

*Estudio in vitro del riesgo de
fototoxicidad de fármacos*

Introducción

Fototoxicidad (mecanismos y técnicas de valoración)

Peroxidación Lipídica (Daño celular)

Modificación de proteínas (Fotoalergia)

Daño al ADN (Fotogenotoxicidad)

Fotogenotoxicidad

SSB

Comet Assay

Secuenciación

Fotoalergia

Diferenciación (reacciones fotoalérgicas/fotoirritantes)

Sensibilización y proliferación linfocitos

Fototoxicidad Sistémica

FOTOSENSIBILIZACIÓN

Existen compuestos, que sin tener un efecto tóxico por si mismos, son capaces de absorber radiación ultravioleta y producir un efecto adverso (toxicidad).

Fármaco

Sin efecto tóxico

Luz

Sin efecto tóxico

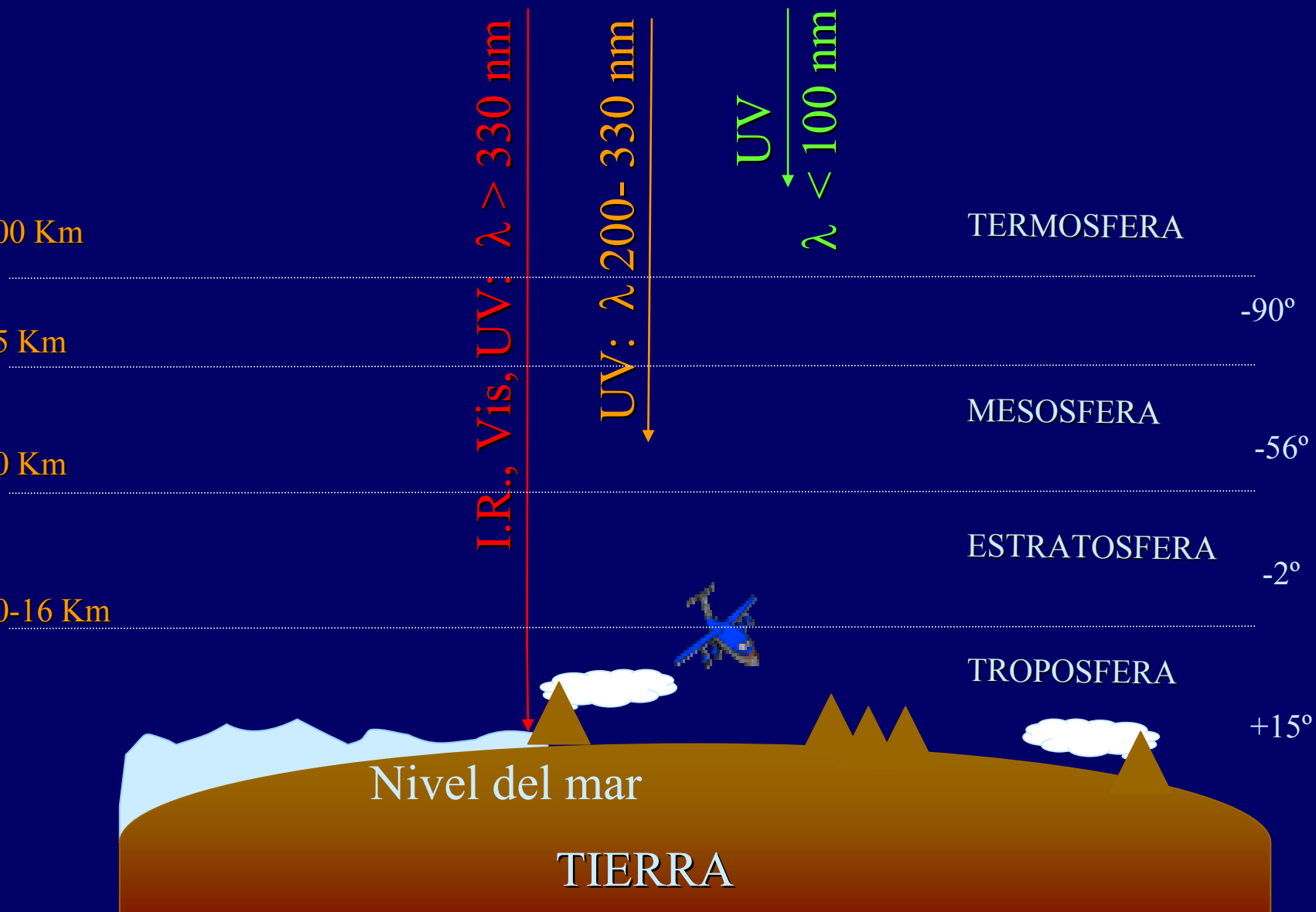
Fármaco + Luz

Toxicidad

Riesgos Fotobiológicos



Radiación Solar



Espectro Solar

Infrarrojo (IR): Longitud de onda > 760 nm

Visible (Vis): 400 - 760 nm

Ultravioleta (UV):

UV-A: 320 - 400 nm *

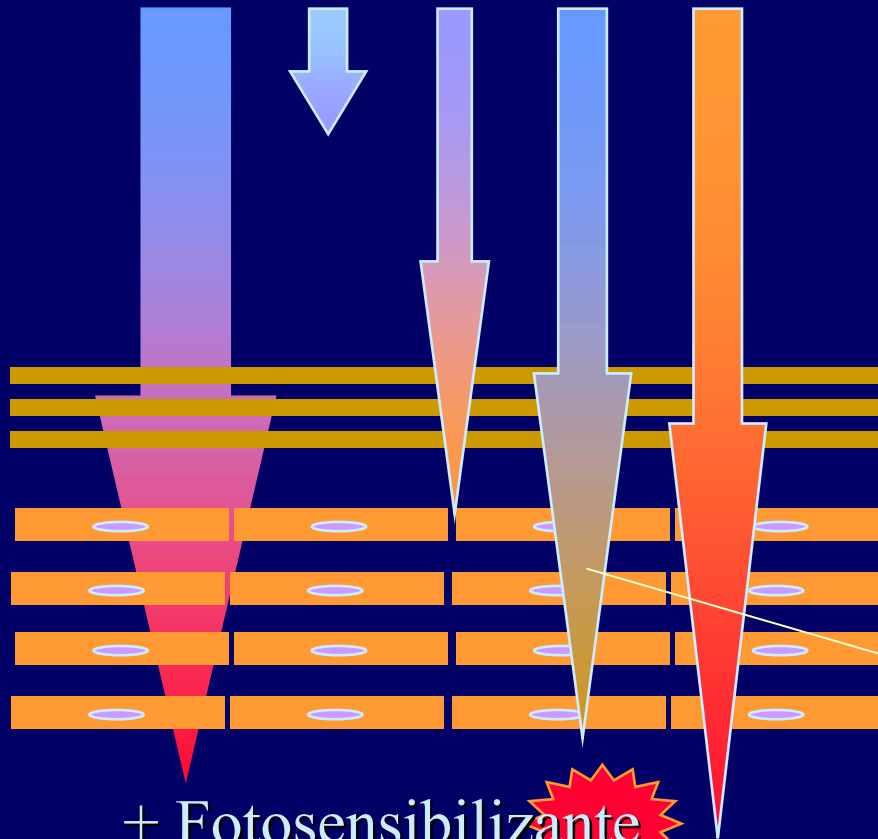
UV-B: 290 - 320 nm (absorbida estrato corneo)

UV-C: < 290 nm (filtrada por la atmósfera)

Radiación Solar y la Piel



UVC UVB UVA VIS



⇒ UVC: no llega a la piel

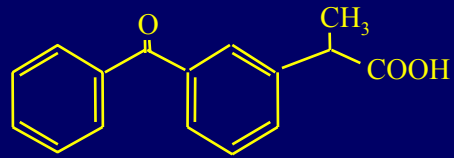
⇒ UVB: eritema, quemaduras

*⇒ UVA/VIS: fototoxicidad,
fotoalérgia*

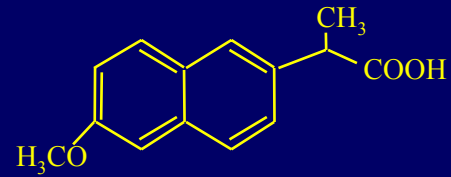
*UVA/VIS: Alcanza capilares
sanguíneos*

FARMACOS FOTOSENSIBILIZANTES

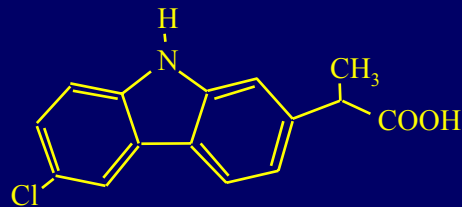
AINES



Ketoprofeno



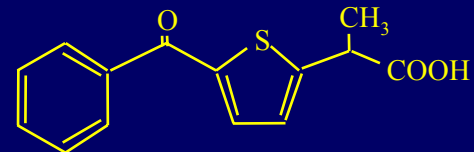
Naproxeno



Carprofeno

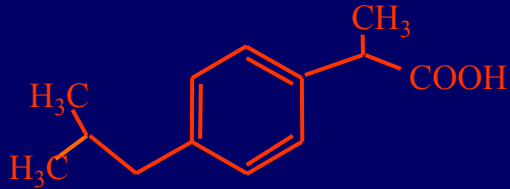


Suprofeno

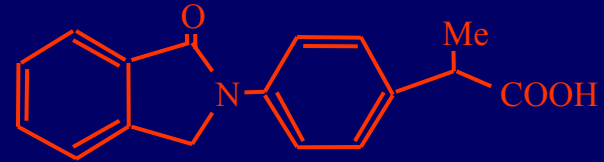


Acido Tiaprofénico

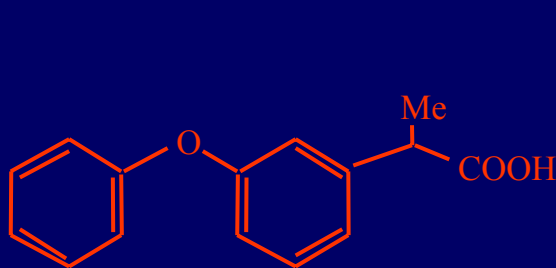
FARMACOS NO FOTOSENSIBILIZANTES



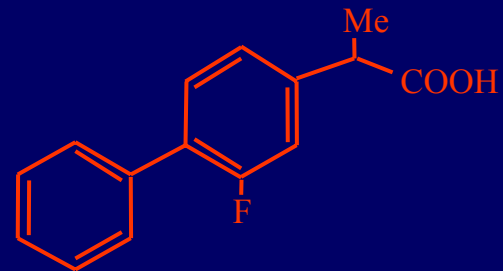
Ibuprofeno



Indoprofeno

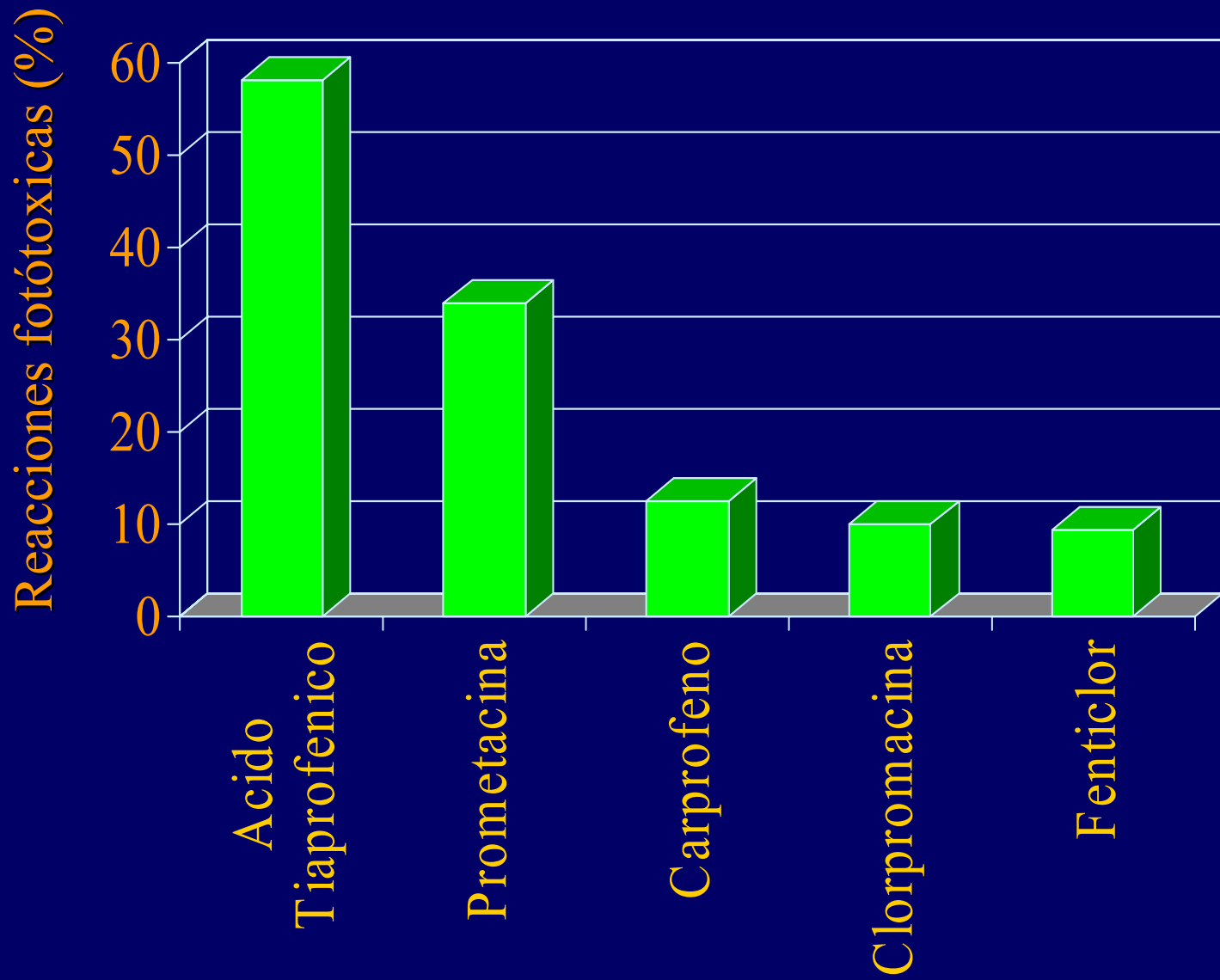


Fenoprofeno



Flurbiprofeno

REACCIONES FOTOTOXICAS



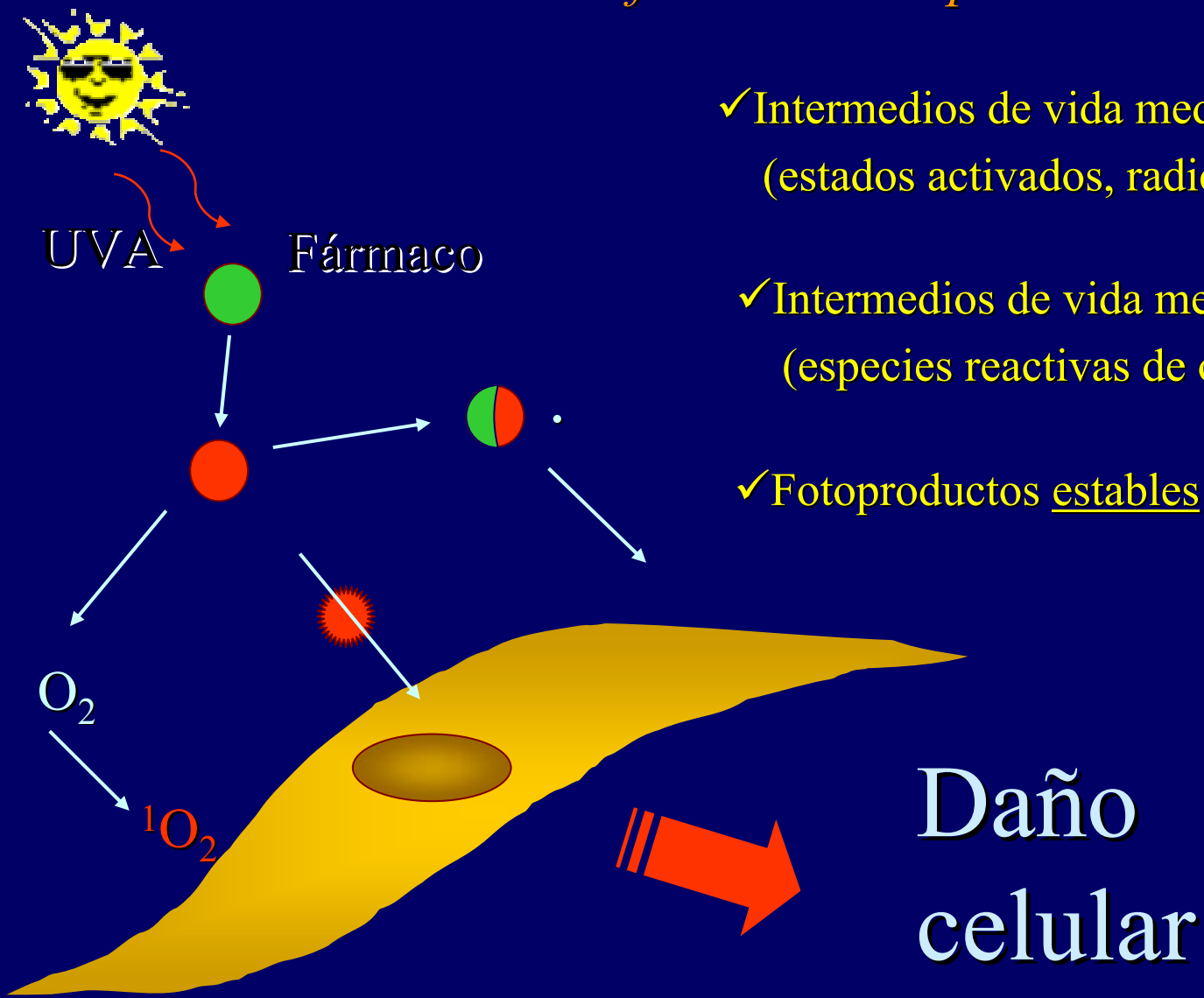
FOTOTOXICIDAD (ley de Grotthus)

Los efectos tóxicos pueden ser debidos a:

✓ Intermedios de vida media muy corta
(estados activados, radicales etc.)

✓ Intermedios de vida media corta
(especies reactivas de oxígeno)

✓ Fotoproductos estables



Estrategia racional para investigar los efectos fotobiológicos de nuevos compuestos

Los efectos biológicos producidos por un compuesto fototóxico, van a depender de la contribución de los siguientes factores:

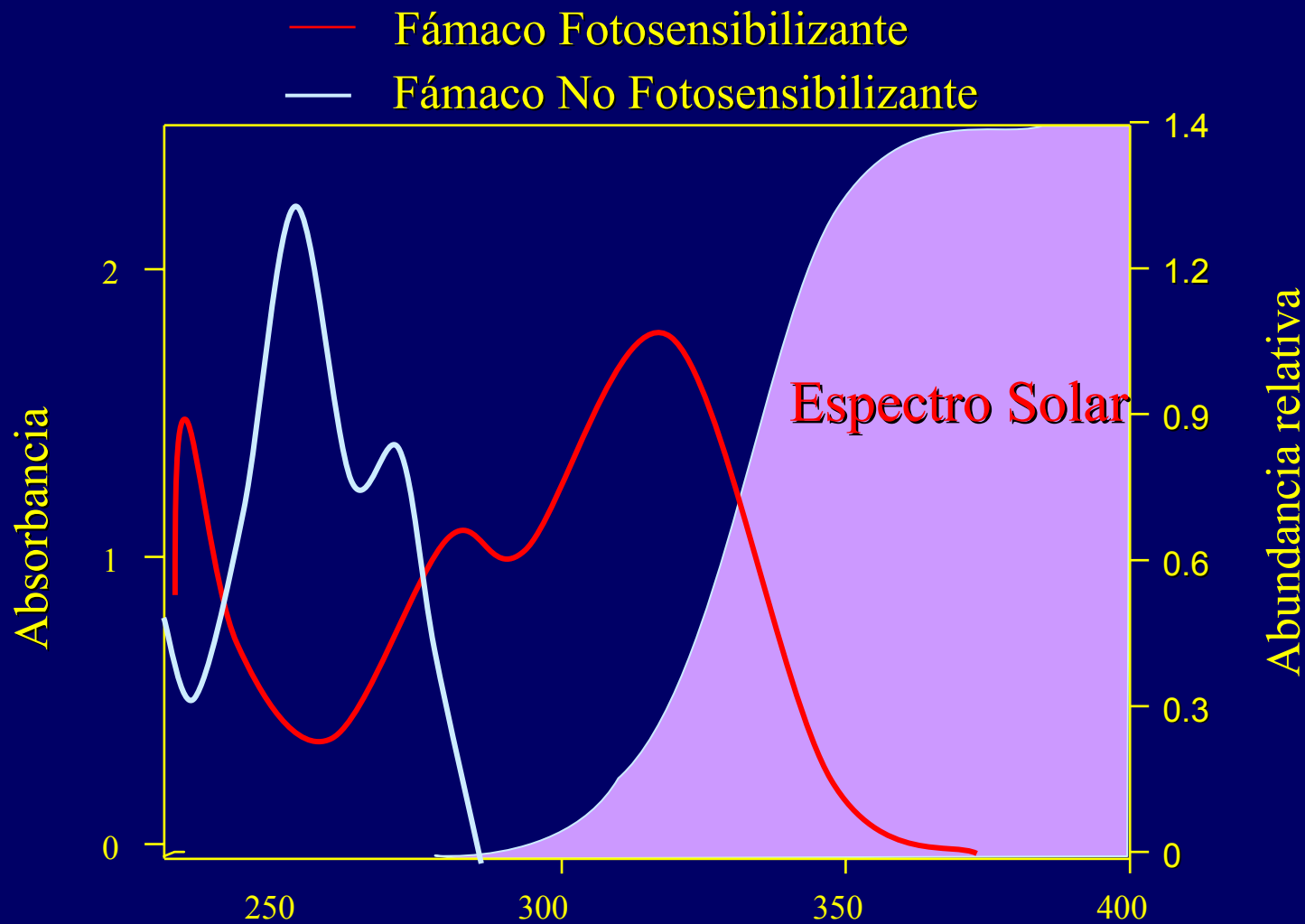
- La intervención relativa de las foto-reacciones primarias
- La accesibilidad del compuesto fotoactivado al lugar de acción
- El grado de daño causado a biomoléculas

Estrategia racional para investigar los efectos fotobiológicos de nuevos compuestos (II)

- Propiedades Fotofísicas
- Estudios Fotoquímicos con biomoléculas
- Correlación estructura/actividad
- Fotosensibilización in vitro (*aguda*) efectos citotóxicos
- Fotogenotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis
- Efectos inmunológicos inducidos por la luz
- Fototoxicidad sistémica; fototoxicidad de metabolitos

Investigación *in vitro* del potencial fototóxico de fármacos

Superposición de los espectros de absorción de fármacos y el espectro de luz solar incidente en la piel



Fototoxicidad

Fármaco*  **Daño Celular** (interacción con Lípidos, Proteínas o DNA)

Daño celular. Técnicas de análisis

Peroxidación Lipídica

Modificación de proteínas (Foto-unión)

Daño al ADN (Foto-genotoxicidad)

Fototoxicidad

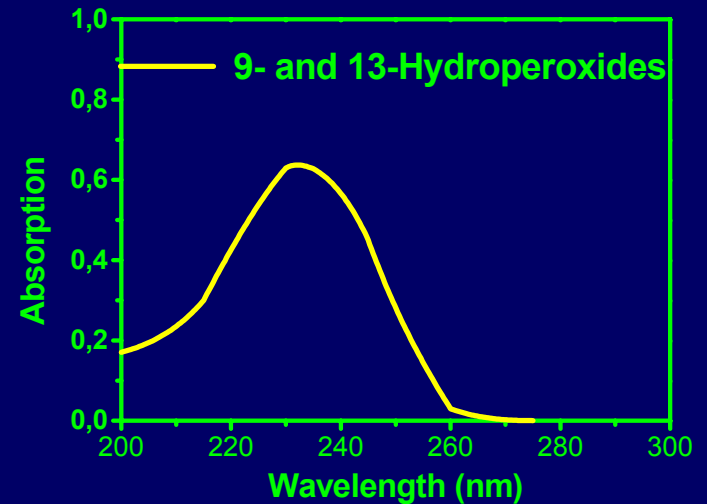
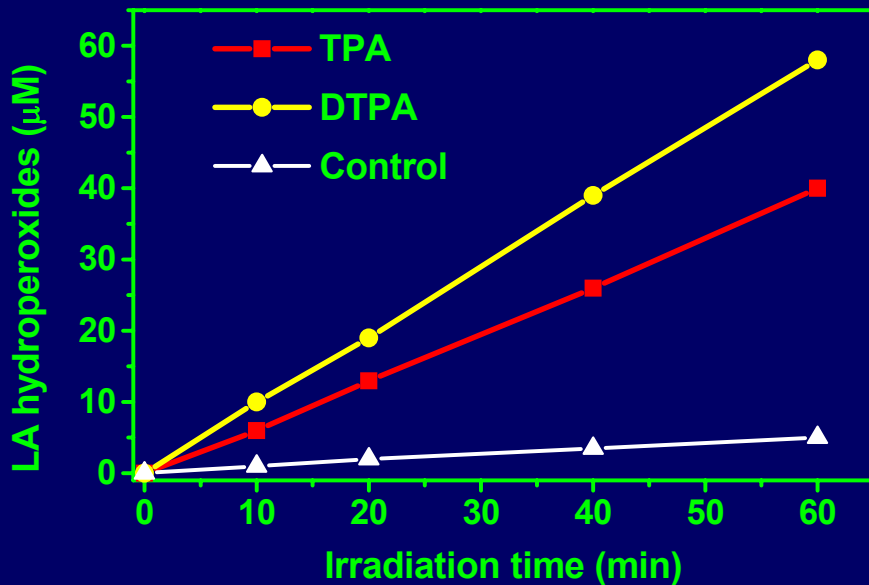
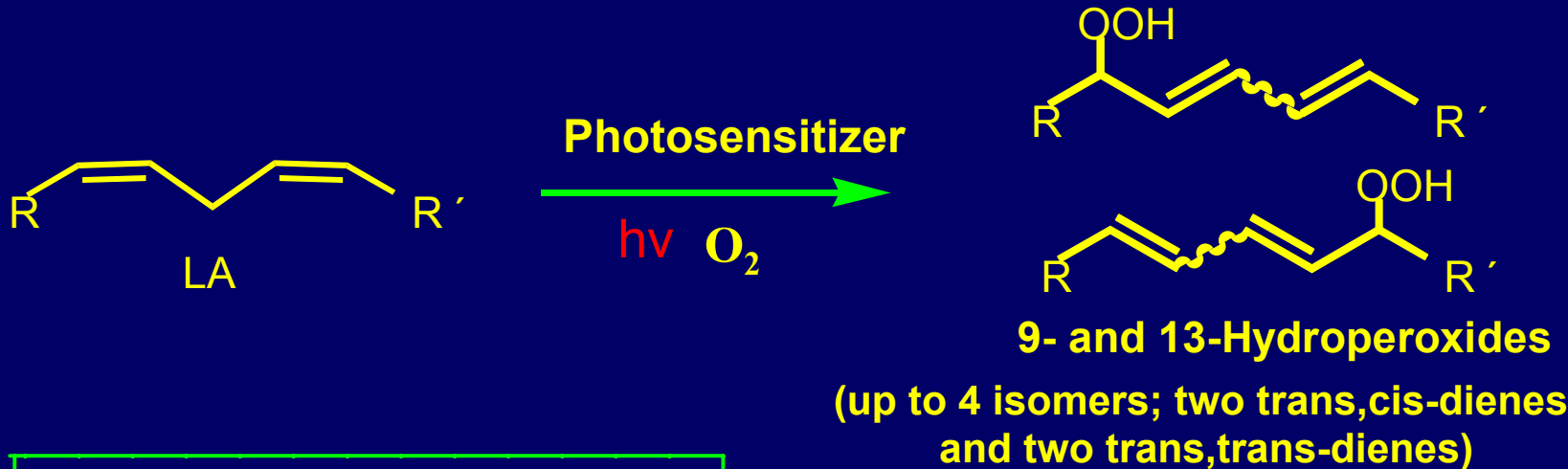
- > Fármaco* interacciona con Lípidos Proteínas o ADN (Daño Celular)
- > Mecanismos y técnicas de valoración del daño celular

Peroxidación Lipídica

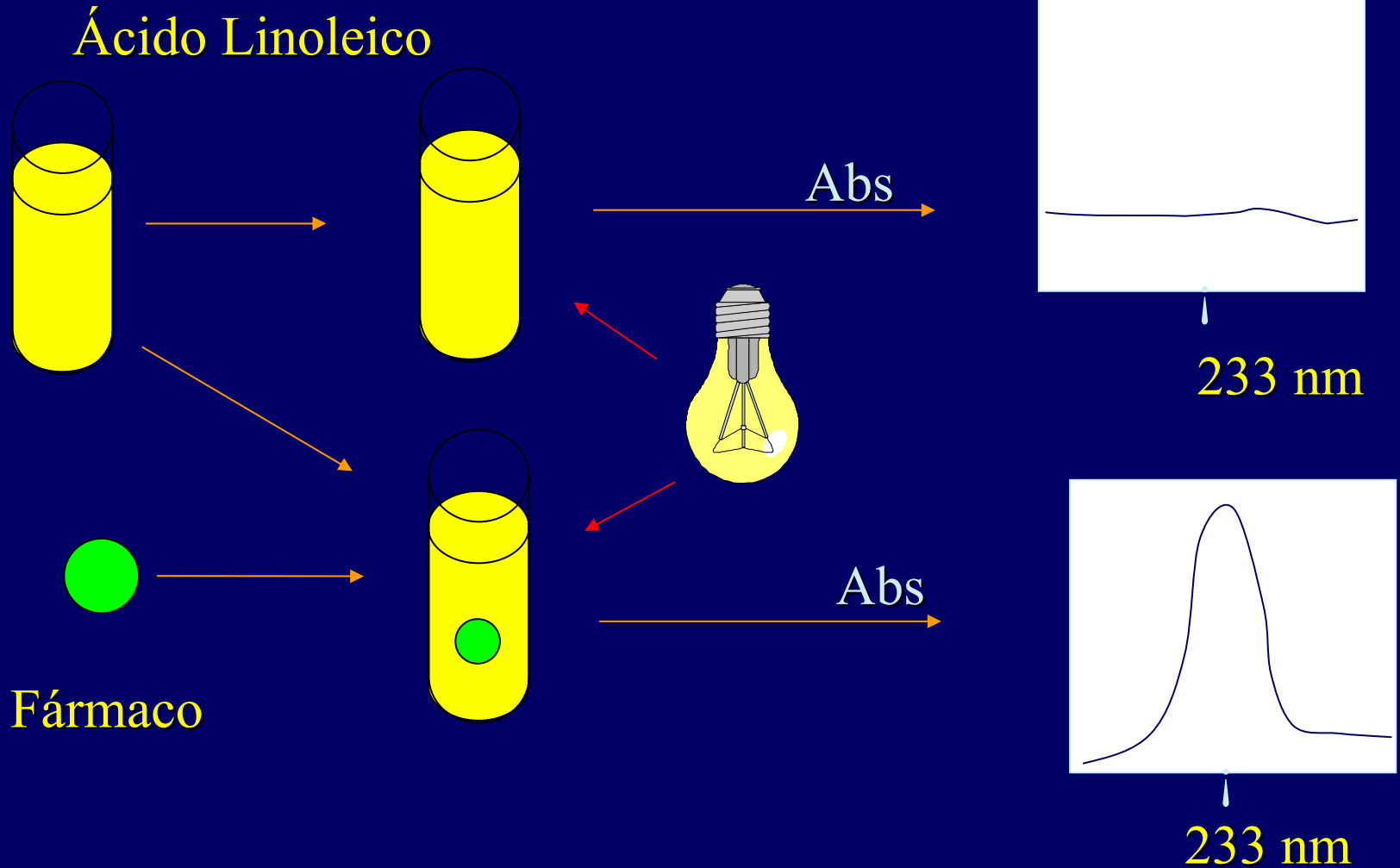
Modificación de proteínas (Foto-unión)

Daño al ADN (Foto-genotoxicidad)

(D) TPA Fotosensibiliza la Peroxidación de los ácidos grasos (ac. Linoléico)



Fotoperoxidación Lipídica



Fototoxicidad

- > Fármaco* interacciona con Lípidos Proteínas o ADN (Daño Celular)
- > Mecanismos y técnicas de valoración del daño celular

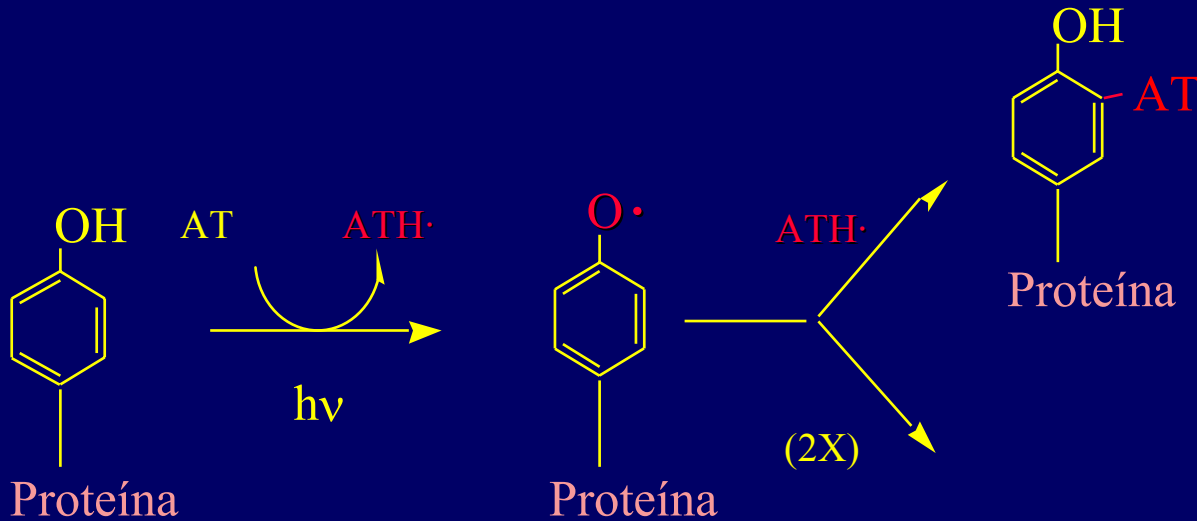
Peroxidación Lipídica

Modificación de proteínas (Foto-unión)

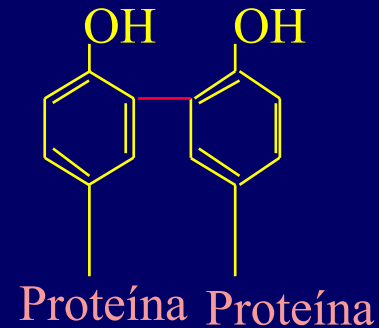
Daño al ADN (Foto-genotoxicidad)

Modificaciones de proteínas

➤ Tyr, Trp, His



Unión covalente



Fotocrosslinking

- *Chem. Res. Toxicol.* 11, 172-177 (1998).
- *Eur. J. Org. Chem.*, 497-502 (1999)

Foto-unión a proteínas (unión covalente)

Espectrofotometría / Fluorimetría (previa purificación o extracción)

Dot blot / western blot *

ELISA *

Radioactividad (compuestos marcados)

Foto-unión a células

Visualización directa al microscopio (solo compuestos fluorescentes)

Inmunotinción *

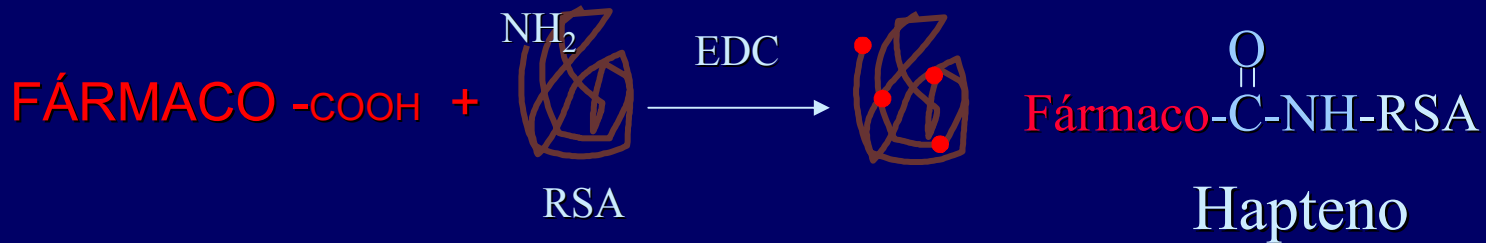
Dot blot / western blot *

Citometría de flujo *

* Son necesarios anticuerpos específicos

Obtención de Anticuerpos Fármaco-Específicos

Formación de aductos



Inmunización de los conejos

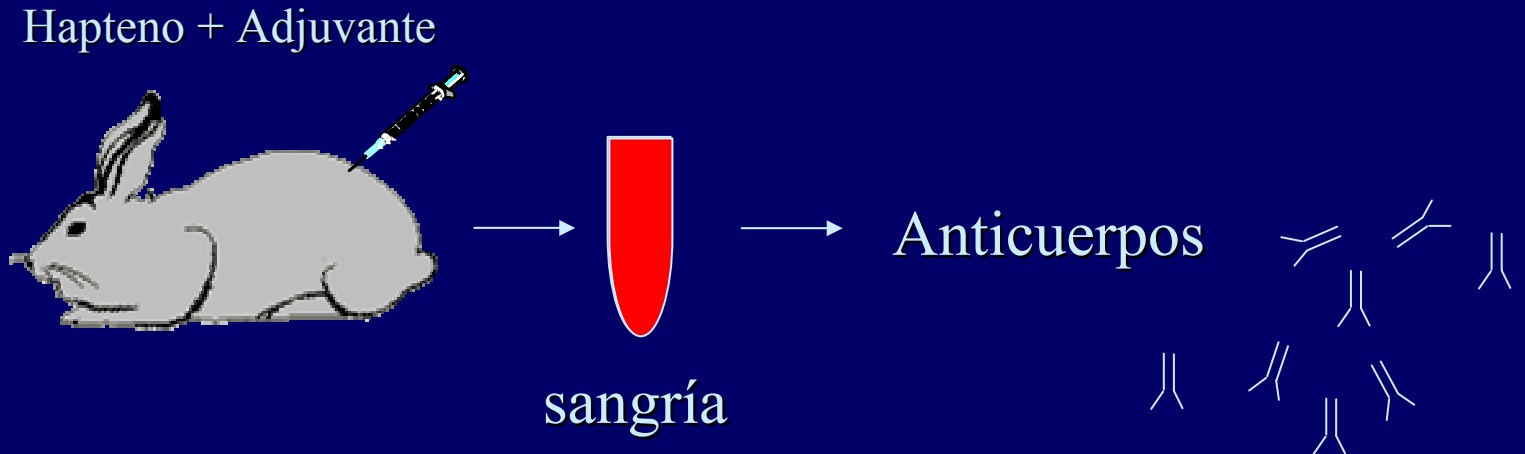
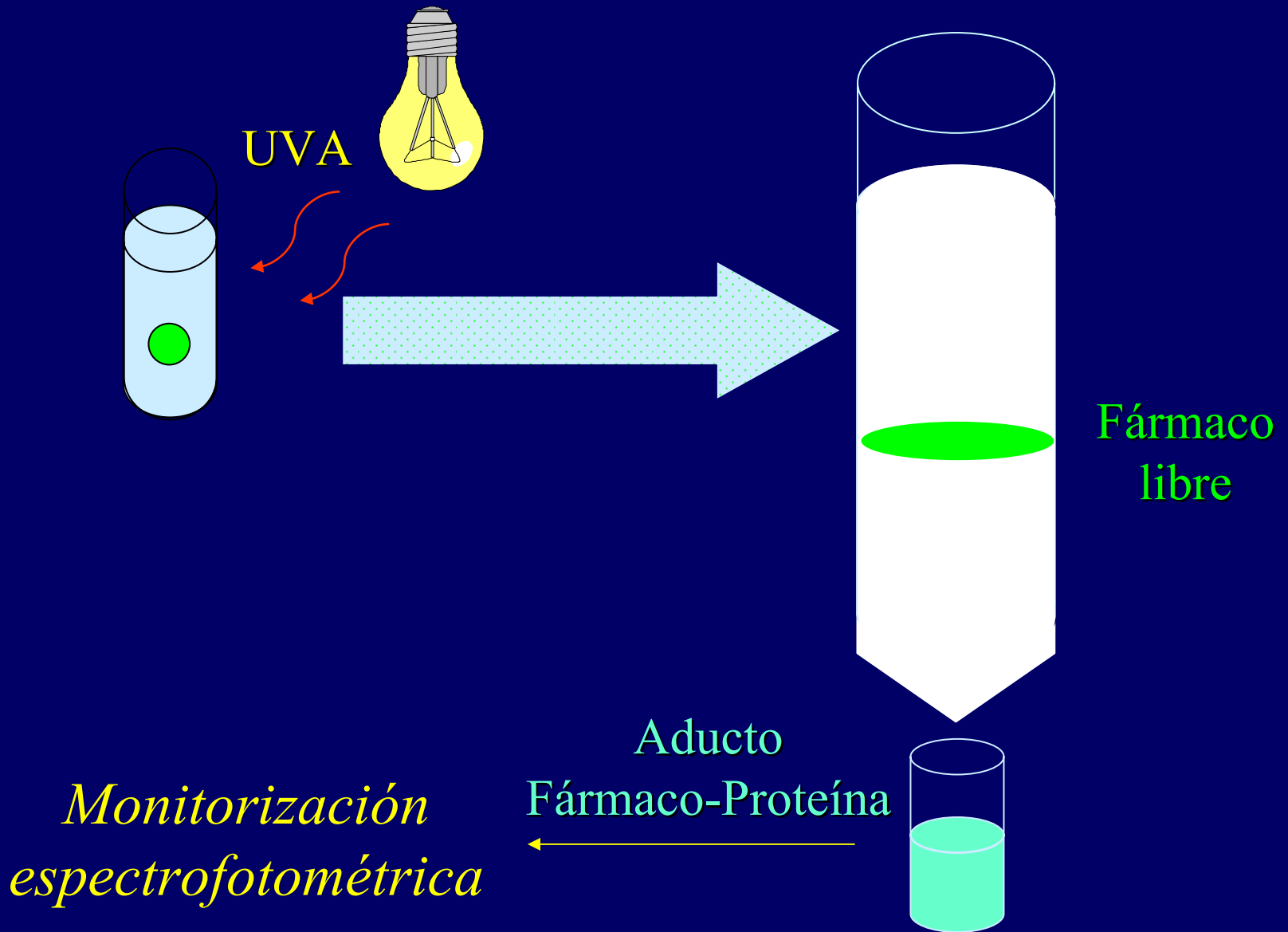
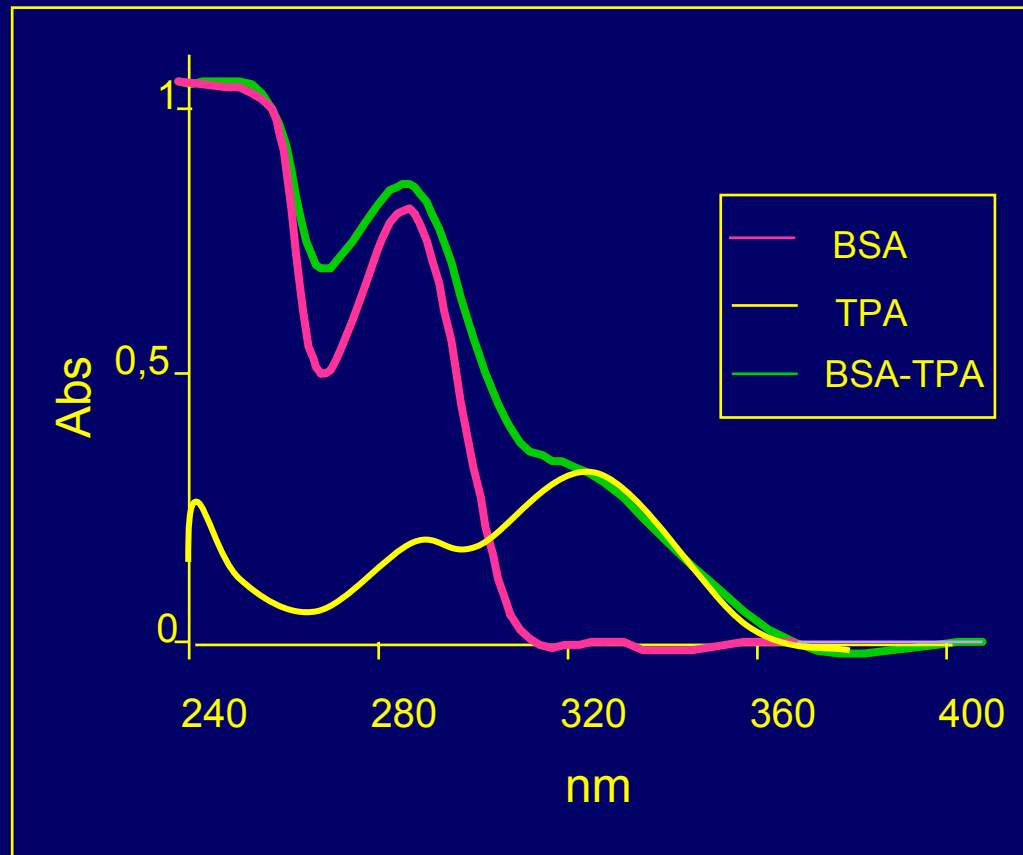


Foto-uni3n a prote3nas

Gel-filtraci3n



Formación de aductos de proteína

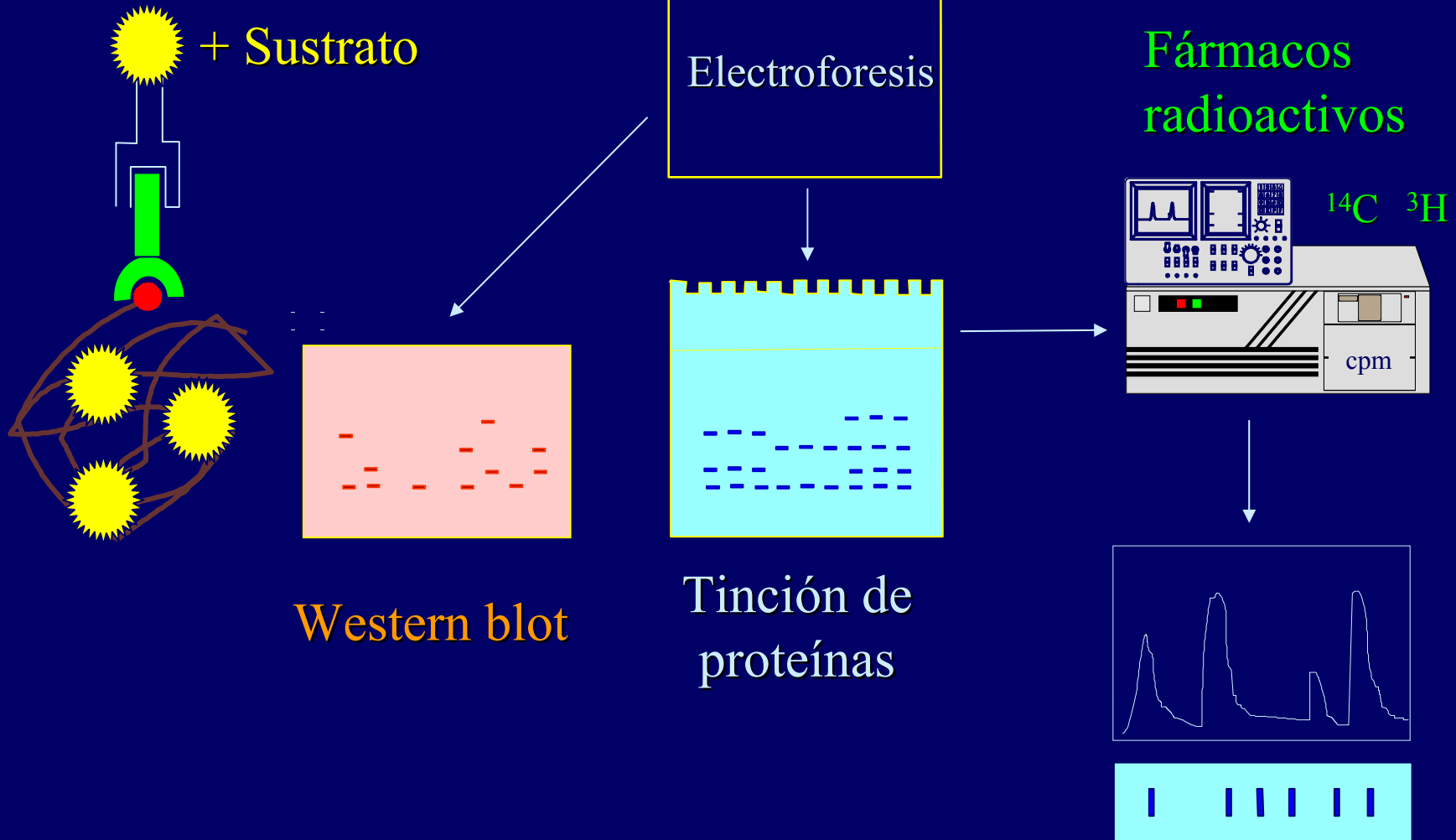


Análisis mediante gel-filtración y monitorización espectrofotométrica

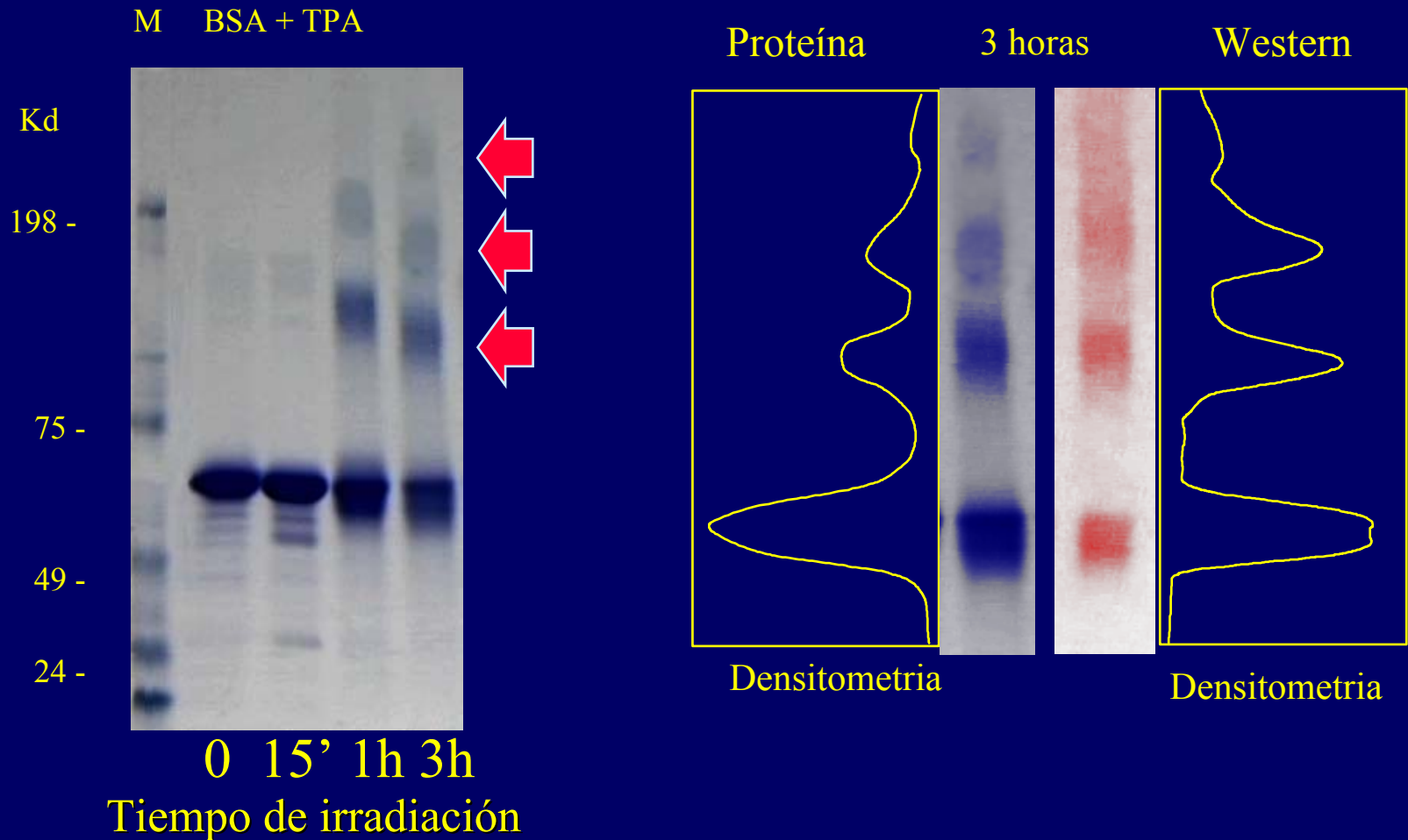
Foto-uni3n a prote3nas

- Western blot
- F3rmacos marcados

Mezclas de irradiaci3n (UV, HSA, Fco)



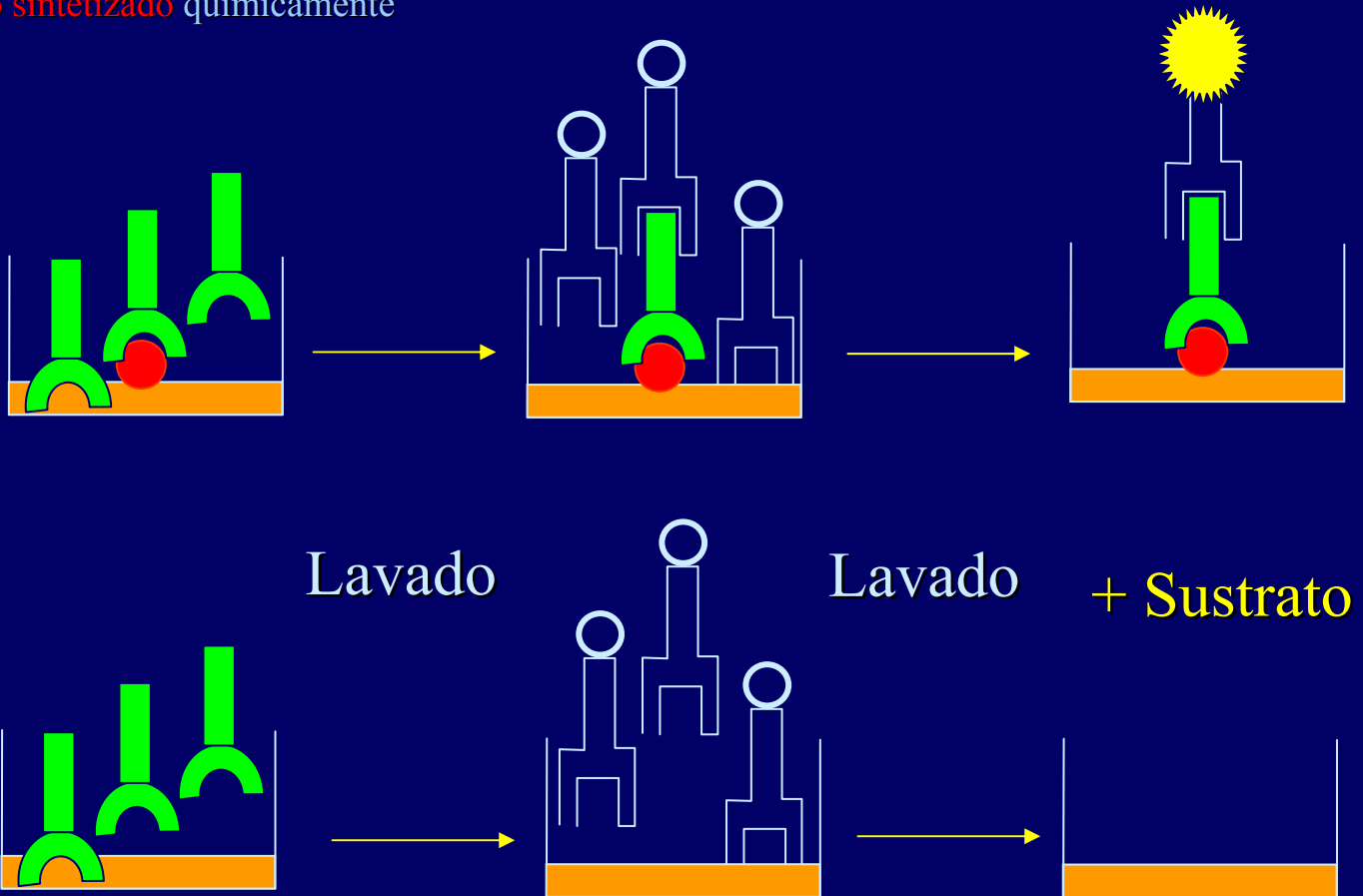
Modificaciones en proteínas fotosensibilizadas por TPA



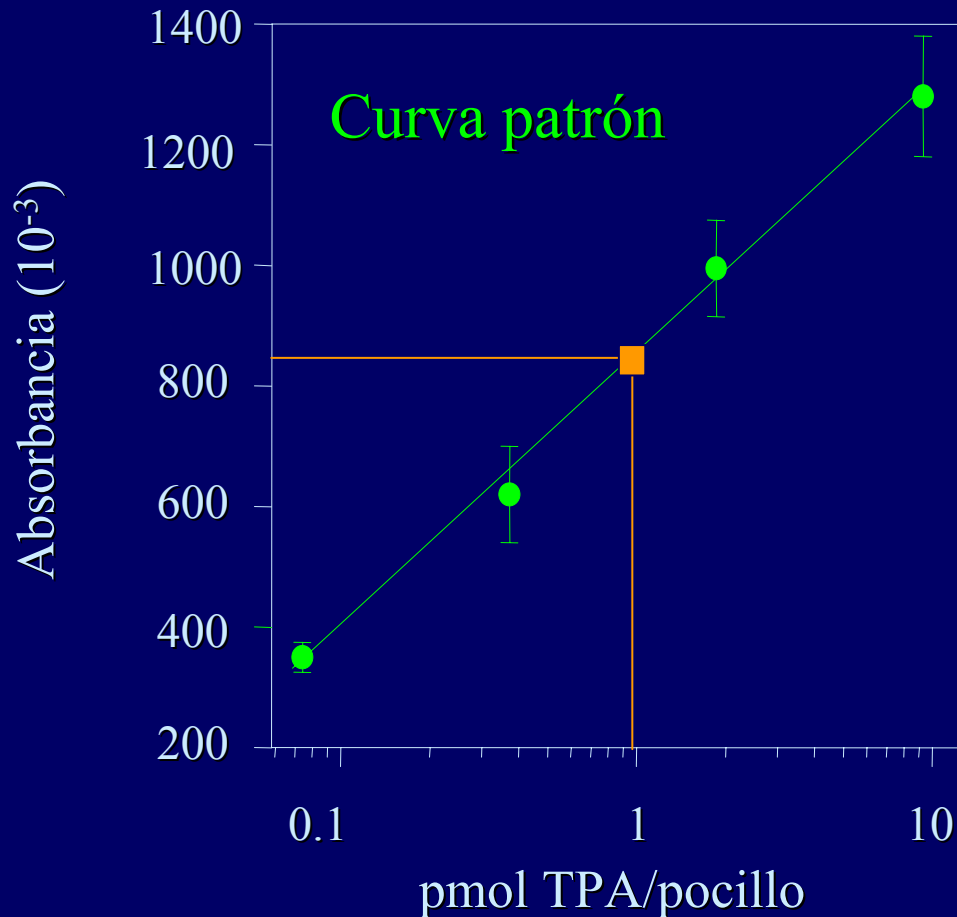
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

SIEMBRA:

- Mezclas de irradiación (UV, HSA, Fco.) **Antígeno fotoquímico**
- **Antígeno sintetizado** químicamente



Cuantificación de foto-aductos por medio de ELISA



BSA irradiado TPA

$$\text{Abs} = 825 \times 10^{-3}$$

$$\text{pmol} = 1$$

Fototoxicidad

- > Fármaco* interacciona con Lípidos Proteínas o ADN (Daño Celular)
- > Mecanismos y técnicas de valoración de daño celular

Peroxidación Lipídica

Modificación de proteínas (Fotounión)

Daño al ADN (Fotogenotoxicidad)

FOTOGENOTOXICIDAD



$h\nu$

Fármaco

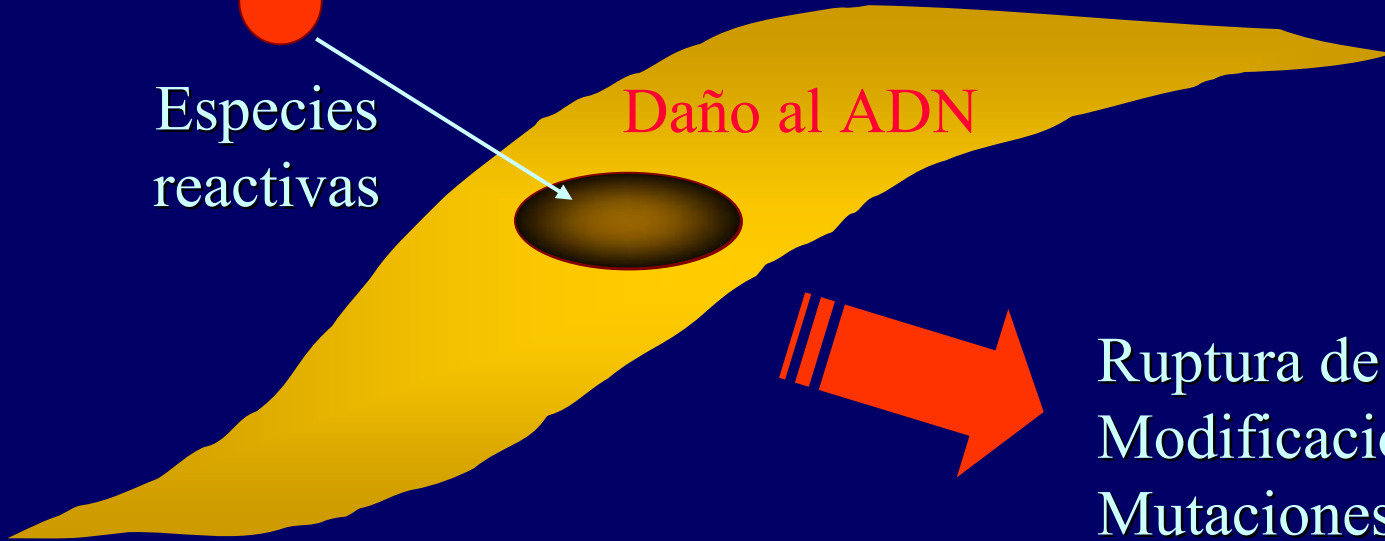
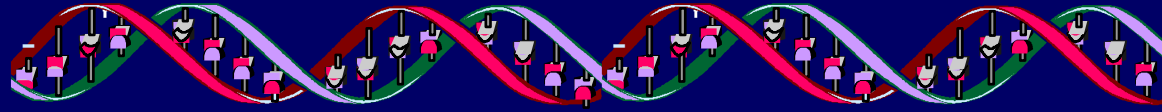


Especies reactivas

Daño al ADN



Ruptura de ADN
Modificaciones de bases
Mutaciones



FOTOGENOTOXICIDAD

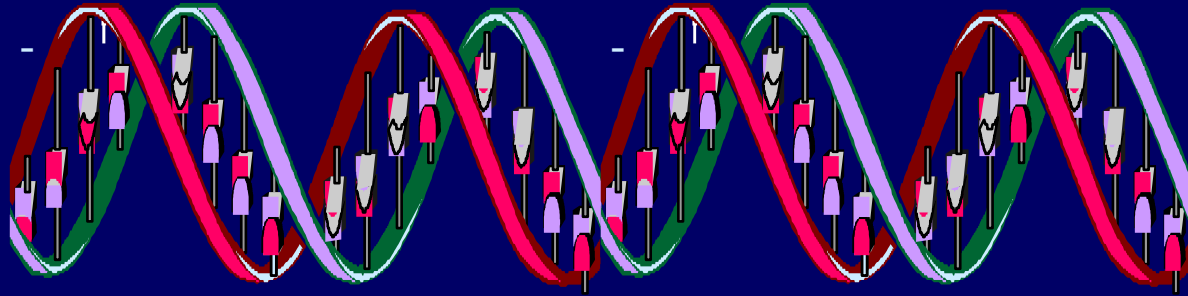
Efectos biológicos

- ↓ Daño al ADN (ruptura de ADN, daño oxidativo)
- ↓ Mutagénesis
- ↓ Carcinogénesis

Técnicas experimentales

- ↓ Modificación de ADN (*rupturas de cadena, bases, Comet assay*)
- ↓ *Test de reparación de Saccharomyces cerevisiae mutante*
- ↓ *Carcinogénesis in vivo (e.g. Skh-1 mouse)*

FOTOGENTOXICIDAD

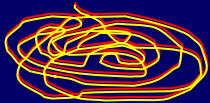


- Secuenciación
- Ruptura de ADN (SSB)
- Comet Assay

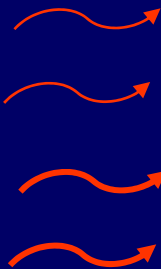
Ruptura de ADN (SSB)

Plásmido Super-enrollado

Pbr 322



Fármaco

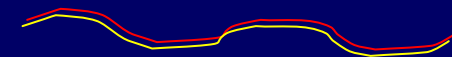


Ruptura de cadena Simple
(el plásmido se circulariza)

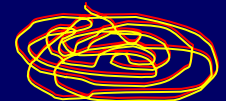
Ruptura de cadena Doble
(el plásmido se lineariza)



Forma II



Forma III



Forma I

Ruptura de ADN (SSB)

Pbr 322

Pbr 322 + TPA 0.25 mM



0

135

0

15

45

75

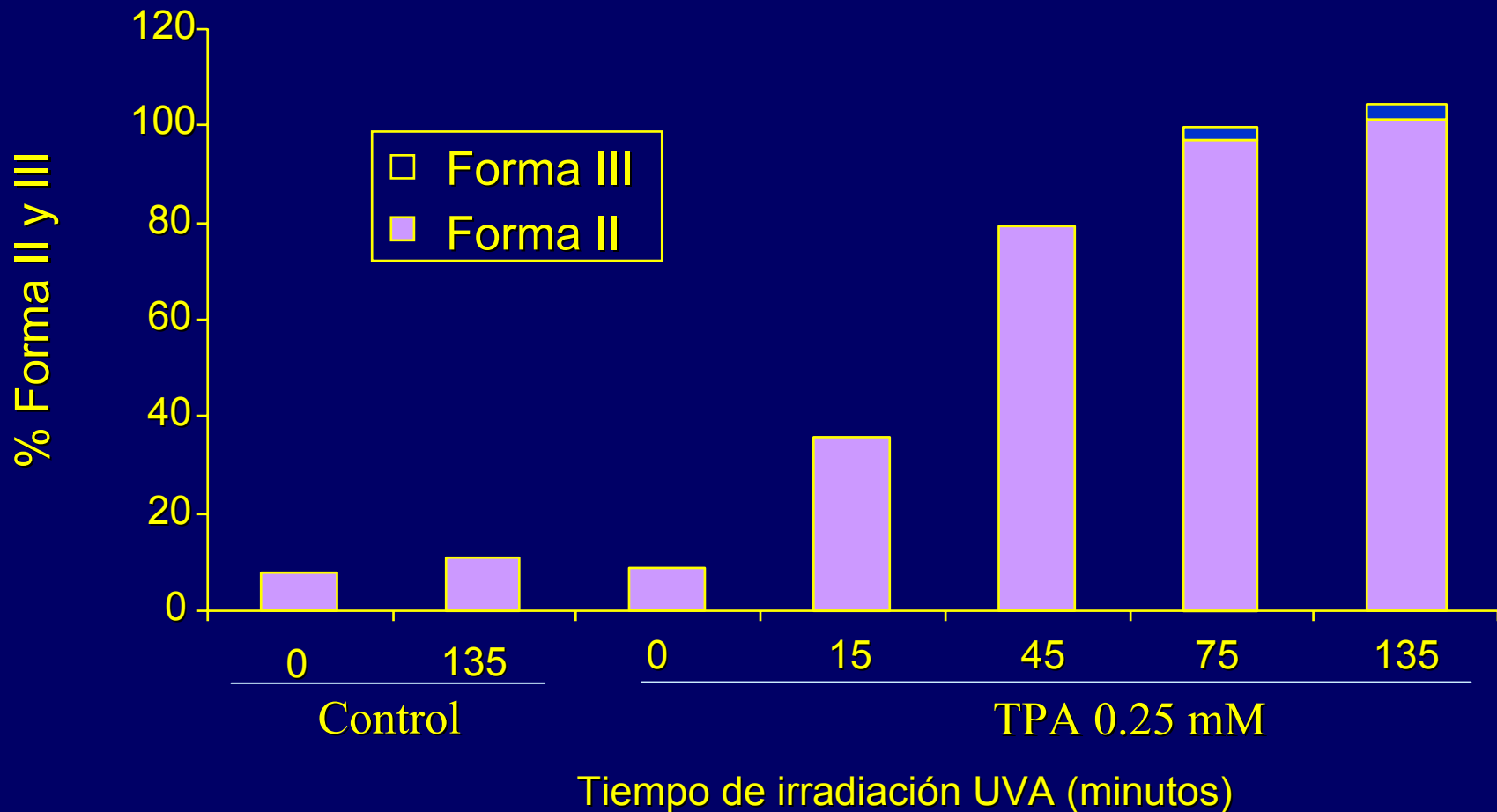
105

135

Irradiación UVA (minutos)

Forma II

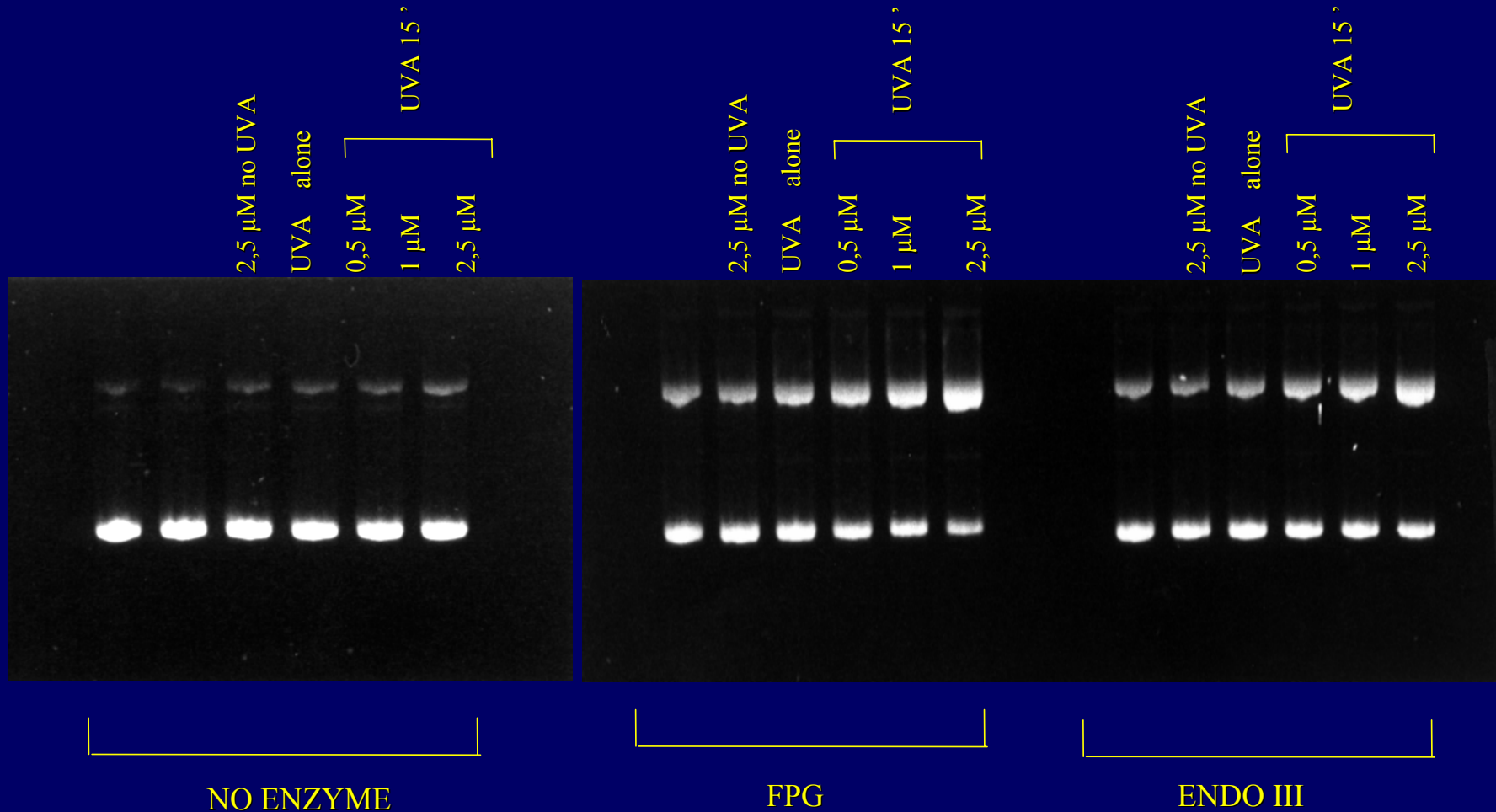
*Cuantificación de la abundancia relativa de las formas II y III
(mediante densitomería de un gel)*



Utilización de enzimas específicos para revelar daños en el ADN

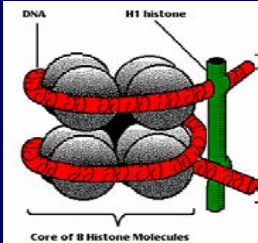
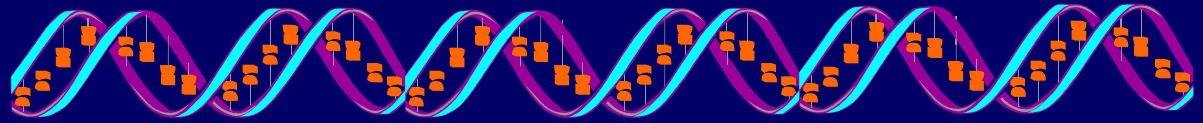
- ✓ T4 Endonucleasa V: Revela los dímeros de timidina, citosina (pirimidinas) y los sitios sin bases.
- ✓ Fpg (Formamido pyrimidine glycolase) : Revela daño oxidativo en guaninas (8-oxoguanina) y adeninas.
- ✓ Endonucleasa III: Revela daños oxidativos en timidinas, citosinas y los sitios sin bases.

Utilización de enzimas específicas para revelar daños en el ADN por TPA

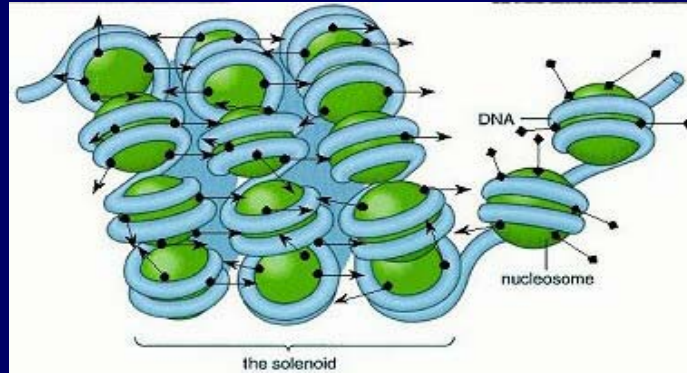


ESTRUCTURA DEL ADN

Plásmido



Solenoid



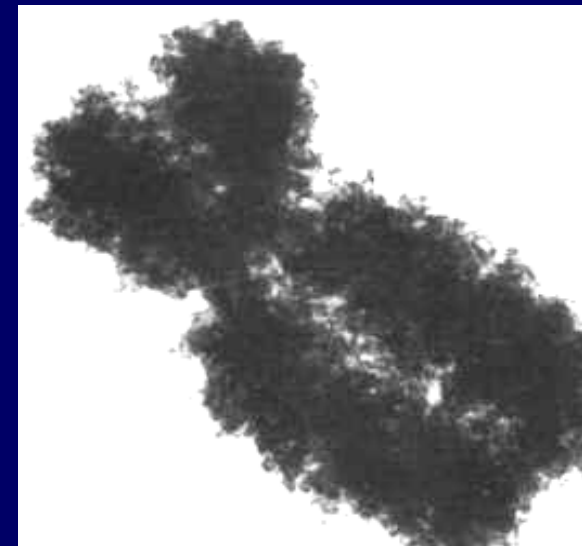
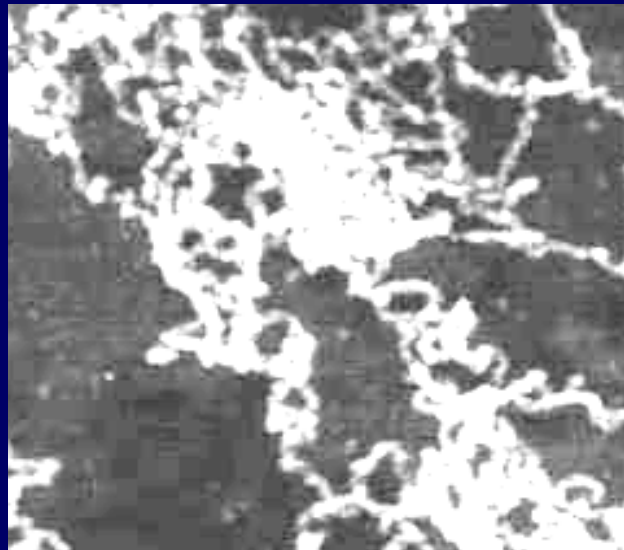
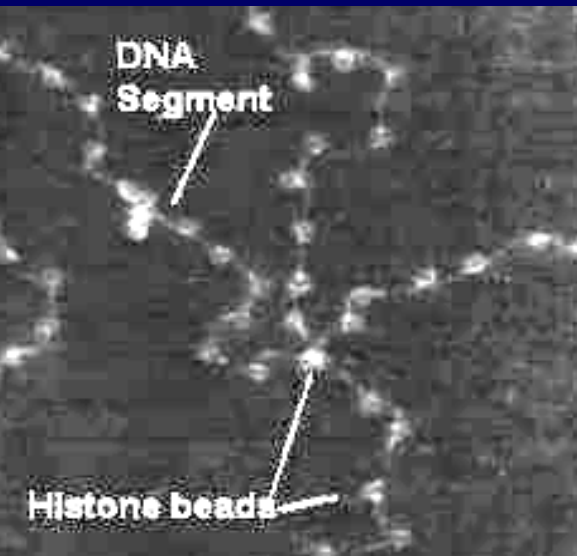
Nucleosome

Estructura de un gen

DNA strand

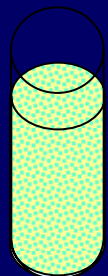
Uncoiled chromatin

Chromosome

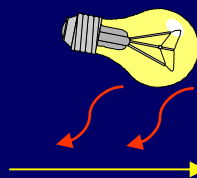
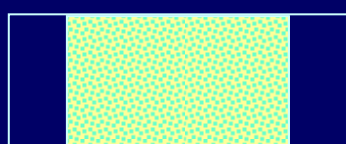


Comet Assay

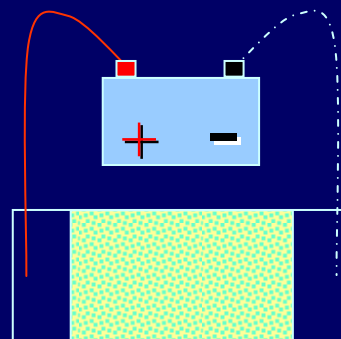
Fármaco



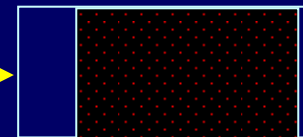
+ Agarosa



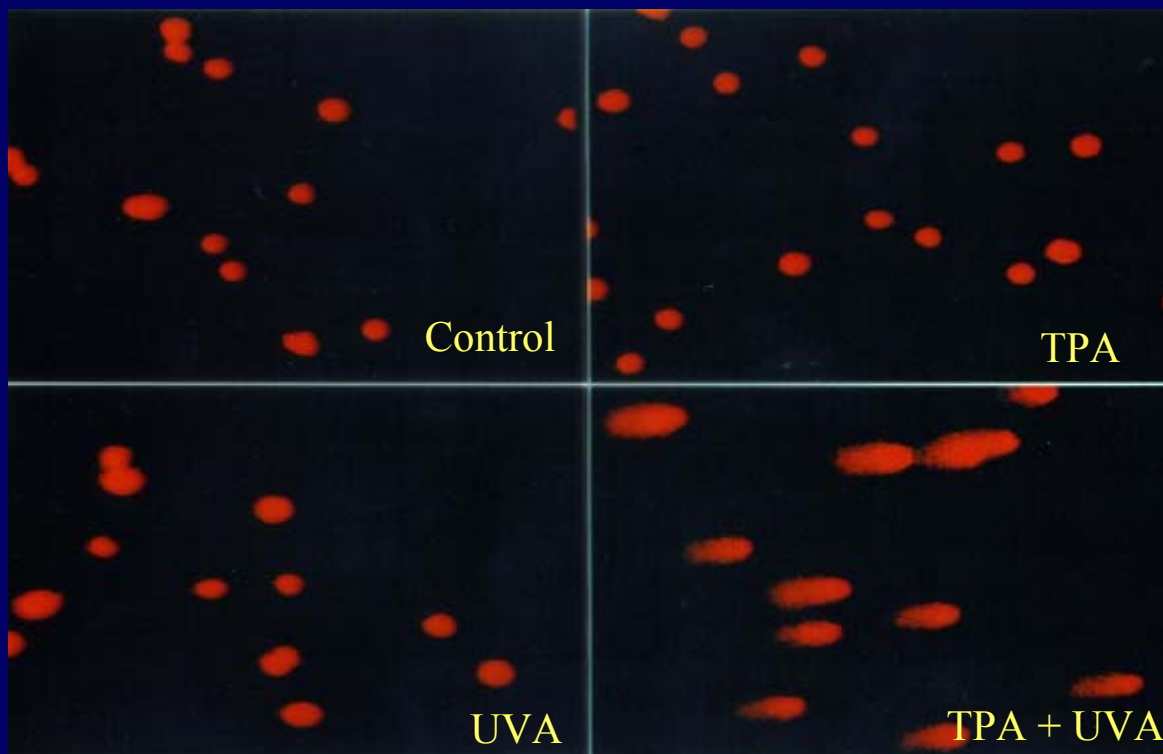
UVA



Tinción

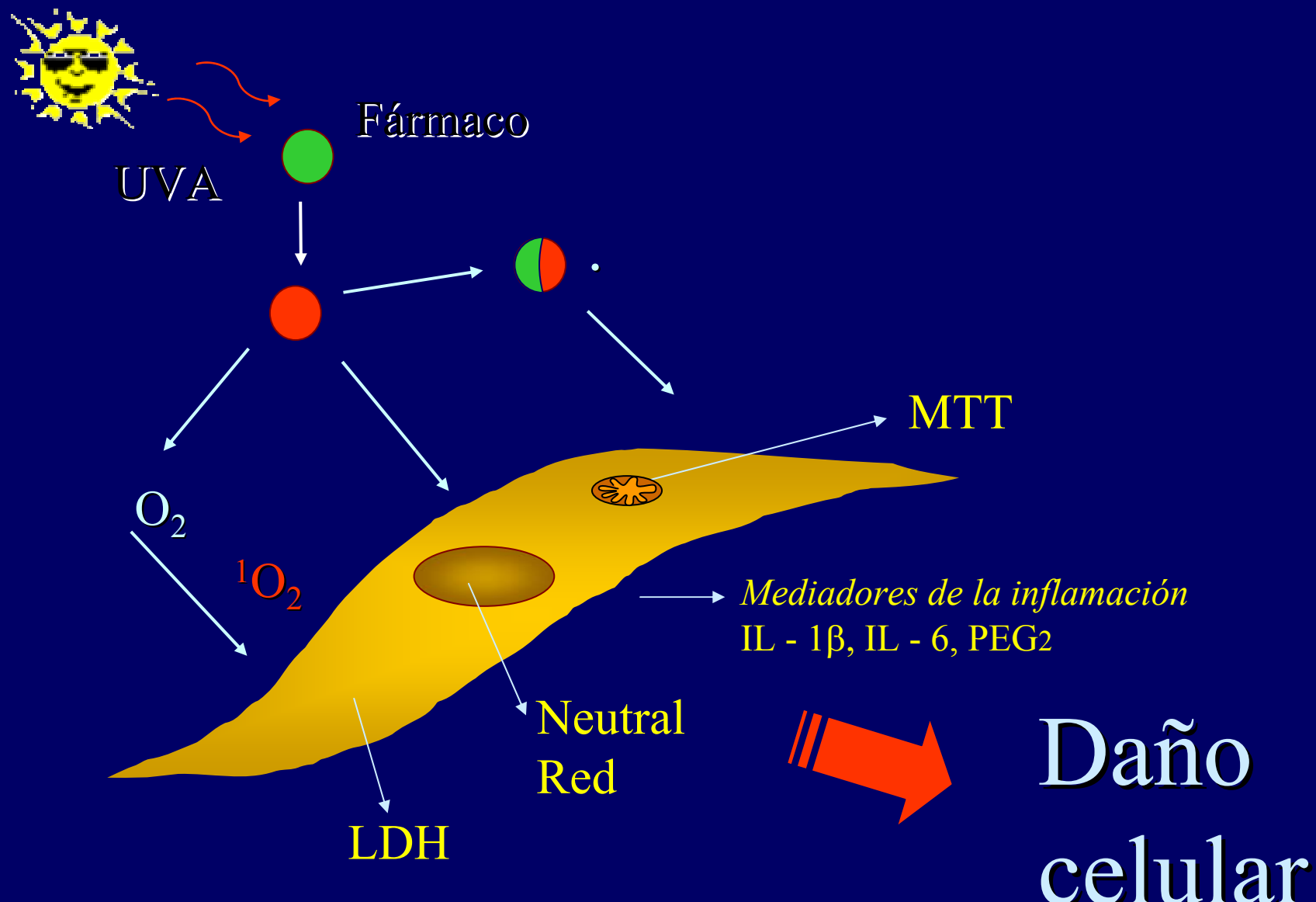


Células en
suspensión

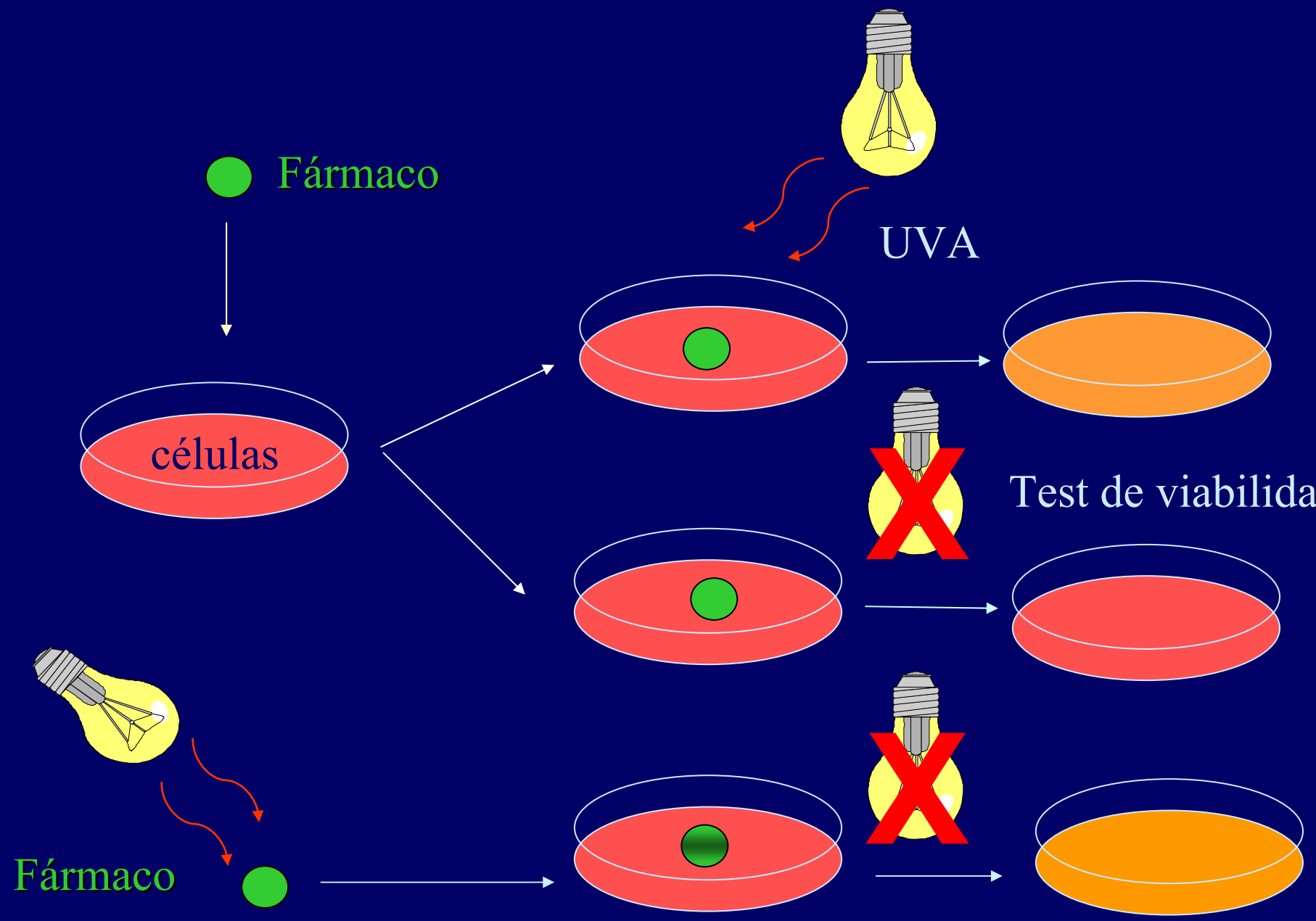


Técnicas de valoración *in vitro* de la Fototoxicidad a nivel celular

Fototoxicidad Celular



Fototoxicidad Celular

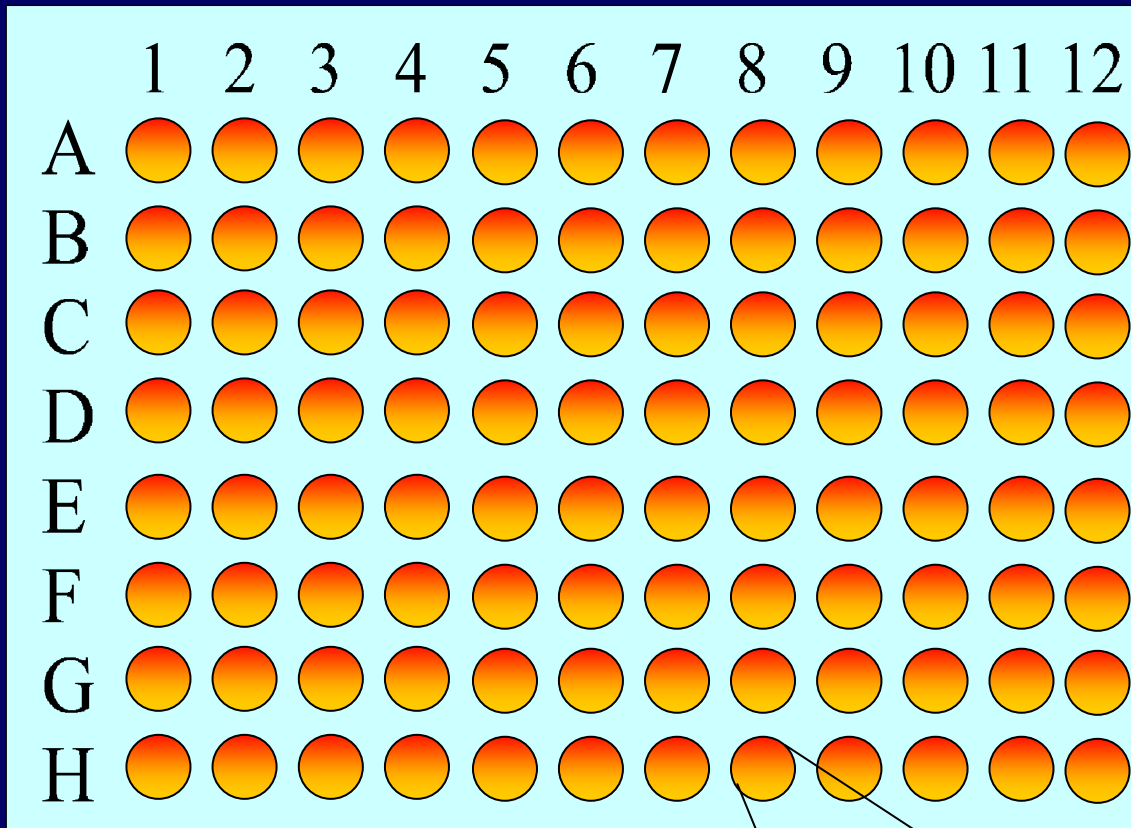


Cultivo de células epiteliales humanas

★ Keratinocitos

★ Fibroblastos

★ Modelos de piel (Episkin, Epiderm..)



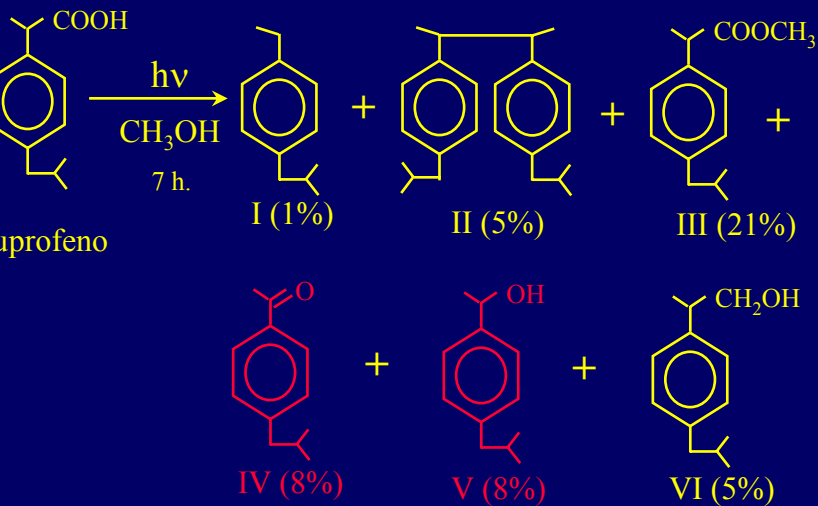
30.000 células / pocillo



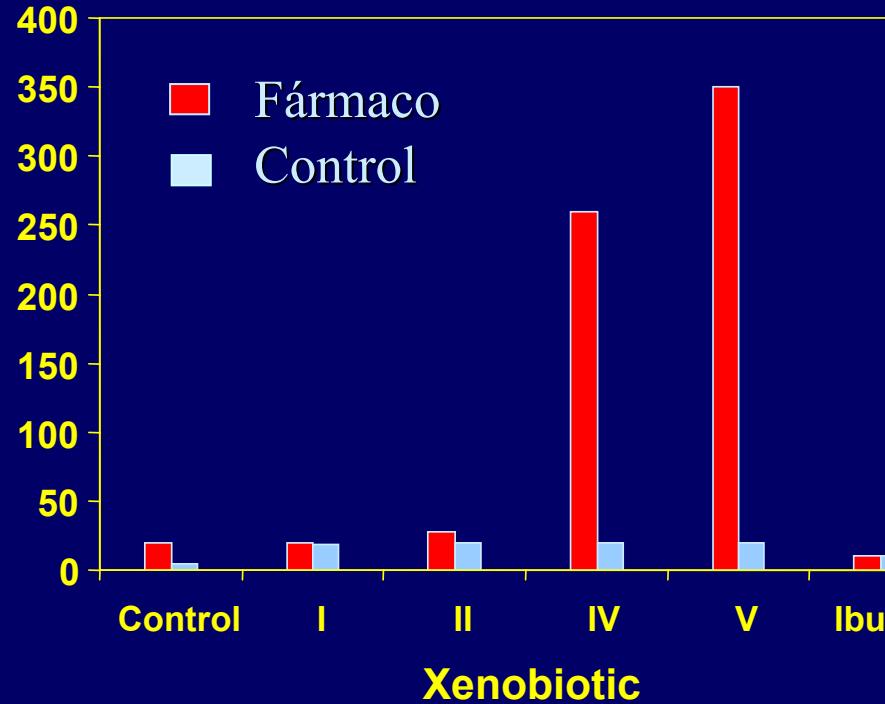
TÉCNICAS DE VALORACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

- LDH
- Rojo Neutro (NRU)
- MTT

LDH

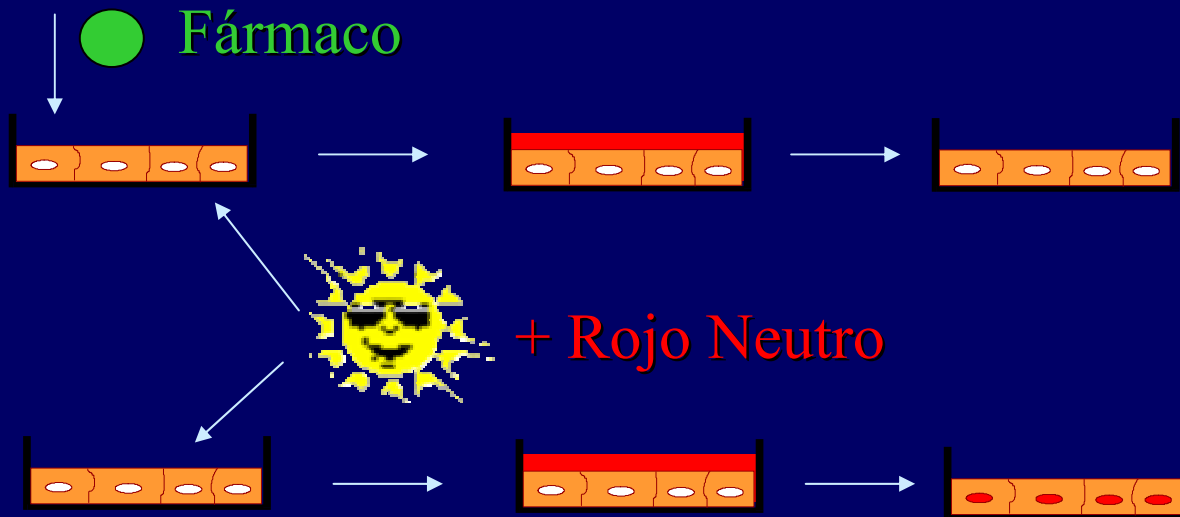


LDH activity in culture medium (mU per plate)



- *J. Pharm. Sci.* 76, 374-378, (1987).
- *Photochem. Photobiol.* 46, 991-996 (1987).

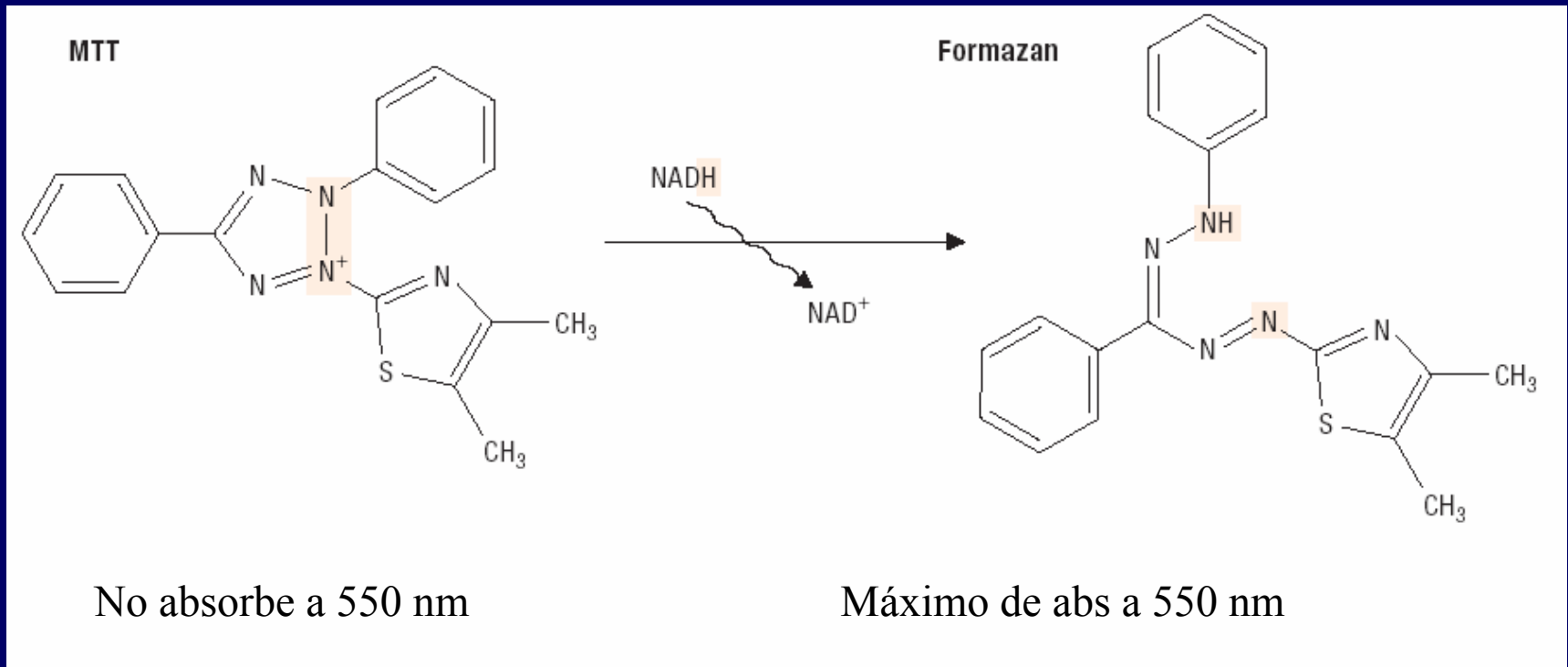
Test del Rojo Neutro (RNU)



Solo las células que no están dañadas con capaces de tomar el rojo neutro en sus lisosomas

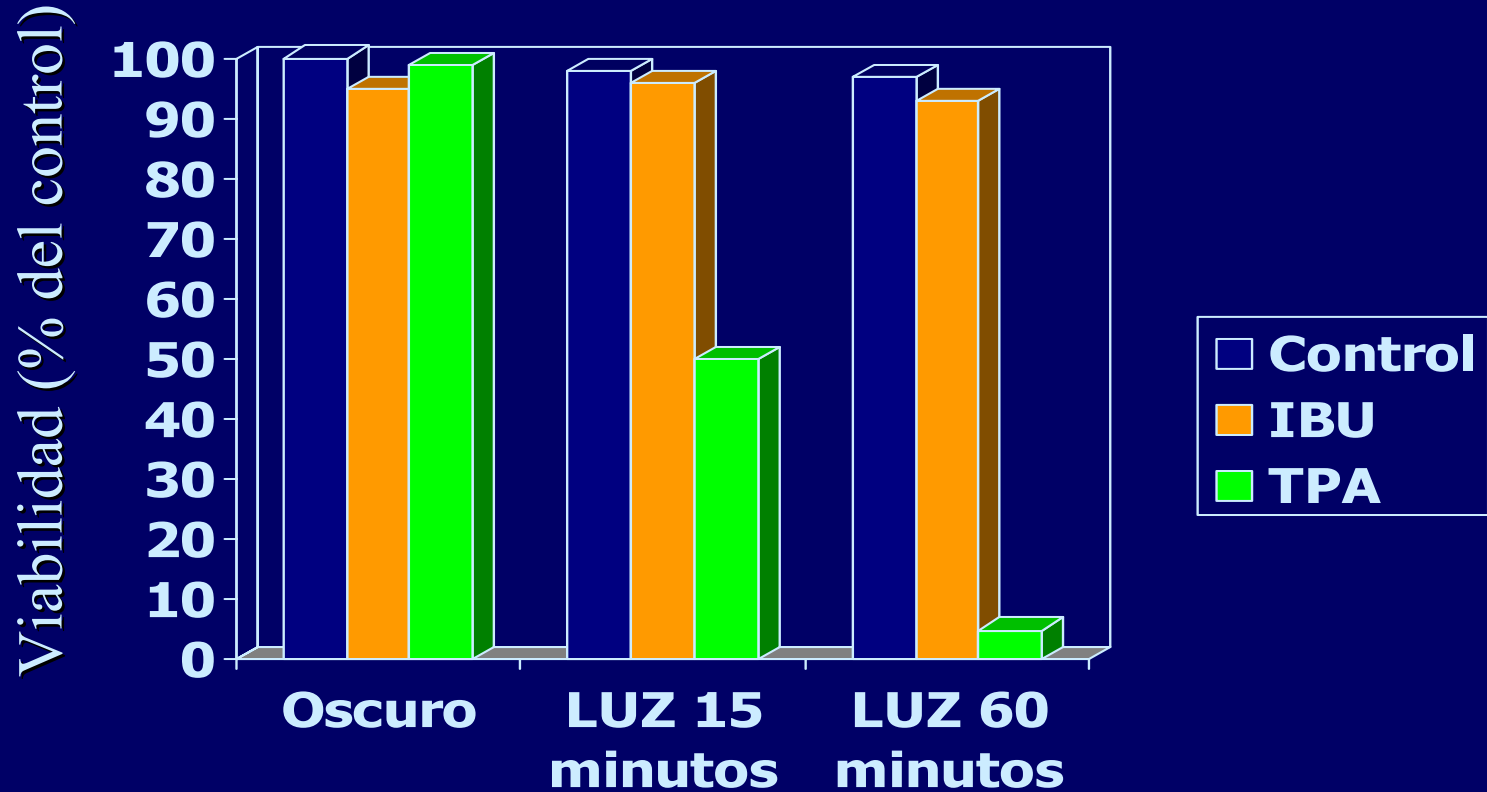
MTT

➤ Método colorimétrico, basado en la capacidad que presentan las células viables de reducir el MTT (sal de tetrazolio) en un compuesto insoluble en agua que queda retenido en las células (azul de formazán). Esta actividad está presente en las mitocondrias y el enzima responsable es la succinato deshidrogenasa. Transcurrido el periodo de incubación con las células, el colorante formado se extrae de las células, se disuelve y se lee su absorbancia a 550 nm.

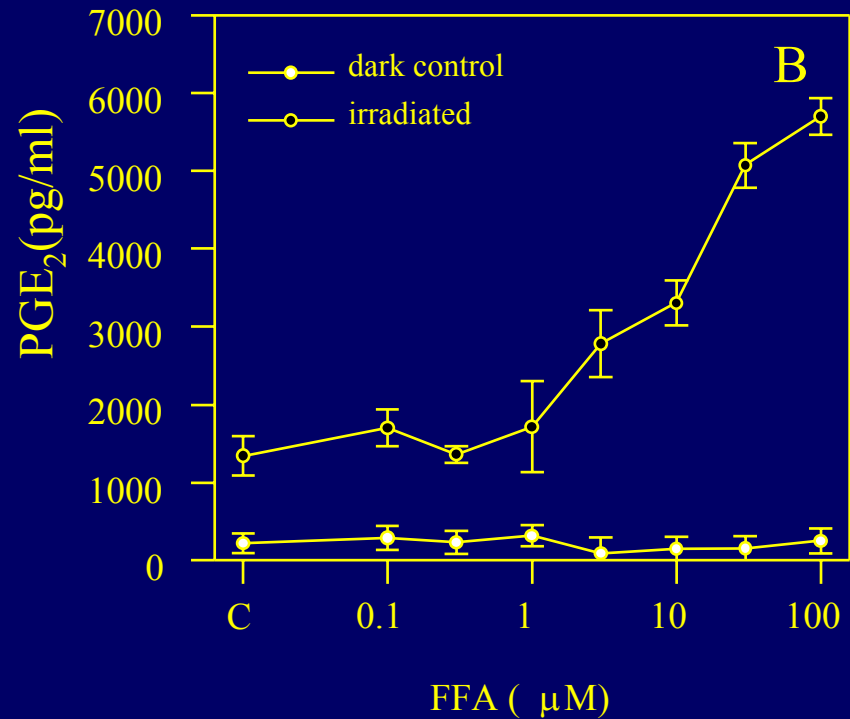
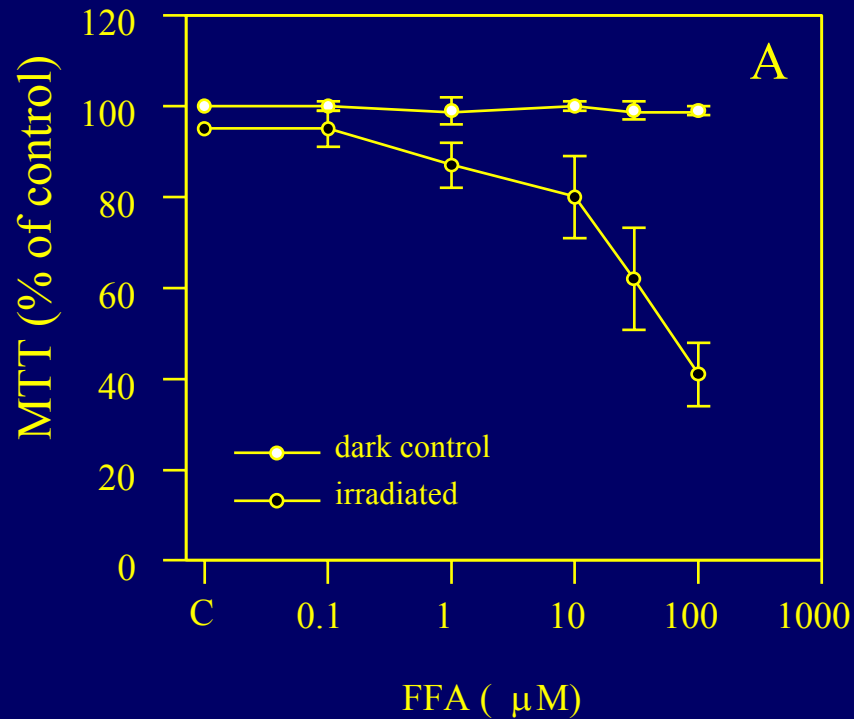


Test de viabilidad MTT

- Fármacos a 0.3 mM.
- UVA = 0.9 mw/cm²



Medida de Prostaglandina en fibroblastos humanos irradiados en presencia de ácido fenofíbrico



Introducción

Fototoxicidad (mecanismos y técnicas de valoración)

Peroxidación Lipídica

Modificación de proteínas (Foto-unión)

Daño al ADN (Foto-genotoxicidad)

Fotogenotoxicidad

SSB

Comet Assay

Secuenciación

Fotoalérgia

Diferenciación (reacciones fotoalérgicas/fotoirritantes)

Sensibilización y proliferación linfocitos

Fototoxicidad Sistémica

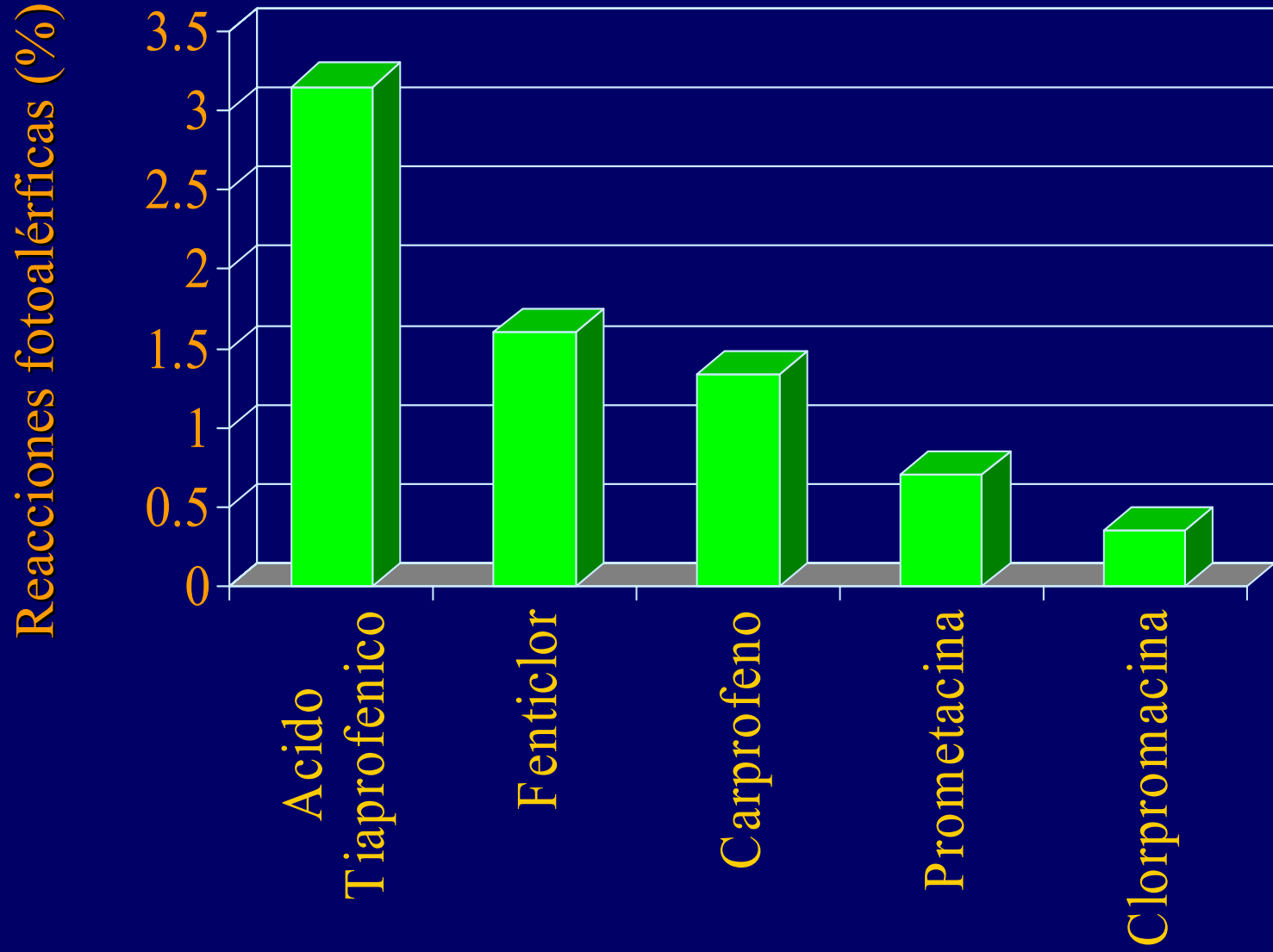
FOTOTOXICIDAD

- * Generalizada
- * Manifestaciones en todos los individuos a la dosis adecuada
- * Puede aparecer en la primera exposición
- * Los efectos son dependientes de la dosis del agente y la radiación
- * Erupción monomorfa con edema
- * Período prodrómico
- * Citotoxicidad debida a productos intermedios
- * Lesión exclusivamente en el área expuesta
- * No hay reacción cruzada
- * El individuo no queda sensibilizado

FOTOALÉRGIA

- * Idiosincrásica
- * Baja incidencia
- * Requiere una segunda exposición
- * No dependiente de la dosis de agente y radiación
- * Eczema, papulas, urticaria
- * Las primeras manifestaciones no aparecen hasta los 7-21 días
- * Participación del Sistema Inmunológico
- * Lesiones diseminadas, brotes
- * Reacciones cruzadas
- * El individuo queda sensibilizado, incluso durante años

REACCIONES FOTOALÉRGICAS



FOTOALÉRGIA

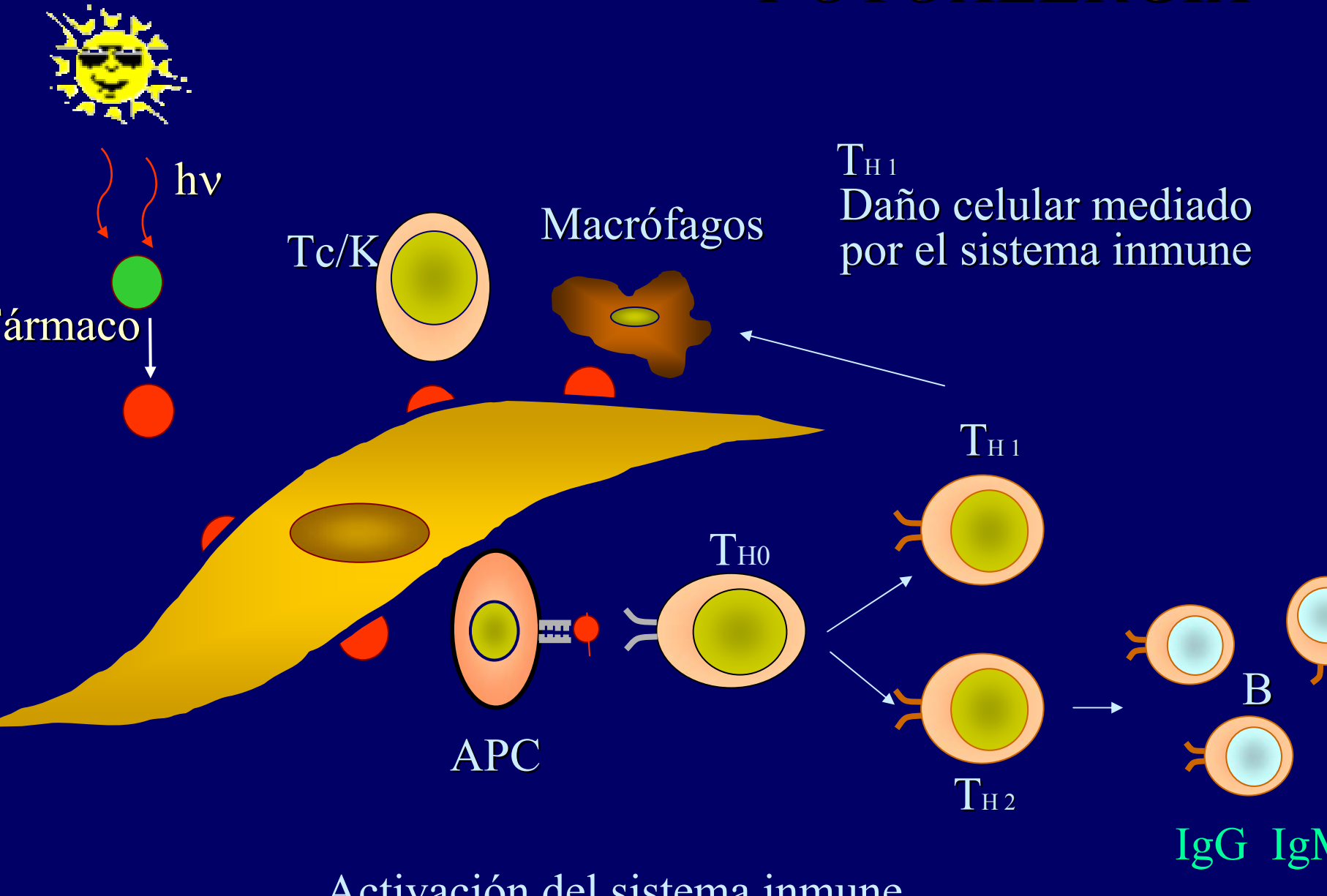


Foto-unión a proteínas (unión covalente)

Espectrofotometría / Fluorimetría (previa purificación o extracción)

Dot blot / western blot *

ELISA *

Radioactividad (compuestos marcados)

Foto-unión a células

Visualización directa al microscopio (solo compuestos fluorescentes)

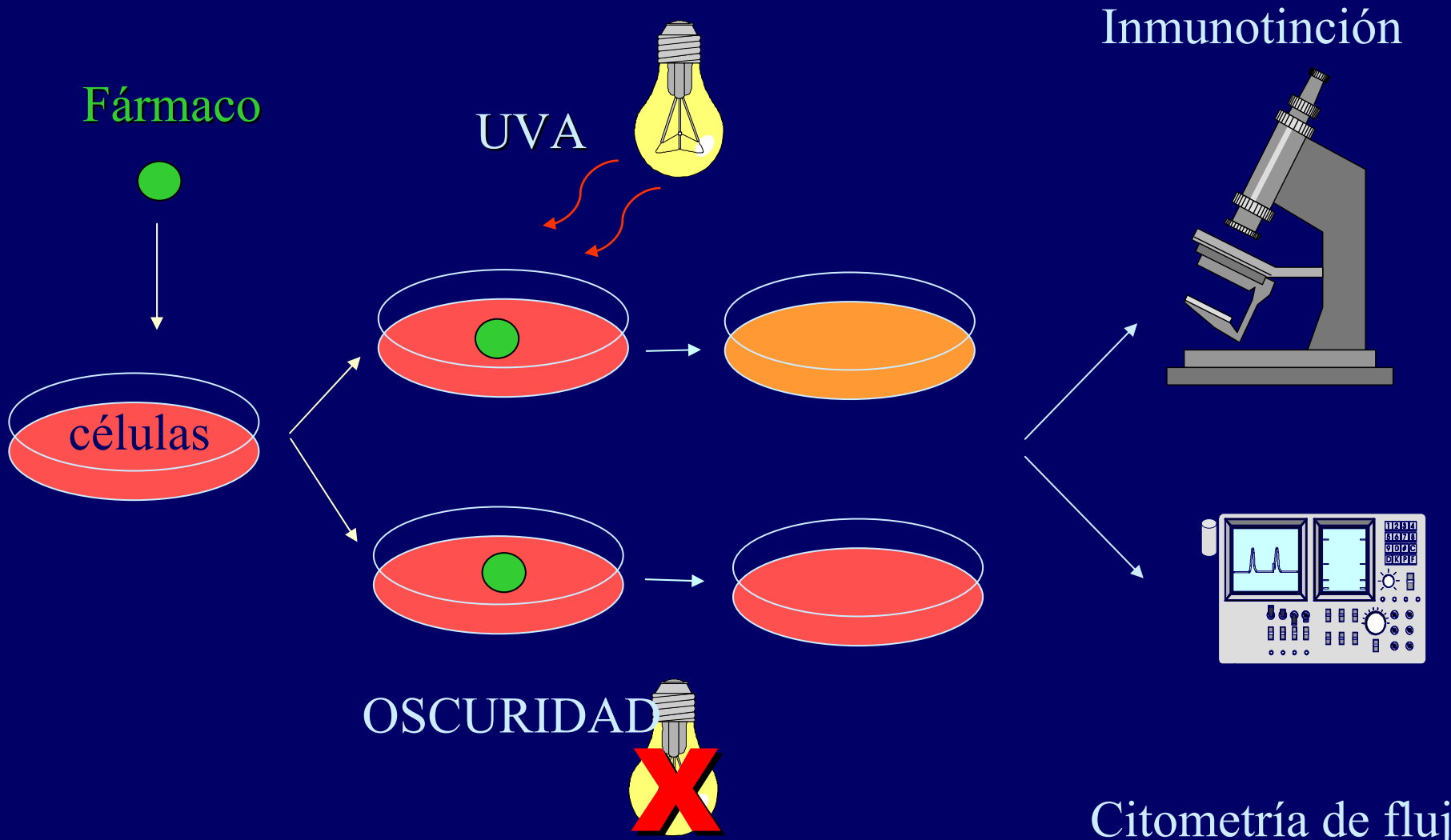
Inmunotinción *

Dot blot / western blot *

Citometría de flujo *

* Son necesarios anticuerpos específicos

Foto-unión a células

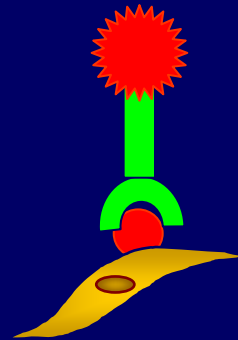
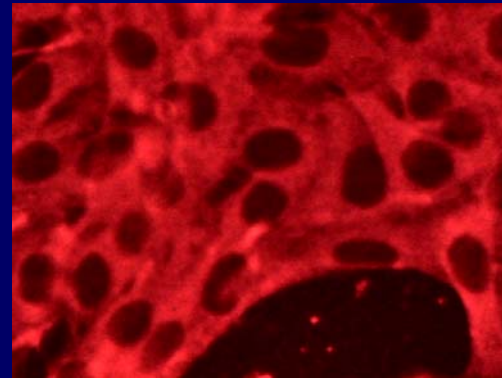
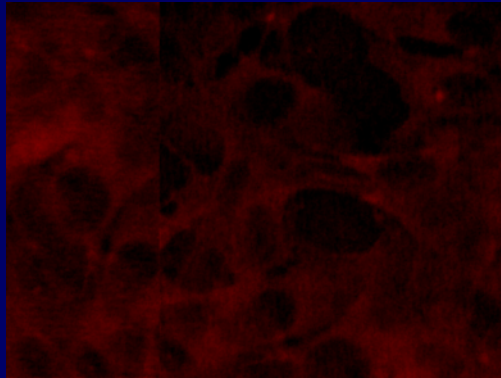


Inmunotinción de células 3T3 irradiadas con TPA

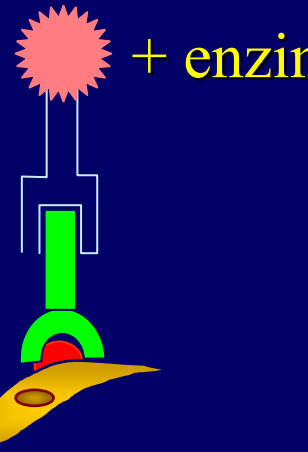
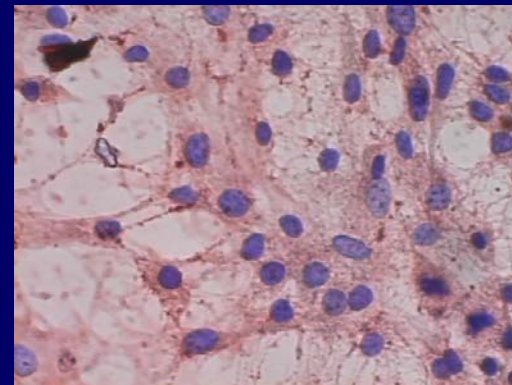
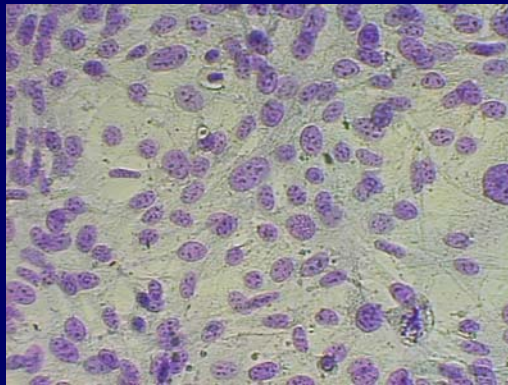
Control

TPA (0.3 mM)

Texas Red



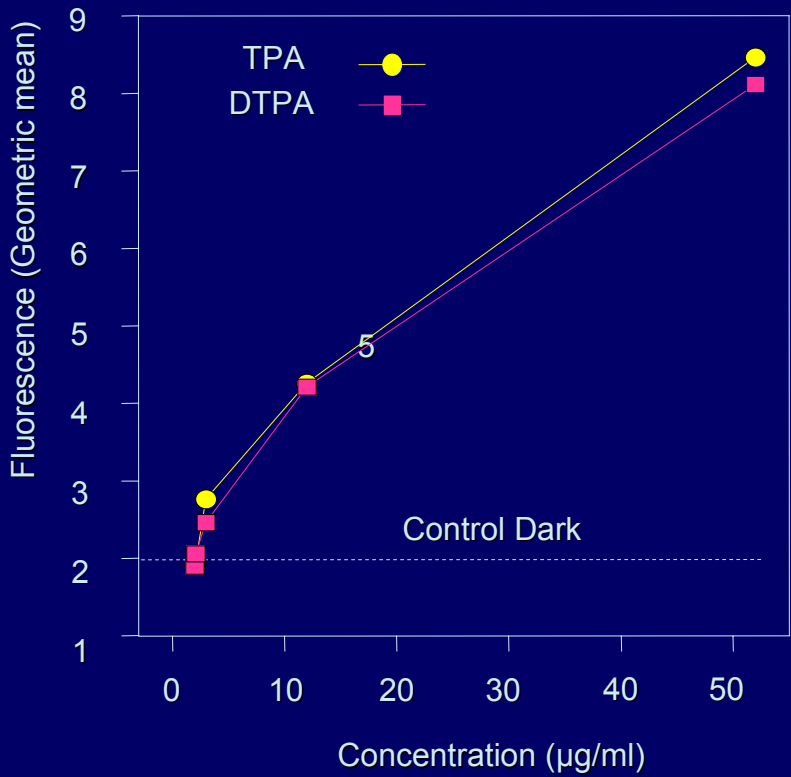
Peroxidase



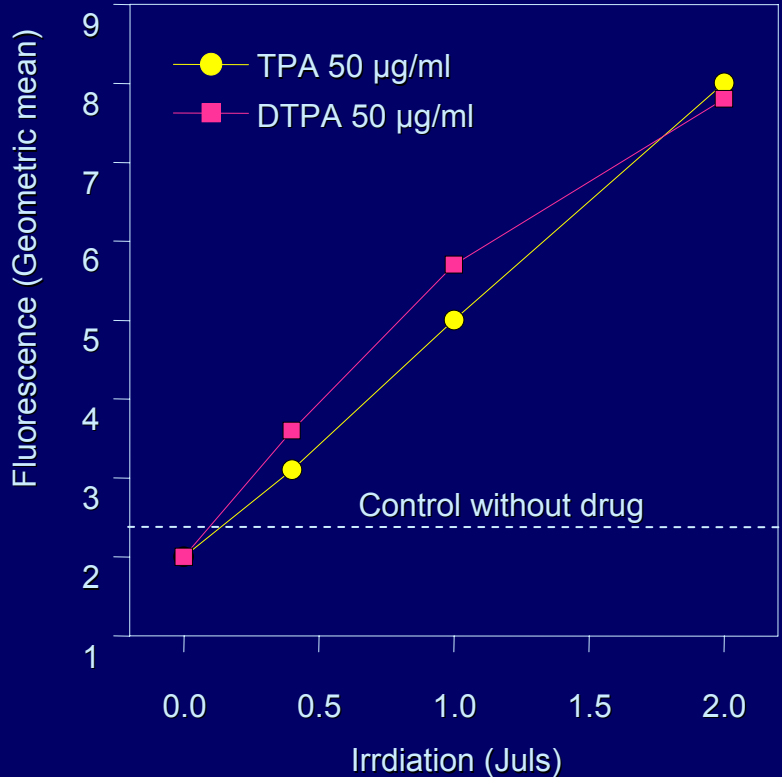
(Anti TPA + labelled 2nd antibody)

Citometría de flujo de células de ratón irradiados en presencia de TPA y DTPA

2 J. Irradiation

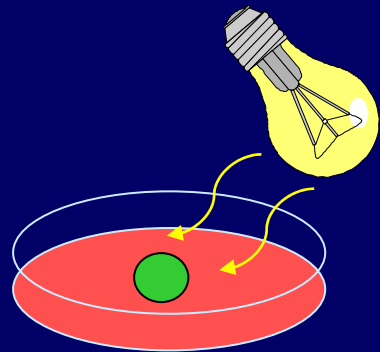


Kinetic UVA irradiation



(Anti TPA labelled with texas red)

Detección de Linfocitos sensibilizados contra fármacos



Immunización
de Ratonés



Extracción del Bazo,
obtención de linfocitos
(gradiente de centrifugación)

Fibroblastos de ratón
irradiados con SUP

Siembra en Placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

^3H Timidina +

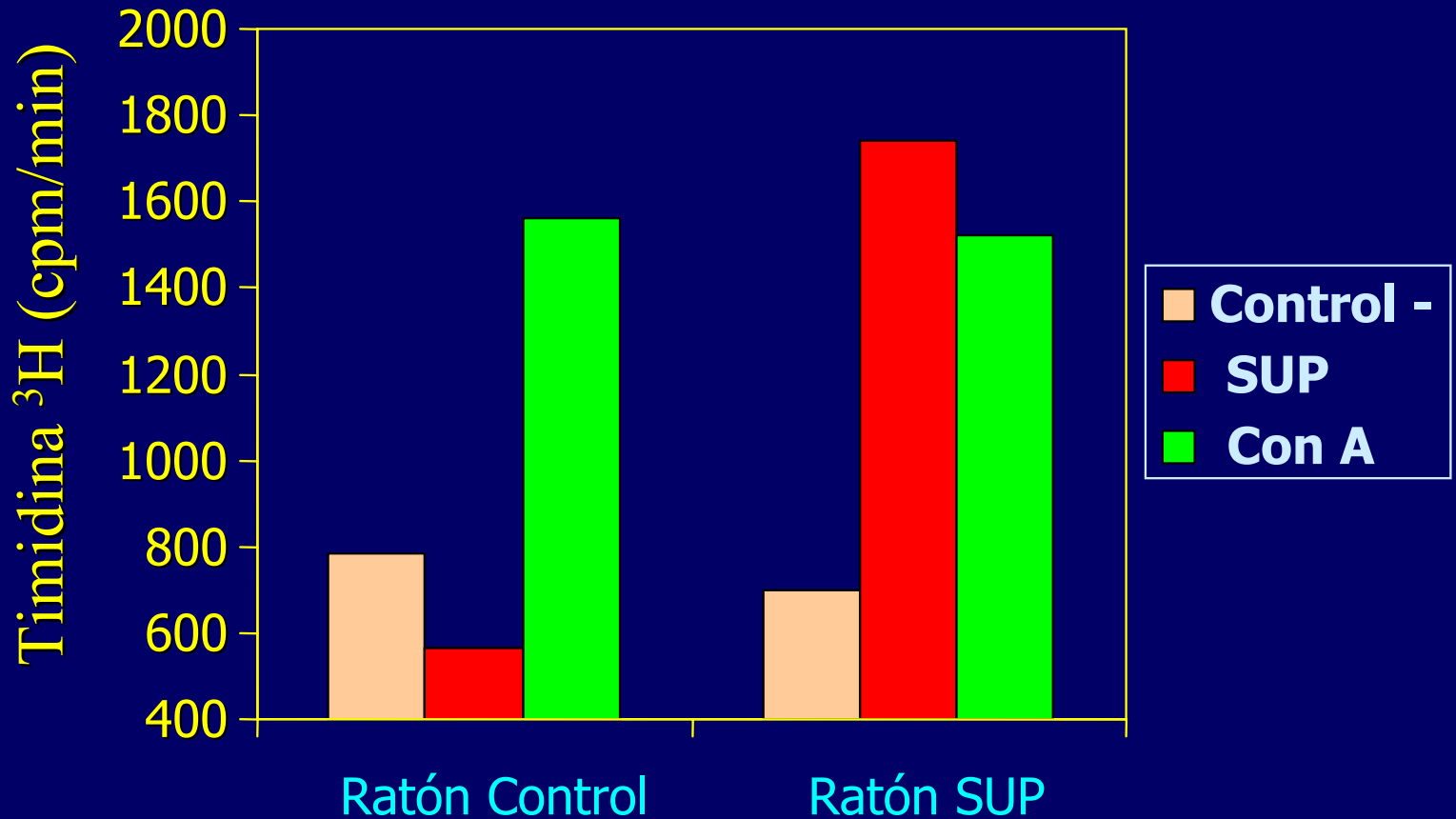
* Fotoantígeno (SUP)

* Mitogeno (Con A)

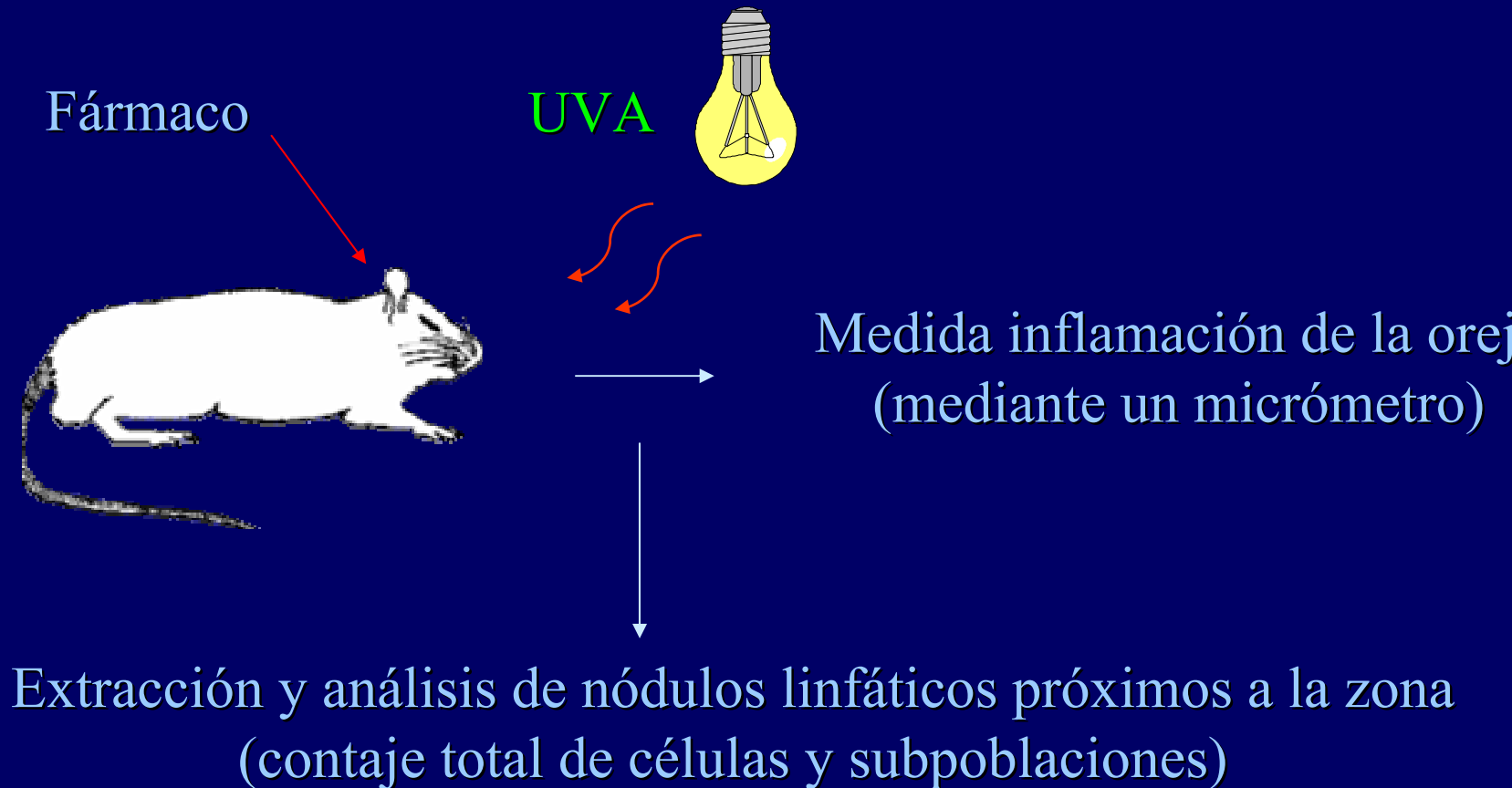
* Control negativo

Proliferación
de linfocitos

Proliferación de Linfocitos

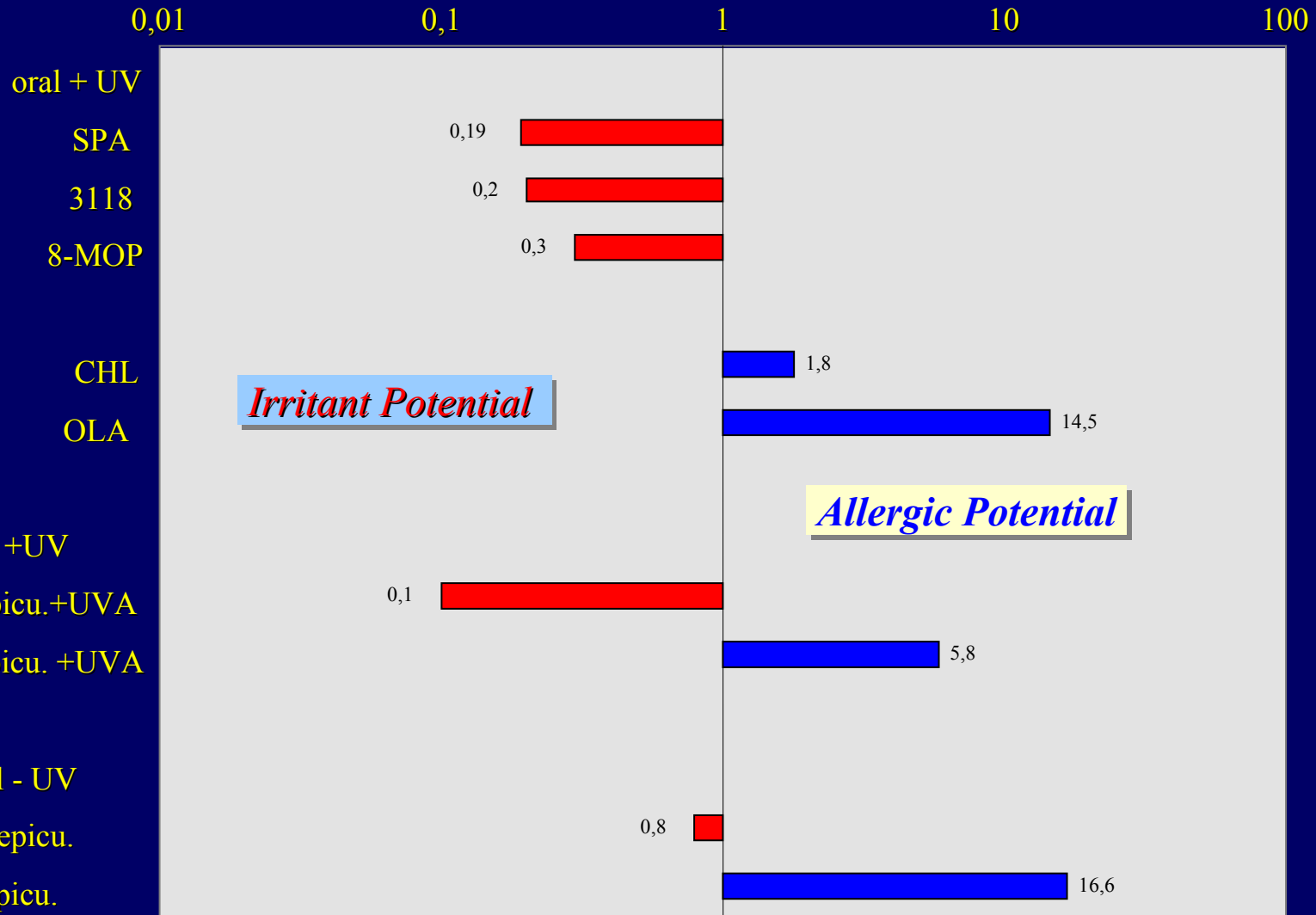


Modelo integrado para la diferenciación entre fármacos que inducen a reacciones fotoalérgicas y/o fotoirritantes



Indice de Diferenciación:

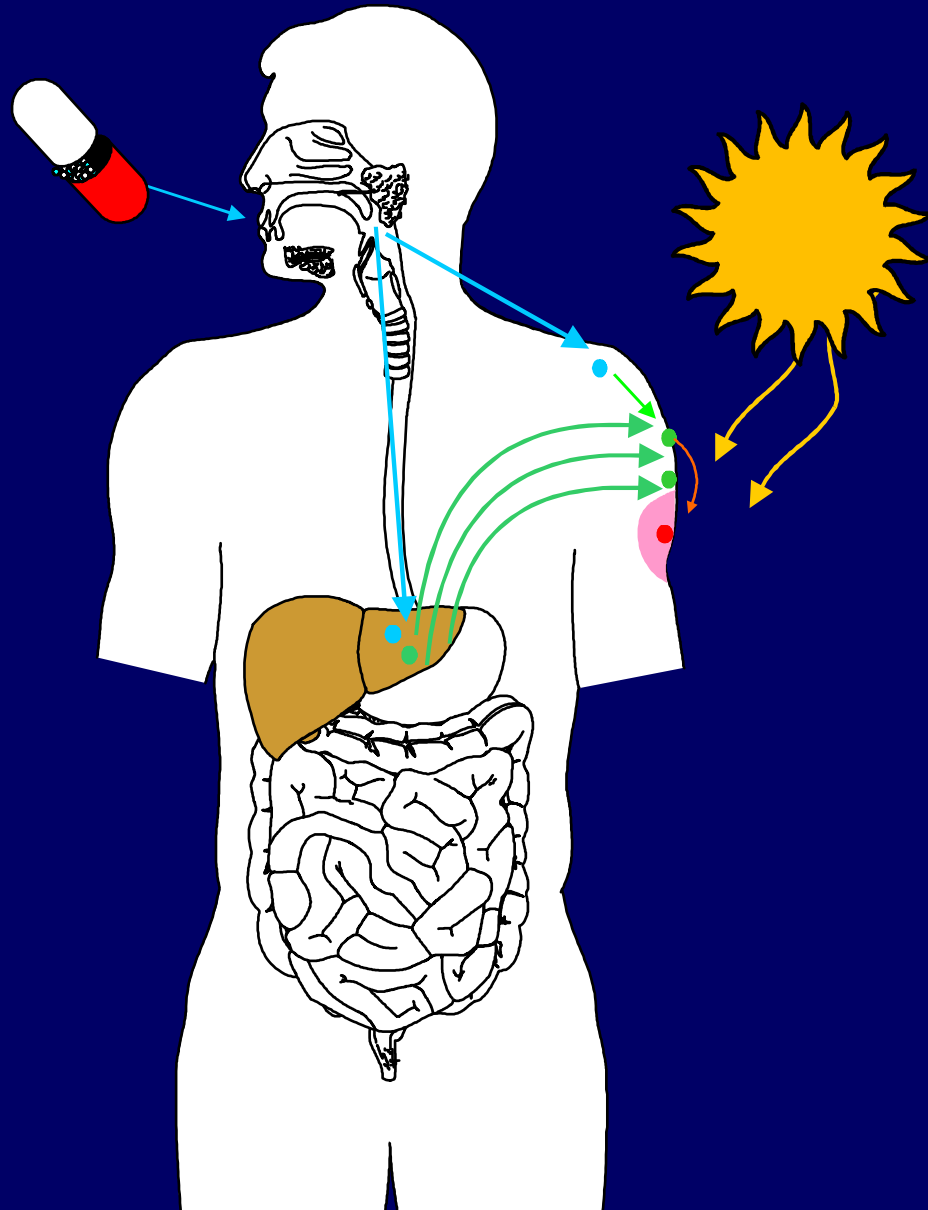
$\frac{\% \text{ del } n^{\circ} \text{ máximo de células del NL}}{\text{incremento en \% del la inflamación}}$



Fototoxicidad de metabolitos

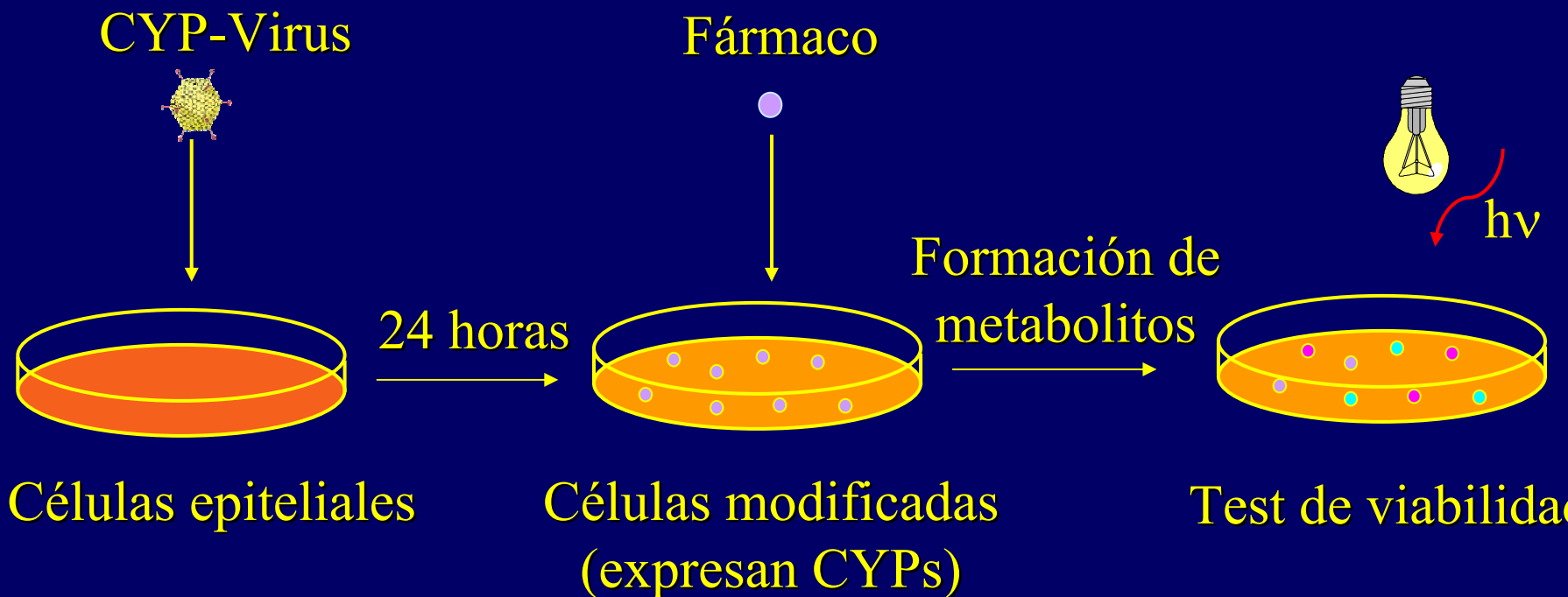
- Fototoxicidad epitelial mediada por metabolitos producidos en otros órganos (Hígado)
- Fototoxicidad sistémica mediada por fotoproductos producidos en la piel

Fototoxicidad mediada por metabolitos

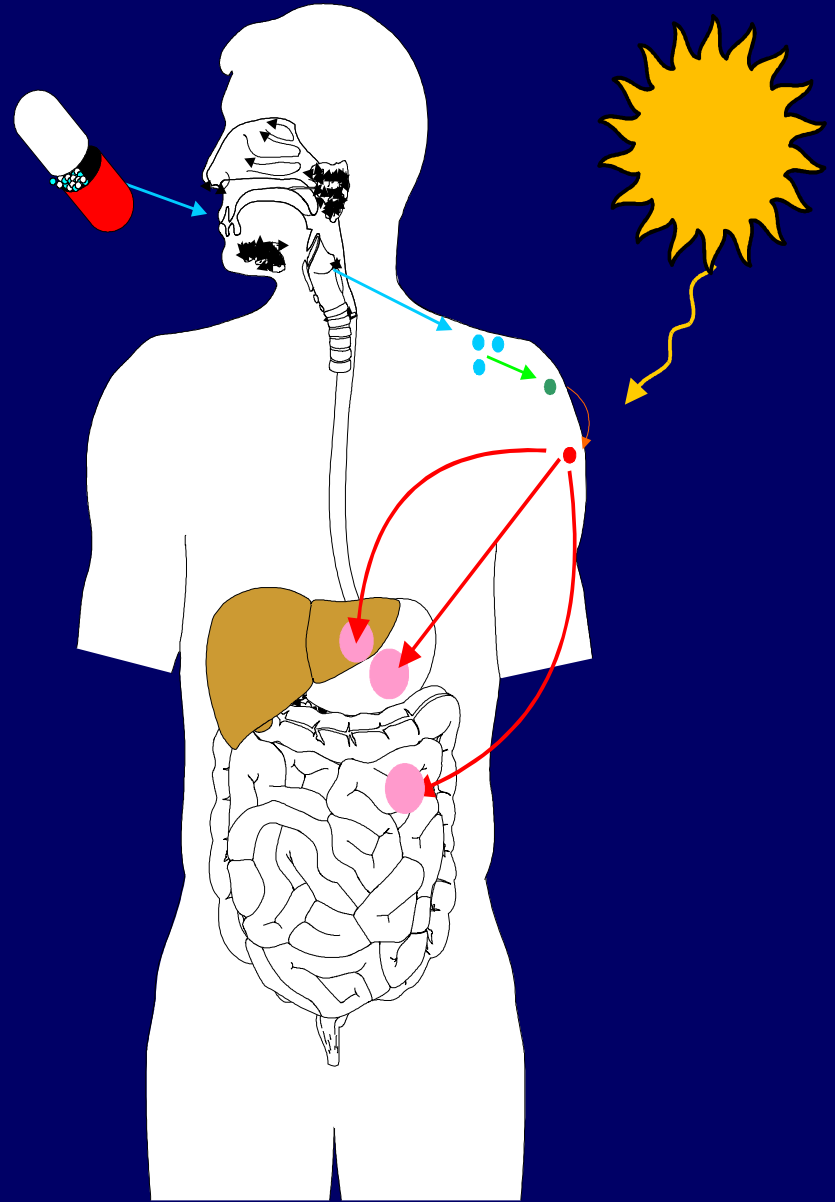


Ensayo *in vitro* para investigar el riesgo fototóxico de los metabolitos de un fármaco

Uso de células modificadas genéticamente para producir metabolitos

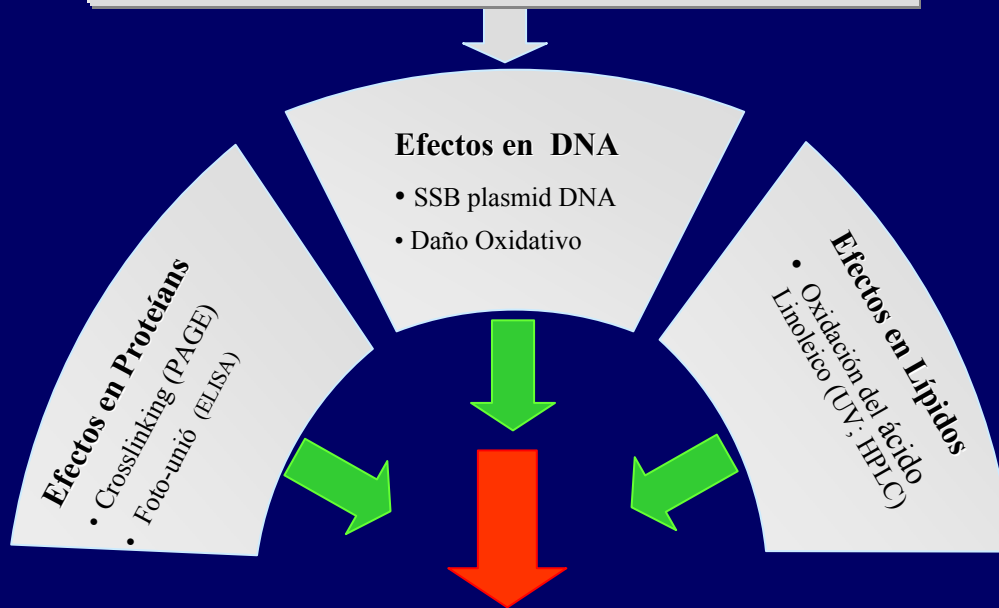


Fototoxicidad
sistémica mediada
por fotoproductos
producidos en la
piel



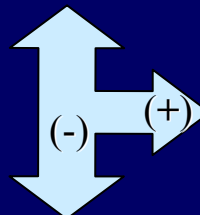
Análisis de fármacos potencialmente fotosensibilizantes

Pre-screening



1^{er} Screening

Test de viabilidad 3T3/fibroblastos humanos



Fármaco Fotosensibilizante

2^o Screening

Genotoxicidad

- Comet assay
- Daño oxidativo a ADN celular
- Reparación def. *Sacharomyces*

Inmunotoxicidad & Fotoalergia

- Discriminación entre potencial (foto) irritante/alérgico

Efectos fototóxicos dependientes de metabolitos

- Fototoxicidad de Fotoproductos
- Fototoxicidad de Metabolitos

