAT redujo la citotoxicidad de la RFL irradiada en 54% (p<0,001), SOD lo hizo en 40,37% (p<0,001) y L-Hist en 54,34% (p<0,001) (Fig. 4B). Estos resultados sugieren

que las ERO responsables de los efectos tóxicos generados luego del tratamiento fotodinámico con RFL, fueron en especial el $O_2(^1\Delta_g)$ y el H_2O_2 y en menor medida el O_2^- .

Cambios morfológicos inducidos por TFD

Con el objeto de analizar los cambios celulares generados por el tratamiento fotodinámico en los distintos modelos experimentales, se observaron las células al microscopio óptico y al microscopio electrónico de transmisión.

Microscopía Óptica de Alta Resolución

El estudio morfológico de las células del grupo control (Fig. 5A), reveló núcleos activos con cromatina laxa y no se observaron detritus celulares en el medio.

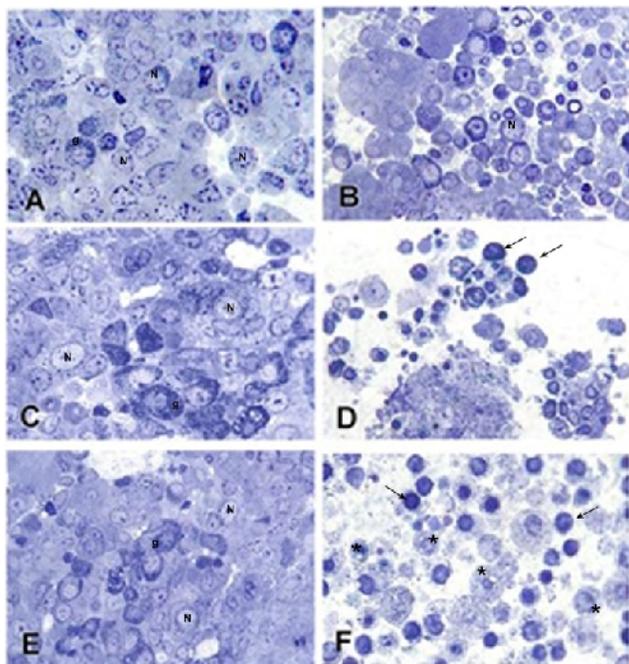


Fig. 5. Microscopía óptica de alta resolución, tinción con azul de toluidina. **A-**Control: Células hipofisarias con características normales. **B-** Células iluminadas con el prototipo 1. **C-** Células tratadas con RF en oscuridad. **D-** Células tratadas con RF e iluminadas. **E-** Células tratadas con RFL en oscuridad. **F-** Células tratadas con RFL e iluminadas. N: Núcleos con cromatina laxa. →: Núcleos hipercrómicos, g: Gránulos secretorios. *: Citoplasma vacuolado.

Las células que sólo fueron iluminadas (Fig 5B), en su mayoría presentaron aspecto normal, membranas conservadas, núcleos con cromatina laxa, nucléolos prominentes y citoplasma con gránulos secretorios. Luego de la incubación con RF sin ser expuestas a la luz (Fig. 5C) las células no presentaron modificaciones estructurales. Sin embargo, las que se incubaron con RF y se irradiaron (Fig. 5D), presentaron en su mayoría núcleos hipercrómicos, pérdida de membranas plasmáticas y citoplasmas vacuolados. Es de destacar la gran cantidad de sustancia amorfa entre las células, que al microscopio electrónico se pudo identificar como restos de material citoplasmático disgregado.

Las células tratadas con RFL y mantenidas en oscuridad (Fig. 5E) preservaron sus características normales mientras que en las tratadas con RFL y expuestas a la luz (Fig. 5F) se observó cambio en el tamaño celular, disminución del volumen citoplasmático y nuclear, y condensación de la cromatina. Algunas células presentaron citoplasma vacuolado.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Las muestras correspondientes a los modelos experimentales fueron analizadas por microscopía electrónica para estudiar los cambios ultraestructurales de las células sometidas a los distintos tratamientos.

Las células controles (Fig. 6a), irradiadas durante 30 min (Fig. 6b), tratadas con RF (Fig. 7a) o con RFL (Fig. 7e), presentaron morfología normal. Los núcleos mostraron predominio de eucromatina, en el citoplasma se observaron gránulos de secreción que permitieron de acuerdo a su tamaño, forma y disposición, identificar el tipo celular. Las mitocondrias, en la mayoría de las células, presentaron tamaño y densidad normal con numerosas crestas. Fue frecuente identificar complejo de Golgi y retículo endoplasmático rugoso (Rer)

desarrollado, lo que indica gran actividad proteinopoyética.

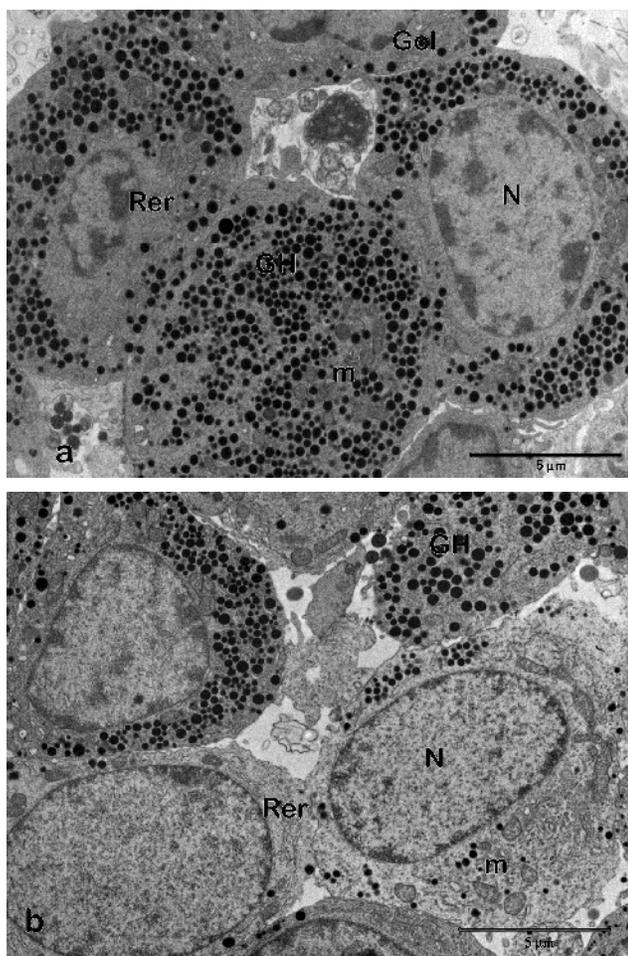


Fig. 6. (a) Células hipofisarias controles, se observan 4 células somatotropas (GH) con citoplasma cargado de gránulos esféricos. (b) Células iluminadas durante 30 min, sin adición de FS. m: mitocondria, N: núcleo, Gol: aparato de Golgi, Rer: retículo endoplasmático rugoso.

En las células tratadas con RF y expuestas por 30 min a la luz (Figura 7 b, c y d), se observaron núcleos con distintos grados de condensación de la cromatina, en algunos casos como los que se muestran en la Fig. 7b, la estructura del núcleo está compuesta en más del 70% por heterocromatina. Se observó además en muchas células, separación de la membrana nuclear formando amplias

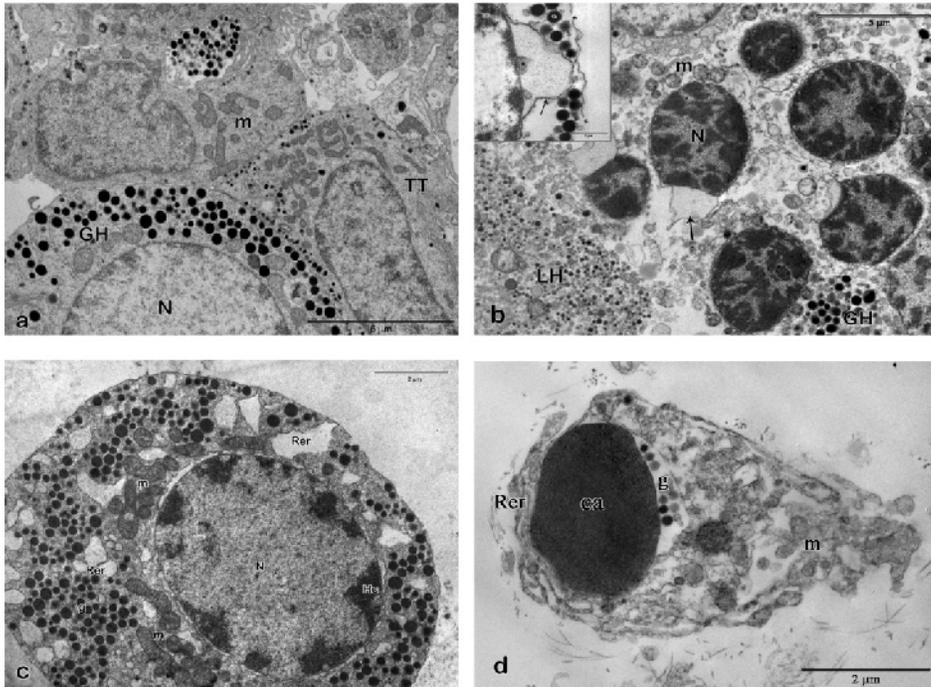
vacuolas electrolucidas (flechas), algunas presentan en su interior cuerpos de moderada electrodensidad y de aspecto granuloso (recuadro Fig. 7b).

Frecuentemente se observó células con dilatación del Rer (Fig. 7c), las que al microscopio óptico toman el aspecto de células vacuoladas. Las mitocondrias y gránulos secretorios presentaron aspecto normal lo que permitió en la mayoría de los casos la identificación del tipo celular (somatotropa, gonadotropa, corticotropa o tirotropa). A nivel citoplasmático se destacó la disrupción de la membrana plasmática y en algunos casos la pérdida de la misma, lo que imposibilitó reconocer los límites celulares (Fig. 7b).

En este modelo se pudo observar algunas imágenes de apoptosis como la que se muestra en la Fig. 7d, con cromatina altamente condensada y conservación de organelas como mitocondrias, Rer y gránulos secretorios. Por último en el grupo de células tratadas con RFL e iluminadas durante 30 min (Figura 7f, g y h) se observaron células con núcleos con alto porcentaje de heterocromatina de distribución periférica, en este modelo también se apreció separación de la membrana nuclear formando grandes vacuolas, en algunos casos con contenido de electrodensidad moderada. Es de destacar la presencia de mitocondrias edematosas que se reconocen por sus crestas.

A menudo se observaron cuerpos apoptóticos y vesículas de diferente tamaño y contenido (Fig. 7h). Debido a la disrupción de la membrana plasmática de muchas de las células se observó frecuentemente contenido citoplasmático disperso.

RIBOFLAVINA HIDROSOLUBLE (RF)



RIBOFLAVINA LIPOSOLUBLE (RFL)

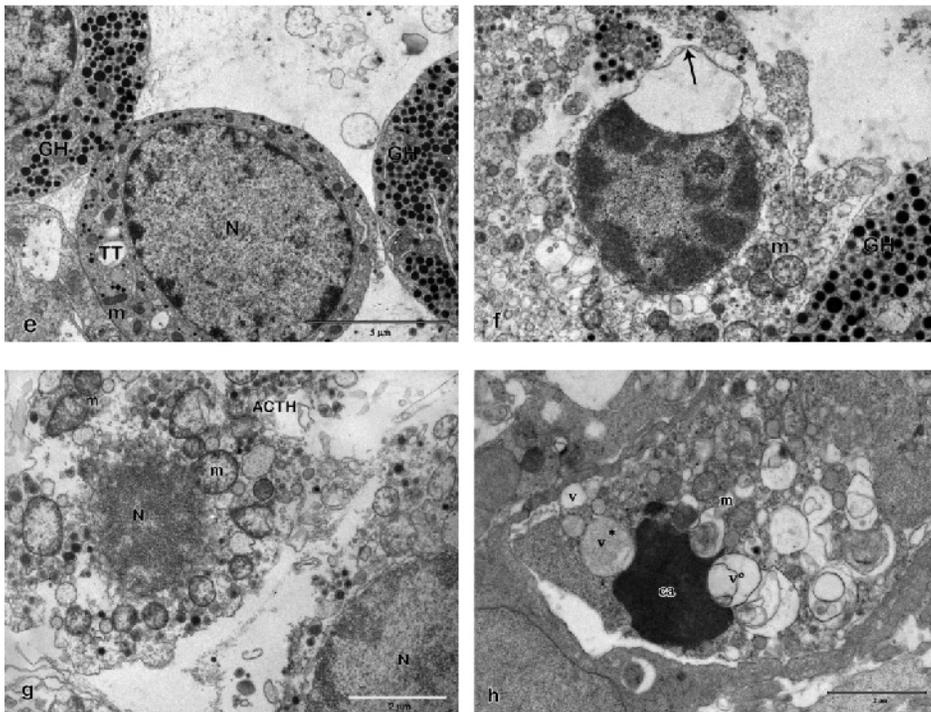


Fig. 7. Riboflavina hidrosoluble (RF) (a) Células hipofisarias incubadas con RF mantenidas en oscuridad. (b-d) Células hipofisarias incubadas con RF e iluminadas durante 30 min. (b) Recuadro: detalle de la separación de la membrana nuclear con cuerpos electrodensos en su interior (*). **Riboflavina Liposoluble (RFL)** (e) Células hipofisarias incubadas con RFL. (f-h) Células hipofisarias incubadas con RFL e iluminadas durante 30 min. m: mitocondria, N: núcleo, Gol: aparato de Golgi, Rer: retículo endoplasmático rugoso. g: gránulo secretor, ca: cuerpo apoptótico. GH: célula somatotropa, LH: célula gonadotropa, TT: célula tirotrópica., ACTH: célula corticotropa, → membrana nuclear. V: vesícula, * contenido granular, ° contenido membranoso.

DISCUSION

En este trabajo se analizaron dos drogas fotosensibles, su citotoxicidad y generación de ERO. En la curva que se obtuvo al iluminar una solución de 3-OHP y RF con luz de 460 nm y 10 mW/cm², se observó que la señal de absorbancia de 3-OHP decayó, esto se produciría debido a la fotooxidación de la 3-OHP en presencia de RF por un proceso que involucra la formación de O₂(¹Δ_g). En este proceso el sensibilizador en estado triplete (³RF*) transfiere la energía al oxígeno en estado basal generando el O₂(¹Δ_g), el cual puede relajarse por interacciones químicas o físicas, con un sustrato, 3-OHP, o por colisión con moléculas de solvente [14]. Además en otros procesos, por transferencia electrónica con la RF, se pueden formar O₂⁻ y H₂O₂.

En el caso de la RFL se utilizó DMA un sustrato liposoluble sensible a las ERO. Este compuesto es un actinómetro que se utiliza para medir constantes de reacción química entre el oxígeno activado y un sustrato [17]. En la curva de fotólisis del DMA por ERO generados a partir de la activación de la RFL, se observó una notoria pérdida de la actividad atribuible a la generación de ERO.

Al ser incubadas las células con RF o RFL e iluminadas se observó una disminución de la viabilidad del 79,45% y 78,10% respectivamente, lo que demuestra la alta efectividad citotóxica de estos FS excitados por la luz.

Para constatar la generación de ERO se incubaron las células con diferentes sustancias antioxidantes, lo que redujo significativamente la citotoxicidad generada por la TFD. Esto demostró que la muerte celular fue debida a la producción de las tres especies reactivas estudiadas (O₂(¹Δ_g), O₂⁻ y H₂O₂.) sin predominio de ninguna de ellas en particular.

El análisis ultraestructural de las alteraciones morfológicas celulares a través de la técnica de microscopía electrónica de transmisión, constituye un instrumento de indudable valor en la profundización del

estudio de la muerte celular. Basados en las diferencias ultraestructurales que presentan ambos mecanismos de muerte, se realizó un detallado estudio por MET de células adenohipofisarias sometidas al tratamiento fotodinámico, donde se pudo observar las características que presentaron las mismas luego de los tratamientos fotodinámicos. A nivel nuclear ambos grupos de células tratadas con RF o RFL e iluminadas se comportaron de manera similar, presentando condensación de la cromatina, separación de la membrana nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Sin embargo a nivel citoplasmático las células tratadas con RF presentaron frecuentemente Rer dilatado. El Rer es un importante sensor de estrés celular que puede detener la síntesis proteica y el metabolismo para reestablecer la homeostasis celular [18]. Incluso puede desencadenar apoptosis si el daño es muy intenso, iniciándose como respuesta a proteínas no plegadas o vía liberación de calcio en el citoplasma [12].

En el tratamiento de RFL iluminada, lo más significativo fue la respuesta de las mitocondrias ya que presentaron abalanzamiento, disminución de las crestas y en algunos casos ruptura de sus membranas. El exceso mitocondrial de ERO, puede dañar el ADN mitocondrial y esto puede llevar a la activación de p53, la cual puede causar apoptosis y detención del ciclo celular [19].

En ambos modelos se observó ruptura e incluso pérdida de las membranas plasmáticas, esto se puede atribuir a la acción de las ERO que también modifican los dobles enlaces de los ácidos grasos poli-insaturados. La oxidación de lípidos puede producir la pérdida de la integridad de la membrana plasmática.

CONCLUSIONES

Los efectos citotóxicos de ambas riboflavinas fotoactivadas, demostraron ser mediados por ERO, las cuales condujeron a la disminución de la viabilidad celular y generación de muerte celular por distintas vías, en

especial necrosis y apoptosis. Esto nos permite proponer a la RF y su ester derivado como FS en TFD.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permitieron por un lado, determinar la eficacia de la RF y RFL como fotosensibilizadores en TFD y por otro, introducir modificaciones en el método de aplicación, determinando la dosis del FS, el modo de administración y el tiempo de exposición a la irradiación lumínica, lo que se traducirá en mejoras sustanciales en la respuesta al tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a las técnicas: Mercedes Guevara, Elena Pereyra y Lucia Artino por el excelente aporte técnico.

Este trabajo se ha realizado con fondos de subsidios otorgados por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] 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: 83-102.
- [2] Nowis D., Makowski M., Stoklosa T., Legat M., Issat T., Gola J. (2005) "Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy" *Acta Bioch. Pol.* 52(2):339-352.
- [3] Dmitri V Sakharov D.V., Bunschoten A., van Weelden H., Wirtz K.W.A (2004) "Photodynamic treatment and H₂O₂-induced oxidative stress result in different patterns of cellular protein oxidation" *Europ. J. Biochem.* 270(24):4859-4865.
- [4] Pittau, R.F., Pons, P., Boeto, N., Aoki, A. (1998) "Inexpensive light source for oncologic photodynamic therapy" *Engineering Med. & Biol.* 17(3): 105-106.
- [5] Pons P., Pittau R.F., Boetto N., Garzón R., Aoki A. "Prototipo de fuente lumínica para terapia fotodinámica diseñado en el centro de microscopía electrónica" *Rev. Fac. Cienc. Méd. Córdoba*, 57 (1): 31-36.
- [6] Pons P., Pittau R.F., Boetto N., Garzón R., Aoki A. (2001) "Terapia fotodinámica de neoplasias dérmicas. Experiencia de dos años" *Rev. Argent. Dermatol.* 82: 208-215.
- [7] Juarranz A., Jaén P., Sanz-Rodríguez F., Cuevas J., González S. (2008) "Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications" *Clin. Transl. Oncol.* 10(3):148-54.
- [8] Buytaert E., Callewaert G., Vandenhede J.R., Agostinis P. (2006) "Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum" *Autophagy* 2(3):238-40.
- [9] Kessel, D., M.G. Vicente, and J.J. Reiners, Jr. (2006) "Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy" *Lasers. Surg. Med.* 38(5):482-488.
- [10] Luthi, A.U. Martin, S.J., (2007) "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates" *Cell. Death. Differ.* 14(4): 641-50.
- [11] Golstein, P. Kroemer, G., (2007) "Cell death by necrosis: towards a molecular definition" *Trends. Biochem. Sci.* 32(1): 37-43.
- [12] De Toro, G., (2006) "Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular" *Actas Hispanoamericanas de patología* 1:1-6.
- [13] Onzaga, I.I., Rincón, J.Guerrero, M.F., (2008) "Perfil vasodilatador del extracto y la fracción flavonoide acetilada iobtenida de *Calea prunifolia* HBK" *Colombia Médica* 39(001): 33-40.
- [14] Pajares A., Gianotti J., Haggi E., Amat-Guerri F., Bertolotti S., Garcia N., (1999) "Visible light-

- promoted interactions between riboflavin and 3-hydroxypyridine in aqueous solution" *Dyes. Pigm.* 41:233-239.
- [15] De Paul, A., Pons, P., Aoki, A.Torres, A., (1997) "Different behavior of lactotroph cell subpopulations in response to angiotensin II and thyrotrophin-releasing hormone" *Cell Mol Neurobiol* 17 (2): 245-58
- [16] Cho, K.S., Lee, E.H., Choi, J.S.Joo, C.K., (1999) "Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells" *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (5): 911-9
- [17] Gunther, S., Lemp, M.Zanocco, A., (2000) "On the use of 9,10-dimethylanthracene as chemical rate constant actinometer in singlet molecular oxygen reactions." *Bol. Soc. Chil. Quím.* 45 (4): 637-644
- [18] Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S.Walter, P., (2000) "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation" *Cell* 101 (3): 249-58
- [19] Waring, P., (2005) "Redox active calcium ion channels and cell death" *Arch Biochem Biophys* 434 (1): 33-42.