

Desarrollo de formulaciones liposomales para aplicación en terapia fotodinámica

Defain Tesoriero, M.V.⁽ⁱ⁾; Casas, A.⁽ⁱⁱ⁾; D´Orio, M.⁽ⁱ⁾; Fukuda, H.⁽ⁱⁱ⁾; Di Venosa, G.⁽ⁱⁱ⁾; Batlle, A.⁽ⁱⁱ⁾; Hermida, L.⁽ⁱ⁾.

⁽ⁱ⁾INTI-Química

⁽ⁱⁱ⁾Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias (CIPYP), Universidad de Buenos Aires-CONICET – Argentina

Introducción

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento antineoplásico sumamente prometedor, y se basa en la acumulación preferencial de un fotosensibilizante en el tejido maligno luego de su administración [1]. La iluminación subsecuente con una luz de longitud de onda adecuada, da lugar a una reacción fotoquímica que produce la destrucción selectiva del tejido tumoral.

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es el precursor en la síntesis de porfirinas, que son los fotosensibilizantes más empleados [2]. De esta manera se induce la acumulación selectiva de los tetrapirroles sintetizados endógenamente en el tumor, sin los efectos colaterales de los tratamientos con porfirinas.

Para realizar aplicaciones tópicas de estos productos sería necesario atravesar el estrato córneo de la piel, altamente lipofílico. El ALA es una molécula hidrofílica, de manera que su penetración a través del mismo y su entrada a las células pueden ser mejorados mediante dos estrategias posibles: a) la esterificación con alcoholes de cadena larga que incrementen su lipofilidad [3] y b) la incorporación a liposomas del ALA o sus derivados.

El objetivo de este trabajo fue elaborar distintas formulaciones liposomales de ALA y su derivado Hexil ALA. Se evaluó el porcentaje de incorporación de las distintas formulaciones. Luego se estudió la eficacia sobre la síntesis de porfirinas en una línea celular tumoral expuesta al ALA y sus derivados en forma libre o liposomal.

Descripción Experimental

Preparación de liposomas

La fosfatidilcolina (PC) empleada se preparó y purificó en el laboratorio a partir de yema de huevo^[4]. Los otros lípidos empleados (Avanti Polar o SIGMA) fueron ácido fosfatídico de huevo (PA), fosfatidilglicerol (PG) y colesterol.

Los liposomas se prepararon por el método convencional de formación del film en solvente orgánico, y posterior extrusión por membranas de policarbonato de 800 nm. La concentración utilizada fue: lípidos, 20 mg/ml, ALA, 0,6 mM y Hexil ALA, 0,22 mM.

Caracterización de los liposomas

Para evaluar el porcentaje de ALA o Hexil ALA incorporado, se separó la sustancia libre de la liposomada mediante cromatografía de exclusión molecular, determinando posteriormente el contenido de fosfolípidos por el método de Stewart^[5] y el de ALA o Hexil ALA mediante el reactivo de Ehrlich, según el método descrito anteriormente^[6].

Línea celular y cultivo celular

La línea celular LM3 de adenocarcinoma murino fue cultivada en medio de Eagle a 37°C en atmósfera 5% CO₂. Las células fueron utilizadas 48 h después de sembradas, incubándolas con los compuestos libre o liposomados 3 hs a 37°C (ver Fig.3).

Quantificación de la producción de porfirinas

La producción de porfirinas intra y extracelulares fue determinada fluorimétricamente utilizando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-510, con longitud de onda de emisión a 604 nm y longitud de onda de excitación a 406 nm^[6].

Resultados

En la Tabla I se observa que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de incorporación para liposomas preparados con ALA, independientemente de su composición. En el caso del Hexil ALA, la incorporación de fosfolípidos con carga negativa (PA y PG) aumenta significativamente los porcentajes de incorporación, lo cual habla de una mayor afinidad del derivado por la bicapa lipídica del liposoma.

Tabla I. Porcentaje de incorporación para distintos tipos de liposomas conteniendo ALA y Hexil ALA.

Composición lipídica	ALA	Hexil ALA
PC (100)	-	28,3
PC/PA (60:40)	24,0	84,7
PC/PA (80:20)	19,4	-
PC/PA/Chol (80:20:20)	19,8	-
PC/PG (60:40)	-	76,5

Para el ALA, no hay diferencias en la producción de porfirinas intracelulares ALA libre, ALA + liposomas vacíos y ALA liposomado, mientras que el nivel hallado para porfirinas totales es mayor con la presencia de lípidos, debido al aumento en porfirinas extracelulares (ver Fig. 1).

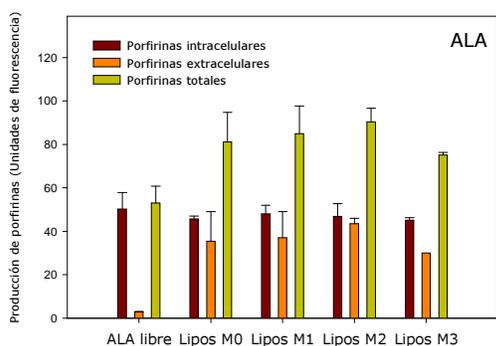


Fig. 1: Producción de porfirinas en células LM3 incubadas 3 hs a 37°C con ALA libre o liposomado. M0: liposomas PC-PA (80:20) vacíos + ALA, M1 : liposomas c/ALA PC-PA (80:20), M2 : liposomas c/ALA PC-PA (60:40), M3 : liposomas c/ALA PC-PA-colesterol (60:20:20).

En el caso del Hexil ALA, la producción total de porfirinas es similar para muestras liposomadas que para la sustancia libre (ver Fig.2).

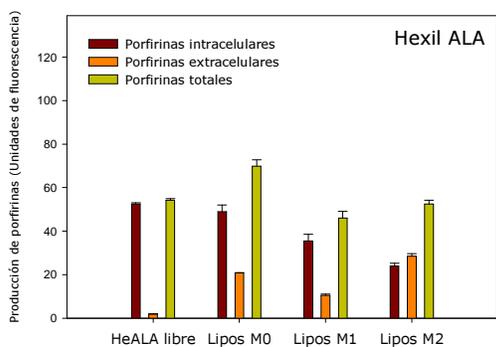


Fig. 2: Producción de porfirinas en células LM3 incubadas 3 hs a 37°C con Hexil ALA libre o liposomado. M0: liposomas PC vacíos + Hexil ALA, M1: liposomas c/Hexil ALA - PC, M2: liposomas c/Hexil ALA PC-PA (60:40)

En el caso de la formulación con fosfolípidos con carga negativa (M2), los niveles de porfirinas intra y extra celulares son muy similares.

Conclusiones

La sola presencia de fosfolípidos aumentaría la

producción total de porfirinas, sin importar si están o no asociados al ALA (bajos % de incorporación).

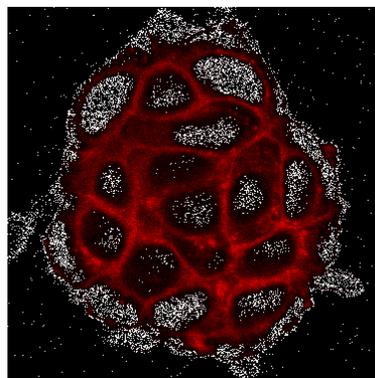


Fig.3: Microfotografía por microscopía confocal de fluorescencia de células LM3 incubadas con ALA (0,6 mM) durante 3 h. Se observa que la protoporfirina producida se acumula principalmente en membrana y mitocondrias, pero no en núcleo.

Esto se debe al incremento de porfirinas extracelulares, hecho que confirma datos de bibliografía en los que se muestra la salida de porfirinas hacia el exterior celular mediada por la presencia de fosfolípidos^[7].

Por lo tanto, sería interesante evaluar si este efecto se mantiene en formulaciones tópicas aplicadas a modelos de tumores de piel. Teniendo en cuenta los bajos % de incorporación obtenidos para ALA, se podría presuponer que estos liposomas no favorecerán el pasaje de esta sustancia (molécula altamente hidrofílica) a través del estrato córneo. Por el contrario, la interacción entre liposomas con carga negativa y Hexil ALA podría ser la clave para atravesar la barrera del estrato córneo. Una vez alcanzadas las células tumorales, se esperaría una respuesta similar al Hexil ALA libre en la producción de porfirinas totales, que al ser irradiadas con una luz de longitud de onda adecuada, provocarían la destrucción selectiva del tumor

Referencias

- [1] T. Dougherty, "Photodynamic Therapy-new approaches" *Semin. Surg. Oncol*, 5: 6-16, (1989)
- [2] J. Kennedy, S. Marcus, R. Pottier, "Photodynamic therapy and photodiagnosis using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid: mechanisms and clinical results" *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14: 289-304, (1996).
- [3] A. Casas, A. Batlle, "Rational design of 5-aminolevulinic acid derivatives aimed at improving" Photodynamic Therapy. *Curr Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 2: 465-475, (2002)
- [4] W.S. Singleton, M.S. Gray, M.L. Brown, J.L. White, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42: 53, (1965)
- [5] J.C.M. Stewart, "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate". *Analytical Biochemistry* 104:10-14 (1980).
- [6] C. Perotti, H. Fukuda, G. Di Venosa, A. MacRobert, A. Batlle, A. Casas "Porphyrin synthesis from ALA derivatives for photodynamic therapy. In vitro and in vivo studies" *Br. J. Cancer*, 90: 1660-1665 (2004).
- [7] H. Fukuda, A. Batlle, P. Riley, "Kinetics of porphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA" *Int. J. Biochem.*, 25: 1407-1410 (1993).

Para mayor información contactarse con:
María Victoria Defain Tesorero mvd@inti.gov.ar