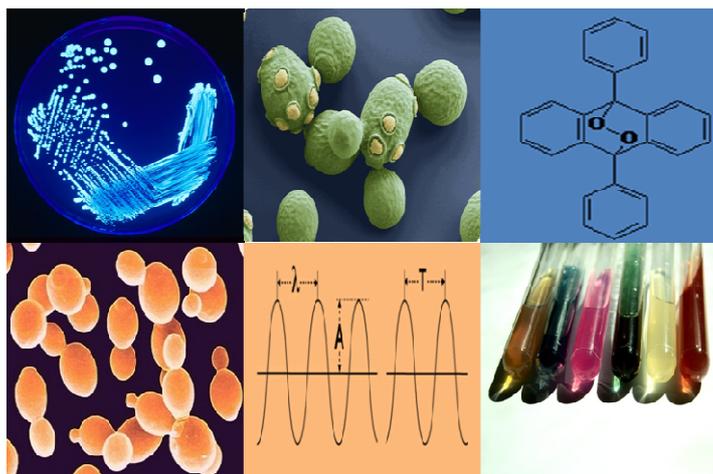


UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
FISICO-QUIMICAS Y NATURALES



**Estudio de la acción citotóxica del tratamiento
combinado de *Saccharomyces cerevisiae* con
ultrasonido y endoperóxidos**



Aldo José DICHARA

Tesis para optar al Título de
MICROBIÓLOGO

Director
Dr. Arnaldo T. SOLTERMANN

Co-Director
Mic. Franco M. ESCOBAR
Río Cuarto – 2010

Este trabajo de tesis de Microbiología, es presentado a la FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Para obtener el título de:

MICROBIÓLOGO

.....
Por: Aldo José Dichiara

TEMA:

Estudio de la acción citotóxica del tratamiento combinado
de *Saccharomyces cerevisiae* con ultrasonido y
endoperóxidos

.....
Director: Dr. Arnaldo T. Soltermann

.....
Co-director: Mic. Franco M. Escobar

Este trabajo se realizó en:
En las áreas de Virología y Microbiología del departamento de Microbiología e
Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la
Universidad Nacional de Río Cuarto.

CALIFICACIÓN:

.....
Dr. Arnaldo T. Soltermann

.....
Dra. Mirta. Demo

.....
Dra. Marisa Rovera

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS a mi mamá y papá por haberme dado la posibilidad de llegar a este momento. Gracias por su apoyo, su paciencia y compañía incondicional ¡GRACIAS DE CORAZON!

A mis hermanos, Griselda, Natalia, Dayana y Gustavo, que siempre estuvieron conmigo cuando los necesite, tanto en las buenas como en las malas y eso no lo voy a olvidar...

A mi Director Arnaldo Soltermann quien me dio la posibilidad de realizar este trabajo...

Un millón de gracias Franco, por tu constante dedicación, por la enorme ayuda que me brindaste, por hacer que cada día en laboratorio sea con alegría y humor, y sobre todo por ser una excelente persona. ¡GRACIAS FRANCO!

A Liliana, por tu ayuda imprescindible, por tu gran humor, por tu sinceridad, por tus consejos y por sobre todas las cosas gracias por permitirme estar y convivir en tu grupo de trabajo.
¡GRACIAS LILI!

A Walter Ducco, por su gran ayuda y sobre todo por tus explicaciones tan elaboradas, para que yo las pudiera entender...

Mil gracias a mis AMIGOS y amigas del alma, Ezequiel, José, Gisela, Manuel y Carolina con quienes he compartido los momentos más inolvidables en estos años. Sin ellos no hubiera sido lo mismo este camino. Me ayudaron a avanzar y ser quien soy. Siempre los tendré presente, porque como dije, son mis amigos del alma...

A mis compañeros con los que he cursado, que me han hecho reír y pasar muy buenos momentos dentro y fuera de la universidad...

Gracias Silvia por tu alegría, buen humor y por tus consejos que me ayudaron mucho...

Gracias a todas las personas que integran el laboratorio de virología, por sus consejos, ayuda, y por generar un ambiente de trabajo cálido y humano...

Y muchísimas GRACIAS a mi abuelo, EL FLACO!!!!



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer	1
1.1.a. Causas que originan cáncer	2
1.1.b. Tratamientos más utilizados para el cáncer	3
1.1.b.1. Cirugía	3
1.1.b.2. Radioterapia	3
1.1.b.3. Quimioterapia	4
1.1.b.4. Trasplantes de médula ósea y células madre	5
1.1.b.5. Inmunoterapia	5
1.1.b.6. Terapia fotodinámica	6
1.1.b.7. Terapia sonodinámica	6
1.2. Ultrasonido	7
1.2.a. Bases físicas del ultrasonido	7
1.2.a.1. Velocidad	7
1.2.a.2. Frecuencia	7
1.2.a.3. Longitud de onda	7
1.2.a.4. Amplitud	8
1.2.a.5. Periodo	8
1.2.a.6. Intensidad	8
1.2.b. Generación de ondas ultrasónicas	9
1.3. Cavitación	9
1.4. Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (HAPs)	10
1.4.a. Formación de los HAPs	11
1.4.b. Estabilidad de los HAPs	11
1.4.c. Efectos sobre la salud de los HAPs	11
1.4.d. Importancia de la molécula 9,10-peroxi-9,10-difenilantraceno (DFAO ₂) en la generación de ROS	12
1.5. Radicales libres	13
1.5.a. Daños producidos por los radicales libres	14
1.5.b. Especies reactivas del oxígeno: su asociación con el estrés oxidativo	14
1.6. <i>Saccharomices cerevisiae</i>	16



1.6.a. <i>S. cerevisiae</i> y estrés oxidativo	16
1.7. Planteamiento del problema	17
1.8. Hipótesis	18
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIALES	
3.1. Drogas	21
3.2. Cepa fúngica	21
3.3. Medios de cultivo	21
3.3.a. Agar Yeast Extract-peptone-dextrose (YPD40%)	21
3.3.b. Caldo Yeast Extract-peptone-dextrose (YPD40%)	21
3.4. Soluciones	21
3.4.a. Solución de agua peptonada	21
3.4.b. Solución fisiológica	22
3.5. Sonoprocador	22
4. MÉTODOS	
4.1. Fotosíntesis del sonosensibilizador de DFAO ₂ a partir de DFA	23
4.2. Sonólisis de la molécula DFAO ₂ mediante ondas ultrasónicas	23
4.3. Mantenimiento de la cepa fúngica	24
4.3.a. Determinación del título de levaduras por UFC/mL	24
4.3.b. Preparación del inóculo fúngico	24
4.4. Determinación de la sensibilidad de la cepa fúngica en función de:	
4.4.a. La energía de ultrasonido aplicada	25
4.4.b. La concentración de DFAO ₂	25
4.4.c. La concentración de 1,4-dioxano	26
4.4.d. La concentración de DFA	26
4.5. Determinación de la muerte celular por acción de las moléculas reactivas generadas desde DFAO ₂ tratadas con ultrasonido a la energía estandarizada	



4.5.a. Agregado del DFAO ₂ en caldo YPD40%, 24 h antes de la sonicación	27
4.5.b. Agregado del DFAO ₂ en caldo YPD40% con sonicación inmediata	27
4.5.c. Agregado del DFAO ₂ en solución fisiológica con sonicación inmediata	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. Fotosíntesis del sonosensibilizador DFAO ₂ a partir de DFA	29
5.2. Sonólisis de la molécula DFAO ₂ mediante ondas ultrasónicas	29
5.3. Mantenimiento de la cepa fúngica	29
5.3.a. Determinación del título de levaduras por UFC/mL	29
5.3.b. Preparación del inóculo fúngico	30
5.4. Determinación de la sensibilidad de la cepa fúngica en función de:	
5.4.a. La energía de US aplicada	30
5.4.b. La concentración del DFAO ₂	32
5.4.c. La concentración de 1,4-dioxano	33
5.4.d. La concentración de DFA	33
5.5. Determinación de la muerte celular por acción de las moléculas reactivas generadas desde DFAO ₂ tratadas con US a la energía estandarizada	33
5.5.a. Agregado de DFAO ₂ en caldo YPD40%, 24 h antes de la sonicación	34
5.5.b. Agregado de DFAO ₂ en caldo YPD40% con sonicación inmediata	36
5.5.c. Agregado de DFAO ₂ en solución fisiológica con sonicación inmediata	38
5.6. Discusión general	41
6. CONCLUSIONES	43
7. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diferencias entre tumores benignos y malignos	1
Tabla 2: Factores de riesgo asociados al cáncer y porcentaje de atribución	2



Tabla 3: Factores de riesgo asociados al cáncer y porcentaje de atribución	12
Tabla 4: Especies reactivas del oxígeno fisiológicas	13
Tabla 5: Sistema antioxidante de <i>S. cerevisiae</i>	17
Tabla 6: Sensibilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a la acción de diferentes niveles de energía ultrasónica	31
Tabla 7: Sensibilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a la acción de diferentes concentraciones de DFAO ₂ sonosensibilizada 24 h posteriores a crecimiento fúngico	34
Tabla 8: Sensibilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a la acción de diferentes concentraciones de DFAO ₂ en caldo YPD40% y sonosensibilizada inmediatamente	36
Tabla 9: Sensibilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a la acción de diferentes concentraciones de DFAO ₂ en solución fisiológica y sonosensibilizada inmediatamente	38
Tabla 10: Sensibilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a la acción de diferentes concentraciones de DFAO ₂ sonosensibilizada bajo diferentes condiciones de trabajo	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la transmisión de la onda λ : Longitud de onda. A: Amplitud. T: Periodo	8
---	---



Figura 2: Los ultrasonidos se propagan en forma de ondas longitudinales. Las moléculas del tejido atravesado sufren ciclos de expansión y compresión (barras verticales). La distancia entre dos puntos consecutivos que se encuentran en el mismo estado es la longitud de onda (λ : longitud de onda).....	9
Figura 3: Molécula de naftaleno	10
Figura 4: Producción de moléculas 9,10-peroxi-9,10-difenilantraceno (DFAO ₂)	13
Figura 5: Tendencia del tiempo de vida, reactividad y distancia de difusión en las células de las ROS más comunes	14
Figura 6: Producción de moléculas ROS y su asociación con funciones fisiológicas.....	15
Figura 7: Aspectos macroscópicos del desarrollo de colonias fúngicas típicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Figura 8: Aspectos macroscópicos del desarrollo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sometidas a diferentes condiciones de tratamiento y evaluado por el método de microdilución en caldo	32

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1: Fotólisis para la generación de la molécula sonosensibilizadora DFAO ₂	23
Diagrama 2: Sonólisis para la generación de DFA y ¹ ΔO ₂ (oxígeno singlete) a partir de DFAO ₂ por US.....	24
Diagrama 2: Evolución de la sensibilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bajo	



diferentes condiciones de tratamiento por el método de microdilución en caldo	26
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efecto del ultrasonido aplicado a diferentes energías (Ws) sobre la viabilidad porcentual de <i>S. cerevisiae</i>	31
Gráfico 2: Efecto sobre la viabilidad de <i>S. cerevisiae</i> de diferentes concentraciones de DFAO ₂ sometida a US (10000 Ws) previa incubación del sistema por 24 h a 30º.....	35
Gráfico 3: Efecto sobre la viabilidad de <i>S. cerevisiae</i> de diferentes concentraciones de DFAO ₂ en caldo YPD40% y sometida a US (10000Ws) inmediatamente	37
Gráfico 4: Efecto sobre la viabilidad de <i>S. cerevisiae</i> de diferentes concentraciones de DFAO ₂ en solución fisiológica y sometida a US (10000Ws) inmediatamente	39

Abreviaturas

A: Amplitud

atm: Atmosfera

ATP: Adenosin trifosfato

°C: Grados Centígrados

CAT: Catalasa

cGy: Centigreys

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

Cm: Centímetro

CS: Control del Sistema

D.O: Densidad Óptica

dB: Decibelio

DFA: 9,10-difenilantraceno

DFAO₂: 9,10-peroxi-9,10-difenilantraceno

f: Frecuencia

FDA: Terapia Fotodinamica

GPX: Glutación Peroxidasa

h: Horas

H₂O₂: Peroxido de Hidrogeno

HAPs: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Hz: Hertzios

KHz: Kilohercios

M: Molar

MHz: Megahertzios

mL: Mililitros

nm: Nanómetro

ns: Nanosegundo

\cdot OH: Hidroxilo

$^1\Delta O_2$: Oxígeno Singlete

$O_2^{\cdot-}$: Anión Superóxido

O_3 : Ozono

RBrS: Especies Reactivas del Bromo

RCIS: Especies Reactivas del Cloro

RL: Radicales Libres

RNS: Especies reactivas del Nitrógeno

RO \cdot : Alcóxido

ROO \cdot : Peróxido

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

rpm: Revoluciones por Minuto

SDT: Terapia Sonodinámica

Seg: Segundos

SOD: Superóxido Dismutasa

T: Periodo

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UNRC: Universidad Nacional de Río Cuarto

US: Ultrasonido

UV: Ultravioleta

v/v: Volumen en Volumen

V: Velocidad

vs: Versus

W/cm 2 : Wattios por centímetros cuadrados

Ws: Wattios por Segundo

YPD: Agar Yeast-extract-Peptone-Dextrose

λ : Longitud de Onda

μL : Microlitros



1. Introducción

1.1. Cáncer

El cáncer no es una sola enfermedad; es el nombre de una variedad de, por lo menos, cien enfermedades muy distintas entre sí y que se produce por el crecimiento anormal y desordenado de las células del cuerpo. Esto es causado por alteraciones celulares ocurridas cuando la clave cromosómica genética ha sido alterada, por lo que las células reciben mensajes erróneos. La célula cancerosa pierde el control de su propio desarrollo, de modo que se divide en más células a mayor velocidad que el resto de tejidos a los que pertenece, sin cumplir las funciones para las que han sido creadas.

Este crecimiento anormal de las células puede llegar a formar masas de tejidos llamadas tumores. El cáncer se desarrolla en diferentes etapas, y probablemente intervienen diferentes factores para convertirlo en un tumor visible. Es importante saber diferenciar los tumores benignos, o no cancerosos, de los malignos, o cancerosos. La diferencia entre los tumores benignos y malignos se puede ver en la Tabla 1.

Tabla 1: Diferencias entre tumores benignos y malignos

TUMORES BENIGNOS	TUMORES MALIGNOS
Son de crecimiento lento	Algunos son de crecimiento lento, pero con frecuencia son de crecimiento muy rápido
Solo crecen hasta determinado tamaño	Crece de manera progresiva e invasiva
No destruyen células normales	Destruyen células, tejidos y órganos
Crece de manera ordenada	Crece de manera desordenada
No se propagan a otros tejidos	Se propagan a los tejidos de otros órganos del cuerpo como metástasis
Normalmente no producen efectos secundarios graves	Si no se controla su crecimiento ocasionan la muerte

Base de datos: (http://incancerologico85.internet.gamma.axesnet.net/documentos/762_cancer.pdf).

Los tumores malignos se conocen por su capacidad de invadir y destruir tejidos y órganos tanto cercanos como los que están lejos del tumor original. Las células del cáncer atacan el tejido sano y nunca dejan de multiplicarse. La muerte se produce cuando la propagación del cáncer daña los tejidos y órganos vitales como el hígado, los pulmones o el cerebro, entre otros, de tal manera que estos órganos dejan de funcionar progresivamente.



1.1.a. Causas que originan cáncer

En general, el cáncer no se origina por una sola causa, sino que en su generación operan múltiples factores; por eso se dice que el cáncer es una enfermedad multifactorial. De manera amplia, las causas del cáncer se clasifican en dos categorías: externas e internas. Las causas internas se conocen como una predisposición genética, lo que quiere decir que en ciertas familias se hereda un gen anormal que hace que sus miembros presenten una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Esto ocurre solo en un pequeño porcentaje (5%-10%) del total de casos. Cuando en una misma familia varios miembros presentan cáncer a edad temprana (antes de los 50 años), se debe buscar una causa hereditaria. En la actualidad se sabe que la mayoría de los cánceres son ocasionados por causas externas, es decir, por exposiciones a sustancias químicas o a agentes físicos o biológicos que afectan los genes de las células, transformándolas en cancerosas. En la Tabla 2 se pueden apreciar los diferentes factores de riesgo a los que se les atribuye el cáncer.

(http://incancerologico85.internet.gamma.axesnet.net/documentos/762_cancer.pdf).

Tabla 2: Factores de riesgo asociados al cáncer y porcentaje de atribución

FACTORES DE RIESGO	PORCENTAJE ATRIBUIDO
Dieta	35
Consumo de cigarrillos	30
Infecciones	10
Rayos solares	3
Alcohol	3
Ocupación	4
Radiación	1
Contaminación	2
Medicamentos	1

Base de datos: (http://incancerologico85.internet.gamma.axesnet.net/documentos/762_cancer.pdf).

El cáncer tiene un comportamiento distinto en cada persona, que depende del órgano afectado y de la etapa en que haya sido diagnosticado. Puede darse a cualquier edad, pero es más probable que afecte a personas de edad avanzada, por lo general a partir de los 55 años. El cáncer también puede presentarse en jóvenes y niños y, de hecho, es la segunda causa principal de muerte de niños de edades comprometidas entre uno y quince años. Afortunadamente, con un tratamiento oportuno, el cáncer en los niños tiene altas probabilidades de curación.



1.1.b. Tratamientos más utilizados para el cáncer

Un tratamiento adecuado, debe proporcionar una alta posibilidad de alivio rápido o prevención del síntoma por un periodo prolongado, empleando poco tiempo para dicha mejoría, lo cual resulta en una baja mortalidad, (Stoll B.A, 1987). Desafortunadamente, solo algunos procedimientos cumplen estas estrictas premisas; sin embargo, en cada paciente, su patología y sintomatología deben ser estudiadas en forma individualizada para evaluar con cual procedimiento podría beneficiarse; estos tratamientos incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y recientemente implementada, la fototerapia.

1.1.b.1. Cirugía

La principal estrategia para el tratamiento curativo del cáncer es la extirpación de todas las células malignas mediante una intervención quirúrgica. En el pasado, esto implicaba la extracción de todo el tejido afectado y de la mayor cantidad posible de tejido potencialmente afectado, incluidos los tejidos vecinos y los ganglios linfáticos. Para algunos tumores, y en especial el cáncer de mama, no es precisa una cirugía tan ablativa (mastectomía) en la mayor parte de los casos. Las mejoras en las técnicas quirúrgicas, los conocimientos en fisiología, en anestesia y la disponibilidad de potentes antibióticos y hemoderivados, han permitido realizar cirugías más limitadas, con menos secuelas y más pronta recuperación. Sin embargo, muchos cánceres están demasiado extendidos en el momento del diagnóstico para que la cirugía curativa sea posible. Si la extensión local del tumor afecta a tejidos vecinos que no pueden ser extraídos, o si existen metástasis a distancia, la cirugía no será un tratamiento curativo. Sin embargo, puede ser beneficiosa para el alivio sintomático de ciertas situaciones como la obstrucción, o puede tener el objetivo de disminuir la masa tumoral para permitir una mejor respuesta al tratamiento quimioterapéutico o radioterapéutico sucesivo, (http://www.cancer.gov/images/documents/c484a70a-2c39-4ce0-8344-e4b43fe655d4/Fs7_1s.pdf).

Efectos secundarios: Los efectos secundarios de la cirugía dependen del tipo de intervención y del estado de salud general del paciente antes del procedimiento. Siendo los más frecuentes el dolor, la fatiga, la hinchazón, la rigidez y el drenaje alrededor del sitio de la cirugía. Así como el sangrado y la infección, que pueden ocurrir en el sitio de la incisión. Por otra parte, el linfedema puede ocurrir después de una disección de los ganglios linfáticos; esta patología es la acumulación anormal de líquido en un brazo o una pierna debido a una obstrucción en el sistema linfático, (<http://www.cancer.net/patient/All+About+Cancer/Cancer.Net+Features/Treatments,+Tests,+and+Procedures/Side+Effects+of+Cancer+Surgery>).

1.1.b.2. Radioterapia

La radioterapia (también llamada terapia con rayos X o irradiación) es el uso de un tipo de energía (llamada radiación ionizante) para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia lesiona o destruye las células en el área que recibe tratamiento al dañar su material genético y hacer imposible que crezcan y se dividan. Aunque la radiación daña las células cancerosas así como las normales, muchas células normales se recuperan de los efectos de la radiación y funcionan adecuadamente. El objeto de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano de alrededor. La radioterapia, por su acción local, es de las mejores opciones para el tratamiento



neoplásico (Delclos L., 1976; Richter and Coia 1985), ya que su toxicidad en muchos casos está localizada. Para iniciar radioterapia, además de la evaluación de síntomas a tratar, extensión de la enfermedad y efectos colaterales que pueden ser causados, hay tres factores con mayor influencia en el valor potencial de esta práctica (Hendrickson and Sheinkop, 1975), como son la radiosensibilidad del tumor, la tolerancia a la radiación de los tejidos normales vecinos y la cantidad de centigreys (cGy, equivalente a radianes como medida de radioterapia) recibidos anteriormente. En algunos casos, el objeto de la radioterapia es la destrucción completa de un tumor. En otros, el objetivo es reducir el tamaño del tumor y aliviar los síntomas. En cualquier caso, los médicos planifican el tratamiento para limitar lo más posible el daño al tejido sano. Alrededor de la mitad de los pacientes con cáncer reciben algún tipo de radioterapia. Se puede usar la radioterapia sola o en combinación con otros tratamientos de cáncer, como la quimioterapia o la cirugía. En algunos casos, es posible que el paciente reciba varios tipos de radioterapia, (http://www.cancer.gov/images/documents/c484a70a-2c39-4ce0-8344-e4b43fe655d4/Fs7_1s.pdf).

Efectos secundarios: La radioterapia puede producir una variedad de efectos secundarios que pueden incluir cansancio, reacciones leves en la piel, malestar estomacal y diarrea o deposiciones líquidas. Otros pueden ser hinchazón, enrojecimiento o irritación de la piel, caída del cabello, tos o dificultad para respirar (si la radiación se aplica en el cuello o el área del tórax), llagas en la boca (si la radiación se aplica en la cabeza) y problemas digestivos (si la radiación se aplica en el área abdominal). Estos desaparecen una vez finalizado el tratamiento. Además, la radioterapia puede causar efectos secundarios a largo plazo que pueden incluir el riesgo de desarrollar un cáncer secundario, infertilidad, problemas cardíacos, problemas gastrointestinales, fibrosis pulmonar (formación de cicatrices o engrosamiento del tejido pulmonar), problemas neurológicos, problemas tiroideos u osteoporosis. Además, los pacientes que ya recibieron radiación en el tórax deben tener en cuenta que tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer de mama y de pulmón, (<http://www.cancer.net/patient/All+About+Cancer/Cancer.Net+Features/Treatments,+Tests,+and+Procedures/Side+Effects+of+Cancer+Surgery>).

1.1.b.3. Quimioterapia

La quimioterapia es el suministro de medicamentos antineoplásicos para el tratamiento del cáncer, se caracteriza por atacar células en rápido crecimiento sin distinción entre normales o neoplásicas. En general está asociada con una variedad de síntomas que pueden causar deterioro de la calidad de vida de los pacientes, pero también se puede relacionar con prolongación de la supervivencia, (Ramond et al., 1985). Durante la división celular es más probable que se produzcan alteraciones en las células. En general, esta es la fase en la que actúa la quimioterapia, alterando la división de las células tumorales e impidiendo su multiplicación, y por tanto destruyéndolas. Con el tiempo, esto se traduce en una disminución o desaparición del tumor maligno. Las finalidades de la quimioterapia son fundamentalmente dos, por un lado es curativa ya que el propósito es curar la enfermedad, pudiendo para ello emplearse como tratamiento único o asociado a otros tratamientos. Un paciente se considera curado cuando no existe evidencia de células tumorales durante mucho tiempo. Por otro lado puede ser paliativa donde se pretende controlar los síntomas producidos por el tumor. Su objetivo primordial es mejorar la calidad de vida de enfermo y si fuera posible, aumentar también su supervivencia,



(http://www.todocancer.com/NR/rdonlyres/AE47F4E2-970E-4E07-AE02-70B835445295/0/guia_quimioterapia.pdf).

Efectos secundarios: Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen del paciente y la dosis utilizada, pero pueden incluir fatiga, riesgo de infecciones, náuseas, vómitos, pérdida del apetito y diarrea. La diarrea no tratada puede ser grave e incluso mortal si se llega a la deshidratación y la malnutrición. Se ha comprobado que, dependiendo del medicamento, algunos pacientes también pueden experimentar cosquilleo o adormecimiento en los brazos y las piernas, caída temporal del cabello, llagas en la boca, e incluso anemia por afectación de las células de la médula ósea, (<http://www.cancer.net/patient/All+About+Cancer/Cancer.Net+Features/Treatments,+Tests,+and+Procedures/Side+Effects+of+Cancer+Surgery>). Los efectos secundarios a largo plazo están asociados con daños permanentes en los órganos al corazón, pulmón, hígado, riñones o sistema reproductor. También puede afectar al sistema nervioso central modificando la concentración y la memoria de las personas. En los niños en particular que han recibido quimioterapia pueden tener problemas de desarrollo. Cambios en el sistema nervioso pueden desarrollarse meses o años después del tratamiento. Por último, los sobrevivientes de cáncer tienen un riesgo más alto de desarrollar cánceres secundarios.

1.1.b.4. Trasplantes de médula ósea y células madres

El trasplante de sangre y de médula ósea es un procedimiento médico no quirúrgico, cuya duración es de semanas a meses, mediante el cual se reemplaza la médula enferma por tejido sano. En el caso de los enfermos de cáncer, el objetivo es eliminar todas las células cancerosas. En el caso de las personas con enfermedades genéticas, el objetivo es corregir la enfermedad genética subyacente

(<http://www.cancer.net/patient/All+About+Cancer/Cancer.Net+Features/Treatments,+Tests,+and+Procedures/Side+Effects+of+Cancer+Surgery>).

Efectos secundarios: Infección por la inmunodeficiencia que se genera; la mayoría de las infecciones se producen durante las primeras cuatro semanas del trasplante. Además de la infección y el posible rechazo del injerto, otros efectos secundarios pueden ocurrir. Estos incluyen fatiga, llagas en la boca, dolor de garganta, diarrea, náuseas y vómitos, bajo recuento sanguíneo, pérdida de cabello, cambios en la pigmentación de la piel y erupción cutánea.

1.1.b.5. Inmunoterapia

La inmunoterapia es el tratamiento que utiliza sustancias inmunomoduladoras producidas por el organismo o en el laboratorio empleando sistemas *in vitro*, con el propósito de potenciar el sistema inmune del paciente afectado y así restaurar las defensas naturales del cuerpo contra el cáncer, (http://med.unne.edu.ar/catedras/cirugia_i/clases/ntc.PDF). Esta práctica está indicada para tumores en los cuales otros tipos de tratamientos no tienen ninguna efectividad, como el melanoma maligno y el carcinoma renal, (Wang et al., 1998). Para efectuar la inmunoterapia es corriente la utilización de anticuerpos monoclonales, interferones (alfa, beta y gamma) e Interleuquinas, infusión de linfocitos de un donante, alotrasplante de células madre de intensidad reducida e incluso algunas vacunas terapéuticas para el cáncer (http://www.leukemia-lymphoma.org/attachments/National/br_1259003723.pdf).



Efectos secundarios: Se ha descrito, en particular para los Interferones; indican que inducen una toxicidad de fácil manejo, caracterizada por un síndrome parecido al resfriado común, con fiebre, malestar general y astenia, (Krown S., 1987). Mientras que el empleo de las interleucinas produce efectos colaterales severos por administración endovenosa, lo que hace que generalmente estos tratamientos se tengan que aplicar en unidades de cuidados intensivos (Thompson J. A., 1987).

1.1.b.6. Terapia fotodinámica:

La terapia fotodinámica se basa en la aplicación de una fuente de energía en forma de luz con una determinada longitud de onda, sobre un tejido previamente fotosensibilizado mediante un compuesto químico, en presencia de oxígeno; de modo que se generan grandes cantidades de radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS) que producen muerte celular. La longitud de onda necesaria para activar el fármaco fotosensibilizador suele estar entre los 600 y los 800 nm. Esto se debe a que la hemoglobina absorbe casi toda la luz por debajo de los 600 nm y a mayores longitudes de onda la energía es insuficiente para generar radicales. La profundidad que alcanza la irradiación depende de la longitud de onda, del flujo administrado, de la capacidad de absorción del tejido y de las características intrínsecas del fármaco utilizado (espectro fotométrico, coeficiente de extinción, vida media)

(<http://scielo.isciii.es/pdf/ae/v31n6/v31n6a09.pdf>). La terapia fotodinámica es una técnica doblemente selectiva pues: i) se consigue una alta concentración del fármaco fotosensibilizante en el tejido diana (tumoral); y ii) se circunscribe la radiación sobre un volumen concreto de tejido.

Efectos secundarios: La terapia fotodinámica es una técnica relativamente nueva como terapia para el cáncer, por lo cual no se hay registros científicos consistentes que refieran a efectos secundarios para considerar. Lo que se puede rescatar de esta terapia como desventaja, es la escasa penetración de la luz visible en los tejidos biológicos, siendo esta la principal limitación para la aplicación clínica, (Ali et al., 2001; Yow et al., 2007).

1.1.b.7. Terapia sonodinámica:

La terapia sonodinámica es un concepto muy reciente, que se refiere a la capacidad del ultrasonido para producir efectos citotóxicos sobre las líneas celulares (Kessel et al., 1996). La citotoxicidad se puede mejorar por la presencia de drogas sonosensibilizadoras que en presencia de oxígeno y por acción del ultrasonido producen especies reactivas del oxígeno (ROS). El gran poder de penetración del ultrasonido en los tejidos biológicos permite superar las limitaciones que posee la fotodinámica en la aplicación clínica, (Yumita and Umemura, 2003; Rosenthal et al., 2004; Hiraoka et al., 2006; Kuroki et al., 2007). Se supone que el efecto citotóxico, esta mediado en gran parte por la cavitación inercial (Kessel et al., 1994), este proceso consiste en crear una burbuja de gas en un líquido por ultrasonido, que se derrumba rápidamente produciendo una onda de choque con una liberación de calor intenso (equivalente a miles grados Kelvin) (Wortington et al., 1997). Las moléculas de agua que rodean la burbuja de cavitación se descomponen en H y OH (pirólisis), estas moléculas se recombinan realizando una oxidación directa, formando H₂O, H₂O₂ y H₂; o pueden reducir las drogas sonosensibilizadoras o las biomoléculas celulares, (Suslick K.S., 1990).



1.2. Ultrasonido

El SONIDO es una vibración mecánica que oscila en la franja audible entre 16 y 20.000 Hertzios. El Hertzio (Hz) es una unidad de frecuencia: 1Hz =1 oscilación o ciclo por segundo (c.p.s). El sonido posee propiedades ondulatorias a semejanza de las ondas electromagnéticas como la luz, y presenta efectos diversos de interacción con el medio, tales como refracción, reflexión, atenuación, difracción, interferencia y emisión.

El ULTRASONIDO (US) es cualquier sonido con una frecuencia más alta a 20.000 Hz, por lo que no es audible para el oído humano y al igual que el sonido, viaja a través de un medio con una velocidad definida; el ultrasonido es una vibración mecánica de la materia que se transmite en forma de ondas de presión. Las características del fenómeno sonoro están relacionadas con su fuente de producción y su medio de propagación

(http://www.imagelearning.com.ar/comunidad/index.php?option=com_content&view=article&id=558:fisica-ultrasonido-co).

1.2.a. Bases físicas del ultrasonido

El ultrasonido puede ser caracterizado a través de ciertos parámetros tales como: velocidad, frecuencia, longitud de onda, amplitud, periodo e intensidad.

1.2.a.1. Velocidad

La velocidad de propagación es la distancia recorrida por la onda dividido por el tiempo empleado para recorrer esa distancia. La velocidad del ultrasonido en un tejido determinado depende de la densidad y elasticidad del medio que a su vez varían con la temperatura. La relación es directa, es decir, a mayor densidad del medio, mayor será la velocidad de transmisión del ultrasonido.

1.2.a.2. Frecuencia

Es el número de oscilaciones (vibración o ciclo) de una partícula por unidad de tiempo (segundo). Como los ultrasonidos son ondas de alta frecuencia, se utiliza como medida básica el Megahertzio (MHz) que es igual a un millón de Hz.

1.2.a.3. Longitud de onda

Es la distancia que existe entre dos puntos que se encuentran en el mismo estado de vibración (Figura 1). La longitud de onda, la velocidad y la frecuencia se relacionan con la fórmula siguiente:

$$\lambda = V / f$$

Donde λ es la longitud de onda, V la velocidad de propagación de la onda por el medio y f la frecuencia. Debido a que la velocidad es constante para cada medio y frecuencia de emisión (si la temperatura es constante) con la fórmula podemos calcular la longitud de onda del haz.

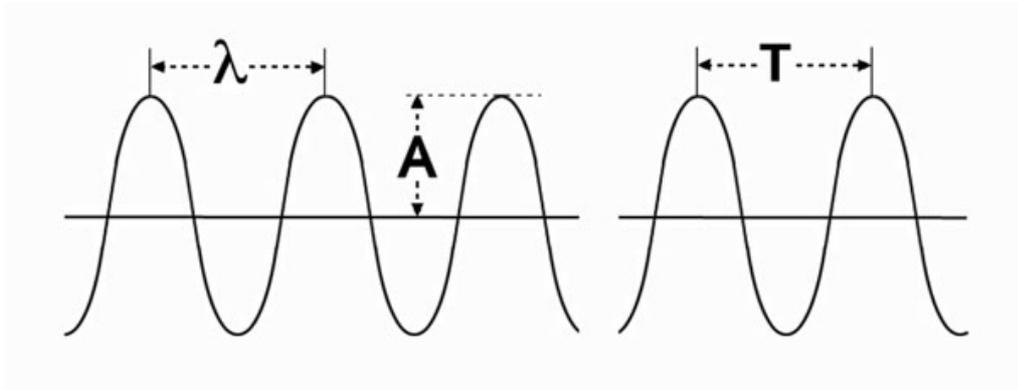


Figura 1: Esquema de la transmisión de la onda. λ : Longitud de onda (cm). A: Amplitud. T: Periodo (seg).

1.2.a.4. Amplitud

Es el máximo cambio producido en la presión de la onda, es decir la distancia máxima que alcanza la partícula vibratoria desde su posición inicial de reposo (altura de la curva sinusoidal. (Figura 1).

La amplitud se relaciona con la intensidad. De este modo si aumentamos la intensidad de una onda determinada aumentaremos su amplitud. Durante la transmisión de las ondas, por efecto de su interacción con el medio, disminuye la intensidad de la onda en función de la distancia recorrida y como consecuencia se produce una disminución de su amplitud. La amplitud, modo de vibración y velocidad de las ondas se diferencian en los sólidos, líquidos y gases debido a las grandes diferencias que entre las distancias de sus partículas internas. La unidad física que se emplea para representar la amplitud del ultrasonido es el belio, sin embargo en la práctica se utiliza el decibelio (dB) que es la décima parte del belio

(http://www.imagelearning.com.ar/comunidad/index.php?option=com_content&view=article&id=558:fisica-ultrasonido-co).

1.2.a.5. Periodo

Es el tiempo de una oscilación completa, es decir lo que tarda el sonido en recorrer una longitud de onda (Figura 1).

1.2.a.6. Intensidad

Es la energía que pasa por segundo a través de una superficie de área unidad colocada perpendicularmente a la dirección de propagación del movimiento. Equivale a la potencia de una onda dividido por la superficie de acción. Proporcional al cuadrado de la amplitud. No es uniforme en el tiempo ni en el espacio. Se mide en W/cm^2 .

La intensidad disminuye con la distancia a la fuente sónica.



1.2.b. Generación de ondas ultrasónicas

La producción y recepción de ultrasonido se realiza por medio de transductores. Estos son materiales piezoeléctricos, que por sus propiedades pueden relacionar energía eléctrica y mecánica. La producción de las ondas ultrasónicas se realiza por los ciclos sucesivos de contracción – expansión que sufren estos materiales cuando se les aplica un campo eléctrico. Del mismo modo, cuando se comprimen y expanden se generan cargas eléctricas que permiten la detección de las ondas ultrasónicas. El ultrasonido se propaga en forma de ondas longitudinales, en este tipo de ondas la dirección de propagación coincide con la de vibración (Figura 2). La onda se transmite en forma de ciclos sucesivos de condensación y enrarecimiento de la materia.

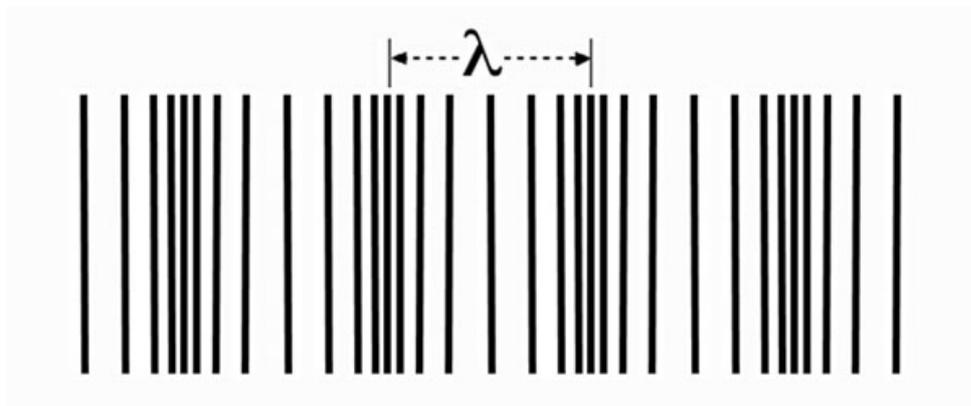


Figura 2: El ultrasonido se propagan en forma de ondas longitudinales. Las moléculas del tejido atravesado sufren ciclos de expansión y compresión (barras verticales). La distancia entre dos puntos consecutivos que se encuentran en el mismo estado es la longitud de onda (λ : longitud de onda).

Para que se propaguen por un medio, este debe tener dos propiedades: la inercia y la elasticidad. A diferencia de las ondas audibles, el ultrasonido no puede transmitirse por el aire con la misma eficiencia que en medios con mayor densidad, ya que cuanto mayor es la frecuencia, la onda necesita una mayor densidad/soporte del medio para su transmisión. Por su naturaleza ondulatoria, el ultrasonido va a presentar los fenómenos de reflexión, refracción, difracción, interferencia y además puede ser “enfocado”

(http://www.imagelearning.com.ar/comunidad/index.php?option=com_content&view=article&id=558:fisica-ultrasonido-co).

1.3. Cavitación

Históricamente, la cavitación se ha clasificado en dos tipos, no inercial e inercial. Las cavidades inerciales son burbujas de gas que crecen por la resonancia y pueden ampliarse hasta un máximo antes de colapsar violentamente.

La temperatura y la presión que experimenta el material contenido dentro de las cavidades de implosión pueden alcanzar valores superiores a 5000°C y 800 atm. Estas condiciones extremas



pueden inducir a una multitud de reacciones químicas dentro de los alrededores de las burbujas, como una concentración de energía suficiente como para generar luz, la radiación electromagnética conocida como sonoluminiscencia, (Duco y col., 2003; Rosenthal y col., 2004; Duco y col., 2008).

Los efectos químicos del ultrasonido, a diferencia de lo que ocurre en fotoquímica, no provienen por la interacción directa de las ondas con especies moleculares. El más importante proceso acústico no lineal de la sonoquímica es la cavitación que involucra tres etapas:

- I. Nucleación
- II. Crecimiento de la burbuja
- III. Colapso por implosión

La nucleación corresponde a la formación de cavidades en el seno de un líquido y es un proceso que depende de la fuerza tensil del mismo. Las cavidades se forman por efecto de la presión negativa de una onda de expansión acústica solo en ciertos puntos del líquido que presenten algún tipo de “falla”. Finalmente algunas burbujas de tamaño dado durante el ciclo positivo de compresión acústica pueden culminar implotando; esto produce un incremento de la temperatura y la presión local.

Las reacciones sonoquímicas pueden ocurrir en tres regiones diferentes. El primero es en el interior de la burbuja de gas, en las que prevalecen las altas presiones y temperaturas. En estas condiciones tienen lugar las reacciones típicas de pirólisis. En soluciones acuosas, los radicales hidroxilos, los átomos de hidrogeno y oxigeno se forman por la disociación térmica del agua. La segunda región es la interfaz entre el colapso de la burbuja de gas y la mayor parte del disolvente, donde existen también altas temperaturas y gradientes de presión. La eficiencia relativa de solutos no volátiles a descomponerse térmicamente en el interfaz del colapso de una burbuja depende de su capacidad para acumularse en la interfase gas/solución de las burbujas de crecimiento. En la tercera región, donde las temperaturas y presiones son normales, los radicales libres formados en las burbujas de cavitación pueden reaccionar con los solutos y producen productos similares a los que se forman en una reacción química (Wu and Nyborg, 2008).

1.4. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y sus derivados están asociados al aumento en la incidencia de diversos tipos de cánceres en el hombre.

Los HAPs son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos condensados. Los anillos pueden estar en formas rectas, anguladas o racimadas. La estructura condensada más sencilla, formada por solo dos anillos es el naftaleno, (Figura 3).

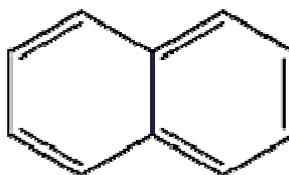


Figura 3: Molécula de Naftaleno



1.4.a. Formación de los HAPs

Los HAPs se forman por pirolisis o combustión incompleta de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno. La composición de los productos de la pirosíntesis depende del combustible y el tiempo de permanencia a altas temperaturas. Los combustibles que forman HAPs son el metano y otros hidrocarburos, así como hidratos de carbono, ligninas, péptidos, etc. Sin embargo, los compuestos insaturados y las estructuras cíclicas suelen favorecer la formación de aquellas moléculas. Una vez que los HAPs se forman se liberan de la zona de combustión en forma de vapores y debido a sus bajas presiones de vapor, la mayoría de los ellos se condensa en el acto sobre partículas de hollín o forman entre sí partículas muy pequeñas. En la atmósfera los HAPs son transportados a grandes distancias por los vientos, (*Stellman y McCan, 1998; Ellenhorn M. J., 1997*).

1.4.b. Estabilidad de los HAPs

Los sistemas conjugados de orbitales π de los HAPs son los responsables de su estabilidad química. Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es pequeña. Dependiendo de su carácter aromático los HAPs absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en muchos disolventes orgánicos, pero prácticamente insolubles en agua, tanto menos cuanto mayor sea su peso molecular, (*Stellman y McCan, 1998; Ellenhorn M.J., 1997*).

Químicamente, los HAPs reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce la saturación, conservándose el sistema de anillos. La mayoría de los HAPs sufren fotooxidación, siendo esta una forma para eliminarlos de la atmósfera. La reacción de fotooxidación más frecuente es la formación de "endoperóxidos", (*Stellman y McCan, 1998; Ellenhorn M.J., 1997*).

1.4.c. Efectos sobre la salud de los HAPs

No todos los HAPs han mostrado poseer efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutágenos y muchas veces el factor se atribuye a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados, principalmente los nitroderivados, (*Mastandrea y col., 2000*), (Tabla 3).



Tabla 3: Factores de riesgo asociados al cáncer y porcentaje de atribución

HAPs	Carcinogenicidad	Genotoxicidad	Mutagenicidad
• Fenantreno	I	L	+
• Antraceno	N	N	-
• Pireno	N	L	+
• Benzo[fluor]os	I	I	?
• Benzo[a]antraceno	S	S	+
• Benzo[e]pireno	I	L	+
• Benzo[a]pireno	S	S	+
• Dibenz[a]antraceno	S	S	+
• Benzo[ghi]perileno	I	I	+

(S= suficiente; I= insuficiente; N= no carcinogénico; L= limitados.)

Mutagenicidad (Test de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconcluso).

Base de datos: (Mastandrea y col., 2000).

1.4.d. Importancia de la molécula 9,10-peroxi-9,10-difenilantraceno (DFAO₂) en la generación de ROS

La fotosíntesis de endoperóxidos a partir de hidrocarburos aromáticos es conocida desde hace mucho tiempo. Así, la síntesis de 9,10-peroxi-9,10-difenilantraceno ó DFAO₂ (Figura 4), puede ser hallada en trabajos de (Wasserman and Larsen, 1972; Khan y col., 1986). Se trata de irradiar adecuadamente un sensibilizador en un solvente apropiado que genere oxígeno singlete molecular en presencia de un derivado antracénico. La incorporación de oxígeno singlete molecular ocurre a través de un conocido proceso de adición 4+2. La descomposición térmica de estos compuestos regenera el hidrocarburo de partida además de producir una mezcla de oxígeno en el estado fundamental y excitado (oxígeno singlete) cuya proporción depende de la naturaleza del endoperóxido de partida, (Balci M., 1981), La reacción de termólisis ha sido estudiada en sus aspectos cinéticos y termodinámicos por varios autores. Asimismo se ha demostrado que muchas reacciones térmicas pueden ser llevadas a cabo a través de la interacción de moléculas con ultrasonido (Mason T.J., 1988).

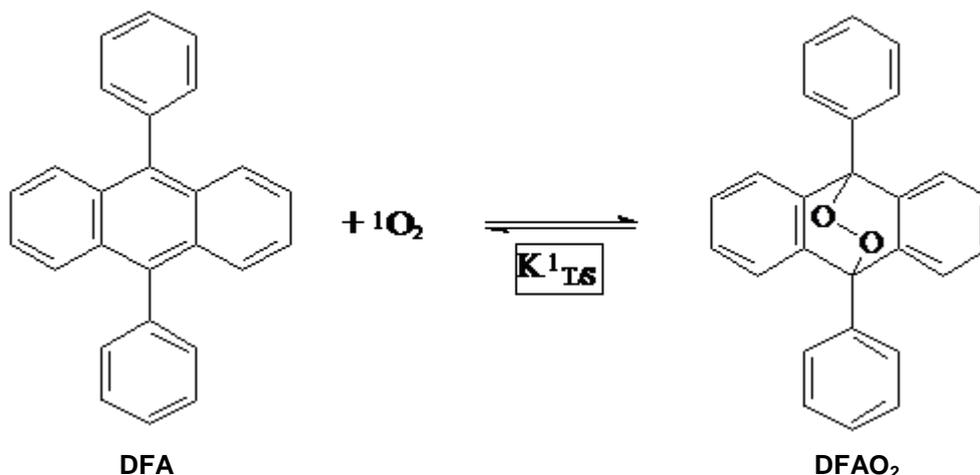


Figura 4: Producción de moléculas 9,10-peroxi-9,10-difenilantraceno (DFAO₂)

1.5. Radicales Libres

Los Radicales Libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado, pueden existir de forma independiente y debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media, (Boots y col., 2008).

La generación de RL no se ha relacionado siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos.

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término Especies Reactivas del Oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, (Tabla 4). La presencia de un (·) en una especie reactiva indica que ésta posee un electrón no apareado, es decir, que es un radical. De forma análoga existen Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS), del Cloro (RCIS) y del Bromo (RBrS), (Halliwell B., 2006).

	ROS	Símbolo
Radicales	<ul style="list-style-type: none"> • Anión superóxido • Hidroxilo • Alcóxido • Peróxido 	<p>O₂^{·-}</p> <p>·OH</p> <p>RO·</p> <p>ROO·</p>
No radicales	<ul style="list-style-type: none"> • Peróxido de hidrógeno • Ozono • Oxígeno singlete 	<p>H₂O₂</p> <p>O₃</p> <p>¹ΔO₂</p>

Tabla N° 4: Especies reactivas del oxígeno fisiológicas. (Halliwell B., 2006).



1.5.a. Daños producidos por los radicales libres

Cuando el organismo se ve desbordado por un exceso de RS (especies reactivas), prácticamente cualquier estructura biológica que lo integran (ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos) puede convertirse en diana de la acción de estas especies reactivas y resultar dañadas, (*Diplock et al., 1998*). El daño causado por el ataque de ROS y RNS puede originar lesiones en el ADN, pérdida de función de enzimas, incremento de la permeabilidad celular, disrupción de la señalización de la célula y, en ocasiones, muerte celular por necrosis o apoptosis, (*Kim et al., 2006*).

No todas las especies reactivas presentan la misma capacidad de reacción o son igual de reactivas. Ciertos compuestos como H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ y NO^{\cdot} , reaccionan de forma relativamente selectivas con solo ciertas moléculas biológicas *in vivo*, mientras que el radical $\cdot OH$ es altamente reactivo, ya que reacciona instantáneamente con cualquier molécula que encuentra, (*Kohen and Nyska, 2002*). Otra característica que diferencia a las ROS es el sitio donde actúan; los radicales libres reaccionan casi al instante en el lugar de su formación debido a su elevada reactividad. Se estima que el tiempo de vida de oxígeno singlete intracelular es de unos 10 – 40ns, que corresponde a una distancia de difusión de 10 – 20nm, (*Redmond and Kochevar, 2006*) (Figura 5); mientras que los ROS no radicalarios, como el H_2O_2 , pueden atravesar membranas biológicas y extender así su campo de acción y su posible toxicidad a zonas alejadas de su lugar de formación y durante periodos de tiempo más largo, (*Kohen and Nyska, 2002*).

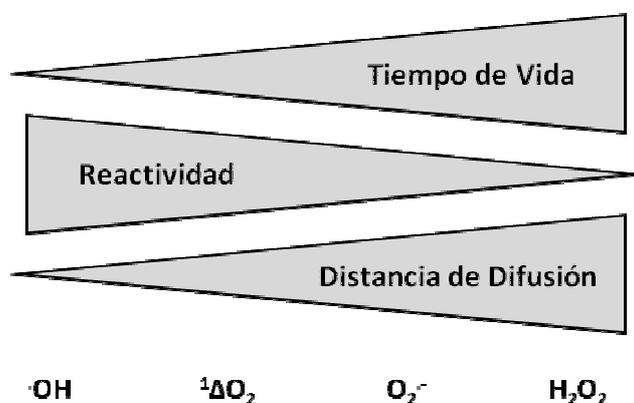


Figura 5: Tendencia del tiempo de vida, reactividad y distancia de difusión en las células de las ROS más comunes

1.5.b. Especies reactivas del oxígeno: su asociación con el estrés oxidativo

A excepción de aquellos organismos llamados anaerobios, que están adaptados para vivir en ausencia de oxígeno, los microorganismos, los animales y las plantas aerobias requieren oxígeno para obtener energía química (ATP), esencial para la vida. Sin embargo, cuando la concentración de oxígeno es mayor que la presente en la atmósfera, los organismos aerobios se enfrentan con la paradójica situación de que el oxígeno, es al mismo tiempo un agente tóxico (*Halliwell and Gutteridge, 1989; Scandalios J.G., 2005*).



La toxicidad del oxígeno es consecuencia de la formación de aquellas especies reactivas del oxígeno. En 1954 se postuló que la mayor parte del daño producido en organismos vivos por el oxígeno a altas presiones, se debía a la formación de radicales libres del oxígeno (*Gerschman y col., 1954; Gilbert D.L., 1981*). Éstas se generan como resultado del metabolismo intracelular normal, fundamentalmente en las mitocondrias y los peroxisomas, así como a partir de una gran variedad de sistemas citosólicos enzimáticos. Además, numerosos agentes externos son capaces de generar la formación de ROS en el organismo (Figura 6) un sofisticado sistema enzimático y no enzimático actúa regulando los niveles de ROS en el organismo para mantener un equilibrio en la célula.

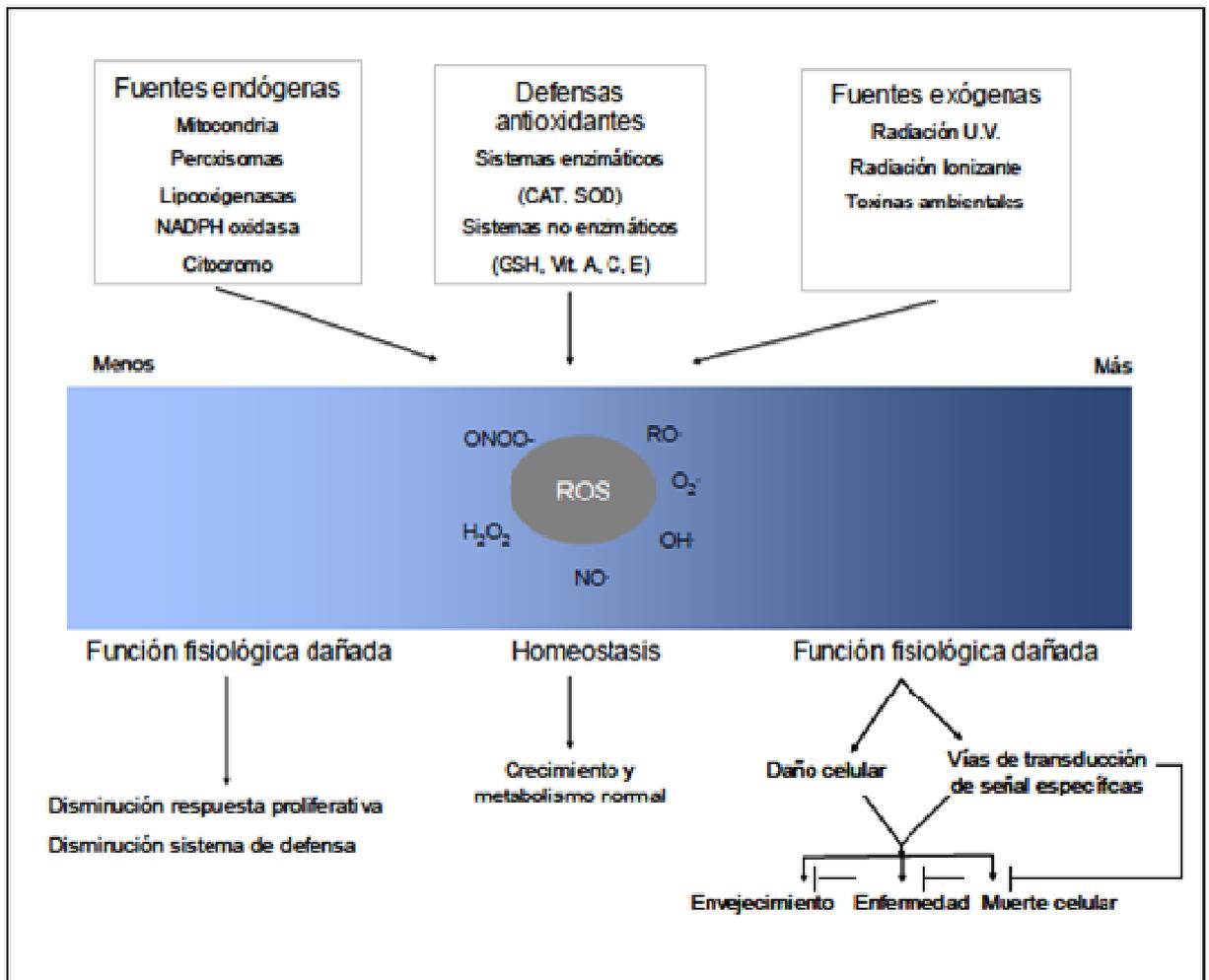


Figura 6: Producción de moléculas ROS y su asociación con funciones fisiológicas (*Valdivieso M.U., 2006*)

Niveles de ROS por debajo de valores homeostáticos celulares pueden alterar las funciones fisiológicas de proliferación y de defensa celular.

De forma similar, cuando existe un incremento de los niveles de ROS, tanto por un aumento de su concentración como por una disminución en los mecanismos de defensa, se pierde el balance entre la aparición de especies nocivas y la capacidad de la célula de evitar su acumulación, originándose una situación conocida como *estrés oxidativo* (*Sies H., 1985*). En estas



condiciones, las especies reactivas del oxígeno reaccionan con las macromoléculas de las células modificando su estructura y su función, dando lugar a alteraciones que pueden originar enfermedades, envejecimiento y muerte celular.

1.6. *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son hongos unicelulares que representan un puente biológico entre bacterias y organismos superiores, manteniendo las ventajas de los microorganismos en cuanto su fácil manipulación y crecimiento rápido.

Saccharomyces cerevisiae es quizás la levadura más importante para la humanidad, ya sea por su utilización desde hace miles de años en la producción de pan y bebidas alcohólicas por fermentación, o por ser uno de los organismos eucarióticos modelo más intensamente estudiados a nivel de su biología celular y molecular.

Debido a su relevancia y amplio conocimiento a nivel genético, el primer genoma eucariota completamente secuenciado fue el de esta levadura (Goffeau y col., 1996). Estudios comparativos de las secuencias permitieron estimar que el 23% de su genoma es similar al de los humanos.

La reproducción de las levaduras, en especial las utilizadas industrialmente, es normalmente asexual, a través de la gemación, pero la reproducción sexual también se puede dar en determinadas condiciones.

1.6.a. *S. cerevisiae* y estrés oxidativo

Las levaduras tienen una gran similitud con las células animales tanto a nivel macromolecular como de orgánulos, y se ha demostrado que ciertos números de proteínas de las levaduras tienen funciones intercambiables con sus homólogas humanas.

En *S. cerevisiae*, las respuestas ante el estrés producido por diferentes agentes (temperatura, falta de nutrientes, etanol, oxidantes, metales pesados, pH, etc.) comparten mecanismos comunes, aunque existen cambios genéticos y bioquímicos específicos dependiendo del agente causante del estrés. *S. cerevisiae* detecta el estrés oxidativo y genera una respuesta a nivel molecular induciendo los sistemas de defensa antioxidantes primarios y secundarios (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). En respuesta a este estrés oxidativo, se activan en la célula rutas de transmisión de señal y factores de transcripción específicos, que aumentan la expresión de genes que codifican para las proteínas antioxidantes. Esta respuesta específica al estrés oxidativo tiene como función disminuir los niveles de ROS así como reparar los daños producidos por estos oxidantes.

Las células disponen de enzimas específicas para la neutralización de las distintas especies reactivas, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX). Además contribuyen en la prevención del estrés oxidativo celular las tiorredoxinas y la glutarredoxina.

La Tabla 5 muestra los genes, las enzimas y las proteínas reguladoras más relevantes, que constituyen los sistemas implicados en la respuesta a estrés oxidativo en *S. cerevisiae*, (Valdivieso M.U., 2006).



Tabla 5: Sistema antioxidante de *S. cerevisiae*

Nombre	Gen	Enzima	Regulador
Glutation	<i>GSH1</i>	Glutamilcisteinil sintetasa	YAP1
	<i>GSH2</i>	Glutation sintetasa	
	<i>GLR1</i>	Glutation reductasa	YAP1
Tiorredoxina	<i>TRX1</i>	Tiorredoxina (citoplasma)	
	<i>TRX2</i>	Tiorredoxina (citoplasma)	YAP1/SKN7
	<i>TRR1</i>	Tiorredoxin reductasa I (citoplasma)	YAP1/SKN7
	<i>TRX3</i>	Tiorredoxina (mitocondria)	
	<i>TRR2</i>	Tiorredoxin reductasa II (mitocondria)	
Glutarredoxina	<i>GRX1</i>	Glutarredoxina (citoplasma)	
	<i>GRX2</i>	Glutarredoxina (citoplasma)	YAP1
	<i>GRX3 GRX4</i>	Glutarredoxina (núcleo)	
	<i>GRX5</i>	Glutarredoxina (mitocondria)	
Superóxido dismutasa	<i>SOD1</i>	Cu-ZnSOD (citoplasma)	YAP1/SKN7
	<i>SOD2</i>	Mn-SOD (mitocondria)	YAP1/SKN7
Catalasa	<i>CTA</i>	Catalasa A (peroxisoma)	YAP1/SKN7
	<i>CTT</i>	Catalasa T (mitocondria)	YAP1/SKN7 MSN2/MSN4
Metalotioneina	<i>CUP1</i>	Metalotioneina	ACE1
	<i>CRS5</i>	Metalotioneina	
Endonucleasa	<i>APN1</i>	Endonucleasa apurinica	
Ruta pentosas fosfato	<i>ZWF1</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	YAP1
	<i>TKL1</i>	Transcetolasa	
	<i>RPE1</i>	Ribulosa 5-fosfato epimerasa	
Glutation peroxidasa	<i>GPX1 GPX3</i>	glutation peroxidasa	
	<i>GPX2</i>	glutation peroxidasa	YAP1
Tiorredoxina peroxidasa	<i>TSA1 AHP1</i>	tiorredoxina peroxidasa	YAP1/SKN7

1.7. Planteamiento del problema

Los tumores malignos siguen siendo una de las principales causa de muerte en todo el mundo. Las modalidades terapéuticas para combatir el cáncer tales como cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapias biológicas son inicialmente exitosas en la mayoría de los casos, sin embargo, todavía es necesario mejorar su eficacia. En consecuencia se han generado nuevas estrategias terapéuticas que incluyen la terapia fotodinámica (FDT) y la terapia sonodinámica (SDT). Uno de las limitantes del tratamiento fotodinámico del cáncer reside en la inapropiada



penetración de la radiación electromagnética, pero esta imposibilidad no es tal para ondas mecánicas. Algunos antecedentes sobre tratamientos sonodinámicos del cáncer pueden ser hallados en los siguientes trabajos (*Rosenthal y col., 2004; Tu y col., 2005*).

Recientes estudios han demostrado que el ultrasonido puede activar, de manera eficiente, algunas moléculas sensibilizadoras para producir especies reactivas del oxígeno (ROS), las que pueden desactivar las células cancerosas directa o indirectamente. Se conocen muchos sensibilizadores utilizados en la investigación actual, principalmente fotosensibilizadores, por ejemplo, las porfirinas y sus derivados (*Rosenthal y col., 2004; Hiraoka y col., 2006; Kuroki y col., 2007; Wang y col., 2008*).

En el Dpto de Química de la UNRC se logró descomponer endoperóxidos fotosintetizados y naturales sometiéndolos a ondas mecánicas ultrasónicas con producción de oxígeno singlete molecular, con el propósito de evaluar su potencial para combatir células tumorales.

El potencial uso de un dispositivo “inteligente” de descarga de drogas en el tratamiento de cáncer depende de múltiples variables. Si bien se ha demostrado que químicamente es posible provocar la formación de partículas reactivas por la combinación de ultrasonido y endoperóxidos (*Duco, Grosso, Soltermann, resultados aún no publicados*), aún queda un importante camino por recorrer.

Así, el propósito de esta Tesina Final fue estudiar la acción citotóxica, del dispositivo químico desarrollado, sobre un sistema biológico. Dada la limitación de la utilización de animales enteros es que se eligió a las levaduras como medio biológico por las siguientes razones: muestran una especial resistencia al ultrasonido y ofrecen la ventaja de tener un mantenimiento simple, reproducible y relativamente más económico que otros sistemas celulares.

1.8. Hipótesis

Las moléculas reactivas del oxígeno (ROS) que se generan por el tratamiento de la molécula sonosensibilizadora (DFAO₂) con ondas de ultrasonido (US) ejercen muerte fúngica celular.



2. Objetivos

2.1. Objetivo General:

Demostrar que la molécula reactiva del oxígeno ($^1\Delta O_2$ = oxígeno singlete) generada por tratamiento con ultrasonido a partir de la molécula sensibilizadora DFAO₂ induce muerte de *Saccharomyces cerevisiae* bajo diferentes condiciones experimentales.

2.2. Objetivos Específicos:

- Fotosintetizar la molécula DFAO₂ a partir de DFA.
- Producir oxígeno singlete por sonosensibilización de DFAO₂
- Propagar y mantener la cepa fúngica.
 - Determinar el título de la levadura por UFC/mL.
 - Preparar del inóculo fúngico
- Determinar la sensibilidad de la cepa fúngica en función de;
 - La energía de ultrasonido aplicada
 - La concentración de DFAO₂
 - La concentración de 1,4-dioxano (solvente)
 - La concentración de DFA
- Determinar la muerte celular por acción de las moléculas reactivas generadas desde DFAO₂ tratada con ultrasonido a la energía estandarizada, con tres variaciones metodológicas:
 - Agregado del DFAO₂ en caldo YPD40% 24hs antes del tratamiento
 - Agregado del DFAO₂ en caldo YPD40% con sonicación inmediata
 - Agregado del DFAO₂ en solución fisiológica con sonicación inmediata



3. Materiales

3.1. Drogas

- 9, 10-Difenilantraceno (DFA). PM = 330,43 g/mol
- 1, 4 dioxano (solvente). PM = 88,11 g/mol
- 9, 10-peroxi-9, 10-difenilantraceno (DFAO₂). PM = 360,43 g/mol

3.2. Cepa fúngica

Se empleó una cepa fúngica, aislada de intestino de cerdo, perteneciente a colección de cultivos de la UNRC: *Sacharomyces cerevisiae* Rc 016.

3.3. Medios de cultivo

3.3.a. Agar yeast extract-peptone-dextrose (YPD40%)

- Peptona 5 g
- Extracto de levadura 5 g
- Dextrosa 40 g
- Agar – Agar 17 g
- Agua destilada c.s.p..... 1000 mL

3.3.b. Caldo yeast extract-peptone-dextrose (YPD 40%)

- Peptona 5 g
- Extracto de levadura 5 g
- Dextrosa 17 g
- Agua destilada c.s.p..... 1000 mL

El medio de cultivo (Yeast -extract-peptone-dextrose) se utilizó para el mantenimiento y desarrollo de levaduras en los ensayos microbiológicos. *Sacharomyces cerevisiae* y otras levaduras crecen bien en un medio mínimo conteniendo sólo glucosa y sales. La adición de proteínas y extracto de levadura permite un crecimiento más rápido.

3.4. Soluciones

3.4.a. Solución de agua peptonada

- Peptona..... 1 g
- Agua destilada c.s.p. 1000 mL



La solución se fraccionó en tubos de vidrio de 9 ml y se esterilizada a 0,75 atmósferas durante 20 minutos, y se conservó a 4°C hasta su uso. Se utilizó para realizar diluciones seriadas de la levadura en los diferentes tratamientos

3.4.b. Solucion fisiológica

CINa 9 g
Agua destilada c.s.p..... .1000 mL

La solución se esterilizó a 0,75 atmósferas durante 20 minutos y se conservó a 4°C hasta su uso. Se utilizó para lavar las células del caldo (YPD). También se la utilizó como diluyente de las células fúngicas en los diferentes tratamientos con ultrasonido.

3.5. Sonoprocador

En todos los experimentos que implicaron el uso de ultrasonido se utilizó un procesador ultrasónico Hielscher modelo UP200S. El tratamiento se llevó a cabo en erlenmeyers de 50 ml de paredes gruesas. La esterilización de los mismos se aseguró por autoclavado a 0,75 atmósferas durante 20 minutos.



4. Métodos

4.1. Fotosíntesis del sonosensibilizador DFAO₂ a partir de DFA.

Una solución de DFA en 1,4-Dioxano de concentración $4,4382 \times 10^{-3}$ M, fue irradiada a 420 nm utilizando un Reactor Fotoquímico Rayonet como fuente de iluminación, y con una potencia de 150 Watts por un lapso aproximado de 40 h. Durante la fotólisis la solución irradiada fue expuesta a una pequeña corriente de oxígeno saturada en 1,4-Dioxano (Diagrama 1).

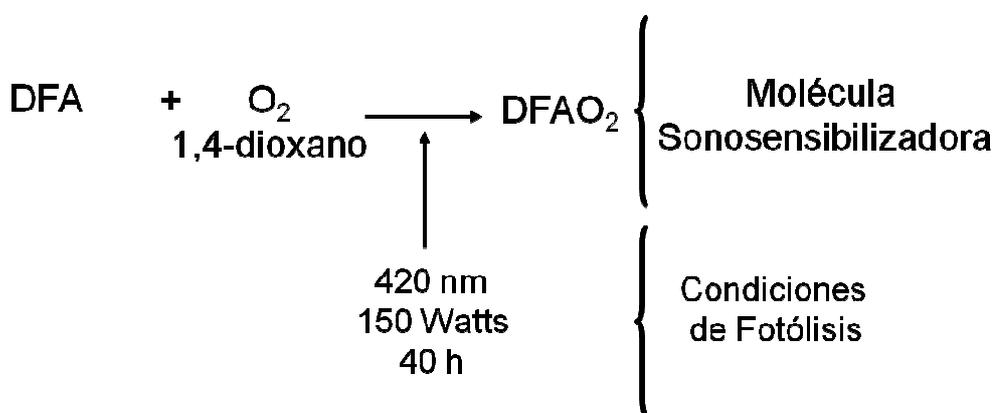


Diagrama 1: Fotólisis para la generación de la molécula sonosensibilizadora DFAO₂

La ruptura de la aromaticidad del antraceno por la adición de oxígeno, que siguió la cinética que describe la Figura 4 del apartado introducción, se evidenció en el espectro UV-Visible.

4.2. Sonolisis de la molécula DFAO₂ mediante ondas ultrasónicas

La disociación de la molécula DFAO₂ en DFA y oxígeno singlete (Diagrama 2), se ha demostrado que acontece eficientemente mediante la aplicación de pulsos ultrasónicos aplicados bajo una potencia acústica de 21 W/cm^2 (Duco y col. 2003; Duco y col., 2008). La eficiencia de esta reacción puede valorarse *in vitro* mediante la cuantificación del DFA formado por espectrofotometría.



Diagrama 2: Generación de DFA y ${}^1\Delta\text{O}_2$ (oxígeno singlete) a partir de DFAO₂ por US.

4.3. Mantenimiento de la cepa fúngica

La cepa fúngica, cedida por docentes del área Micología del Dpto. de Microbiología e Inmunología, fue crecida en caldo YPD 40% a 30°C y mantenida en el mismo medio por repiques sucesivos. Se consideró stock fúngico.

4.3.a. Determinación del título de levaduras por UFC/mL

La determinación del título fúngico se realizó siguiendo las especificaciones técnicas descritas por *Gamazo et al. (2005)*. Brevemente, la cepa fue diluida en agua peptonada hasta la dilución 10^{-6} . Posteriormente, de cada una de las últimas 3 diluciones se tomaron 100 μL , se sembraron en forma independiente sobre superficie de placas de Petri conteniendo agar YPD40%. Se incubó a 30°C durante 48 h; luego se realizó el recuento en aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias. El título fúngico fue expresado como Unidades Formadoras de Colonias UFC/mL. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.3.b. Preparación del inóculo fúngico

Para poder efectuar los ensayos de sensibilidad de la cepa fúngica a la acción de las drogas problema fue necesario realizar inicialmente la preparación de un inóculo fúngico uniforme. Para lograr ese propósito, se tomó desde una placa de Petri, una colonia de *Sacharomyces cerevisiae* que fue repicada en un tubo conteniendo 4 mL de caldo YPD40%, incubándose el sistema a 30°C por 24 h. Al cabo de ese tiempo y desde ese tubo, se tomó un inóculo que fue sembrado por triplicado en tubos conteniendo también 4 mL de YPD40%, con el propósito de amplificar la masa crítica de hongos mediante una incubación durante 24 h más a la misma temperatura. Pasado el tiempo de incubación, el contenido de esos 3 tubos fue homogeneizado y trasvasado a un erlenmeyer conteniendo caldo YPD40%. Empleando un espectrofotómetro con una longitud de onda (D.O. = 600), se ajustó una suspensión fúngica que arrojó una lectura de 0,05 y que garantizó una cantidad suficiente y fisiológicamente adecuada para los ensayos posteriores.



4.4. Determinación de la sensibilidad de la cepa fúngica en función de:

4.4.a. La energía de ultrasonido aplicada.

Veinte mL del inóculo preparado como se describe en el punto anterior fueron sometidos, en ensayos independientes, a los siguientes niveles de energía de US: 1.000 Ws (t1), 4.000 Ws (t2), 7.000 Ws (t3), 10.000 Ws (t4), 13.000 Ws (t5) y 16.000 Ws (t6) respectivamente. Todos, en pulsos de 0,5 segundos y con una densidad de potencia acústica de 21 W/cm^2 (20% de la potencia máxima del procesador). El control negativo del sistema (CS) incluyó 20 mL del inóculo que no recibió ninguna descarga de energía de US (0 Ws).

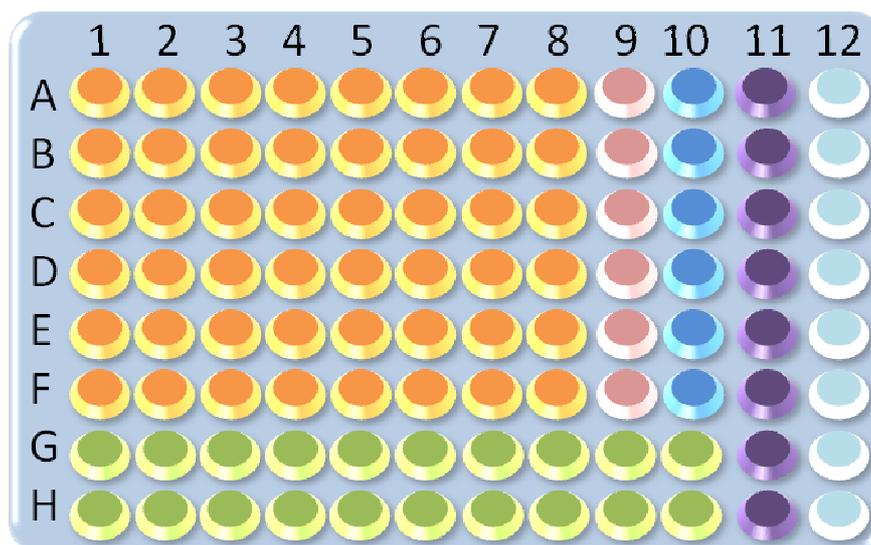
La determinación de la acción de la energía de US sobre la viabilidad de la levadura fue interpretada por reducción de título fúngico de los sistemas tratados vs el CS, (Quiroga, et al., 2001); cuantificando el título según la descripción metodológica del punto 4.2.a.

4.4.b. La concentración de DFAO₂

Considerando que DFAO₂ es la droga sustrato a partir del cual se genera la DFA y el oxígeno singlete, se eligieron diferentes concentraciones de aquella sustancia, en el orden de los microgramos y basados en la bibliografía de las terapias antimicrobianas (Muschiatti et al., 2005; Oussalah et al. 2007; Shan et al. 2007), para evaluar la influencia de la concentración de DFAO₂ sobre la viabilidad de la levadura seleccionada. Se realizó el ensayo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en cultivos fúngicos a pequeña escala mediante la técnica de microdilución en caldo según Bammert and Fostel (2000). Brevemente, la experiencia se desarrolló empleando microplacas de 96 pocillos. Se utilizaron 8 concentraciones, en $\mu\text{g/mL}$ de DFAO₂: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0,5, empleando como solvente de dilución el caldo YPD40%. En ensayos realizados por sextuplicado (Diagrama 3, pocillos naranja), se enfrentaron 75 μL de cada concentración de la droga a 75 μL del inóculo fúngico con una D.O. = 0,1. Como control negativo se trabajó el inóculo fúngico sólo, con caldo de cultivo y sin droga (columna 11, pocillos violetas). El sistema se llevó a incubar a 30°C por 24 h. Finalizado el tiempo de incubación, la acción del derivado antracénico sobre la viabilidad fúngica se interpretó por lectura en el lector de Elisa a una D.O. = 600 comparando valores alcanzados en los sistemas tratados vs el control y restando la lectura de la D.O de la droga sola diluida en caldo sin inóculo, (filas G y H, color verde).



Diagrama 3: Evaluación de la sensibilidad de *Saccharomyces cerevisiae* bajo diferentes condiciones de tratamiento por el método de microdilución en caldo.



- Concentraciones decrecientes de DFAO₂ en caldo YPD40%
- Concentraciones crecientes de 1,4-Dioxano en caldo YPD40%
- 75 µL de DFA + 75 µL de caldo YPD
- Inóculo fúngico diluido al medio en caldo YPD (control desarrollo normal)
- 150 µL de caldo YPD (control del caldo)
- 75 µL de cada uno de los diferentes concentraciones (DFAO₂ – 1,4-dioxano y DFA) + 75 µL caldo YPD (blanco de las diluciones)

4.4.c. La concentración de 1,4-dioxano

Por la misma técnica de microdilución en caldo se determinó el valor de CIM para el 1,4-dioxano empleado como solvente de la droga DFAO₂ y DFA. A tal fin las concentraciones porcentuales finales ensayadas de dicho solvente (v/v) en caldo YPD40%, fueron: 2, 3, 4, 5, 6 y 9 (Diagrama 3, columna 9, rosa). Los pocillos G9 y H9 representaron el control de este ensayo que incluyó el solvente a la mayor concentración testada (9% v/v), con caldo y sin inóculo.

4.4.d. La concentración de DFA

La determinación de la sensibilidad de la levadura a la acción de DFA fue realizada a una concentración fija de esta droga por considerar que la reacción de generación de la misma acontece como se muestra en el Diagrama 2.



De acuerdo a la estequiometría de esa reacción química, si se partiera de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DFAO₂, y si la eficiencia de la reacción fuera del 100%, lo máximo de DFA presente en el sistema sería esa concentración. Esto justificó seleccionar una concentración de DFA de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En el Diagrama 3 la columna 10 representa el ensayo realizado por sextuplicado en donde se enfrentaron 75 μL de DFA (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 75 μL del inóculo fúngico con una D.O. = 0,1. Se incluyó como control: la droga en caldo YPD40% y sin el inóculo fúngico (pocillos G10 y H10). El sistema se incubó a 30°C por 24 h. La interpretación del resultado se efectuó por visualización directa de presencia o ausencia de crecimiento fúngico y se corroboró por lectura de la D.O. a 600 nm en un lector de Elisa.

4.5. Determinación de la muerte celular por acción de las moléculas reactivas generadas desde DFAO₂ tratada con ultrasonido a la energía estandarizada.

Hubo tres variaciones metodológicas para estos ensayos y en todos los casos la eficiencia del tratamiento ultrasónico fue evaluado inmediatamente por el recuento de formación de colonias en cápsulas de Petri según descripción metodológica del punto 4.3.a.

4.5.a. Agregado del DFAO₂ en Caldo YPD40%, 24 h antes de la sonicación

Las experiencias se llevaron a cabo empleando 20 mL del inóculo microbiano con una D.O. = 0,05 que fue enfrentado, en ensayos independientes, a concentraciones decrecientes de DFAO₂: 16, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El sistema se incubó durante 24 h a 30°C y luego se expuso a las ondas ultrasónicas aplicadas con una energía de 10.000 ws. El ensayo incluyó los siguientes controles:

- a) Inóculo sólo sin droga ni exposición al US: Control de desarrollo fúngico normal
- b) Inóculo + DFAO₂ (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sin exposición al US: Control de inocuidad de la droga
- c) Inóculo sin droga con exposición al US: Control de inocuidad del US.

4.5.b. Agregado del DFAO₂ en Caldo YPD40% con sonicación inmediata

Las experiencias se llevaron a cabo empleando 20 mL del inóculo microbiano con una D.O. = 0,05 que fue incubado durante 24 h a 30°C y luego enfrentado, en ensayos independientes, a concentraciones decrecientes de DFAO₂: 16, 8, 4, 2, y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ser inmediatamente expuesto a las ondas ultrasónicas aplicadas con una energía de 10.000 Ws. El ensayo incluyó los mismos controles descritos en el punto anterior.



4.5.c. Agregado del DFAO₂ en solución fisiológica con sonicación inmediata

Las experiencias se llevaron a cabo empleando 160 mL del inóculo microbiano el que fue incubado durante 24 h a 30°C en caldo YPD40%. Al cabo de ese tiempo el medio fue removido por centrifugación a 2.000 rpm. El precipitado conteniendo las levaduras fue colectado en esterilidad y resuspendido en 160 mL de solución fisiológica estéril, la que fue fraccionada de a 20 mL en 8 erlenmeyer. Cinco envases fueron reservados para enfrentarlos, en forma individual, a las 5 concentraciones de prueba de DFAO₂ (16, 8, 4, 2 y 1µg/mL). Los 3 envases restantes se reservaron para el diseño de los mismos controles del sistema ya descrito.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Fotosíntesis del sonosensibilizador DFAO₂ a partir de DFA.

La eficiencia de la reacción para generar la molécula sonosensibilizadora DFAO₂ fue muy buena ya que el rendimiento en la producción de endoperóxidos fue del orden del 98%. La lectura al espectro visible reveló que partiendo de una concentración inicial de DFA = $4,40 \times 10^{-3}$ M, se obtuvo una concentración final de DFA = $6,85 \times 10^{-5}$, por lo que la concentración de endoperóxidos (DFAO₂) fue de $4,30 \times 10^{-3}$. Este rendimiento óptimo ha sido reportado por otros investigadores cuando han generado DFAO₂ a partir de hidrocarburos aromáticos, (*Khan et al., 1986; Wasserman and Larsen, 1972*).

5.2. Sonolisis de la molécula DFAO₂ mediante ondas ultrasónicas

La cuantificación de los productos de reacción generados mediante sonolisis de la molécula DFAO₂ reveló una producción exitosa de O singlete del orden del 80%, con el mismo nivel de eficiencia reportado por *Duco y col., (2008)*.

5.3. Mantenimiento de la cepa fúngica

Con el procedimiento descrito en el apartado 4.2. de métodos logró mantenerse la cepa fúngica problema en óptimas condiciones de viabilidad.

5.3.a. Determinación del título de levaduras por UFC/mL

La determinación del título fúngico en la mayoría de las experiencias indicó valores del orden 3×10^7 UFC/mL. El análisis macroscópico de las colonias desarrolladas en el agar se condijo con las características morfológicas ya descriptas para la levadura empleada, Figura 7.



Figura 7: Aspectos macroscópicos del desarrollo de colonias fúngicas típicas de *Saccharomyces cerevisiae*

5.3.b. Preparación del inóculo fúngico

Durante la preparación del inóculo fúngico los ensayos revelaron un desarrollo óptimo de la levadura que indicó un buen estado fisiológico del microorganismo garantizando la continuidad de las experiencias. El criterio de selección de un valor de D.O de 0,05, leído al espectrofotómetro con una longitud de onda de 600 nm, estuvo basado en el análisis de datos bibliográficos (NCCLS 2002; Yin et al 2006).

5.4. Determinación de la sensibilidad de la cepa fúngica en función de:

5.4.a. La energía de US aplicada

Los valores de viabilidad celular alcanzados luego de la aplicación de diferentes niveles de energía de US se muestran en la tabla siguiente.



Tabla 6: Sensibilidad de *Saccharomyces cerevisiae* a la acción de diferentes niveles de energía ultrasónica.

PARÁMETROS EVALUADOS	TRATAMIENTOS						
	Energía aplicada (Ws)						
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
	0	1000	4000	7000	10000	13000	16000
UFC/mL	$3,18 \times 10^7$	$2,69 \times 10^7$	$2,61 \times 10^7$	$2,05 \times 10^7$	$2,25 \times 10^7$	$1,36 \times 10^7$	$1,18 \times 10^7$
% Viabilidad Promedio	100	84,7	82,18	64,44	70,84	42,93	37,15

En este estudio pudo demostrarse que a medida que se incrementó la energía disipada en la solución, disminuyó la viabilidad celular porcentual calculada según la reducción del número de UFC/mL en los diferentes tratamientos respecto del sistema control sin tratar. Los datos, que fueron analizados por análisis de regresión lineal, permitieron construir el Gráfico 1 cuyo análisis confirma cierta relación dosis-respuesta.

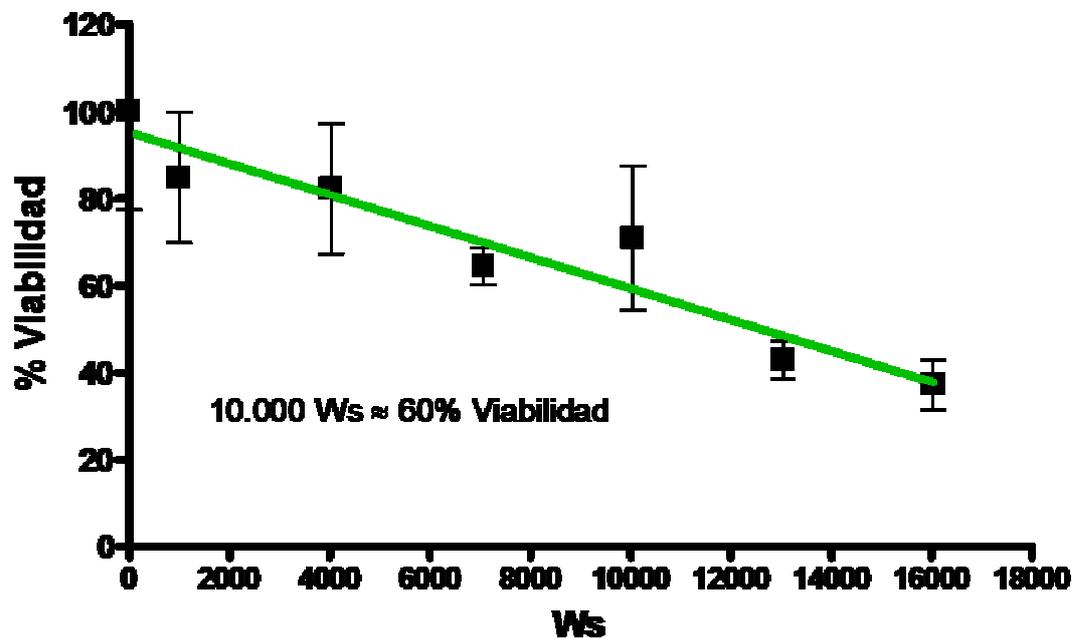


Gráfico 1: Efecto del ultrasonido aplicado a diferentes energías (Ws) sobre la viabilidad porcentual de *S. cerevisiae*

Como se observa, la intrapolación dentro de la curva muestra que una energía de US igual a 10.000 ws arrojaría un porcentaje de levaduras viables próximo al 60%. Se destaca este valor de energía pues con ella se ha logrado demostrar en ensayos previos que es la energía mínima



necesaria para asegurar la generación de ROS a partir del endoperóxido estudiado (DFAO₂) (Duco y col. 2008).

Podría interpretarse que un porcentaje de muerte celular del orden 40% es importante, no obstante la interpretación de los ensayos posteriores no se vería comprometida porque el valor de la potencia del desarrollo fúngico se mantuvo constante y alto (10⁷ UFC/mL) y la viabilidad fúngica superó el 60%. Este valor muestra una importante cantidad de microorganismos que me permite realizar recuentos confiables.

5.4.b. La concentración de DFAO₂

En el enfrentamiento de las diferentes concentraciones de DFAO₂ con las células fúngicas se pudo demostrar que hubo un excelente crecimiento de la levadura frente a todas las concentraciones de droga empleada (Figura 8).

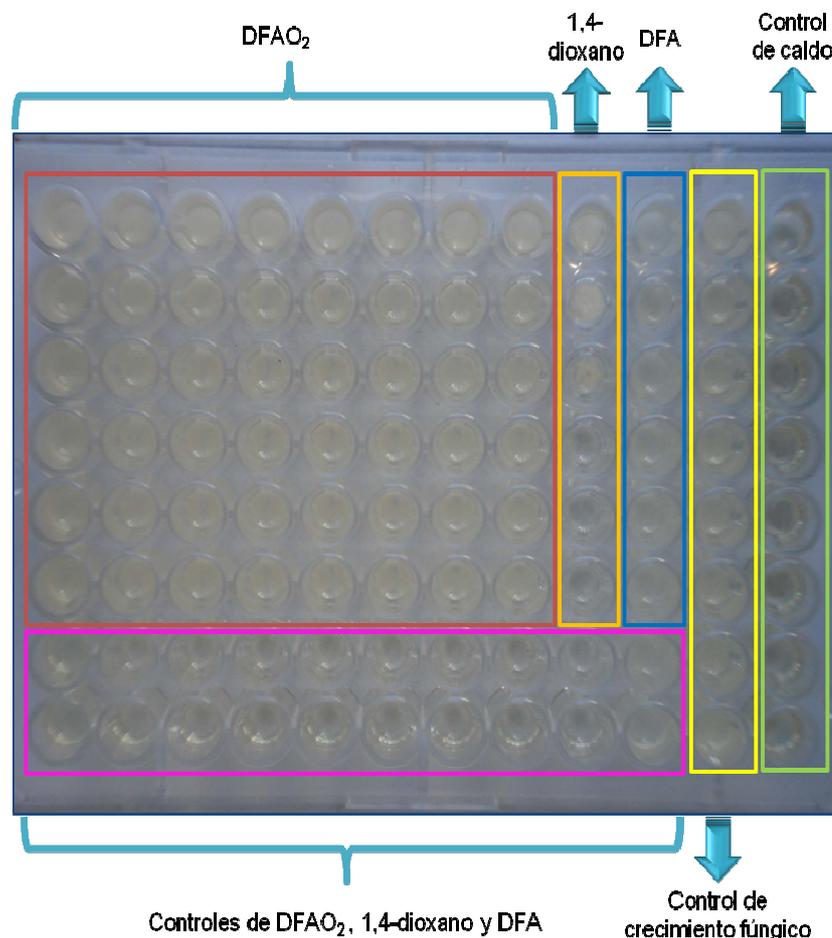


Figura 8: Aspectos macroscópicos del desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* sometida a diferentes condiciones de tratamiento y evaluado por el método de microdilución en caldo.

La turbidez registrada a la lectura en el espectrofotómetro reveló valores similares en los diferentes tratamientos vs el sistema control, indicando que DFAO₂ no modificó la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* en las condiciones de ensayo desplegadas. Por otra parte, el buen



desarrollo de la cepa problema sin droga, corroborado por la adecuada turbidez del medio, indicó la sostenida viabilidad del microorganismo seleccionado. En el tratamiento control, la ausencia de contaminación microbiana, confirmó buen manejo experimental durante el desarrollo de las experiencias.

Del conjunto de resultados obtenidos en este punto se infiere que el valor de CIM de DFAO₂ sería > 64 µg/mL. Este dato es muy importante pues muestra que la molécula sonosensibilizadora, al no interferir con la viabilidad del microorganismo, se puede utilizar con el propósito perseguido de generar oxígeno singlete.

5.4.c. La concentración de 1,4-dioxano

En el tratamiento de las células fúngicas con las diferentes concentraciones del solvente 1,4-dioxano, fue posible visualizar desarrollo de la levadura en las 3 concentraciones más bajas de dicho solvente (Figura 8). Cantidades mayores al 4% v/v ejercieron una total inhibición del microorganismo (pozos D, E y F9). Los datos resultan relevantes pues la cantidad necesaria del solvente para disolver aun la mayor concentración de DFAO₂ (64 µg/mL) no supera el 4% v/v. Esto garantiza que ninguno de los dos componentes del sistema estén ejerciendo *per se*, acción fungitóxica y permite seguir evaluando el potencial de la molécula sonosensibilizadora DFAO₂ para uso terapéutico.

5.4.d. La concentración de DFA

Como se observa en la Figura 8, una concentración alta y fija de DFA no modificó la capacidad del microorganismo de crecer adecuadamente. Hubo completo desarrollo fúngico en todos los pocillos (A-F10). Este resultado permitió continuar con ensayos de sensibilidad del microorganismo frente al oxígeno singlete asumiendo que la máxima concentración de DFA que se puede generar en la reacción de sonólisis no afecta la viabilidad del microorganismo.

5.5. Determinación de la muerte celular por acción de las moléculas reactivas generadas desde DFAO₂ tratada con ultrasonido a la energía estandarizada.

Mediante los ensayos anteriores fue posible estandarizar las condiciones controladas que permitieran evaluar la acción de oxígeno singlete que se genere por el US, sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*.



5.5.a. Agregado del DFAO₂ en Caldo YPD40%, 24 h antes de la sonicación

Para este diseño experimental los resultados obtenidos, que se exhiben en la Tabla 7 fueron empleados para la construcción del Gráfico 2.

Este experimento fue diseñado sabiendo que la droga no resultó citotóxica empleada a 16 µg/mL, y asumiendo además que al estar el microorganismo en contacto, antes de la sonicación, con la droga y en condiciones optimas de desarrollo, la misma sería internalizada y estaría disponible para generar oxígeno singlete que resultarían letales para la levadura.

Tabla 7: Sensibilidad de *S. cerevisiae* a la acción de diferentes concentraciones de DFAO₂ sonosensibilizada 24 h posteriores al crecimiento fúngico.

TRATAMIENTOS	CONDICIONES DEL SISTEMA		PARÁMETROS EVALUADOS	
	Energía (Ws)	Tiempo (seg)	UFC/mL	Viabilidad (%)
Control de Crecimiento Fúngico Normal	0	0	7 X 10 ⁷	100
Control de Inocuidad de droga (16 µg/mL)	0	0	6,2 X 10 ⁷	88
Control de Inocuidad de US (10000 Ws)	10000,19	793	5,03 X 10 ⁷	72
Concentración de DFAO ₂ (µg/mL)	Energía (Ws)	Tiempo (seg)	UFC/mL	Viabilidad (%)
1	10003,28	732	3,37 X 10 ⁷	48
2	10010,35	801	2,75 X 10 ⁷	39
4	10001,22	756	3,1 X 10 ⁷	44
8	10009,25	763	4,76 X 10 ⁷	68
16	10002,78	798	3,73 X 10 ⁷	53

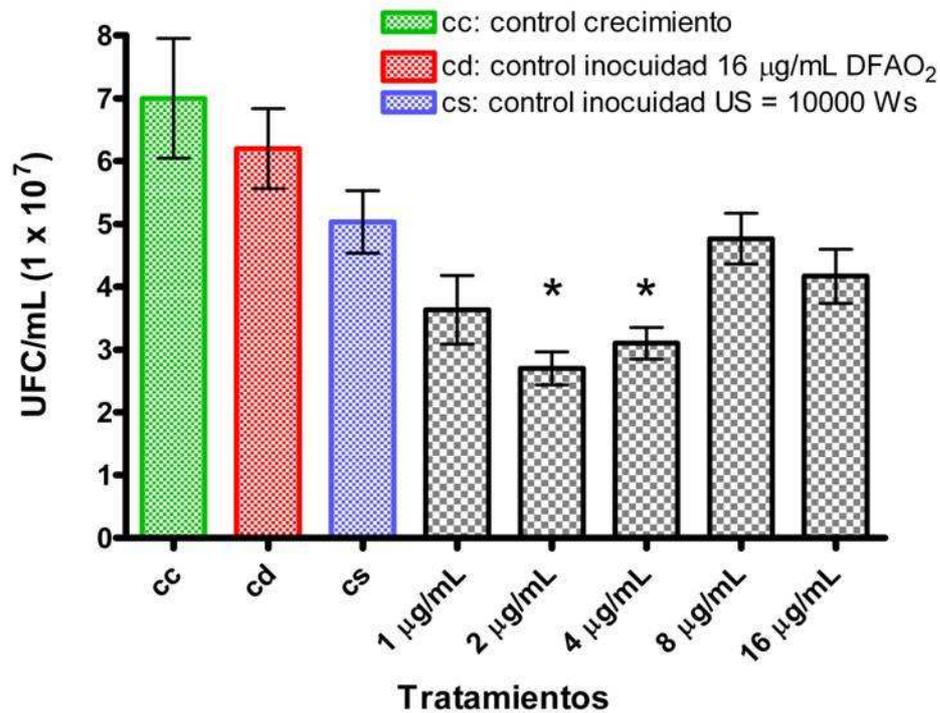


Gráfico 2: Efecto sobre la viabilidad de *S. cerevisiae* de diferentes concentraciones de DFAO₂ sometida a US (10000 Ws) previa incubación del sistema por 24 h a 30°C

Como se observa, el desarrollo de la cepa fúngica en el sistema control fue óptimo. De igual forma la incorporación de la droga DFAO₂ empleada a 16 µg/mL no comprometió el crecimiento de la levadura; mientras que el US aplicado a 10000 Ws disminuyó ese crecimiento en promedio no más allá del 35%. Todos estos datos corroboran los resultados previamente mostrados.

Los tratamientos de *Saccharomyces cerevisiae* con DFAO₂ empleada a diferentes concentraciones mas US, generó modificaciones en el desarrollo fúngico. El análisis comparativo de los resultados alcanzados parece apropiado realizarlo en función del desarrollo del hongo en todos los tratamientos con la droga vs al hongo crecido sin ella pero con US, por ser justamente esta variable parte esencial del sistema de ensayo. Pudo demostrarse que DFAO₂ sonosensibilizada no interfirió en el crecimiento del hongo siguiendo un modelo dosis-respuesta. Sólo las concentraciones de 2 y 4 µg/mL indujeron disminución del desarrollo fúngico, con diferencias significativas respecto del control ($p < 0,05$). La droga empleada a 1 µg/mL no produjo alteración significativa del crecimiento del hongo, esta circunstancia podría deberse a que esa concentración ha sido muy baja como para generar la suficiente cantidad de oxígeno singlete que modifique la fisiología del microorganismo. Llamativamente altas concentraciones de DFAO₂ no modificaron sustancialmente el crecimiento fúngico. Podría especularse que a altas cantidades de DFAO₂ se generen moléculas ROS que activan los mecanismos normales de defensa del huésped.

Mas allá de toda especulación, y analizando el conjunto de los resultados alcanzados podría decirse que el sistema así diseñado no resultó ser un modelo óptimo para demostrar que el oxígeno singlete generado desde DFAO₂ induzca citotoxicidad. Asumiendo además que como el



US fue aplicado a todo el sistema luego de que el microorganismo estuviera en contacto 24 h antes con DFAO₂ y que esta circunstancia podría llevar a que la levadura la metabolice, es que se planteó otro ensayo experimental.

5.5.b. Agregado del DFAO₂ en Caldo YPD40% con sonicación inmediata

Los resultados alcanzados en estas experiencias se vuelcan en la Tabla 8 y se emplearon para la construcción de Gráfico 3.

Tabla 8: Sensibilidad de *S. cerevisiae* a la acción de diferentes concentraciones de DFAO₂ en caldo YPD40% y sonosensibilizada inmediatamente.

TRATAMIENTOS	CONDICIONES DEL SISTEMA		PARÁMETROS EVALUADOS	
	Energía (Ws)	Tiempo (seg)	UFC/mL	Viabilidad (%)
Control de Crecimiento Fúngico Normal	0	0	7,06 X 10 ⁷	100
Control de Inocuidad de droga (16 µg/mL)	0	0	6,07 X 10 ⁷	85
Control de Inocuidad de US (10000 Ws)	10000,99	778	4,66 X 10 ⁷	66
Concentración de DFAO ₂ (µg/mL)	Energía (Ws)	Tiempo (seg)	UFC/mL	Viabilidad (%)
1	10003,28	752	3,46 X 10 ⁷	49
2	10006,11	805	2,56 X 10 ⁷	36
4	10006,72	765	2,82 X 10 ⁷	40
8	10000,00	760	4,53 X 10 ⁷	64
16	10005,55	779	3,73 X 10 ⁷	53

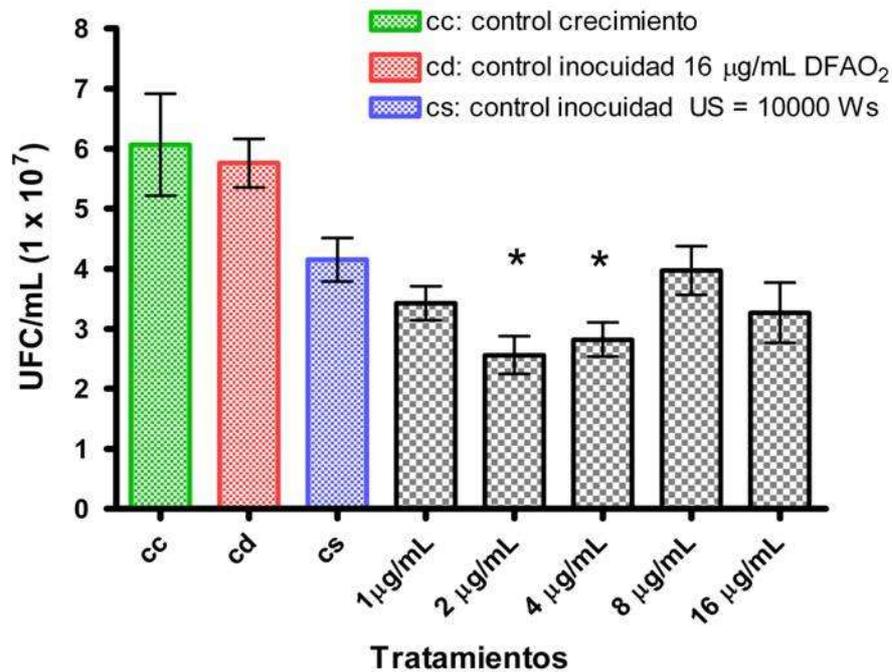


Gráfico 3: Efecto sobre la viabilidad de *S. cerevisiae* de diferentes concentraciones de DFAO₂ en caldo YPD40% y sometida a US (10000 Ws) inmediatamente.

El análisis de los resultados revelaron que el comportamiento del microorganismo frente a las diferentes concentraciones de la droga sonosensibilizada inmediatamente fue similar al desplegado cuando el sistema se sometió a ultrasonificación estando presente la droga 24 h antes.

Con los datos obtenidos mediante este diseño experimental se descarta que la posible internalización y/o metabolización de la droga haya influido en los resultados. Es posible que la poca acción citotóxica del oxígeno singlete generado, se deba a una efecto protector de los solutos del medio que interfieren su acción letal. Ante esta duda es que se planteó realizar las experiencias sometiendo al microorganismo a la acción de DFAO₂ disuelta en solución fisiológica basado en los antecedentes experimentales de *Tsukamoto et al.*, 2004.

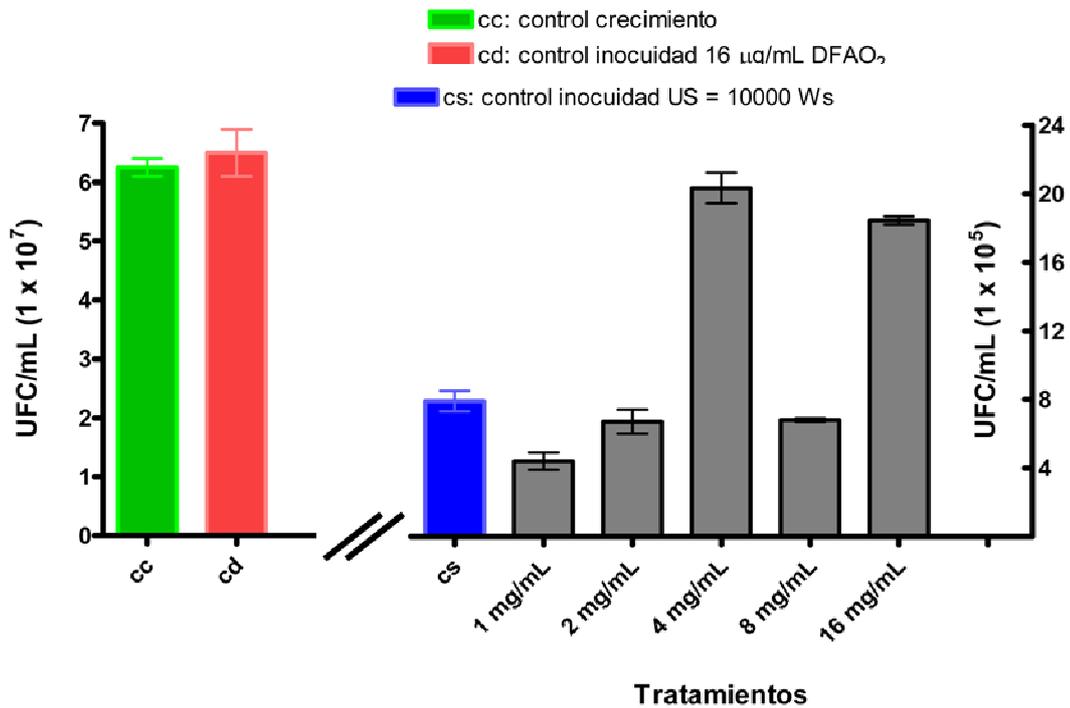


5.5.c. Agregado del DFAO₂ en solución fisiológica con sonicación inmediata

Los resultados alcanzados en estas experiencias se vuelcan en la Tabla 9 y se emplearon para la construcción de Gráfico 4.

Tabla 9: Sensibilidad de *S. cerevisiae* a la acción de diferentes concentraciones de DFAO₂ en solución fisiológica y sonosensibilizada inmediatamente.

TRATAMIENTOS	CONDICIONES DEL SISTEMA		PARÁMETROS EVALUADOS	
	Energía (Ws)	Tiempo (seg)	UFC/mL	Viabilidad (%)
Control de Crecimiento Fúngico Normal	0	0	$6,25 \times 10^7$	100
Control de Inocuidad de droga (16 µg/mL)	0	0	$6,50 \times 10^7$	100
Control de Inocuidad de US (10000 Ws)	10000,3	662	$7,90 \times 10^5$	1,2
Concentración de DFAO ₂ (µg/mL)	Energía (Ws)	Tiempo (seg)	UFC/mL	Viabilidad (%)
1	10012,01	623	$4,4 \times 10^5$	0,7
2	10001,28	630	$6,7 \times 10^5$	1
4	10005,27	669	$2,03 \times 10^6$	3,3
8	10007,93	691	$6,08 \times 10^5$	1,1
16	10010,19	703	$1,84 \times 10^6$	3



Gr

Gráfico 4: Efecto sobre la viabilidad de *S. cerevisiae* de diferentes concentraciones de DFAO₂ en solución fisiológica y sometida a US (10.000 Ws) inmediatamente.

Los resultados indican que todas las concentraciones de la droga resultaron letales sobre la levadura. También se vio dramáticamente afectado el crecimiento del microorganismo cuando se lo enfrentó exclusivamente a las ondas ultrasónicas y sin droga. Esto permite inferir que la acción letal sería ejercida en realidad por el US en sí mismo.

El haz de ultrasonido va perdiendo intensidad conforme va avanzando por el medio. Esta pérdida por unidad de longitud se denomina atenuación. La atenuación se produce por diferentes factores, desde la propia absorción de ultrasonido por el medio hasta las diversas reflexiones que puedan producirse por heterogeneidad del medio. También se producen dispersiones y pérdidas de dirección por refracción que lo hacen ineficaz a efectos terapéuticos, (<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-fis/ultrasonidos.pdf>).

Como la droga fue administrada en solución fisiológica, el sistema carece de los componentes químicos complejos que forman parte del medio de cultivo de la levadura, los que, actuando como solutos, estarían ejerciendo protección sobre el hongo, atenuando el US, tal como se deduce en las dos experiencias anteriores.

Los datos compilados de las tres experiencias últimas se vierten en la Tabla 10.



Tabla 10: Sensibilidad de *S. cerevisiae* a la acción de diferentes concentraciones de DFAO₂ sonosensibilizada bajo diferentes condiciones de trabajo.

Tratamientos	Crecimiento fúngico expresado en UFC/mL para los tratamientos		
	DFAO ₂ + US previa incubación 24 h en caldo	DFAO ₂ + US inmediatamente en caldo	DFAO ₂ + US inmediatamente en solución fisiológica
Control de Crecimiento Fúngico Normal	7,00 x 10 ⁷	6,07 x 10 ⁷	6,25 x 10 ⁷
Control de Inocuidad de droga (16 µg/mL)	6,20 x 10 ⁷	5,76 x 10 ⁷	6,5 x 10 ⁷
Control de Inocuidad de US (10000 Ws)	5,03 x 10 ⁷	4,15 x 10 ⁷	7,9 x 10 ⁵ *
[1 µg/mL] DFAO ₂	3,63 x 10 ⁷	3,42 x 10 ⁷	1,85 x 10 ⁶ *
[2 µg/mL] DFAO ₂	2,70 x 10 ⁷	2,56 x 10 ⁷	6,7 x 10 ⁵ *
[4 µg/mL] DFAO ₂	3,10 x 10 ⁷	2,82 x 10 ⁷	2,03 x 10 ⁶ *
[8 µg/mL] DFAO ₂	4,77 x 10 ⁷	3,97 x 10 ⁷	6,80 x 10 ⁵ *
[16 µg/mL] DFAO ₂	4,16 x 10 ⁷	3,27 x 10 ⁷	1,85 10 ⁶ *

* Diferencia significativa respecto al control de crecimiento fúngico (p<0,001).

Claramente se observa que el efecto protector de la solución fisiológica no existió porque hubo una disminución marcada del número de células del orden de 1 y 2 logaritmos tanto en las levaduras sometidas a la acción de las diferentes concentraciones DFAO₂ como al US administrado solo, sin droga, respecto de los sistemas controles sin tratar.

El US aplicado a 10000 Ws en solución fisiológica fue altamente letal. Este resultado no sorprende pues investigaciones efectuadas para evaluar la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* por irradiación ultrasónica han demostrado una alta tasa de muerte celular, cercana al 90%, cuando se aplicó la radiación en agua mineral, (Tsukamoto et al., 2004). Con esta explicación parecería inapropiado elegir esta energía, sin embargo es la cantidad mínima y necesaria de US que demanda la conversión de DFAO₂ en oxígeno singlete, por ello es que se utilizó de esta manera.

La explicación de tan alta tasa de muerte microbiana se le podría atribuir al hecho de que mediante el US se desencadena el proceso de cavitación con una gran formación de moléculas



ROS. No solo se generaría el oxígeno singlete desde la DFAO₂ sino que habría otras moléculas reactivas como OH⁻ y peróxidos producidos a partir del agua del sistema que representa el solvente de la solución fisiológica. Al haber mayor producción de ROS y una menor atenuación se justifica la diferencia de viabilidad celular cuando el microorganismo se encuentra en solución fisiológica respecto de su crecimiento cuando se encuentra en el caldo YPD40%.

Discusión General

En términos generales todo el estudio tuvo como objetivo diseñar un modelo *in vitro*, empleando células eucariota de fácil manipulación en el laboratorio y a bajo costo, para medir la eficiencia de la sonoconversión de DFAO₂ en DFA y en oxígeno singlete y cuantificar el poder citotóxico de esta última molécula.

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* son útiles para definir la citotoxicidad basal, por ejemplo la habilidad intrínseca de un componente para causar muerte celular como consecuencia del daño severo de las funciones celulares (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Cuando se efectúan algunas consideraciones relacionadas a las pruebas de citotoxicidad *in vitro*, es válido decir que existen muchos blancos celulares para el daño, pero generalmente, estos mecanismos convergen y producen una respuesta celular común, que es la muerte celular.

En relación a los tumores malignos, que siguen siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo, existe como se indicó diferentes modalidades terapéuticas aplicables para combatir su malignidad. Desde el avance de la ciencia se destacan últimamente como nuevas estrategias citotóxicas la fotodinámica y sonodinámica. Las moléculas sonosensibilizadoras cobran relevancia desde su capacidad para generar algunos productos de reacción que al interactuar con estructuras celulares influyan en su viabilidad. Así, la DFAO₂ como hidrocarburo aromático policíclico es motivo de estudio en los últimos tiempos, como potencial generadora de oxígeno singlete bajo condiciones de ultrasonicación.

Su eficacia se aborda en el laboratorio con el propósito de aplicarla a futuro como una sustancia que permita controlar y/o inhibir el desarrollo de células tumorales. La investigación está en sus inicios de forma tal que resulta necesario evaluar los posibles diseños metodológicos que permitan conocer su aplicabilidad terapéutica asociada al ultrasonido.

Los estudios aquí realizados han demostrado que bajo todas las condiciones experimentales solo fue posible evaluar daño citotóxico significativo sobre *Saccharomyces cerevisiae* cuando el microorganismo estuvo en solución fisiológica. No obstante, dicha acción no fue selectiva pues la muerte se registró asociada más a US que a la presencia del oxígeno singlete. Cuando el microorganismo en cambio se sometió a la acción de la droga en un medio rico en proteínas no pudo demostrarse que la molécula sonosensibilizadora fuera realmente efectiva. Es probable que los solutos del medio ejercieran una citoprotección en relación al oxígeno singlete. De igual forma, cuando el mismo fue eficaz al destruir algunas células, los productos de desecho generados por la lisis celular pudieron neutralizar la acción citotóxica del oxígeno singlete. No se ha discutido aquí la capacidad innata del microorganismo de influir en la capacidad de acción de las moléculas ROS, ya que es conocido que *S. cerevisiae* detecta el estrés oxidativo generando



activación de rutas de transmisión de señal y factores de transcripción específicos, que aumentan la expresión de genes que codifican para las proteínas antioxidantes.

Es probable que si el microorganismo se encuentra en un medio de crecimiento óptimo, su fisiología también sea óptima y así pueda defenderse de la agresión de moléculas extrañas. Debe considerarse además la presencia de la pared celular que podría estar contribuyendo a su resistencia a la acción citotóxica evaluada. La molécula DFAO₂ pudo no haber ingresado y al ser sonicada los productos reactivos generados hayan reaccionado con las proteínas del medio y no con las proteínas vitales de la levadura. Además, no debe ignorarse la escasa vida media de las moléculas ROS y su gran reactividad con diferentes solutos (*Redmond and Kochevar, 2006*). La atenuación y la buena fisiología de la célula eucariota bajo estas condiciones experimentales no permitieron mostrar la eficacia del oxígeno singlete como molécula asesina luego de la sonosensibilización de DFAO₂.

Desde todas estas experiencias puede concluirse que los diseños experimentales no han permitido definir un modelo óptimo para cuantificar la citotoxicidad desde la sonosensibilización de DFAO₂. Por tal motivo, la proyección experimental debería ser abordada mediante el empleo de células eucariotas en cultivos celulares, tal cómo se observa en numerosas investigaciones (*Feril Jr. et al. 2004; Rosenthal et al. 2004; Wang et al. 2010*).



6. CONCLUSIONES

- ◆ Como la producción de endoperóxidos fue del orden del 98% se concluye que la eficiencia de la reacción en las condiciones establecidas para generar la molécula sonosensibilizadora DFAO₂ fue muy buena.
- ◆ La cuantificación del O singlete como producto de reacción generado mediante sonólisis de la molécula DFAO₂ reveló una producción exitosa, del orden del 80%.
- ◆ La cepa fúngica, en caldo YPD40%, sometida a la acción de energía ultrasónica aplicada en valores crecientes revelaron cierta relación dosis-respuesta e indicaron que 10.000 Ws comprometió sólo el 40% de la viabilidad celular.
- ◆ El excelente crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* frente a todas las concentraciones empleadas de droga DFAO₂ (1-64 µg/mL) muestra que esta molécula sonosensibilizadora, al no interferir con la viabilidad del microorganismo, se puede utilizar con el propósito de generar oxígeno singlete.
- ◆ Como el solvente 1,4 dioxano resultó tóxico en proporciones superiores al 4% v/v se garantizó que no interferiría sobre la viabilidad del microorganismo porque en ensayos posteriores fue empleado a concentraciones menores.
- ◆ El excelente crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* frente a una única concentración de DFA (64 µg/mL) muestra que esta molécula no interfiere sobre la viabilidad del microorganismo cuando se produce a efectos de la sonólisis.
- ◆ Los estudios de sensibilidad de la cepa fúngica a la acción de DFAO₂ bajo diferentes condiciones experimentales revelaron que la droga no sería incorporada por el microorganismo en virtud de que el crecimiento fúngico fue similar cuando el sistema fue sometido a sonólisis inmediatamente o después de 24 h de incorporada la molécula sonosensibilizadora.



- ◆ Presumiblemente existiría poca difusión del oxígeno singlete al interior de la levadura pues el mismo reaccionaría con los solutos del medio afectando su acción citotóxica.
- ◆ El efecto protector de las sustancias químicas que componen el caldo de cultivo se pierde cuando la cepa es enfrentada a DFAO₂ en solución fisiológica. El incremento de la muerte celular en este medio revela además el efecto citotóxico aditivo de otras moléculas ROS.
- ◆ Los modelos experimentales para evaluar la utilización de 9,10-peroxi-9,10-difenilantraceno (DFAO₂) como molécula sonosensibilizadora, generadora de oxígeno singlete (¹ΔO₂), para una futura utilización en el tratamiento de tumores; no permitieron evidenciar la acción citotóxica del ¹ΔO₂ sobre *Saccharomyces cerevisiae*, demostrando que la energía ultrasónica mínima necesaria para sonosensibilizar a DFAO₂ posee cierta toxicidad sobre el sistema celular empleado como diana.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ali. S. M, Chee. S. K, Yuen. G. Y, Olivo. M. 2001. Hypericin and hypocrellin induced apoptosis in human mucosal carcinoma cells. *J. Photochem Photobiol B.* **65**: 59–73.
2. Balci M. 1981. Bicyclic endoperoxides and synthetic applications. *Chem Rev.* **81**: 91-108.
3. Bammert G., Fostel J. 2000. Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1255–1265.
4. Boots A. W., Haenena G., Basta A. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology.* **585**: 325-337.
5. Costa V. and Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* **22**: 217-246.
6. Delclos L., 1976. New and old concepts in radiotherapeutic treatment. *Int J Radiant Oncol Biol Phys.* **1**: 1217.
7. Diplock A., Charleux T., Crozier-Willi J. L, Kok G., Rice-Evans F. J., Roberfroid, L. 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* **80**: 77-112.
8. Duco W., Soltermann A., Grosso V. 2003. Fotosíntesis de endoperóxidos y su degradación termo y sonoasistida ¿Efecto sonodinámico? XIII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química inorgánica realizado en Bahía Blanca – Argentina. Organizado por: Asociación Argentina de Investigación Físicoquímica y la Universidad Nacional del Sur – Argentina. 07 al 10 de Abril de 2003.
9. Duco W., Soltermann A., Grosso V. 2008. Sonoquímica de peróxidos en solución: cinética y mecanismos de reacción. Posibles aplicaciones. 5º Encuentro Nacional de Investigadores en Temas Relacionados con Sustancias Peroxídicas. Olavarría, Provincia de Buenos Aires, 23 y 24 de octubre de 2008.
10. Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B.J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, J.C. Lhuguenot, R.; Pieters, R.; Kleiner, J. 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology* **40 (2-3)**:193-236.
11. Ellenhorn M. J. 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En: Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. Second edition. Baltimore: Williams & Williams. p. 1420-47.
12. Feril L.B. Jr, Tsuda Y., Kondo T., Zhao Q.L., Ogawa R., Cui Z.G., Tsukada K., Riesz P. 2004. Ultrasound-induced killing of monocytic U937 cells enhanced by 2,2'azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *Cancer Science* **95**: 181-185.
13. Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. Manual Práctico de Microbiología 3 edición. 2005. Masson, S. A. ISBN 84-458-1599.
14. Gerschman R., Gilbert D. L., Nye S. W., Dwyer P., Fenn W.O. 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science.* **119**: 754-760.
15. Gilbert D.L. 1981. Oxygen and living processes. An interdisciplinary approach. Springer-Verlag, NY (Ed).



16. Goffeau A., Barrel B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D, Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettlin H, Oliver S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*. **274**: 563-567.
17. Halliwell B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* **141**: 312-322.
18. Halliwell B. and Gutteridge J.M. 1989. Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon press.
19. Hendrickson. F. R, Sheinkop. M. B, 1975. Management of osseus matastases. *Semin Oncol*. **2**: 399-404.
20. Hiraoka W, Honda H, Feril L. B. Jr., Kudo N, Kondo T. 2006. Comparison between sonodynamic effect and photodynamic effect with photosensitizers on free radical formation and cell killing. *Ultrason Sonochem*. **13**: 535-542.
21. http://incancerologico85.internet.gamma.axesnet.net/documentos/762_cancer.pdf
22. http://med.unne.edu.ar/catedras/cirugia_i/clases/ntc.PDF
23. <http://scielo.isciii.es/pdf/aue/v31n6/v31n6a09.pdf>
24. http://www.cancer.gov/images/documents/c484a70a-2c39-4ce0-8344-e4b43fe655d4/Fs7_1s.pdf
25. <http://www.cancer.net/patient/All+About+Cancer/Cancer.Net+Features/Treatments,+Tests,+and+Procedures/Side+Effects+of+Cancer+Surgery>
26. <http://www.cancer.net/patient/All+About+Cancer/Cancer.Net+Features/Treatments,+Tests,+and+Procedures/Side+Effects+of+Cancer+Surgery>
27. http://www.imagelearning.com.ar/comunidad/index.php?option=com_content&view=article&id=558:fisica-ultrasonido-co
28. http://www.leukemia-lymphoma.org/attachments/National/br_1259003723.pdf
29. <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-fis/ultrasonidos.pdf>
30. http://www.todocancer.com/NR/rdonlyres/AE47F4E2-970E-4E07-AE02-70B835445295/0/guia_quimioterapia.pdf
31. Kessel D, Jeffers R, Fowlkes J. B, Cain C. 1994. Porphyrin-induced enhancement of ultrasound cytotoxicity. *International Journal of Radiation Biology*. **66**: 221-228.
32. Kessel D, Jeffers R, Fowlkes J. B, Cain C. 1996. Effects of sonodynamic and photodynamic treatment on cellular thiol levels. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. **32**: 103-106.
33. Khan S., Chou Pi-Tai, Frei H., 1986. Time-resolved O₂¹⁷B-Oeg→3Σ_g⁻chemiluminescence upon UV laser photolysis of an aromatic endoperoxide in aqueous solution. *Chemical physics letters Y*. **129(5)**: 463-467.
34. Kim H., Rafiuddin-Shah M., Tu H. C., Jeffers J. R., Zambetti G. P. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology* **8(12)**: 1348-1358.
35. Kohen R. and Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **30**: 620-650.
36. Krown. S, 1987. Interferon treatment of renal cell carcinoma. Current status and future prospect. *Cáncer*. **59**: 645-648.



37. Kuroki M., Hachimine K., Abe H., Shibaguchi H., Kuroki M., Maekawa S., Yanagisawa J., Kinugasa T., Tanaka T., Yamashita Y. 2007. Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers. *Anticancer Res.* **27**: 3673–3677.
38. Mason T. J. 1988. Sonochemistry (theory, applications and uses of ultrasound in chemistry). *Ellis Horwood series.* **3**: 64-98.
39. Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A. 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **39(1)**: 27-36.
40. Muschietti L., Derita M., Sülsen V., Muñoz J de D., Ferraro G., Zacchino S., Martino V. 2005. In vitro antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **102**: 233–238.
41. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd ed. M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
42. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **18**: 414–420.
43. Quiroga, E. N.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* **74**: 89-96.
44. Ramond. E. H, Metcalfe. M. S, MacDonald. J. S, 1985. Palliative chemotherapy and hormonal therapy. *Semin Oncol.* **12**: 384-389.
45. Redmond R. W and Kochevar I. E. 2006. Symposium-in-Print: Singlet Oxygen Invited Review Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology.* **82**:1178–1186.
46. Richter. M. P. and Coia. L. R, 1985. Palliative radiation therapy. *Semin Oncol.* **12**; 375-383.
47. Rosenthal I, Sostaric J. Z, Riesz P. 2004. Sonodynamic therapy-a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry.* **11**: 349–363.
48. Scandalios J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **38**: 995-1014.
49. Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* **117**: 112–119
50. Sies H. 1985. Oxidative stress. San Diego. Academic Press. (Ed.)
51. Stellman J. M. y McCan M. 1998. Hidrocarburos poliaromáticos. En: Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. 3ª edición. Madrid: Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales – Subdirección General de Publicaciones. p. 310-9.
52. Stoll. B. A, 1987. Knowing when not to treat. *Balliere`s Clinical Oncology.* **1**: 443-55.
53. Suslick K. S, 1990. Sonochemistry. *Science.* **247**: 1439–1445.
54. Thompson J. A. 1987. Recombinant interleukin-2 toxicity, pharmacokinetics and immunomodulatory effects in a phase 1 trial. *Cáncer Res.* **47**: 4202-4207.



55. Tsukamoto I.; Yim B.; Stavarache C.E.; Furuta M., Hashiba K.; Maeda Y. 2004. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry* **11**: 61–65.
56. Tu G., Chen S., Xiong Z., Yu T. 2005. The use of models in “target” theory to evaluate the survival curves of human ovarian carcinoma cell line exposure to adriamycin combined with ultrasound. *Ultrasonics Sonochem.* **12**: 345-348.
57. Valdivieso M. U. 2006. Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutation. Tesis Doctoral en Química. ISBN: 84-338-3821-0.
58. Wang P., Wang X., B, Liu Q., H, Tang W, Li T. 2008. Enhancement of ultrasonically induced cytotoxic effect by hematoporphyrin in vitro. *Chemotherapy.* **54**:364–371.
59. Wang P.; Xu C.; Xu J.; Wang X.; Leung A. W. 2010. Hypocrellin B enhances ultrasound-induced cell death of nasopharyngeal carcinoma cells. *Ultrasound in Med. & Biol.* **36(2)**:336-342
60. Wang T. S., Lowe L., Smith J. W. 1998. Complete spontaneous regression of pulmonary metastatic melanoma. *Dermatol Surg.* **24**: 915-919.
61. Wasserman H. and Larsen L. 1972. Formation of 1,4-endoperoxides from the dye-sensitized photo-oxygenation of alkyl-naphthalenes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **94**: 253-254.
62. Wortington A.E., Thompson J., Rauth A.M., Hunt J.W. 1997. Mechanism of ultrasound enhanced porphyrin cytotoxicity. Part I: a search for free radical effects. *Ultrasound in Medicine and Biology.* **23**: 1095–1105.
63. Wu J. and Nyborg W. L. 2008. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **60**: 1103–1116.
64. Yin H., Zhao Y., Zhang Y., Zhang H., Xu L., Zou Z., Yang W., Cheng J., Zhou Y. 2006. Genome-wide analysis of the expression profile of *Saccharomyces cerevisiae* in response to treatment with the plant isoflavone, wighteone, as a potential antifungal agent. *Biotechnology Letters* **28**: 99–105.
65. Yow C.M.N., Wong C.K, Huang Z., Ho R.J. 2007. Study of the efficacy and mechanism of ALA-mediated photodynamic therapy on human hepatocellular carcinoma cell. *Liver International.* **27**: 201–208.
66. Yumita N. and Umemura S. 2003. Sonodynamic therapy with photofrin II on AH130 solid tumor. Pharmacokinetics, tissue distribution and sonodynamic antitumoral efficacy of photofrin II. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* **51**: 174–178.