



**I
N
A
O
E**

Caracterización de la Muerte Celular Generada por la Terapia Fotodinámica en una Línea Celular de Cáncer de Mama

por

Nayeli Fernanda Pérez Pérez

Tesis sometida como requisito parcial para obtener el grado de

Maestría en Ciencias y Tecnologías Biomédicas

en el

Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica

Septiembre, 2019

Bajo la supervisión de:

Teresita Spezzia Mazzocco

INAOE

María Guadalupe Delgado López

CIBIOR

©INAOE 2021

El autor otorga al INAOE el permiso de reproducir y distribuir copias parcial o totalmente de esta tesis.

Vo. Bo. Teresita Spezzia Mazzocco



Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mi familia, en especial a papá y a mamá, por su amor incondicional y el apoyo que siempre me brindan en cada una de las decisiones que he tomado, ¡gracias por tanto!

A la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco, por aceptarme para realizar esta tesis de maestría, además del apoyo y la motivación brindada.

A la Dra. Guadalupe Delgado López, por la oportunidad de trabajar con usted y por toda su paciencia, enseñanza y el tiempo brindado durante la realización de mi estancia.

A Itzel, Juan Carlos, Jonathan y todos los compañeros de laboratorio, por los consejos y por compartir sus conocimientos conmigo, además de siempre alegrar mi estancia.

Al Centro De Investigación Biomédica De Oriente (CIBIOR), por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los servicios y las facilidades que me ofrecieron para realizar la maestría.

A Vianey, Arely y María, por el apoyo y cariño que siempre me brindan.

Y finalmente, quiero agradecer a mis amigos, Hans, Balaam, Jesús, Zapata, César, Sergio, Saúl, Freddy, Héctor, Laura y Luisa, por la paciencia, cariño, entendimiento y apoyo durante toda la maestría.

¡Muchas Gracias!

Introducción: El cáncer de mama es la principal causa de mortalidad entre las mujeres de todo el mundo. Las terapias aplicadas a esta enfermedad (quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal) en general son técnicas invasivas e inespecíficas. La terapia fotodinámica (TFD ó PDT por sus siglas en inglés), es una terapia anticancerígena que puede destruir células tumorales, mediante la interacción de un agente fotosensibilizante, que cuando es estimulado por la longitud de onda apropiada induce la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS ó ROS, por sus siglas en inglés) que causan muerte celular. La TFD es un procedimiento mínimamente invasivo, no ionizante y una nueva y prometedora alternativa para combatir el cáncer, sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a las células a la muerte siguen sin estar claros.

Métodos: en este estudio, caracterizamos el tipo de muerte provocado por la TFD en una línea celular de cáncer de mama triple negativo humano (MDA-MB-231) con morfología epitelial, altamente agresivo, invasivo y poco diferenciado, y una línea celular epitelial humana no tumorigénica de glándula mamaria (MCF 10A), se utilizaron como fotosensibilizadores al azul de metileno y al rosa de bengala. Las células se incubaron en ausencia o presencia del fotosensibilizador y se irradiaron o no a 10 J/cm^2 . Se hicieron observaciones por microscopía óptica con tinción de Giemsa y microscopía de fluorescencia con tinción de Hoechst para evaluar los cambios morfológicos y determinar el tipo de muerte celular provocado. Además, se llevó a cabo la medición de la presencia de especies reactivas de oxígeno en las células por medio de citometría de flujo. Finalmente se realizó un examen de viabilidad (MTT) para la línea no tumorigénica (MCF 10A), para los tratamientos de TFD con ambos fotosensibilizadores. Para la línea celular MDA-MB-231, se consideraron los valores de viabilidad reportados en un trabajo previo.

Resultados: observamos que la TFD con rosa de bengala o azul de metileno, produjo la muerte de las células cancerosas, sin embargo, las células no tumorales no respondieron al tratamiento. Lo que sugiere una selectividad del tratamiento por las células tumorales. Los resultados de la prueba de viabilidad por MTT en la línea MCF 10A confirmaron que las células no tumorigénicas no tiene disminución en la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa y por lo tanto siguen viables aún después del tratamiento. Los análisis morfológicos de la línea MDA-MB-231 sometida a la TFD utilizando azul de metileno a la más alta concentración de fotosensibilizador ($20 \mu\text{M}$) y la TFD con rosa de bengala a la más alta concentración de fotosensibilizador ($7 \mu\text{M}$), mostró células con compactación del citoplasma, disminución del tamaño nuclear, cuerpos apoptóticos y formación de burbujeo (blebbing) en citoplasma. La

TFD con azul de metileno, también mostró células con características oncóticas y cariolíticas, sin embargo, fueron en menor cantidad. Fue posible observar que la confluencia disminuyó drásticamente con los dos tratamientos, lo que nos indica que las células pierden la habilidad de mantenerse adheridas a la superficie y por lo tanto un daño. Se sugiere que el tipo de muerte celular generado por la TFD con rosa de bengala es “apoptosis”, mientras que, para el azul de metileno, hay una predisposición a la “apoptosis” pero también existen células con “necrosis”.

La identificación del tipo de vía de oxidación que inicia el proceso de muerte celular se evaluó con el ensayo de especies reactivas de oxígeno, con el cual se observó que la línea celular tumorigénica contenía por sí misma niveles muy altos de ROS, mucho mayores a los de la línea no tumorigénica, sin embargo, las células tumorigénicas resultaron sensibles a la TFD a diferencia de la no tumorigénica; Por lo tanto, se plantea que la vía por la que actúa esta terapia, sea directamente a procesos oxidativos como la producción de oxígeno molecular singulete. Además, se demostró, que después del tratamiento en la línea de cáncer de mama la TFD con ambos fotosensibilizadores, presentó una disminución de las ROS en contra parte de los niveles basales, la no tumorigénica con TFD utilizando como fotosensibilizador al azul de metileno aumentó sus niveles altos de ROS llegando hasta un 50% en comparación con los estados basales, con el fotosensibilizador rosa de bengala como fotosensibilizador, el aumento fue mínimo. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan conocimiento valioso para el mejor entendimiento del proceso de muerte celular ocasionado por la TFD.

Review:

Introduction: Breast cancer is the leading cause of mortality among women worldwide. The therapies applied to this disease (chemotherapy, radiotherapy, hormonal therapy) in general are invasive and nonspecific techniques. Photodynamic therapy (PDT) is an anticancer therapy that can destroy tumor cells, through the interaction of a photosensitizing agent, which when stimulated by the appropriate wavelength induces the formation of reactive oxygen species that cause cell death. PDT is a minimally invasive, non-ionizing procedure and a promising new alternative to fight cancer, however, the molecular mechanisms that lead cells to death remain unclear.

Methods: In this study, we characterized the type of death caused by PDT in a human triple negative breast cancer cell line (MDA-MB-231) with highly aggressive, invasive and poorly differentiated epithelial morphology, and an epithelial cell line Non-tumorigenic human mammary gland (MCF 10A), were used as photosensitizers to methylene blue and rose flare. The cells were incubated in the absence or presence of the photosensitizer and irradiated or not at 10 J / cm². Observations were made by optical microscopy with Giemsa staining and fluorescence microscopy with Hoechst staining to assess morphological changes and determine the type of cell death caused. In addition, the measurement of the presence of reactive oxygen species in the cells was carried out by means of flow cytometry. Finally, a viability test (MTT) was performed for the non-tumorigenic line (MCF 10A), for PDT treatments with both photosensitizers. For the MDA-MB-231 cell line, the viability values reported in previous work were considered.

Results: we observed that the PDT with bengal rose or methylene blue, caused the death of the cancer cells, however, the non-tumor cells did not respond to the treatment. Which suggests a selectivity of the treatment by the tumor cells. The results of the MTT viability test on the MCF 10A line confirmed that non-tumorigenic cells have no decrease in the activity of the enzyme succinate dehydrogenase and therefore remain viable even after treatment. Morphological analyzes of the MDA-MB-231 line submitted to PDT using methylene blue at the highest concentration of dye (20 μ M) and PDT with sparkler rose at the highest concentration of dye (7 μ M), showed cells with cytoplasm compaction, decrease in nuclear size, apoptotic bodies and blebbing formation in cytoplasm. The PDT with methylene blue also showed cells with oncotic and karyolytic characteristics, however, they were in smaller quantities. It was possible to observe that the confluence decreased drastically with the two

treatments, which indicates that the cells lose the ability to remain attached to the surface and therefore damage. It is suggested that the type of cell death generated by PDT with bengal rose is "apoptosis", while, for methylene blue, there is a predisposition to "apoptosis" but there are also cells with "necrosis".

The identification of the type of oxidation pathway that initiates the cell death process was evaluated with the test of reactive oxygen species, with which it was observed that the tumorigenic cell line itself contained very high levels of ROS, much higher than of the non-tumorigenic line, however, tumorigenic cells were sensitive to PDT as opposed to non-tumorigenic cells; Therefore, it is proposed that the route by which this therapy acts, is directly to oxidative processes such as the production of singlet molecular oxygen. In addition, it was shown that after treatment in the breast cancer line, PDT with both photosensitizers, presented a decrease in ROS against part of the basal levels, non-tumorigenic with PDT using methylene blue as a photosensitizer increased its high levels of ROS reaching up to 50% compared to baseline states, with the pink sparkler dye as a photosensitizer, the increase was minimal. The results obtained in this thesis work provide valuable knowledge for the better understanding of the process of cell death caused by PDT.

| | |
|---|-----|
| Agradecimientos | II |
| Resumen..... | III |
| Índice general | VII |
| Índice de figuras..... | IX |
| Índice de tablas..... | X |
| Índice de graficas | XI |
| | |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.2. Descripción de la problemática o necesidad | 5 |
| 1.3. Justificación..... | 5 |
| 1.4. Objetivo general | 6 |
| 1.5. Objetivos específicos..... | 6 |
| 1.6. Organización de la tesis..... | 6 |
| 2. Marco teórico y estado del arte | 8 |
| 2.1. Terapia fotodinámica..... | 8 |
| 2.2. Fotosensibilizadores y sus características | 9 |
| 2.2.1. Rosa de bengala..... | 10 |
| 2.2.2. Azul de metileno..... | 10 |
| 2.3. Especies reactivas de oxígeno | 11 |
| 2.4. Muerte celular..... | 12 |
| 2.4.1. Apoptosis..... | 12 |
| 2.4.2. Autofagia..... | 15 |
| 2.4.3. Necrosis | 16 |
| 2.4.4. Necroptosis | 17 |
| 2.4.5. Piroptosis | 17 |
| 2.4.6. Ferroptosis | 17 |
| 2.5. Resumen | 18 |
| 3. Materiales y métodos..... | 19 |
| 3.1. Líneas celulares | 19 |
| 3.2. Dispositivos lumínicos | 20 |
| 3.3. Fotosensibilizadores | 21 |
| 3.4. Mantenimiento de las líneas celulares..... | 21 |
| 3.5. Cultivo en placas de 96 pozos | 21 |
| 3.6. Aplicación de la TFD | 23 |

| | |
|---|----|
| 3.7. Tinción de Hoechst..... | 23 |
| 3.8. Tinción de Giemsa..... | 23 |
| 3.9. Medición de especies reactivas de oxígeno..... | 24 |
| 3.10. Medición de la viabilidad celular por MTT..... | 24 |
| 3.11. Conteo y caracterización celular por el programa Image J..... | 25 |
| 3.12. Análisis estadístico..... | 25 |
| 3.13. Resumen..... | 25 |
| 4. Resultados..... | 27 |
| 4.1. Cambios morfológicos..... | 27 |
| 4.1.1. TFD con rosa de bengala con la línea MDA-MB-231..... | 27 |
| 4.1.2. TFD con azul de metileno con la línea MDA-MB-231..... | 32 |
| 4.1.3. TFD con rosa de bengala con la línea MCF 10A..... | 36 |
| 4.1.4. TFD con azul de metileno con la línea MCF 10A..... | 40 |
| 4.2. Núcleos de la línea MDA-MB-231..... | 43 |
| 4.2.1. Núcleos de la línea MDA-MB-231, TFD con azul de metileno..... | 44 |
| 4.2.2. Núcleos de la línea MDA-MB-231, TFD con rosa de bengala..... | 45 |
| 4.3. Conteo celular de las imágenes de Hoechst por el programa Image J..... | 46 |
| 4.4. Viabilidad celular medida en la línea MCF 10 por medio de MTT..... | 48 |
| 4.5. Medición de ROS generado por TFD..... | 49 |
| 4.6. Resumen..... | 61 |
| 5. Discusión..... | 63 |
| 5.1. Resumen..... | 67 |
| 6. Conclusiones y trabajo a futuro..... | 69 |
| 7. Bibliografía..... | 71 |

| | |
|---|----|
| 1.1. Tasa de mortalidad | 2 |
| 1.2. Mecanismos mediante los cuales la TFD lleva a cabo la destrucción del tumor | 4 |
| 2.1. Diagrama de Jablonski modificado | 9 |
| 2.2. Apoptosis extrínseca, mediada por el ligando de muerte..... | 13 |
| 2.3. Apoptosis intrínseca | 13 |
| 2.4. Descripción de los cambios morfológicos durante la apoptosis | 14 |
| 2.5. La célula y sus cambios a nivel nuclear | 15 |
| 2.6. Necrosis..... | 16 |
| 3.1. Posición de LED's en placas para TFD | 20 |
| 3.2. Espectro de emisión de los dispositivos utilizadas para la TFD | 20 |
| 3.3. Configuración de cultivo celular..... | 22 |
| 4.1. Línea MDA-MB-231, Objetivo 10x | 28 |
| 4.2. Línea MDA-MB-231, objetivo 20x, control sin tratamiento y control de luz para TFD con rosa de bengala..... | 29 |
| 4.3. Línea MDA-MB-231, objetivo 20x, control de fotosensibilizador para TFD con rosa de bengala..... | 30 |
| 4.4. Línea MDA-MB-231, objetivo 20x, TFD con rosa de bengala | 31 |
| 4.5. Línea MDA-MB-231, objetivo 10x | 32 |
| 4.6. Línea MDA-MB-231, objetivo 20x, control sin tratamiento y control de luz para TFD con azul de metileno | 33 |
| 4.7. Línea MDA-MB-231, objetivo 20x, control de fotosensibilizador para TFD con azul de metileno..... | 34 |
| 4.8. Línea MDA-MB-231, objetivo 20x, TFD con azul de metileno..... | 35 |
| 4.9. Línea MCF 10A, objetivo 10x | 36 |
| 4.10. Línea MCF 10A, objetivo 20x, control sin tratamiento y control de luz para TFD con rosa de bengala | 37 |
| 4.11. Línea MCF 10A, objetivo 20x, control de fotosensibilizador para TFD con rosa de bengala..... | 38 |
| 4.12. Línea MCF 10A, objetivo 20x, TFD con rosa de bengala. | 39 |
| 4.13. Línea MCF 10A, objetivo 10x | 40 |
| 4.14. Línea MCF 10A, objetivo 20x, control sin tratamiento y control de luz para TFD con azul de metileno..... | 41 |
| 4.15. Línea MCF 10A, objetivo 20x, control de fotosensibilizador para TFD con azul de metileno | 42 |
| 4.16. Línea MCF 10A, objetivo 20x, TFD con azul de metileno | 43 |
| 4.17. Núcleos de la línea MDA-MB-231, 40x, TFD con azul de metileno | 44 |
| 4.18. Núcleos de la línea MDA-MB-231, 40x, TFD con rosa de bengala..... | 45 |

| | |
|---|----|
| 2.1. TFD en cáncer de mama | 8 |
| 2.2. Fotosensibilizadores utilizados en TFD | 9 |
| 2.3. Efectos de ROS en células | 11 |

| | |
|--|----|
| 4.1. Conteo de células, TFD con azul de metileno y controles..... | 46 |
| 4.2. Conteo de células, TFD con rosa de bengala y controles..... | 47 |
| 4.3. Análisis de la viabilidad en la línea MCF 10A, TFD con azul de metileno y controles.... | 48 |
| 4.4. Análisis de la viabilidad en la línea MCF 10A, TFD con rosa de bengala y controles | 49 |
| 4.5. Citometría de flujo, niveles bajos, medios y altos | 50 |
| 4.6. Medición de ROS de la línea MCF 10A, control sin tratamiento | 50 |
| 4.7. Medición de ROS de la línea MCF 10A, control de luz verde | 51 |
| 4.8. Medición de ROS de la línea MCF 10A, control rosa de bengala a 5 μM | 51 |
| 4.9. Medición de ROS de la línea MCF 10A, control rosa de bengala a 7 μM | 52 |
| 4.10. Medición de ROS de la línea MCF 10A, TFD con rosa de bengala a 5 μM | 52 |
| 4.11. Medición de ROS de la línea MCF 10A, TFD con rosa de bengala a 7 μM | 53 |
| 4.12. Medición de ROS de la línea MCF 10A, control de luz roja..... | 54 |
| 4.13. Medición de ROS de la línea MCF 10A, control azul de metileno a 10 μM | 54 |
| 4.14. Medición de ROS de la línea MCF 10A, control azul de metileno a 20 μM | 55 |
| 4.15. Medición de ROS de la línea MCF 10A, TFD con azul de metileno a 10 μM | 55 |
| 4.16. Medición de ROS de la línea MCF 10A, TFD con azul de metileno a 20 μM | 56 |
| 4.17. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, control sin tratamiento | 56 |
| 4.18. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, control de luz verde | 57 |
| 4.19. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, control rosa de bengala a 5 μM | 57 |
| 4.20. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, control rosa de bengala a 7 μM | 58 |
| 4.21. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, TFD con rosa de bengala a 5 μM | 58 |
| 4.22. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, TFD con rosa de bengala a 7 μM | 59 |
| 4.23. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, control de luz roja | 59 |
| 4.24. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, control azul de metileno a 10 μM | 60 |
| 4.25. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, control azul de metileno a 20 μM | 60 |
| 4.26. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, TFD con azul de metileno a 10 μM | 61 |
| 4.27. Medición de ROS de la línea MDA-MB-231, TFD con azul de metileno a 20 μM | 62 |

1.1. Antecedentes

El cáncer de mama es una enfermedad maligna que se caracteriza por una proliferación acelerada, desordenada y no controlada de las células de la glándula mamaria. Estas células forman un tumor con la capacidad de diseminarse e invadir otros tejidos, dando origen a lo que se conoce como metástasis.

Al igual que otros tipos de cáncer, el cáncer de mama, comienza con un crecimiento descontrolado de células. En este caso, en células donde se genera la leche (cáncer de mama lobulillar) o en los ductos que llevan la leche al pezón (cáncer de mama ductal).

El cáncer de mama abarca una variedad de tumores que pueden variar morfológicamente, clínicamente y biológicamente, por lo tanto, se le clasifica de diferentes maneras. El perfil de expresión genética y los avances en la biología molecular han permitido una nueva forma de clasificación del cáncer de mama, la cual establece cuatro subtipos: luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo, que dependen de la presencia o no de receptores hormonales.

El subtipo luminal A expresa altos niveles de estrógeno (ER+) y progesterona (PR+), es sensible a la abstinencia de estrógenos y se tratan con hormonoterapia. El subtipo luminal B presenta receptores (ER+), (PR±), (HER2) y también es tratado con hormonoterapia. El subtipo HER2 (factor de crecimiento epidérmico humano HER2), es negativo a los receptores ER-, PR- y presenta niveles altos del protooncogén HER2/neu, cuya proteína interviene en el crecimiento normal de las células; este subtipo de cáncer es más agresivo que los luminales A y B, pero responde bien a la terapia anti-HER2. El subtipo triple negativo no está estimulado por las hormonas ER, PR ni por la presencia de receptores de HER2. Por lo tanto, el cáncer de mama triple negativo no responde a la hormonoterapia, ni a las terapias dirigidas a los receptores de HER2. Las características previas lo convierten el peor pronóstico posible a su alta capacidad de recurrencia y metástasis (R Cominetti et al., 2019).

El cáncer de mama sigue siendo un importante problema de salud para las mujeres en todo el mundo. Se estima que cada año se diagnostican cerca de 1.67 millones de mujeres con cáncer de mama y 522,000 pacientes fallecen por esta enfermedad. El control y la supervivencia varían de acuerdo con la población y la región donde esta neoplasia se presenta. En países pobres y en vías de desarrollo la supervivencia a 5 años es de 30% a 45%, en contraste con países plenamente desarrollados, donde es de 80% (Cárdenas Sánchez, 2017). En el año 2016,

en México (fig 1.1) se observaron 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años y más (INEGI, 2018).

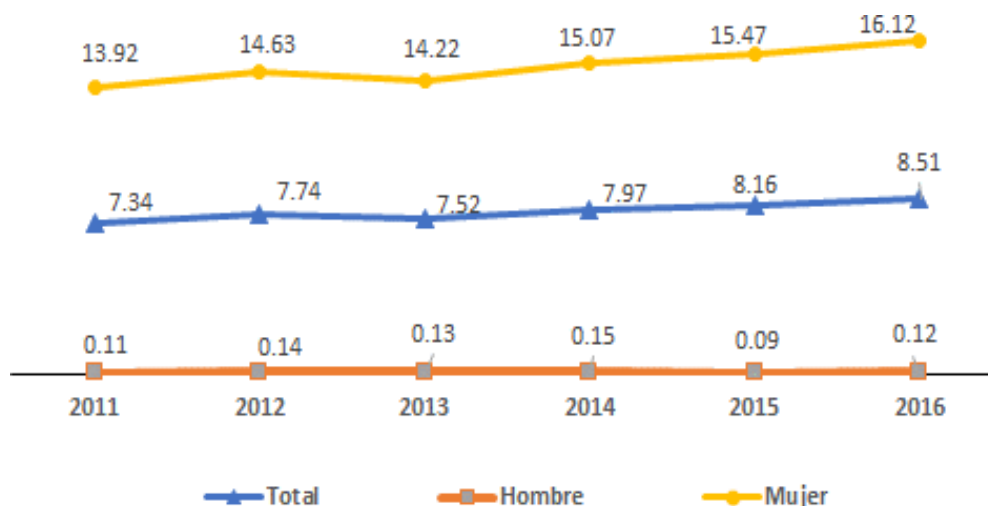


Fig 1.1 Tasa de mortalidad observada en la población de 20 años y más, por tumor maligno de mama. Serie anual de 2011 a 2016 Por cada 100 000 habitantes

Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), código C50. Excluye defunciones con residencia habitual en el extranjero y edad no especificada.

Fuente: INEGI. Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos; y CONAPO. Proyecciones de la Población 2010-2050.

Es importante destacar que, a nivel mundial, el cáncer de mama es más común entre las mujeres (los hombres también pueden presentar cáncer de mama) y representa 16% de los tumores malignos diagnosticados. Otro dato relevante es que 69% del total de muertes por esta enfermedad se presentan en países en desarrollo, usualmente, se identifica en etapas tardías, dificultando el tratamiento exitoso (OMS, 2018).

Los tratamientos contra el cáncer dependen del tipo de tumor, el grado de remoción del tumor, la presencia de metástasis, localización del tumor, tolerabilidad del paciente, la edad de la paciente, el estado de salud general, por lo tanto, los planes de tratamiento más comunes incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, así como la terapia hormonal o combinaciones de ellos.

Si bien estas terapias han tenido importante papel en el control de la enfermedad, la falta de especificidad hacia las células tumorales, la generación de efectos secundarios adversos que en ocasiones originan la suspensión del tratamiento por parte del paciente y su elevado costo obligan a la búsqueda de posibles terapias alternativas para el tratamiento de cáncer de mama que sean efectivas, mínimamente tóxicas y de bajo costo.

Dentro de la rama de la óptica, se manejan terapias activadas por luz, como la terapia con láser de bajo nivel (LLLT), terapia de luz ocular (OLT), terapia con luz pulsada intensa (IPL)

entre otras, sin embargo, cabe resaltar a la TFD, ya que ha demostrado eficientes resultados en la inactivación de virus, hongos, bacterias, en tratamientos para la psoriasis y el cáncer (Bacellar, et al., 2015). En comparación con otras terapias, ésta resulta ser no ionizante y mínimamente invasiva, además de poder hacerla selectiva, ya que es posible delimitar el área a tratar.

Fue en el año de 1905, por Von Tappeiner y Jesionek, cuando, por primera vez se mostró la efectividad de la TFD aplicada a 6 pacientes con carcinoma, de los cuales cuatro pacientes mostraron la remisión completa del tumor.

La TFD a diferencia de otras terapias con luz tiene la característica de utilizar un fotosensibilizador biocompatible, que es capaz de interactuar con el medio que le rodea (agua y otras biomoléculas) para así llevar a cabo la muerte celular (fig. 1.2), también tiene otros efectos antitumorales, como daño vascular o el aumento significativo del sistema inmune.

Se han descrito múltiples fotosensibilizadores que tienen la característica de ser activados a cierta longitud de onda, es por lo que se les ha clasificado en diferentes generaciones (primera, segunda y tercera generación), dependiendo sus características físicas y químicas.

Al inicio de la TFD, derivados de hematoporfirina y otras preparaciones derivadas de ella, fueron llamados Fotosensibilizadores de primera generación, sin embargo, varias desventajas están asociados con ellos, como la capacidad de degradación por el organismo, presentando una prolongada vida media que dura de 4 a 6 semanas. Dentro de la segunda generación de fotosensibilizadores, tenemos a: clorinas, porfirinas, xantenos, bacterioclorinas y ftalocianinas, éstos presentan una ventaja significativa pues poseen una mejor absorción de la luz a una mayor longitud de onda, lo que incrementa la profundidad a la cual puede aplicarse la TFD, y también los fotosensibilizadores de segunda generación presentan cierta selectividad por las células tumorales, sin embargo, se siguen investigando los efectos de estos, ya que dependerá del tipo de célula, del fotosensibilizador, del ambiente, de la cantidad de oxígeno, y/o de la cantidad de luz, que pueden ser clave para que se lleve a cabo la destrucción de dichas células.

Los fotosensibilizadores de la tercera generación, son aquellos cuyas propiedades les permite la acumulación selectiva del tumor, ya que se encuentran encapsulados en nanopartículas, liposomas, etc., que contienen anticuerpos lo cual les ayuda a unirse al tejido tumoral.

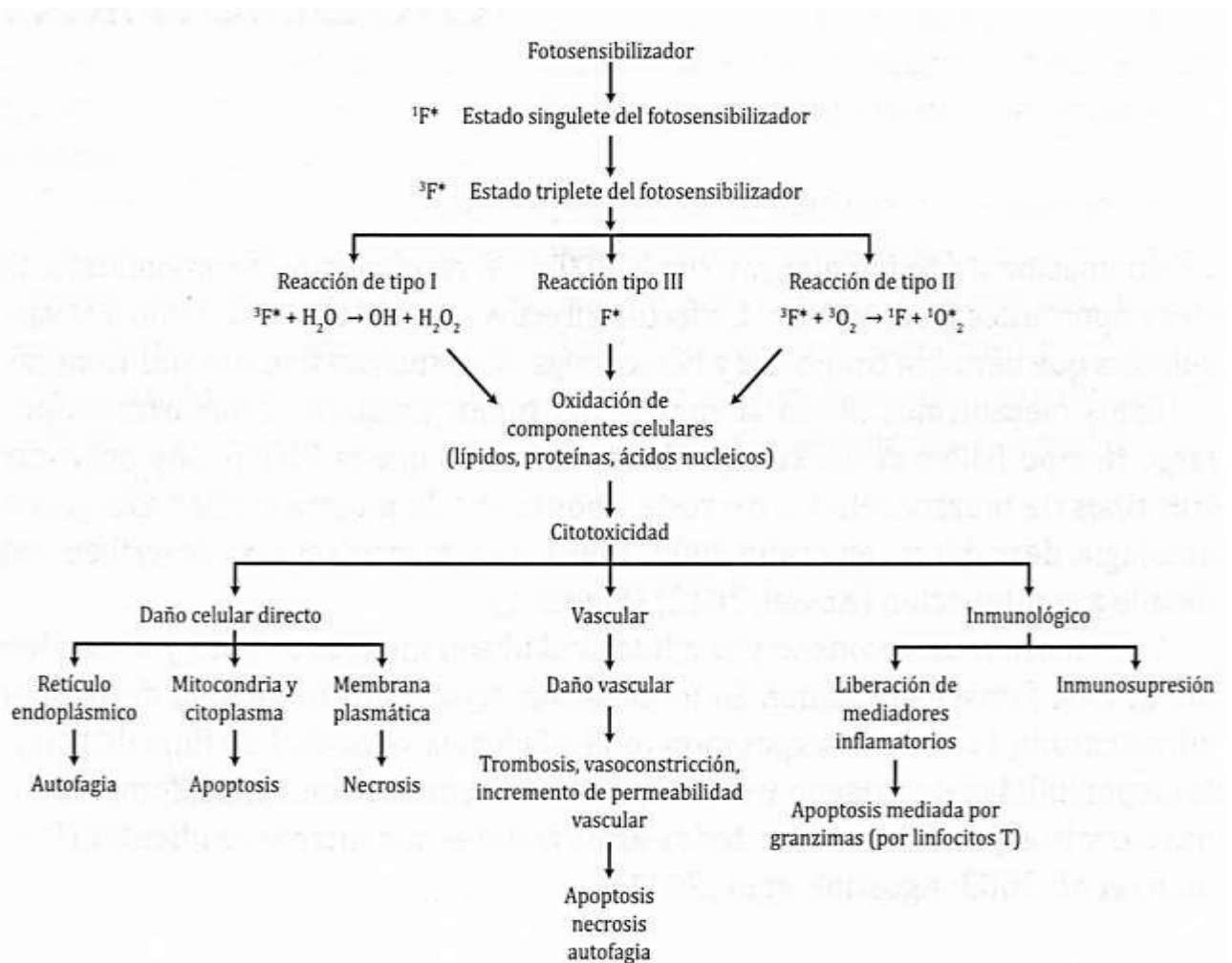


Fig. 1.2 Mecanismos mediante los cuales la TFD lleva a cabo la destrucción del tumor (Prasad 2003, Gallegos, 2015).

La acción citotóxica directa de la TFD resulta en la muerte celular (fig. 1.2), pudiendo desencadenar diversos tipos de muerte, como apoptosis, necrosis, piroptosis, necroptosis, etc., es de suma importancia conocer el efecto causado por la TFD, ya que tiene consecuencias para la posterior respuesta del sistema inmune.

En la literatura se menciona que dependiendo el tipo de fotosensibilizador (carga eléctrica, hidrofiliidad y simetría molecular) y su localización intracelular, será el tipo de muerte o el efecto citotóxico. Existen algunos estudios que evalúan los diferentes modos de muerte celular, estos muestran que la TFD tiene el potencial de inducir una mayor variedad de respuestas celulares dependiendo de la dosis aplicada de luz o fotosensibilizador (Kiesslich, et al., 2013).

La acción citotóxica directa de la TFD resulta en la muerte celular (fig. 1.2), los mecanismos, dependerán del tipo y concentración del fotosensibilizador, de la dosis de luz aplicada, así como del sistema sobre el cual se efectúa la TFD.

Tomando como referencia resultados previos (Atenco, 2018), en este trabajo se evaluó el efecto de la TFD sobre una línea NO tumoral de mama humana (MCF 10A), así como el tipo de muerte celular ejercida sobre esta línea celular y en la línea celular tumoral de mama (MDA-MB-231).

1.2. Descripción de la problemática o necesidad

La TFD ha sido estudiada a lo largo de la historia por diferentes autores, demostrando que tiene aplicaciones en diversos padecimientos médicos, como la inactivación de hongos, virus o la eliminación de células cancerígenas (Bacellar, et al., 2015). Este tratamiento ha sido evaluado desde diferentes enfoques, desde los cuales se reconoce como interaccionan las células después de ser tratadas con dicha terapia (Kramer, 2014). Se ha evidenciado la formación de ROS que inducen el rompimiento de enlaces dentro de la célula, que le genera un daño irreversible y posteriormente puede activar diferentes vías de muerte (Gallegos, 2015), sin embargo, aún falta mucho conocimiento sobre los procesos subcelulares involucrados, así como para la identificación del tipo de muerte celular ocasionado por los diferentes fotosensibilizadores empleados en esta técnica.

1.3. Justificación

En la actualidad el cáncer de mama es considerado el más común entre las mujeres y representa 16% de los tumores malignos diagnosticados (OMS, 2018), las terapias (cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal) hasta el momento empleadas, si bien tienen un efecto importante sobre las células tumorales, también ejercen un efecto importante sobre las células no tumorales generando efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida de los pacientes que presentan esta patología.

La TFD ha sido probada exitosamente en numerosos tipos de cáncer con efectos secundarios mucho menores que los producidos con la quimioterapia o radioterapia (Gallegos, 2015). El Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica en colaboración con el Centro de Investigación Biomédica de Oriente, han estandarizado concentraciones de dos fotosensibilizadores de familias químicas distintas: azul de metileno y rosa de bengala, utilizados de forma poco frecuente en la TFD para la eliminación de dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y T-47D), obteniendo resultados favorables (Atenco, 2019). Como consecuencia a estos trabajos de selección y dosificación, en la presente tesis nos planteamos estudiar los cambios morfológicos, así como el tipo de muerte celular provocado y la formación de ROS a partir de los dos fotosensibilizadores mencionados, así mismo, planteamos comparar el efecto de la TFD sobre una línea celular de mama no tumorigénica.

El conocimiento generado por esta tesis puede aportar herramientas importantes para el entendimiento y mejoras de la TFD.

1.4. Objetivo general

Caracterizar el tipo de muerte celular inducido por la TFD, aplicada con rosa de bengala y azul de metileno en una línea celular de cáncer de mama, así como evaluar la actividad de especies reactivas de oxígeno y los cambios morfológicos que conllevan a este tipo de muerte y simultáneamente comparar el efecto de la TFD con una línea celular de mama no tumorigénica.

1.5. Objetivos específicos

1. Determinar el tipo de muerte celular generado por la TFD tanto en una línea celular tumorigénica (MDA-MB-231), como en una no tumorigénica (MCF 10A).
2. Determinar el efecto citotóxico de la TFD, sobre una línea no tumoral de mama (MCF 10A).
3. Determinar la formación de ROS en ambas líneas celulares (MDA-MB-231 Y MCF 10A), generadas por la TFD.

1.6. Organización de la tesis

La organización de la tesis continúa con los siguientes capítulos:

Capítulo 2: En este capítulo se describen los conceptos de TFD, los fotosensibilizadores que se utilizan en la terapia y sus características, las moléculas que interactúan denominadas especies reactivas de oxígeno y el concepto de muerte celular.

Capítulo 3: Se describe de manera detallada los pasos para llevar a cabo las técnicas de tinción celular de Giemsa, tinción nuclear de Hoechst, citometría de flujo para cuantificar la cantidad de especies reactivas de oxígeno intracelular, conteo de células por el programa Image J, medición de la viabilidad por MTT y los materiales utilizados en estos, además de la técnica utilizada para el análisis estadístico.

Capítulo 4: En este capítulo se presentan los resultados de las diferentes técnicas utilizadas y la descripción de éstas.

Capítulo 5: Se presenta una comparación entre trabajos relacionados a la tesis y los resultados obtenidos en ésta.

Capítulo 6: En este capítulo se redactan las conclusiones de la tesis. Se presentan diferentes caminos que proponemos seguir sobre esta línea de investigación.

El cáncer de mama triple negativo ha generado gran interés debido a que muestra renuencia a los tratamientos convencionales como la hormonoterapia, quedando solo como opción la quimioterapia, que resulta ser poco eficiente y no selectiva. Debido a esto existe una necesidad por encontrar tratamientos alternativos para curar dicha enfermedad.

En el siguiente capítulo se presenta la descripción de una terapia alternativa como lo es la TFD, las características de los fotosensibilizadores utilizados en dicha terapia, las moléculas que genera y los procesos de muerte que una célula puede sufrir.

En la siguiente tabla 2.1 se ponen ejemplos de la TFD en cáncer de mama:

Los espacios en blanco (-) son aquellas características que aún no están reportadas en la literatura.

Tabla 2.1. TFD en cáncer de mama

| Referencia | Línea Celular | Fotosensibilizador | Concentración del Fotosensibilizador | Longitud de Onda | Densidad de Luz | Tiempo de Incubación |
|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------|------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Ghoodarzi et al. 2016 | MCF-7 | Radachlorin | 1, 2.5, y 3.5 µg/ml | - | 6 y 12 J/cm ² | 12 h |
| Ferenc et al. 2010 | MCF-7 y MDA-MB-231 | hypericin | 0.0084 - 21 µM | 530 y 620 nm | 4.4 J/cm ² | 16 h |
| Sazgarnia et al. 2013 | MCF-7 | mitoxantrone | 1 µM | 660 nm | 10, 30, 60, 108 J/cm ² | 90 min |
| Wang et al. 2015 | 4T1 | Sinoporphyrin Sodium | - | 635 nm | 1.43 - 7.15 J/cm ² | - |
| Dos Santos et al. 2017 | MDA-MB-231 y MCF 10A | Methylene Blue | 0.2, 2, 20 µM | 640 nm | 4.5 J/cm ² | 2 h |

2.1. Terapia fotodinámica

El proceso fotodinámico consiste en la irradiación con luz visible a la longitud de onda adecuada sobre células anteriormente incubadas con un fotosensibilizador. La absorción de la luz permite que el fotosensibilizador pase a un estado de mayor energía (singulete), y decaiga a un estado intermedio (tripleto) de menor energía para después interactuar con el agua y otras biomoléculas que se encuentran a su alrededor, formando ROS, a esta reacción se le denomina tipo I. También puede pasar toda la energía al oxígeno molecular y formar oxígeno singulete (el radio de acción del oxígeno singulete es de 30 nm), este es altamente reactivo y el de mayor efectividad oxidante, a esta reacción se le denomina tipo II. La reacción tipo III,

consiste en dañar directamente la célula liberando la energía en exceso del fotosensibilizador, pero esta es poco probable. La reacción tipo II, es la que más se ha reportado en la literatura, también es la más eficiente dada la creación de oxígeno singlete, como se muestra en la figura 2.1.

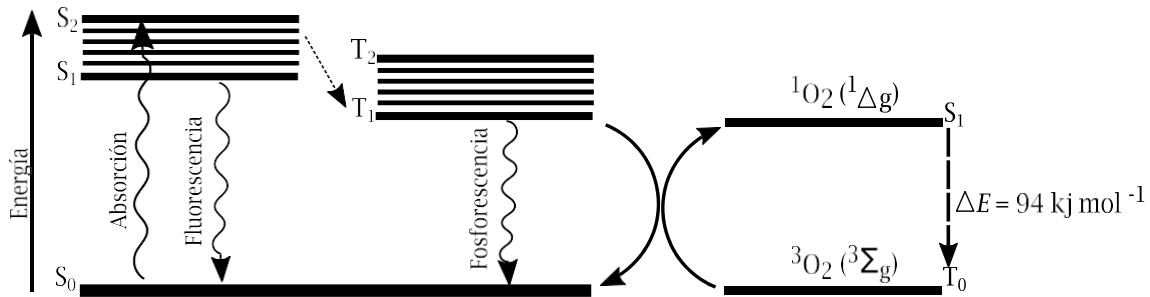


Fig. 2.1 diagrama de Jablonski modificado. Se observa el comportamiento de la reacción tipo II. S_0 , estado basal del fotosensibilizador, S_1 , S_2 , Estado excitado de mayor energía (Singlete), T_1 , T_2 , Estado de menor energía (Triplete), 1O_2 ($^1\Delta_g$), Estado excitado de mayor energía del oxígeno molecular (Singlete), creación de dos tipos de oxígeno singlete, 3O_2 ($^3\Sigma_g$), Estado del oxígeno molecular (Triplete)

2.2. Fotosensibilizadores y sus características

Las características principales que debe presentar un fotosensibilizador para poder utilizarse en la TFD son:

1. Alto coeficiente de absorción en la región de excitación.
2. Generación del estado triplete con una energía que permita una eficiente transferencia de energía al estado base del oxígeno.
3. Alto rendimiento cuántico de formación de tripletes.
4. Tiempo de vida del estado triplete largo.
5. Alto rendimiento cuántico en la generación de oxígeno singlete.
6. Foto estabilidad y pureza.
7. El fotosensibilizador debe ser biocompatible.
8. Acumulación rápida en células tumorales excluyendo el núcleo.
9. El fotosensibilizador debe ser excretado rápidamente del cuerpo. Esto producirá una baja toxicidad sistémica y reducirá la sensibilidad a la luz solar después del tratamiento con la TFD.

La tabla 2.1 que se muestra a continuación, menciona diferentes fotosensibilizadores utilizados en la TFD y sus características como: la duración en el tejido biológico, el solvente

y la longitud de onda en la que absorbe. Los espacios en blanco (-) son aquellas características que aún no están reportadas en la literatura.

Tabla 2.2. Características principales de los fotosensibilizadores utilizados en TFD

| Fotosensibilizador | λ_{ex} [nm] | Solvente | Duración en tejido |
|------------------------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Derivados de hematoporfirina | 632 | agua | 2-3 meses |
| Ácido 5 - aminolevulínico | 635 | buffer fosfato (1 %) - tritón (100X) | 1-2 días |
| verteporfina | 690 | buffer fosfato (1 %) - tritón (100X) | 3-5 días |
| Etil etiopurpurina de estaño | 660 | - | 1 mes |
| Temoporfin | 652 | - | 6 semanas |
| Texafirina | 732 | - | - |
| Ftalocianina | 670 - 680 | agua pesada | 8-10 días |
| Rodamina | 511 | agua | - |
| Porfíceno | 590 | - | - |
| Hipericina | 590 | buffer fosfato (1 %) - tritón (100X) | - |
| Azul de metileno | 668 | agua | - |
| Rosa de bengala | 540 | agua | - |

2.2.1. Rosa de bengala

El rosa de bengala (RB: 4,5,6,7-tetrachloro-20,40,50,70-tetraiodofluoresceindisodium) es un colorante de la familia de los xantenos, soluble en agua, biocompatible, utilizado en la clínica como un agente de diagnóstico para desordenes oftalmológicos y función hepática (Zamani et al., 2014).

Tiene una carga aniónica, por lo tanto, no penetra la membrana lipídica (Atenco, 2019). Se ha propuesto un mecanismo de acción en diferentes células cancerígenas, donde el rosa de bengala, utilizado como fotosensibilizador en TFD, activa el receptor de muerte Fas por acción del oxígeno singulete, el cual se ve implicado en la señalización de vías extrínseca de apoptosis (Zhuang et al., 1998, 1999).

2.2.2. Azul de metileno

El azul de metileno (trihidrato (dimetilamino) de cloruro del phenazathionium 3,7-Bis), es un colorante de la familia de las fenotiazinas, utilizado ampliamente en el campo clínico.

El espectro de absorción del azul de metileno depende de la dimerización. La forma monómero y dímera tienen distinto espectro de absorción, el tipo monómero presenta pico de absorción en 664 nm y el tipo dímero en 590 nm. Diversos artículos mencionan que el colorante azul de metileno se acumula en la mitocondria, la generación de ROS en este organelo causadas por la TFD induce a la activación de la apoptosis por vía mitocondrial (Yan Lu, et al., 2008, Tardivo, et al., 2005).

2.3. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son compuestos que derivan del oxígeno molecular que se encuentra en las células, generalmente se consideran subproductos del consumo de oxígeno y del metabolismo celular, formados por la reducción parcial del oxígeno molecular. La mayor parte de ROS se genera en la cadena de transporte de electrones que está ubicada en la mitocondria y ayudan en diversos mecanismos de señalización. En esta familia existen los radicales libres (RL) como el ion superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el alcoxilo ($ROO\cdot$) y el óxido de nitrógeno. Un segundo grupo de ROS lo constituyen los no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singulete ($^1 O_2$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (San-Miguel et al., 2009, carrillo et al., 2015).

Las ROS son capaces de dañar de forma reversible o irreversible todo tipo de biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, macromoléculas del tejido conectivo, etc. En condiciones normales, los niveles de ROS son bajos y los antioxidantes ayudan al equilibrio de éstas, también ayudan a la reparación y señalización de sobrevivencia, ver Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Efectos de ROS en células. (Moloney, et al., 2017)

| Célula sana | Célula tumorigénica | Muerte celular |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> Niveles bajos de ROS Bajos niveles de antioxidantes Adaptación adecuada Supervivencia y control normal | <ul style="list-style-type: none"> Altos niveles de antioxidantes Baja reparación celular Inestabilidad genómica Adaptación a ROS Sobrevive, crece y prolifera | <ul style="list-style-type: none"> Niveles de ROS tóxicos Bajos niveles de antioxidantes Daños irreparables en el DNA Estrés oxidativo Adaptación inadecuada |

Las ROS se han asociado durante mucho tiempo con el cáncer, donde se ha demostrado que diferentes tipos de células tumorales producen niveles elevados de ROS en comparación con sus contrapartes normales (Moloney et al., 2018). Se ha reportado que los niveles altos de ROS en células de cáncer se encuentran relacionados con la señalización de supervivencia, la pérdida de genes supresores de tumores, el incremento en el metabolismo de glucosa, la adaptación a la hipoxia y la generación de mutaciones oncogénicas.

Sin embargo, los niveles tóxicos de ROS en células cancerosas son antitumorigénicas e inducen a la muerte celular (Moloney et al., 2018), por esta razón existen diferentes grupos de investigación apostando por terapias antitumorales usando ROS.

2.4. Muerte celular

La muerte celular es el proceso a través del cual una célula muere y es eliminada. Se define como muerte cuando se han detenido las funciones vitales y las reacciones químicas normales del metabolismo. La muerte de las células en los tejidos humanos y en otros organismos multicelulares es un hecho normal y no produce alteración de las funciones. Existe un balance entre la proliferación de células nuevas y la muerte de células agotadas o seniles, existiendo una tasa o ritmo de la relación, proliferación - muerte que varía de un tejido a otro (Adolfo, 2002).

La muerte celular se manifiesta con alteraciones morfológicas macroscópicas. Junto con los mecanismos mediante los cuales se eliminan las células muertas y sus fragmentos, estos morfotipos se han empleado históricamente para clasificar la muerte celular en tres formas diferentes: apoptosis, necrosis y autofagia (Galluzzi et al. 2018). Sin embargo, es poco preciso catalogar todos los tipos de muerte en solo tres clases. Por lo que se han tomado en cuenta aspectos genéticos, bioquímicos y morfológicos para una mejor clasificación.

2.4.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un hecho natural en los seres vivos, se caracteriza por ser un proceso indispensable, limpio y ordenado. Se regula por apoptosis el número de células durante el desarrollo embrionario, se eliminan las que no cumplen correctamente su función o las que presentan algún daño, por lo tanto, es necesario para la regulación de enfermedades como el cáncer o el alzhéimer.

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales han de ser continuas y proceden de otras células. Entre estas señales positivas están los factores del crecimiento y las hormonas (Cascales, 2009).

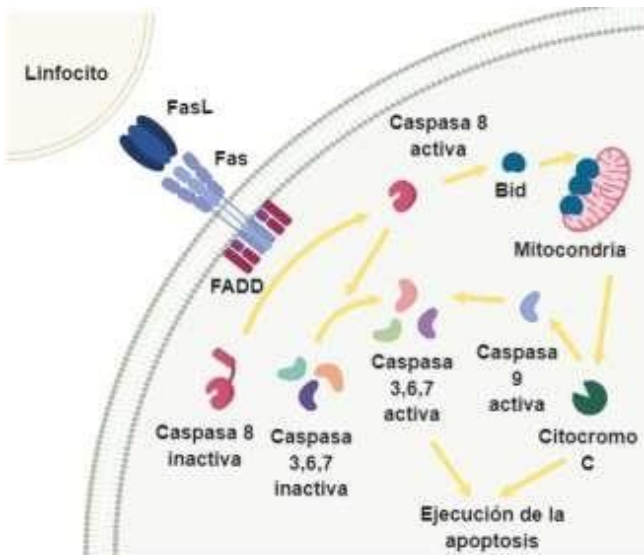


Fig. 2.2 Apoptosis extrínseca, mediada por el ligando de muerte. El linfocito envía un ligando que se une al receptor de muerte anclado a la membrana celular, generando una cascada de señalización que activa a la caspasa 8, ésta activa a las caspasas 3,6 y 7, las cuales serán las encargadas de dismantelar a la célula. La caspasa 8 activa, también puede señalar otra vía, en la cual se ve involucrada la mitocondria y la expulsión al citoplasma del citocromo c.

Uno de los mecanismos por el cual se efectúa la apoptosis se denomina vía **extrínseca** que implica interacciones mediadas por receptores transmembrales como Fas, TNFR1 y TRAIL, dónde interactúa un ligando enviado por un linfocito, desencadenando una serie de señales que atraen a caspasas iniciadoras como la caspasa 8 inactiva (pro-caspasa 8), en ella se hace un corte proteolítico que forma caspasa 8 activa, ésta interacciona con diferentes caspasas efectoras como la 3, 6 y 7, que son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas como se muestra en la figura 2.2. La caspasa 8 también puede activar a un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 llamado Bid, el cual se encuentra en forma inactiva en el citosol; cuando la caspasa 8 lo rompe, se activa y se puede translocar a la mitocondria, donde altera la membrana y libera al citocromo c, a su vez conduce a la activación de la caspasa 9 amplificando aún más la cascada de caspasas efectoras (3,6 y 7) (García, et al. 2003).

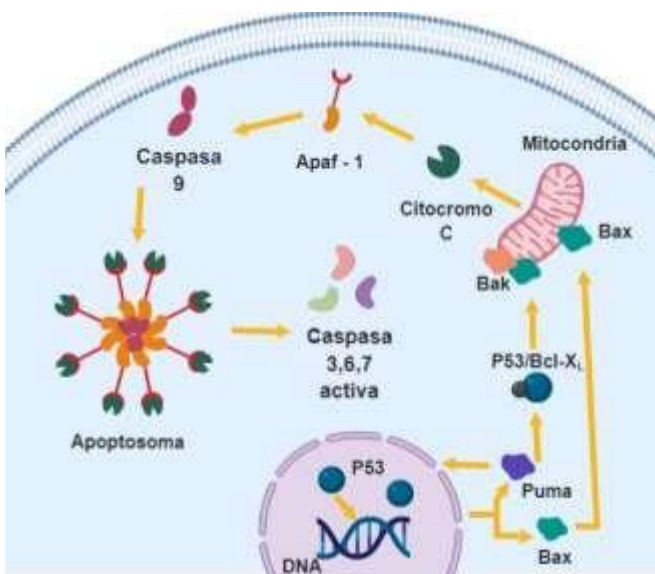


Fig. 2.3 Apoptosis intrínseca. Se genera a la proteína p53, la cual se une a la mitocondria haciendo escapar al citocromo c por medio de poros, al salir se une con apaf-1 y caspasa 9, se crea el apoptosoma que activa a las caspasas 3,6 y 7, las cuales serán las encargadas de dismantelar a la célula

La vía **intrínseca** es otro mecanismo por el que la apoptosis procede, se presenta cuando hay daño irreversible en el DNA o por estrés celular y en este caso como se muestra en la figura 2.3, donde p53 se activa y se une a promotores de genes que codifican para proteínas pro-apoptóticas centinelas de la familia Bh3-only (PUMA y NOXA) y a su vez se libera p53 (proteico) en el citosol. PUMA en el citoplasma interactúa con Bax, se inserta en la membrana mitocondrial externa y forma un poro, se libera el citocromo c y smac-DIABLO. El citocromo c en el citosol, interactúa con APAF-1 y forman un complejo proteico (apoptosoma) en forma de rueda que atrae a la caspasa 9 y la activa. La activación secuencial de una caspasa tras otra, crea una cascada expansiva de actividad proteolítica que conlleva la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, la degradación del DNA cromosómico y la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Cascales, 2009).

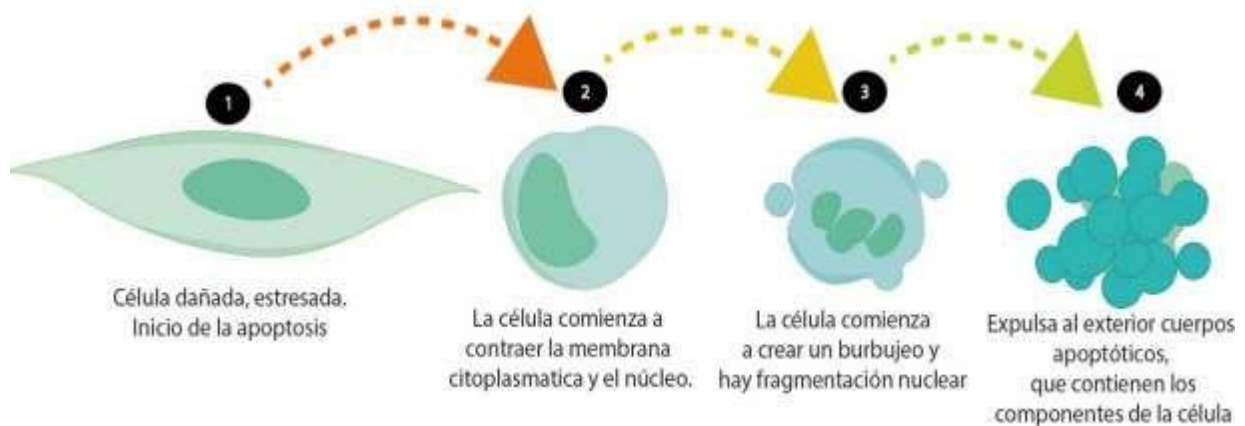


Fig. 2.4 Descripción de los cambios morfológicos durante la apoptosis. La membrana comienza a contraerse, pero nunca se rompe, a continuación, comienza a generar burbujas (blebbing) y se fragmenta el núcleo. Al término se generan cuerpos apoptóticos que contienen el material celular dentro, esperando ser fagocitados.

Los cambios morfológicos resultantes de la apoptosis son visibles ante el microscopio. La célula comienza por redondearse y disminuir su volumen nuclear como se observa en las fig. 2.4 y 2.5 (picnosis), se separa de las células vecinas, las membranas celulares se ondulan y se generan burbujas en la superficie, se condensa la cromatina a menudo en forma de media luna o globular y el núcleo se fragmenta (cariorexis).

Las células se dividen en numerosas vesículas denominadas cuerpos apoptóticos que salen al exterior. Finalmente, es seguida por una ruptura completa de la membrana plasmática y la adquisición de una morfología necrótica (*in vitro*). Sin embargo, la apoptosis también puede ocurrir sin la fragmentación nuclear (De Toro, 2006).

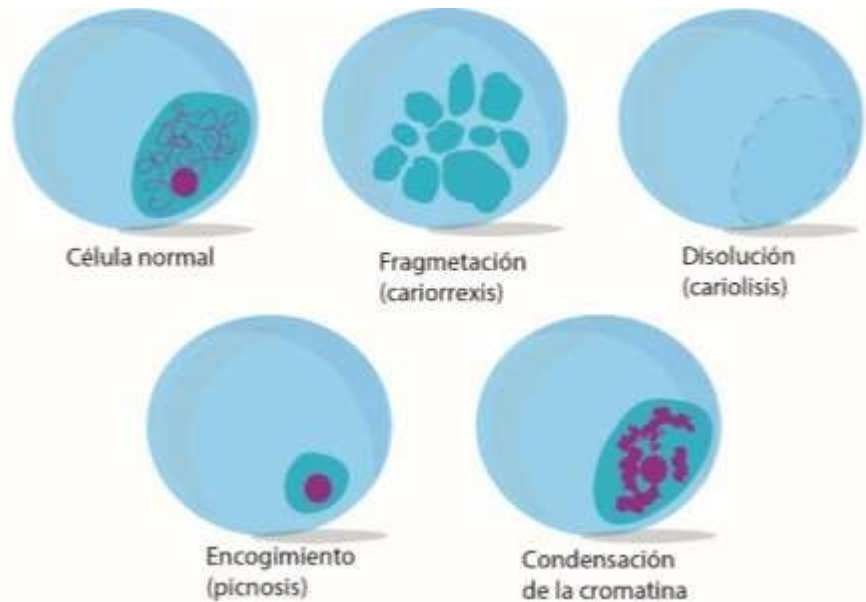


Fig. 2.5 La célula y sus cambios a nivel nuclear. La fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina, la picnosis, son cambios característicos de muerte celular por apoptosis. La cariólisis ocurre cuando el núcleo se disuelve, característico de muerte celular por necrosis.

2.4.2. Autofagia

La autofagia es el mecanismo natural, regulador de las células en el que se desmontan los elementos innecesarios o disfuncionales. Se puede activar por diferentes vías de señalización y sirve para el mantenimiento, dado que permite reutilizar desechos en el interior de la célula. También puede servir de ayuda para la célula en situaciones con restricción calórica, ya que se degradan proteínas y elementos no esenciales o estructuras dañadas y las reutilizan para obtener energía. La autofagia también se presenta como otro medio para secuestrar, degradar y reciclar patógenos intracelulares, lo que puede desencadenar respuestas inmunitarias innatas y adaptativas contra los microorganismos.

En el proceso de la autofagia, se envuelven los organelos y el material que se encuentra en el citosol en pequeños sacos generados a través de la nucleación y el alargamiento de la membrana; éstas a su vez se van cerrando dando como resultado unas estructuras denominadas autofagosomas, tienen la característica de poseer doble membrana. Existen varios mecanismos de un huésped que permiten que los autofagosomas reconozcan y alcancen bacterias dentro de las células. Los autofagosomas se unen entre ellos y también a pequeñas endosomas tardíos que están unidos a la membrana y a los lisosomas, formando estructuras de mayor tamaño llamados auto lisosomas. Los lisosomas se rompen y degradan lo que se encuentra dentro de auto lisosoma (Kimchi et al., 2004).

2.4.3. Necrosis

La muerte por necrosis es un evento no programado y se considera un suceso accidental que ocurre cuando no hay suficiente energía (ATP). Este tipo de muerte puede ser provocado por estrés mecánico, térmico o químico. La muerte celular por necrosis se produce debido a un fallo en la permeabilidad de la membrana plasmática que libera componentes celulares de forma desordenada al exterior.

Existen tres razones por las cuales se produce una necrosis, la primera de ellas es por la falla energética en la membrana celular, que provoca la apertura de las bombas ATP y la entrada de cationes al citosol, provocando un hinchamiento celular (oncosis) y después el rompimiento membranar. El segundo mecanismo es por la sobre producción de ROS (fig. 2.6); En condiciones normales, las células producen ROS en cantidades reguladas. Cuando existe alguna patología, la mitocondria aumenta la producción de estas moléculas que pueden romper enlaces, modificar los lípidos, con la consiguiente liberación de proteasas o un influjo de calcio y por lo tanto dañar a los lisosomas, al retículo endoplásmico y a la membrana mitocondrial y celular que resultará en necrosis (Escobar et al., 2015).

La tercera forma es por medio de la entrada excesiva de calcio al medio intracelular. Este evento activa proteasas activadas por calcio, como las calpaínas, provocando una concentración excesiva de calcio, que conlleva a la apertura de un poro en la membrana mitocondrial (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial), donde el citocromo c sale a la membrana externa perdiendo la capacidad de producir ATP por la cadena respiratoria.

Las características principales de este evento son la rápida pérdida de los potenciales de membrana, ruptura de la membrana plasmática, dilatación de organelos citoplasmáticos, ligera condensación de la cromatina o pérdida del núcleo (cariolisis) como se observa en la fig. 2.5

(De Toro, 2006).

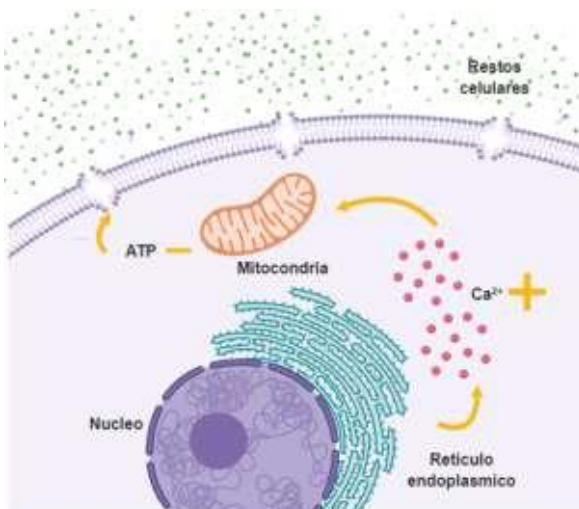


Fig. 2.6 Necrosis. Las células sufren necrosis cuando son expuestas a estrés extremo. Se induce un aumento rápido del calcio intracelular desde el medio extra celular como por liberación desde su almacenamiento intracelular, esto produce pérdida de la permeabilidad en la membrana mitocondrial, causando la salida de ciertas proteínas y la pérdida en la generación de energía. La permeabilidad de la membrana celular se pierde, dejando a los organelos expuestos al medio extra celular.

2.4.4. Necroptosis

La necroptosis se inicia por perturbaciones en el medio extracelular o intracelular que se detectan por receptores de muerte específicos. Presenta una muerte celular programada con características similares a la necrosis, pero que guarda relación con la apoptosis ya que es regulada por ATP, p53 y la familia de las proteínas BCL. Sin embargo, no implica fragmentación del ADN. La forma más común de activación de la necroptosis es a través de la activación de los receptores de la muerte (pertenecientes a la familia TNF)

Un ligando de muerte se une al receptor de muerte transmembranal, se forma un complejo llamado complejo de pro-survival I que contiene RIPK1 (receptor interacting protein kinase). Después se degrada una parte cuando se inhibe la caspasa 8 y se convierte en el complejo IIb, que recluta RIPK3 y conduce a la formación de necrosomas que son una estructura filamentosa, es entonces cuando da comienzo al proceso de necroptosis (Linares, 2017, Simmons, 2018) y se fosforila la proteína MLKL, la cual se une a la membrana plasmática y promueve la liberación de componentes intracelulares. Este proceso conlleva una respuesta inflamatoria y la ruptura de la membrana celular.

2.4.5. Piroptosis

Este tipo de muerte celular es dependiente únicamente de la caspasa 1. Esta ocurre con mayor frecuencia tras la infección con patógenos intracelulares, es probable que forme parte de la respuesta antimicrobiana. La fragmentación de ADN se da por una nucleasa activada por caspasa 1 que, junto con la reconstitución del citoesqueleto de actina, provocan la creación de poros de membrana por donde pueden salir citoquinas que también son activadas por caspasa 1, estas citoquinas corresponden a mensajeros químicos de muerte necrótica. Al final existe un desequilibrio de los gradientes iónicos, oncosis celular y lisis osmótica. Para algunos investigadores la piroptosis no es más que una muerte de tipo necrótica dependiente de caspasa 1 (De Toro, 2006).

2.4.6. Ferroptosis

La característica principal de este tipo de muerte es que se producen excesivamente peróxidos lipídicos que son dependientes de hierro, tanto el metabolismo del hierro como la peroxidación lipídica son dos procesos críticos involucrados en el mecanismo de la ferroptosis.

La ferroptosis, es morfológica, bioquímica y genéticamente distinta de otras formas bien

conocidas de muerte celular, incluidas la apoptosis, varias formas de necrosis y la autofagia (Dixon et al., 2012). Hay cambios especiales y distintivos en la morfología mitocondrial durante la ferroptosis, principalmente la pérdida de integridad estructural, como mitocondrias más pequeñas de lo normal con densidades de membrana mitocondrial condensada, mitocondria reducida o ausente y ruptura de la membrana mitocondrial externa (Bin Lu et al., 2018).

2.5. Resumen

Lo más destacado de este capítulo, es el hecho de que el cáncer de mama triple negativo no cuenta con tratamientos específicos, por lo que las terapias actuales suelen ser agresivas (atacan células indiscriminadamente) y poco eficientes. Por lo tanto, es de primordial importancia el proponer nuevas terapias que sean efectivas, no agresivas y específicas. Como lo es el caso de la TFD.

Dentro de la TFD existen tres reacciones características tipo I, tipo II y tipo III, las cuales depende de tres factores: el modelo de estudio (oxígeno), el fotosensibilizador y la densidad de energía aplicada. Lo más importante de estas reacciones es la generación de especies reactivas de oxígeno (en particular el oxígeno singulete), las cuales causan estrés a las células causándole la muerte celular. Es decir, detienen las funciones vitales y el metabolismo celular.

Existen diferentes tipos de muerte celular, como apoptosis, necrosis, autofagia, entre otros. Estos tipos de muerte se activan dependiendo el estímulo ocasionado y la capacidad de respuesta de la célula.

En este proyecto se caracterizó la respuesta a la TFD de una línea tumorigénica sub tipo triple negativo y así como su contra parte en una línea no tumorigénica.

Las líneas celulares se utilizan ampliamente en la investigación, ya que nos proporcionan un ambiente controlado que puede emular condiciones similares al tejido *in vivo*, permitiéndonos observar de forma aislada el comportamiento de éstas.

Los modelos experimentales *in vitro*, son utilizados para evaluar la efectividad de una gran gama de terapias, como las terapias contra el cáncer. Las cuales, tienen que pasar por diferentes técnicas experimentales para evaluar los efectos que estas pueden producir.

En el siguiente capítulo, se describen las diferentes pruebas que se realizaron y por medio de las cuales se logró identificar el tipo de muerte celular generada por la TFD en la línea celular humana de cáncer de mama ductal triple negativo y en la línea celular humana de mama ductal, utilizada como control.

Asimismo, son descritos todos los parámetros utilizados en estas técnicas con el fin de poder verificar su reproducibilidad.

3.1. Líneas celulares

Se trabajó con una línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) y una línea no tumorigénica MCF 10A (ATCC CRL-10317), las cuales fueron adquiridas directamente de ATCC (American Type Culture Collection). La investigación se efectuó en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente del IMSS, así como en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 fue aislada por primera vez de una efusión pleural de mujer caucásica de 51 años de edad, que presentaba un adenoma mamario metastásico. Por lo cual es alta mente agresiva e invasiva. No expresa receptores para estrógenos (ER), progesterona (PR) así como el receptor de crecimiento epidérmico humano (HER-2). La invasividad de las células MDA-MB-231 está mediada por la degradación proteolítica de la matriz extra celular.

Línea celular de glándula mamaria MCF 10A de mujer caucásica de 36 años de edad, morfología epitelial, negativa para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) y para receptores hormonales (RRHH-).

3.2. Dispositivos lumínicos

Se emplearon dos dispositivos diseñados y elaborados en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica. Cuentan con un arreglo de 12 LED's como se muestra en la fig 3.1, una superficie disipadora de calor y un soporte para microplacas de 96 pozos. El ancho de banda para la primera placa comprende de 600-650 nm, para la segunda placa el ancho de banda es de 490-540 nm, el espectro de emisión se muestra en la fig. 3.2. La potencia promedio de las placas fue censada con un medidor de potencia (Thorlabs pm100d) y es de 33.58 mW.

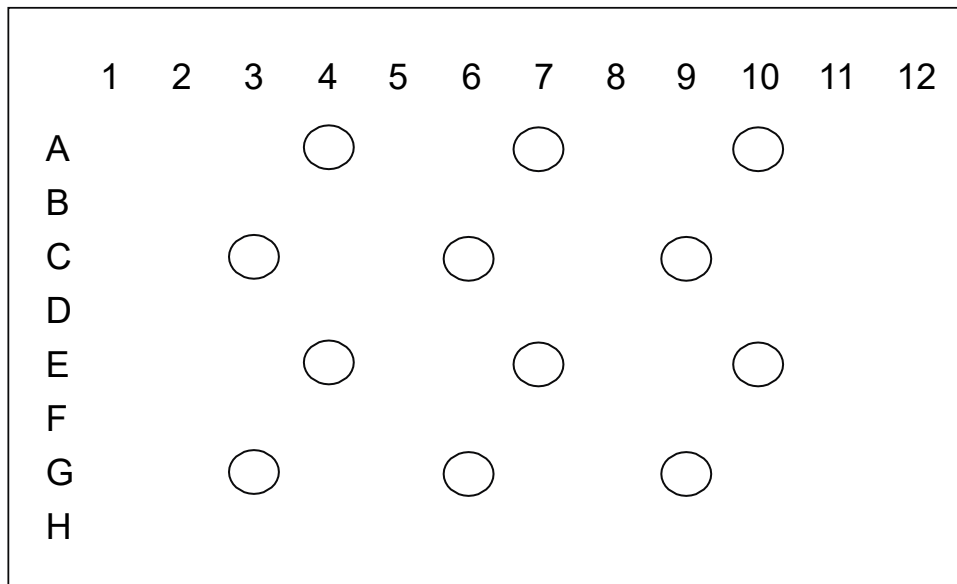


Fig.3.1 Posición de LED's en placas para TFD

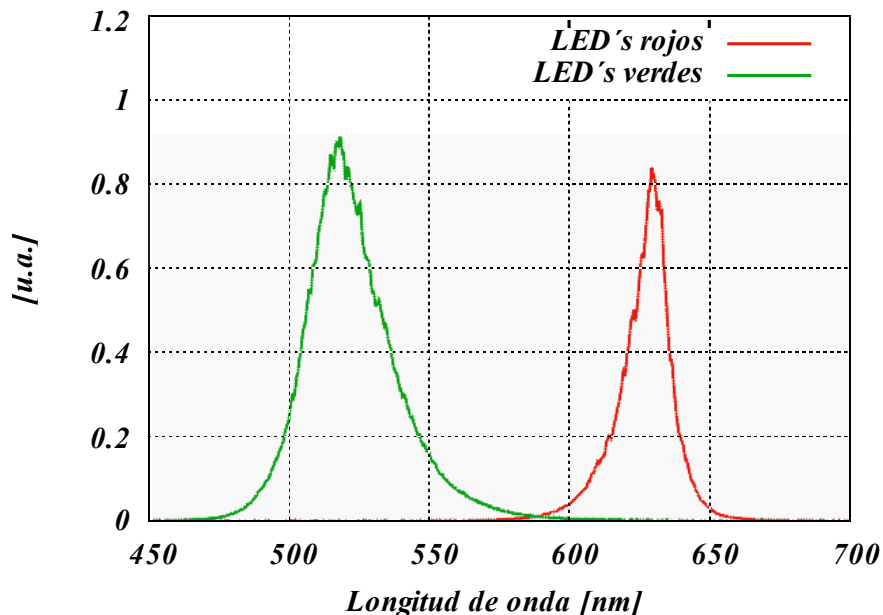


Fig. 3.2 Espectro de emisión de los dispositivos utilizadas para la TFD

3.3. Fotosensibilizadores

Se utilizaron dos fotosensibilizadores solubles en agua y con un espectro de absorción dentro del rango visible. El rosa de bengala (MEYER #632-69-9) y azul de metileno (MEYER #7220-79-3), estos favorecen la formación de oxígeno singlete a través de la transferencia energética.

3.4. Mantenimiento de las líneas celulares

Para mantenimiento de rutina de los cultivos, se sembró la línea celular tumorigénica MDA-MB-231 en botellas de poliestireno para cultivo (Techno Plastic Products #90025) en medio leibovit's (ATCC, 30-2008) adicionado con 10% de suero bovino fetal y 100 µl de antibiótico (Solución estabilizada, con 10,000 unidades de penicilina y por cada 1 ml de suero 10 mg de estreptomicina/ml), el medio contenía 2 mM de glutamina y es formulado para su uso en aire atmosférico, se incubaron a 37°C hasta formar una monocapa confluyente de células de un 80%.

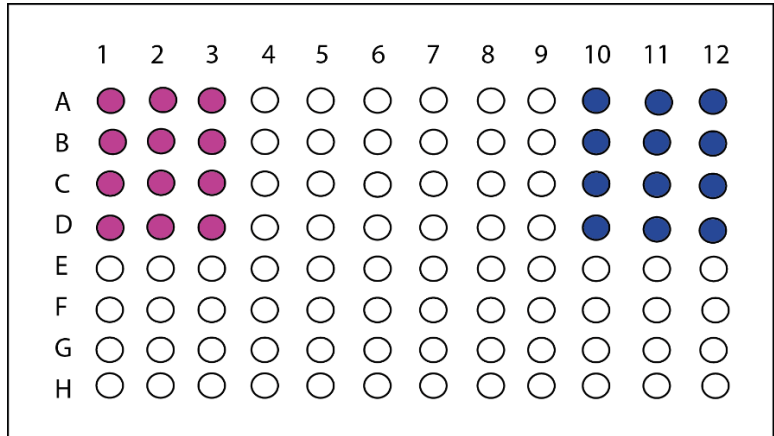
La línea no tumorigénica se sembró en placas de 6 pozos para cultivo (Corning #3506) en medio Ham's F12 (Biowest #L0135) complementado con factor de crecimiento (Sigma #SRP3027), hidrocortisona (Sigma-Aldrich #H4001), enterotoxina del cólera (Sigma-Aldrich #C8052) e insulina, adicionado con 10% de suero de caballo (Biowest #S0910) y 100 µl de antibiótico por cada 1 ml de suero, se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% hasta formar una monocapa confluyente de células de un 80%.

El recambio de medio se llevó a cabo cada cuatro días, en el cual, se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS, pH 7.4).

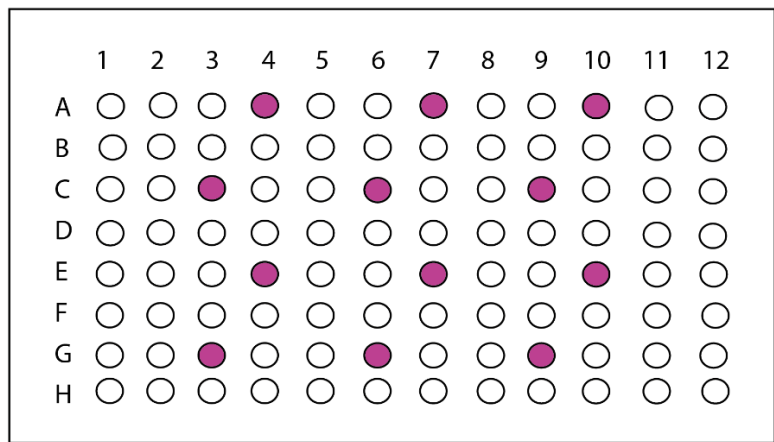
3.5. Cultivo en placas de 96 pozos

A partir de un cultivo previo de células con una confluencia del 80%, estas fueron recuperadas mediante el empleo de 400 µl de tripsina (Gibco #25200056) durante 5 minutos. La acción de la tripsina se inactivó agregando un 1 ml de medio, a continuación, el cultivo fue recolectado en un tubo eppendorf (#MTC-150-C) y centrifugado (Sigma #D347520) a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de medio para el conteo celular, después, 20,000 células MDA-MB-231 se depositaron en los pozos de una placa de 96, y 10,000 células de la Línea celular MCF-10A.

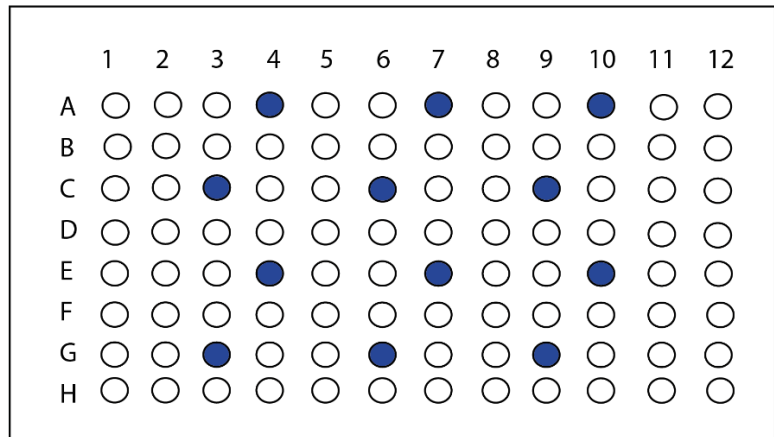
La distribución de las muestras en la microplaca está representada en la fig. 3.3.



A)



B)



C)

Fig.3.3 Configuración de cultivo celular. A) placa de control, de lado izquierdo se cultivaron células para ser tratadas con rosa de bengala y de lado derecho para azul de metileno (en la primera fila (A) se colocaron controles sin tratamiento, la placa no fue irradiada y se colocaron controles de toxicidad sin luz), B) placa de TFD con rosa de bengala (en la primera fila (A) se colocaron controles de luz), C) placa de TFD con azul de metileno (en la primera fila (A) se colocaron controles de luz). La distribución de los cultivos celulares en estos pozos determinados es debido a la posición de los LED's en los dispositivos.

3.6. Aplicación de la TFD

24 horas después del sembrado de células en placas de 96 pozos, se hizo un lavado con PBS y se colocó fotosensibilizador a las siguientes concentraciones:

- 3 μM , 5 μM y 7 μM para rosa de bengala, 5 μM , 10 μM y 20 μM para azul de metileno.

El fotosensibilizador se incubó durante una hora en obscuridad, posteriormente se le hicieron dos lavados con PBS a la placa control y fue añadido el medio de cultivo correspondiente para cada línea celular. Las placas de TFD fueron lavadas de la misma forma que la placa control, sin embargo, antes de agregar el medio, se colocaron 100 μl de PBS y se irradió a 10 J/cm^2 .

(La TFD fue aplicada antes de cada método descrito a continuación).

3.7. Tinción de Hoechst

Este ensayo está basado en una tinción nuclear que emite fluorescencia azul, el fluorocromo (Hoechst) es permeable a las células y se une al ADN, es excitado alrededor de 350 nm, tiene una emisión en 450 nm.

Bajo nuestras condiciones experimentales, se hizo un lavado con PBS y a continuación, a temperatura ambiente y en obscuridad se colocaron 50 μl de paraformaldehído al 4%, dejándolo por 20 min. Se agregaron 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hoechst (Sigma-aldrich #33258) y se incubó durante 20 min, posteriormente se hicieron 2 lavados PBS y se observó en el microscopio de fluorescencia (ZEISS)

Se adquirieron fotografías con objetivos de 10x y 20x.

3.8. Tinción con Giemsa

La tinción de Giemsa es una mezcla de azure, azul de metileno y de eosina, que se usa para teñir de manera variable los diversos componentes de las células. Eosina y azure tiñen de manera variable los componentes básicos de las células, es decir; el citoplasma, los gránulos, etc., y el tinte azul de metileno tiñe los componentes ácidos, especialmente el núcleo de la célula.

Una vez aplicada la TFD como se indica en el párrafo correspondiente, las muestras fueron lavadas con PBS, después se añadieron 50 μl de metanol absoluto durante 5 min, se lavaron 2 veces con agua destilada y se añadieron 100 μl de Giemsa durante 3 min (Se añadió Giemsa (Goden Bell #63200) previamente filtrado), se retiró el fotosensibilizador y dejó secar durante 48 h. Se obtuvieron imágenes con el microscopio con un objetivo de 10x y 20x.

3.9. Medición de ROS

El ensayo fluorométrico para detectar ROS (peróxido e hidroxilo) consiste en colocar un compuesto que se oxida al estar en contacto con las ROS haciendo que cambie su estructura molecular y pueda ser excitada a cierta longitud de onda y al decaer emita fluorescencia. La producción de fluorescencia nos permite cuantificar la formación de ciertas ROS y es posible detectarlas por un espectrómetro, citómetro o microscopio de fluorescencia.

Para este ensayo se utilizó un kit (Sigma-aldrich #MAK142) para la medición de ROS intracelulares (especialmente radicales superóxido e hidroxilo). Se excitó a 640 nm y se midió la emisión a 675 nm. Se elaboró un control positivo de ROS, utilizando 100 μ M de tert-butyl hydroperoxide (TBHP), el cual se incubó durante 30 minutos a 37°C y CO₂ al 5%. Se hizo un lavado con PBS y se agregó 100 μ l de la mezcla de reacción maestra (buffer de ensayo y reactivo detector de ROS). La mezcla fue añadida una hora después del tratamiento con TFD). A continuación, se incubó a 37°C durante 30 min en oscuridad.

Las células fueron tripsinizadas, bloqueadas con medio y depositadas en un eppendorf. A continuación, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se decantaron, se agregaron 100 μ l de PBS, se resuspendieron, filtraron y colocaron en un tubo para citometría se realizaron las lecturas de las muestras en el citómetro de flujo FACS Canto a través del canal APC (aloficocianina, 660 nm).

3.10. Medición de la viabilidad por MTT

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas de la célula que conlleva a que se produzca un daño que puede ser detectado, por lo que la capacidad para reducir al bromuro de 3-(4, 5- dimetiltiazol-2ilo) -2, 5-difeniltetrazol (MTT) constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias, cuya actividad funcional es interpretada como una medida de viabilidad celular. El MTT es reducido por el enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán, el producto de reacción es retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas, de esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido (Mosmann, 1983). Bajo nuestras condiciones experimentales, el ensayo se realizó de la siguiente manera:

Se retiró el medio y se lavó con PBS, después se añadió 37 μ l de solución de trabajo de MTT (5 mg/ml PBS, MTT 10%, Suero Bovino Fetal (SBF) 7%, antibiótico 10 μ l/ml) se cultivó por

4 horas, después se añadió DMSO (Caledon #4100-1) y se agitó durante 15 m a 470 rpm. Se hizo la lectura a 570 nm en el lector de placas (BIOTEK - CINERGY 4).

3.11. Conteo y caracterización celular por el programa Image J

ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes gratuito, diseñado para imágenes biológicas, desarrollado en el National Institutes of Health (NIH).

Para la cuantificación de los cambios morfológicos, desde el programa Image J, se abrieron las imágenes de las líneas celulares tratadas con TFD y analizadas en el microscopio de fluorescencia anteriormente procesadas en el programa ZEN blue (programa para análisis de imágenes de fluorescencia) y se hizo una conversión a 8 bits, para linearizarlas. Se seleccionó la imagen, después se obtuvo el histograma de la imagen, lo que nos permitió hacer la linearización de la imagen en blanco y negro.

Desde la pesataña analyze particles que se encuentra en el programa Image J, se definió el rango de las partículas y se colocaron valores de 0 a 1 para hacer referencia a un círculo completo (célula) para el conteo. Al final se obtuvo el número de células en el plato. Se hizo el conteo de 5 fotos, de diferente campo por pozo.

Se evaluó la confluencia de las células en monocapa con el programa de Image J.

3.12. Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizan al menos por triplicado, los resultados se expresaron con valor medio \pm desviación estándar (SD). Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía (***) $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, $N = 3$). Los valores expresados como porcentaje, fueron normalizados, previamente a su análisis estadístico.

3.13. Resumen

En el capítulo anterior, se presentan las diferentes técnicas utilizadas para evaluar la terapia aplicada.

En cuanto a recurso material se utilizaron dos líneas celulares humanas. Una de cáncer de mama ductal triple negativo y otra línea de mama ductal no tumorigénica. Además, se utilizaron dos fotosensibilizadores, cuyo pico de absorción para el rosa de bengala se encuentra entre los 490-540 nm, mientras que para el azul de metileno se encuentra entre los 600-650 nm. Se variaron las dosis dependiendo del fotosensibilizador, para rosa de bengala se utilizaron 3, 5 y 7 μM y para azul de metileno se utilizaron 5, 10 y 20 μM .

Se utilizaron placas LED's diseñadas en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, cuya matriz permite irradiar placas de cultivo de 96 pozos donde se realizaron los experimentos. La densidad de energía aplicada a cada muestra fue de $10 J/cm^2$.

Además, en el capítulo previo se describieron las diferentes técnicas para evaluar el tipo de muerte, la cantidad de ROS y la viabilidad celular. Para evaluar los cambios morfológicos e identificar el tipo de muerte, se utilizó la tinción celular de Giemsa, y la tinción con Hoechst para teñir los núcleos celulares. Para medir la cantidad de especies reactivas de oxígeno, se utilizó una sonda medida a través de citometría de flujo. Mientras que la medición de viabilidad en la línea no tumorigénica se llevó a cabo por la técnica de MTT.

4.1. Cambios morfológicos

En el siguiente capítulo se muestran los resultados obtenidos por las técnicas descritas anteriormente. Estos resultados se despliegan principalmente como imágenes y gráficos.

En las imágenes donde se muestra la tinción celular de Giemsa pueden apreciarse cambios morfológicos. A partir de los cuales se puede corroborar la existencia o inexistencia de estrés celular, muerte celular y la capacidad de adherencia y resistencia a la terapia.

En las imágenes de tinción nuclear de Hoechts pueden apreciarse los cambios en el núcleo celular. Como lo son: picnosis, cariolisis, cariorexis, fragmentación nuclear y condensación nuclear.

Las gráficas de medición de viabilidad por MTT, muestran la actividad del succinato deshidrogenasa la cual nos da una apreciación de la capacidad mitocondrial y por lo tanto de la capacidad metabólica celular.

Las gráficas de medición de ROS, nos muestra los niveles medios, altos y bajos de fluorescencia. Los cuales corresponden a los niveles de generación de ROS en un conjunto de células.

4.1.1. TFD con rosa de bengala y controles en la línea MDA-MB-231

Con la finalidad de evaluar los cambios morfológicos que la TFD pudiera causar sobre las diferentes líneas celulares, se realizó una tinción por Giemsa y se obtuvo registro de estos con ayuda de un microscopio óptico (*Olympus BH2-RFCA*), estas se muestran a partir de la figura 4.1 a la 4.10.

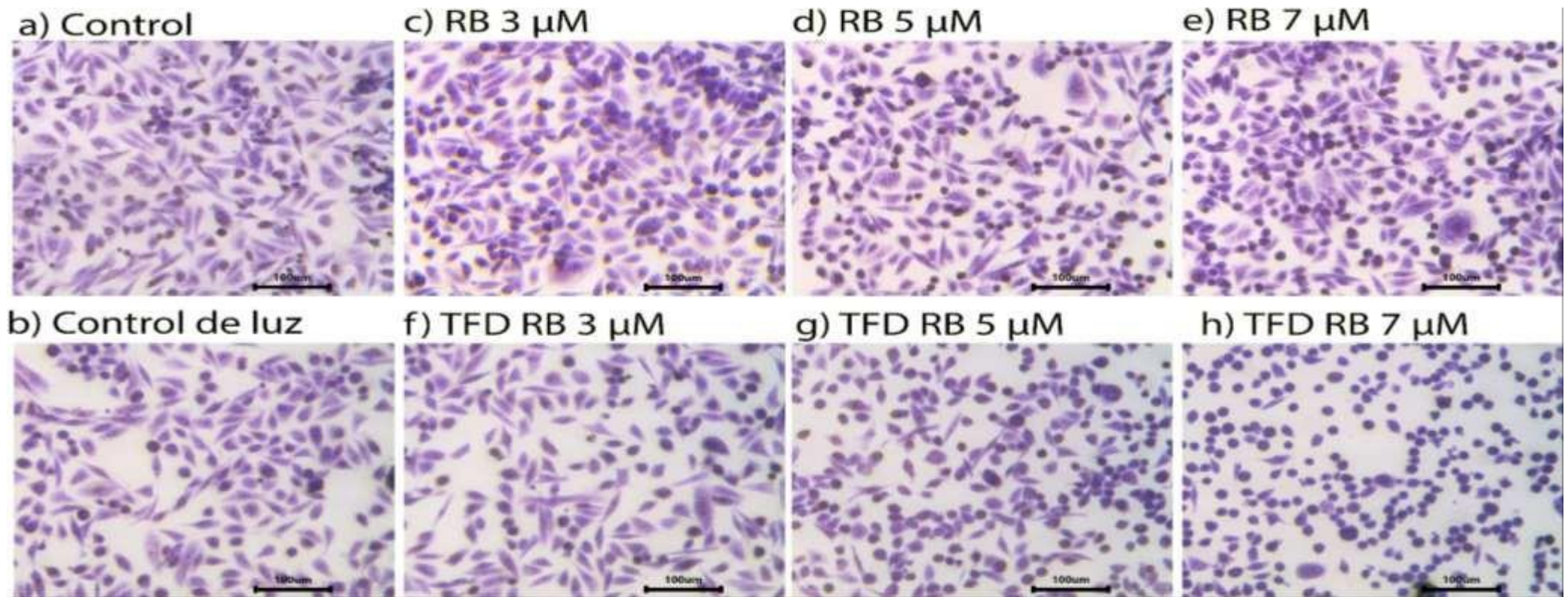
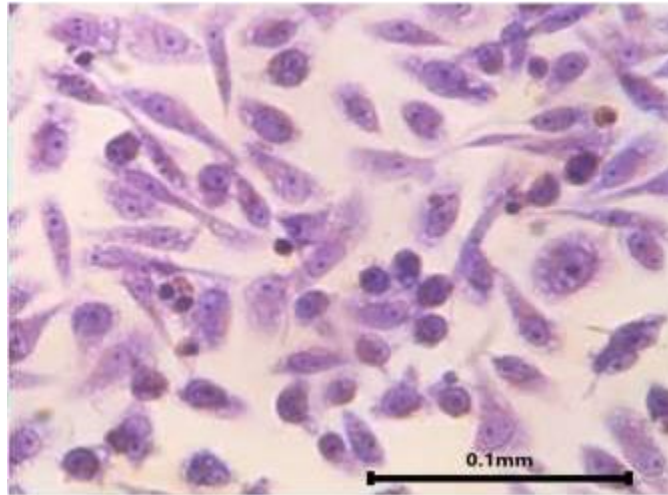


Fig. 4.1 Tinción de Giemsa con la línea celular MDA-MB-213 tomadas con un objetivo de 10x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). El cultivo celular control (sin tratamiento), representada en el inciso a) el cual mostró un aspecto normal característico de la línea MDA-MB-231, adherente y epitelial. Al ser una línea cancerígena, tiene una morfología alterada, ya que pierde el contacto y la habilidad de crecer sobre otra célula. El inciso b) representa el cultivo control de luz verde con una densidad de energía de 10 J/cm². En los cultivos de control de fotosensibilizador con rosa de bengala (RB) 3, 5 y 7 μM (c, d y e, respectivamente), se observó un ligero cambio en la confluencia, como también, un aumento de células redondeadas. En los pozos de TFD RB (f, g, y h) se observó una disminución considerable en la confluencia del cultivo, también fue posible apreciar que la morfología de las células cambió drásticamente, entre mayor fue la concentración de fotosensibilizador RB en la TFD mayor, el número de células redondeadas y que perdieron la asimetría, característica de una célula apoptótica.

a) Control



b) Control de luz

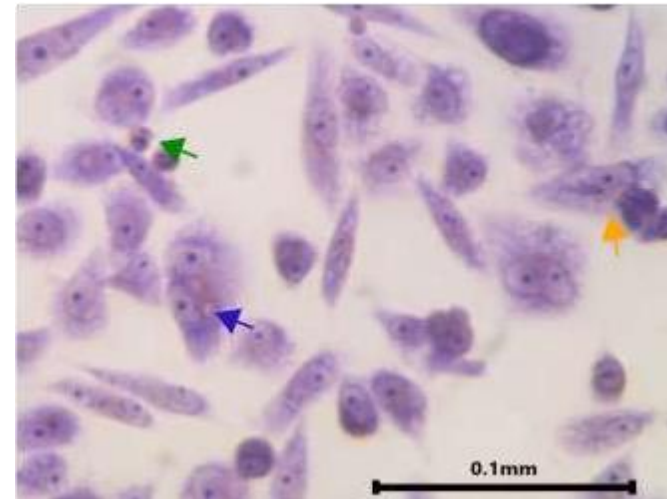
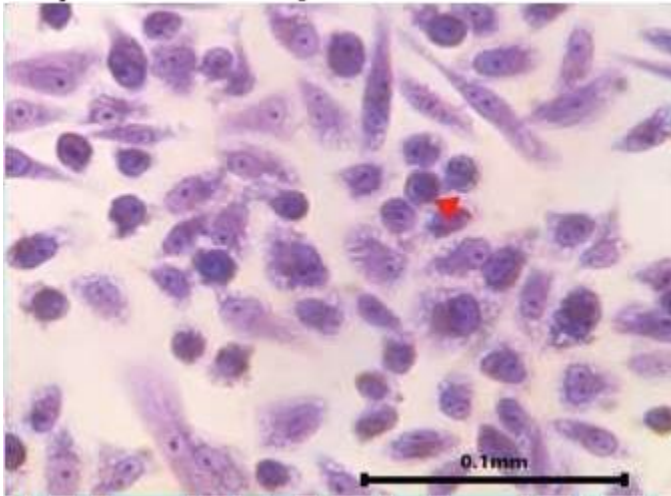
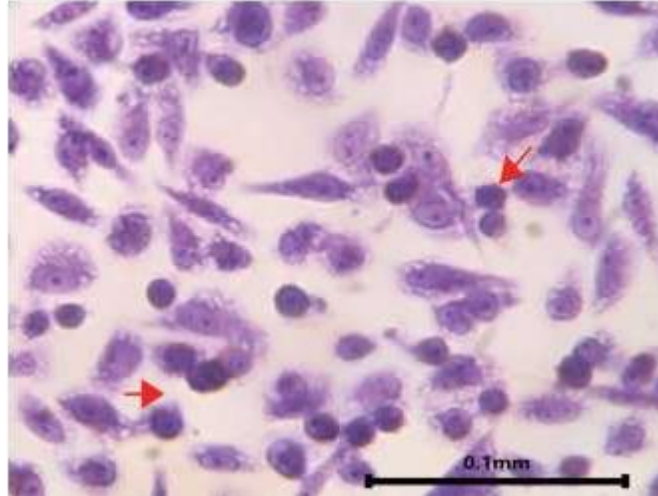


Fig. 4.2 Tinción de Giemsa con la línea celular MDA-MB-213 tomadas con un objetivo de 20x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). En el inciso a) se representa la imagen control, en la cual se apreció una morfología normal característica de la línea celular, membrana bien definida, núcleos no condensados, ni fragmentados y una confluencia del 90 % (medido con el programa Image J). En el inciso b) se representa el control de luz, en él se observó una disminución en la cantidad de células adheridas al pozo. También se observó que su morfología, en comparación con el control, cambió para ser un poco más grandes (señalada por la flecha naranja) y algunas comenzaron a verse más redondeadas, lo que nos indica que hay una compactación en la membrana. Fue posible observar que los núcleos no presentaron fragmentación, pero sí un ensanchamiento poco habitual respecto al control. Pudimos observar que en algunas células existen dos nucleolos, cada uno en una envuelta nuclear diferente, esto es característico de división celular (flecha azul). La flecha color verde, muestra una célula necrótica, pues ya no se observa integridad en la membrana celular.

c) RB 3 μ M



d) RB 5 μ M



e) RB 7 μ M

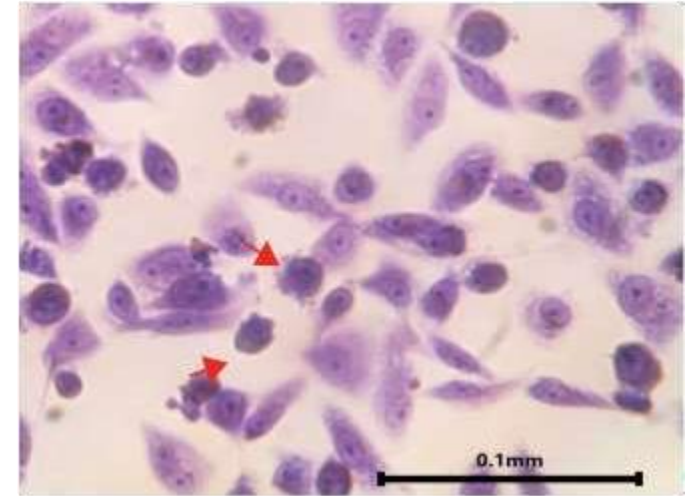
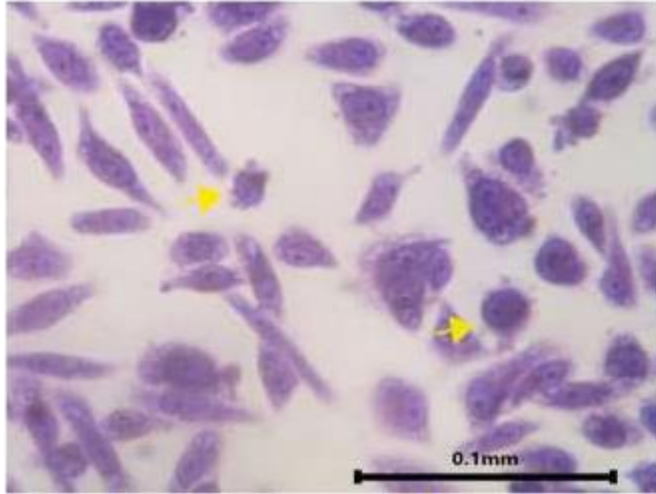
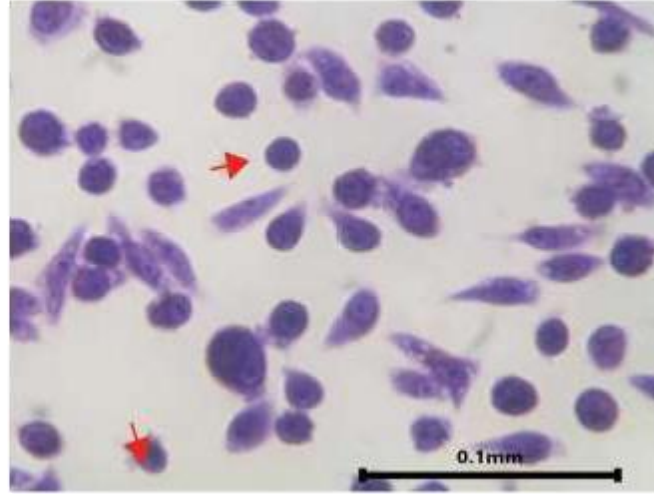


Fig.4.3 Tinción de Giemsa con la línea celular MDA-MB-21, imágenes tomadas con un objetivo de 20x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). Las imágenes de control de fotosensibilizador rosa de bengala (RB) (c,d y e), mostraron una disminución de la confluencia y aumento en las células con compactación del citoplasma, a las cuales no fue posible distinguirles el núcleo debido a su disminución de tamaño (flechas roja). En el pozo de 7 μ M (e), fue posible ver un burbujeo (blebbing), característicos de apoptosis temprana. Estas células también mostraron una compactación membranal, sin embargo, aun conservaron su integridad.

f) TFD RB 3 μM



g) TFD RB 5 μM



h) TFD RB 7 μM

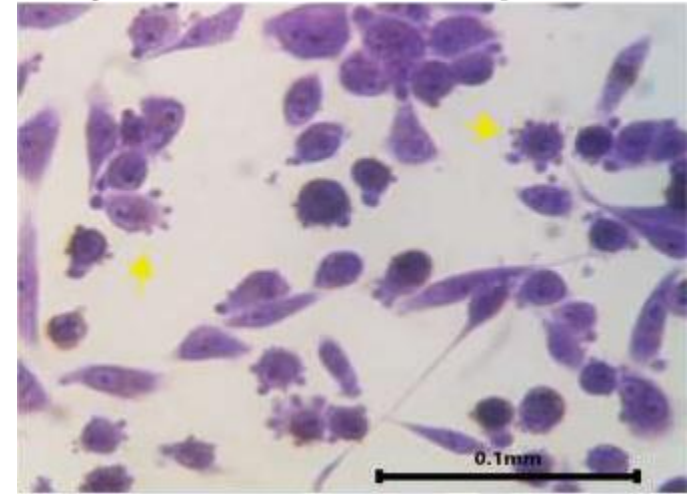


Fig.4.4 Tinción de Giemsa con la línea celular MDA-MB-213 tomadas con un objetivo de 20x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). Los incisos f, g y h, muestran células con TFD a 3, 5 y 7 μM de rosa de bengala (RB) respectivamente. En el inciso f) se observaron células con características muy similares al control. En ellas fue posible ver el cambio en la confluencia y un aumento en las células con condensación de la membrana y cambio en la simetría, característico de la apoptosis. También fue posible observar algunas células con pequeños fragmentos alrededor (flechas amarillas). En la segunda dosis de TFD 5 μM (inciso g)), se apreció un cambio significativo en la morfología, ya que la membrana se retrajo en la mayoría de las células y éstas tendieron a separarse más entre sí. Por lo tanto, hubo un aumento de células con el citoplasma compactado (flechas rojas), además de una pérdida de la simetría y una disminución considerable en la confluencia. En la TFD con la mayor dosis (inciso h)), se observaron pequeñas vesículas recubiertas de membrana, características de cuerpos apoptóticos (flechas amarillas), la célula tiene una compactación del citoplasma y una disminución de la región nuclear. La disminución en la confluencia se observó en mayor grado y puede atribuirse a la incapacidad de la célula para mantenerse adherida al pozo, características de daño celular.

4.1.2. TFD con azul de metileno y controles en la línea MDA-MB-231

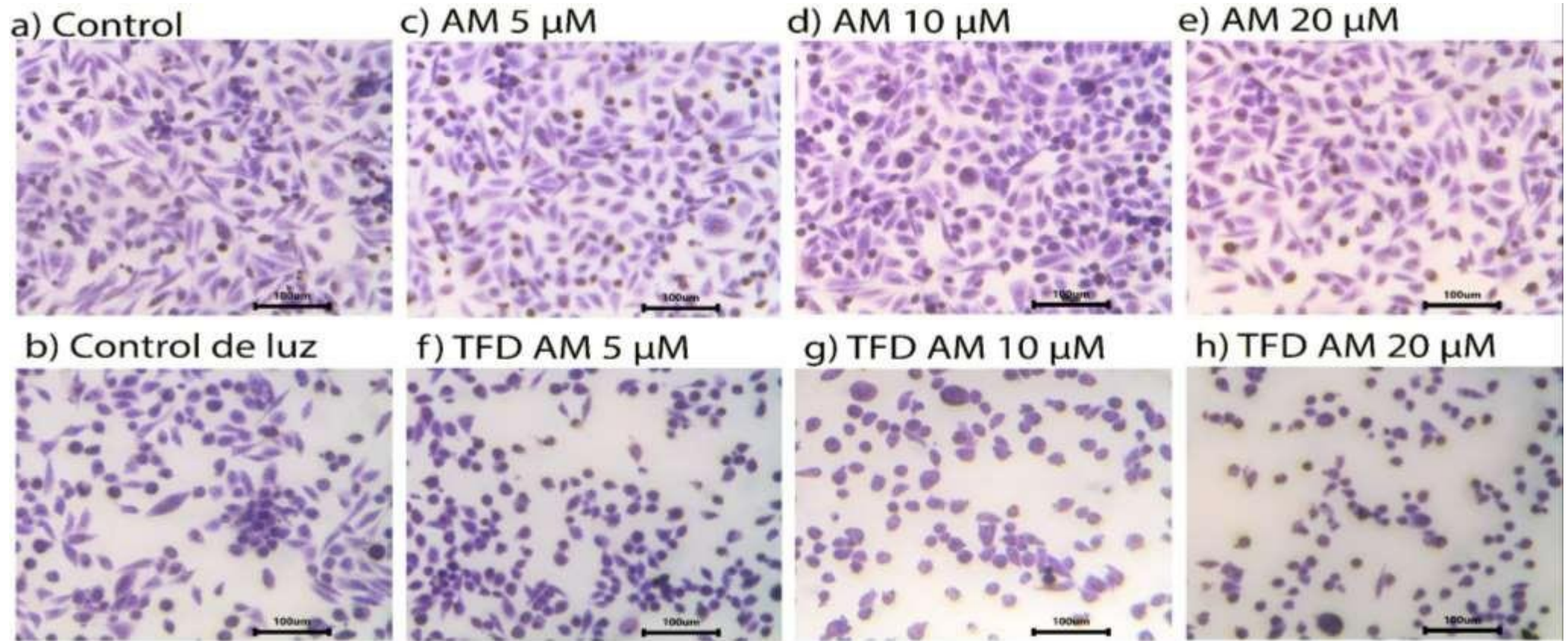
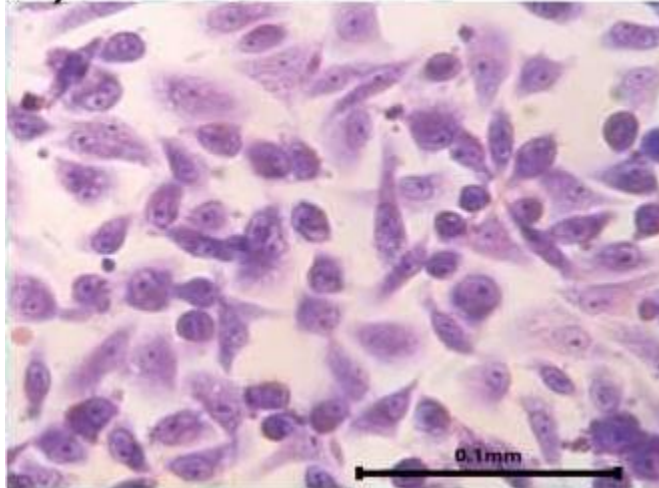


Fig. 4.5 Tinción de Giemsa con la línea celular MDA-MB-231 tomadas con un objetivo de 10x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). El inciso a) muestra a las células control sin tratamiento, característico de la línea MDA-MB-231, las células formaron una monocapa con una confluencia de hasta un 90 %. La imagen del cultivo control de luz roja (inciso b)), con una densidad de energía de 10 J/cm², mostró una disminución en la confluencia bastante drástica en comparación con el control de luz verde, esto se puede deber a la incapacidad de la célula de mantenerse adherida a la superficie. También fue posible observar pequeños grupos con células cuyas membranas están compactadas y no fue posible distinguir el núcleo. En esta imagen no se vieron restos celulares a simple vista. En los cultivos de control de fotosensibilizador de azul de metileno (AM) 5, 10 μM (c y d, respectivamente), fue posible visualizar un ligero aumento en la confluencia, sin embargo, a 20 μM (inciso e)), volvió a decaer la cantidad de células en el pozo. En los pozos de TFD con azul de metileno (AM) (incisos f, g y h), se pudo observar que existe un cambio dramático en la morfología de las células. Las células tratadas con TFD tendieron a compactar su membrana, tuvieron una pérdida de la asimetría y la confluencia con forme aumenta la concentración de fotosensibilizador.

a) Control



b) Control de luz

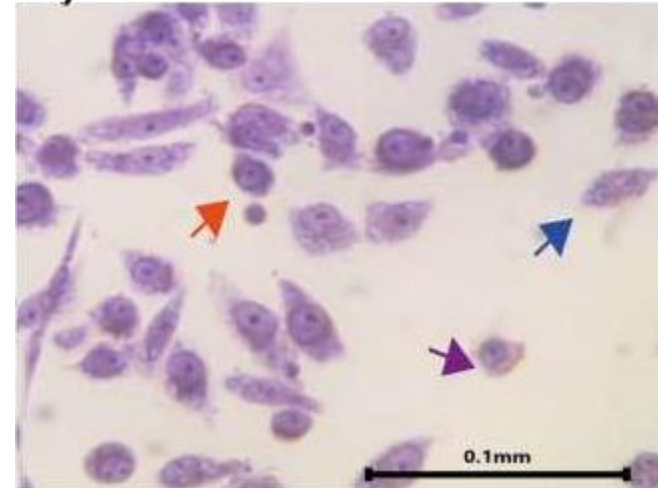
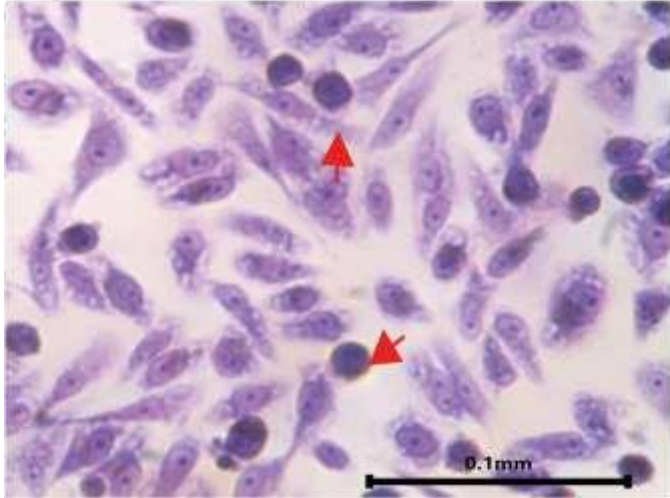
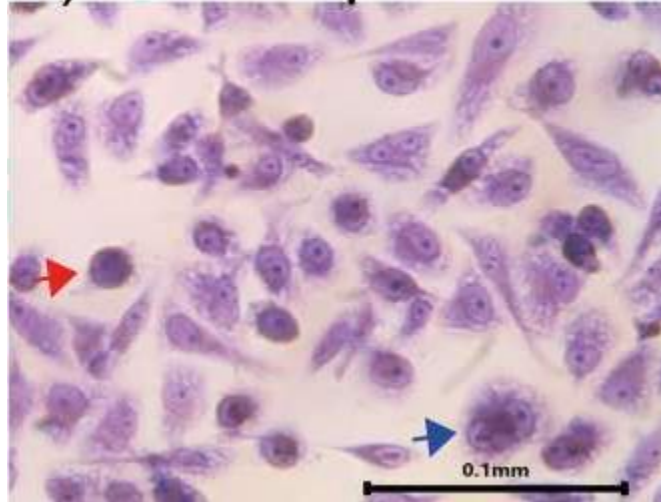


Fig. 4.6 Tinción de Giemsa con la línea celular MDA-MB-213 tomadas con un objetivo de 20x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). En el inciso a) se observan las células de control sin tratamiento, en ellas se apreció una morfología normal característica de la línea celular, membrana bien definida, núcleos no condensados, ni fragmentados y una confluencia del 90 %. En las células control de luz roja (inciso b)), se observaron células cuya membrana se está contrayendo (flecha naranja), núcleos y membranas intactas, adheridas por sus filamentos de actina. Sin embargo, en la célula señalada con flecha azul marino, se pudo observar que existen dos nucleolos, cada uno en una envuelta nuclear diferente, esto es característico de división celular. La flecha morada señala a una célula que perdió su membrana, por lo tanto, está necrosada. En esta condición fue posible observar una disminución de células.

c) AM 5 μM



d) AM 10 μM



e) AM 20 μM

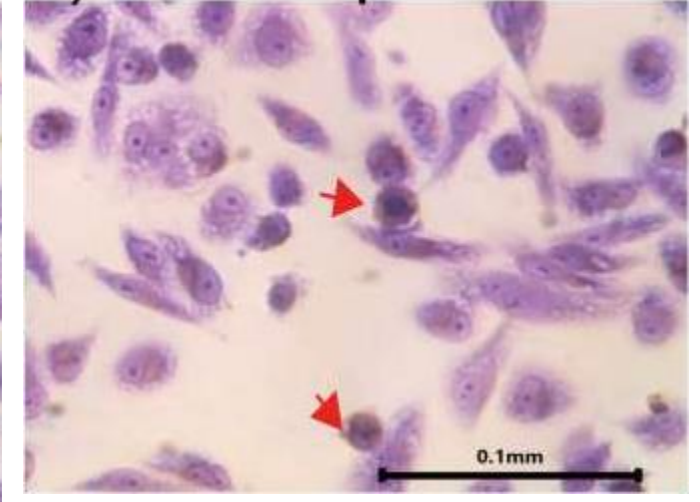


Fig. 4.7 Tinción de Giemsa con la línea celular MDA-MB-213 213 tomadas con un objetivo de 20x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). Las dosis de fotosensibilizador de azul de metileno (AM) que se observan en los incisos c, d y e, (5,10 y 20 μM respectivamente) mostraron un aumento en la confluencia y también en el número de células redondeadas, a las cuales no fue posible distinguirle el núcleo debido a su disminución de tamaño (flecha roja). En las células sometidas a la dosis de 10 μM (inciso d), se observaron células cuyas membranas se vieron retraídas y fue posible observar aún su anclaje, los nucleolos aumentaron a dos en algunas células, y se observaron dos envueltas nucleares por cada célula (flecha azul). En la última dosis de fotosensibilizador sin luz (inciso e)), podemos observar flechas rojas, indicando la compactación de la membrana.

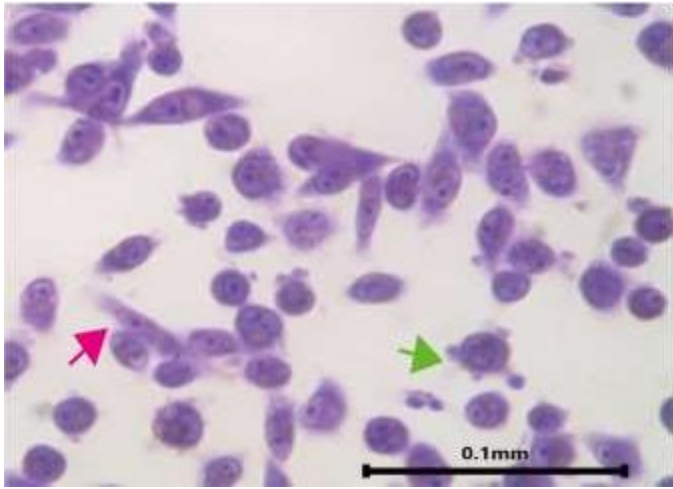
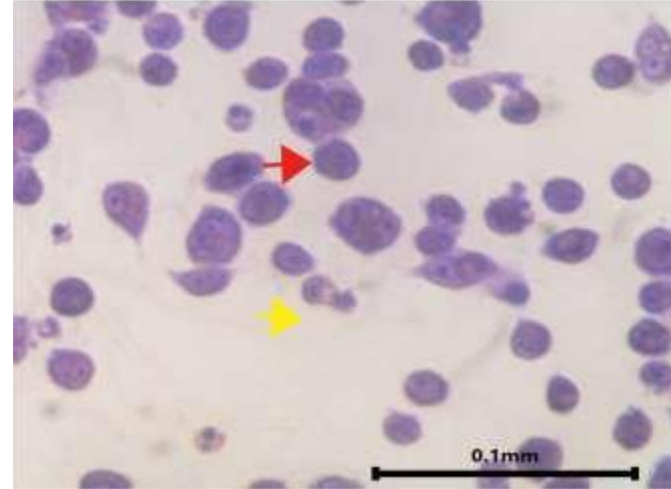
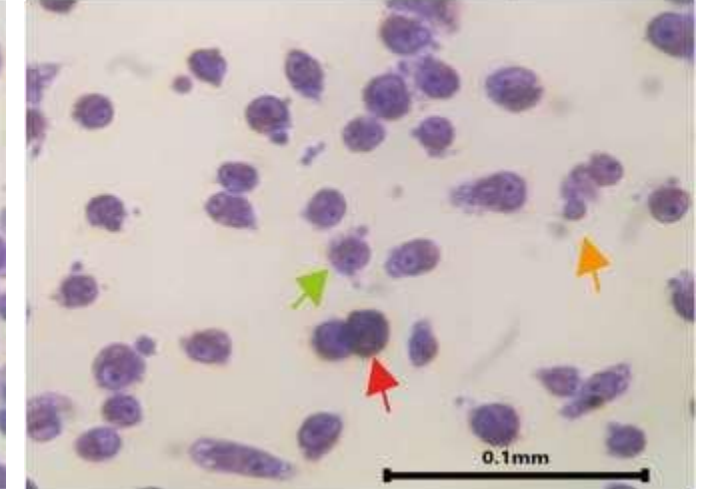
c) TFD AM 5 μM d) TFD AM 10 μM e) TFD AM 20 μM 

Fig. 4.8 Tinción de Giemsa con la línea celular MDA-MB-213 tomadas con un objetivo de 20x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). Se aprecian las células tratadas con TFD a las concentraciones de 5, 10 y 20 μM de azul de metileno (AM) (incisos f, g y h, respectivamente). Estas mostraron una compactación del citoplasma, además, mientras aumentó la dosis aminoró la cantidad de células adheridas a la superficie. En la primera dosis de TFD 5 μM de azul de metileno (inciso f), se pudo observar que se compactó la membrana celular en algunas células, sin embargo, aún se observaron células que conservaban la morfología de células sanas (flecha rosa). Hubo también células en las que se pudo observar un cambio en el núcleo. Sin embargo, en estos casos no existe otra envuelta nuclear, esto nos puede indicar que existe una fragmentación nuclear sin rompimiento de membrana, característico de la apoptosis y células cuya membrana tiene una especie de burbujeo (flechas verdes). En la segunda dosis de TFD con azul de metileno a 10 μM (inciso g) pudimos apreciar células cuya membrana se contrajo, su núcleo perdió su forma y también se observaron cuerpos apoptóticos (flecha roja). Fue posible observar células necróticas (flecha amarilla), las cuales no presentaron simetría en sus membranas celulares, también hubo una disminución muy marcada en su confluencia celular. En la última y más alta dosis de TFD 20 μM (inciso h), se observaron células que nos indican un burbujeo (flecha verde), además de membranas que se contrajeron de tal manera que perdieron total simetría (flecha roja). La flecha naranja, nos indican a las células que generaron características necróticas, ya que tuvieron pérdida de núcleo y del citoplasma, lo que indica pérdida en la integridad de la membrana celular.

4.1.3. TFD con rosa de bengala y controles en la línea MCF 10A

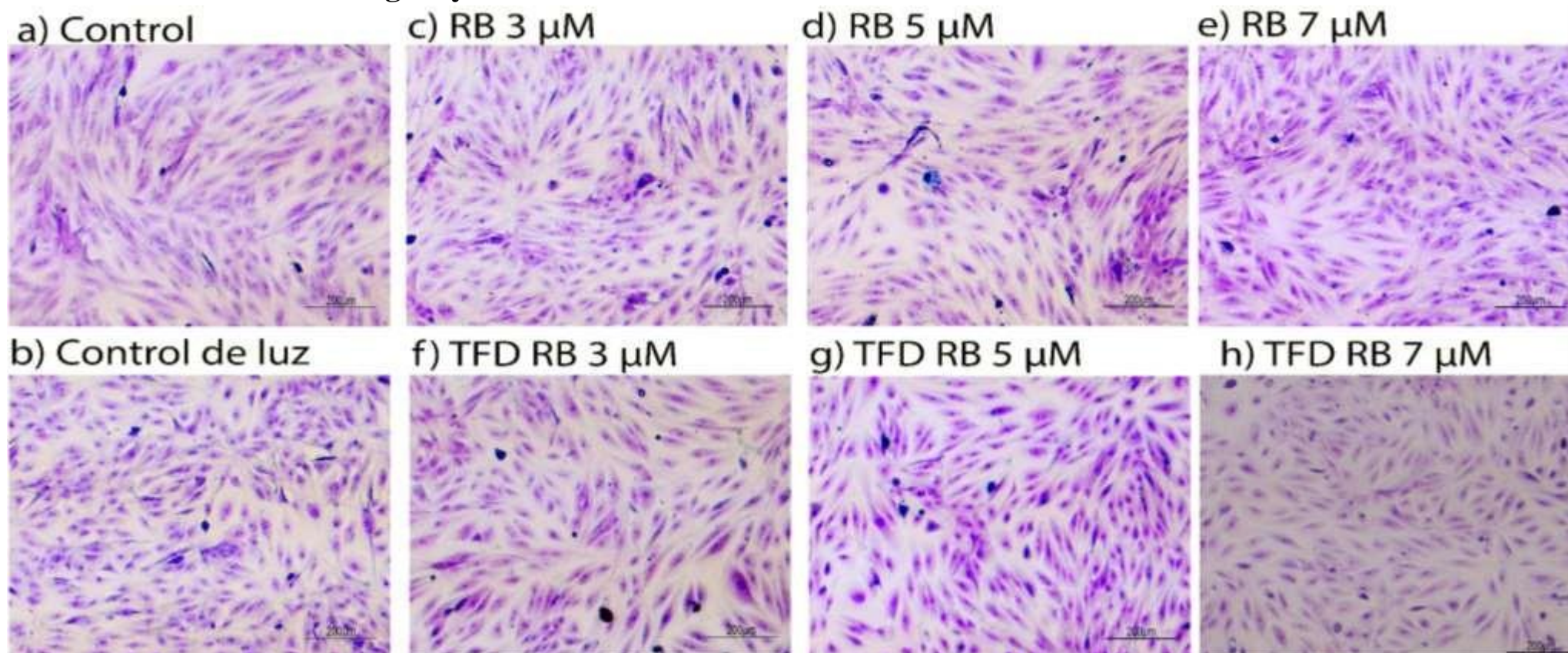
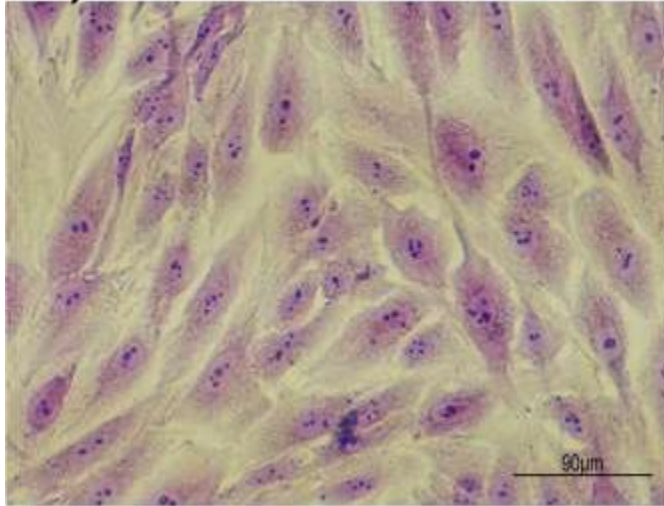


Fig. 4.9 Tinción de Giemsa con la línea celular MCF 10A tomadas con un objetivo de 5x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). El inciso a) muestra el control de la línea MCF 10A no tumorigénica, la cual está conformada por células epiteliales que se encuentran en los ductos de la glándula mamaria en la superficie luminal. El inciso b) muestra el control de luz verde, en el cual se observó que no hubo cambios significativos en la confluencia, solo se observó un pequeño encogimiento de las células. Para las concentraciones de fotosensibilizador con rosa de bengala (RB), se pudo observar que las células se mantuvieron adheridas a la superficie (incisos c, d y e). En las concentraciones de TFD con rosa de bengala (RB) (incisos f, g y h), se vio una disminución de la confluencia, menor al 10%.

a) Control



b) Control de luz

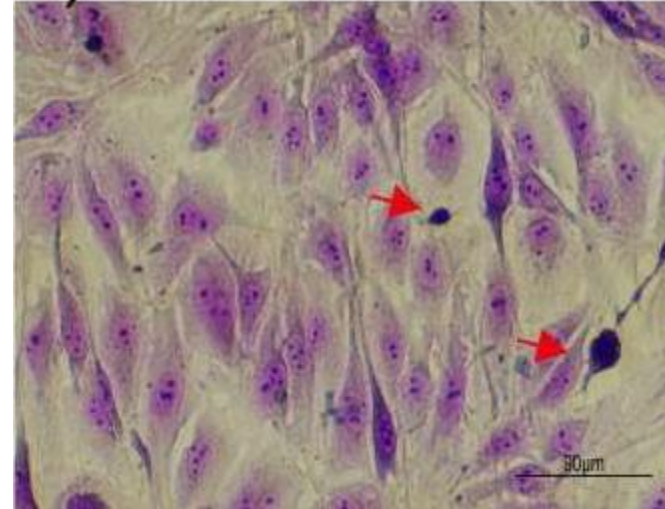
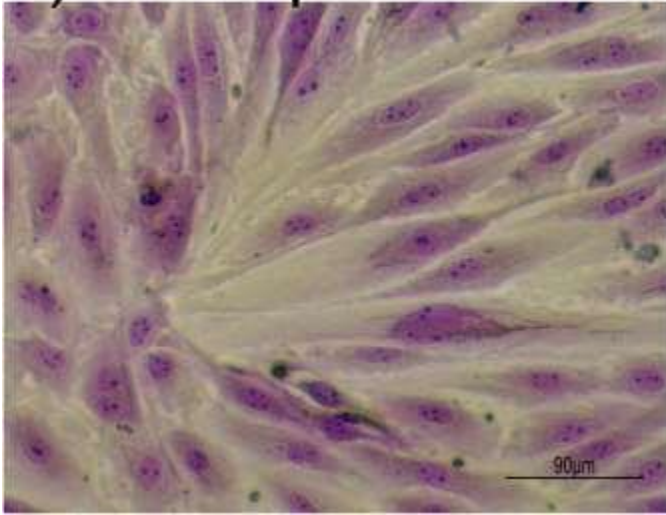
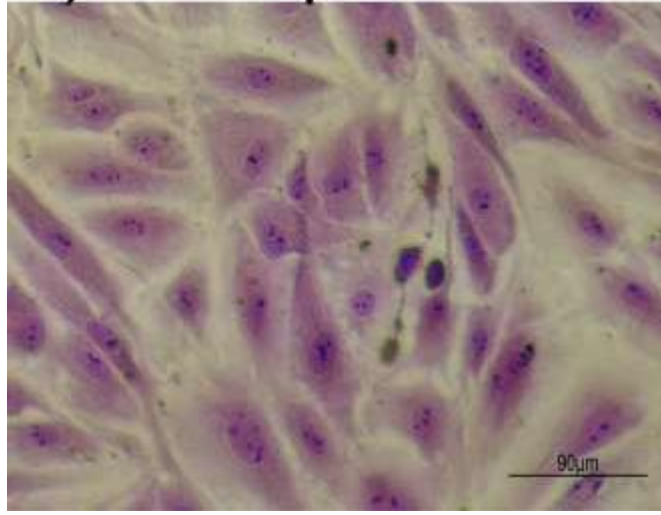


Fig. 4.10 Tinción de Giemsa con la línea celular MCF 10A fotos adquiridas a través de microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA) con un objetivo de 10x. El inciso a) muestra a las células control, en las cuales se observó que contienen más de un nucleolo, además de estar en contacto con las células a su alrededor y que su núcleo es simétrico. En el control de luz verde (inciso b)), se observaron células cuyas membranas fueron parcial o totalmente retraídas (flechas rojas), sin embargo, la cantidad de células con esta morfología fue menos del 10%.

c) RB 3 μ M



d) RB 5 μ M



e) RB 7 μ M

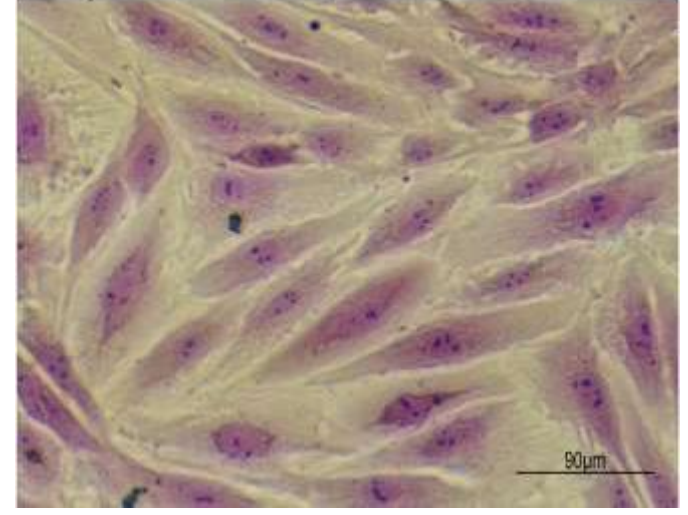
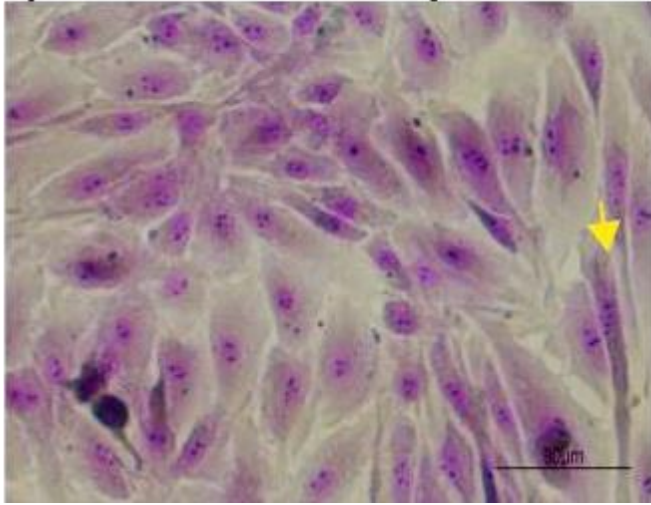
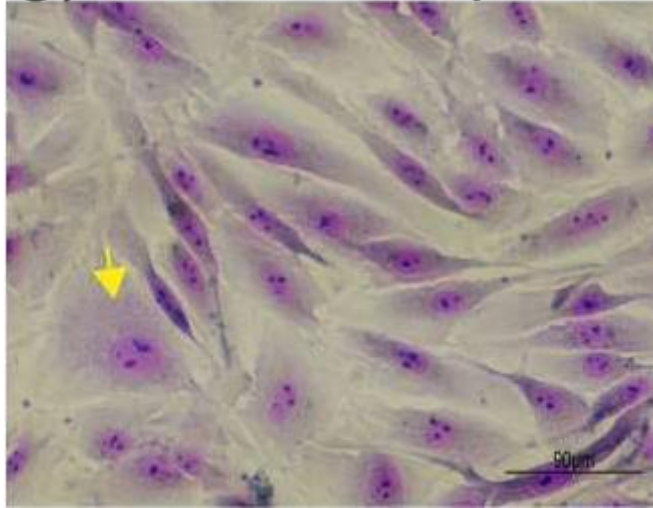


Fig. 4.11 Tinción de Giemsa con la línea celular MCF 10A tomadas con un objetivo de 10x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). En la figura 22 se muestra a el grupo control de fotosensibilizador con rosa de bengala (incisos c, d y e) de la línea MCF 10A no tumorigénica. Esta línea celular no mostró cambios significativos después de ser incubadas con fotosensibilizador rosa de bengala a diferentes concentraciones (3, 5 y 7 μ M).

f) TFD RB 3 μM



g) TFD RB 5 μM



h) TFD RB 7 μM

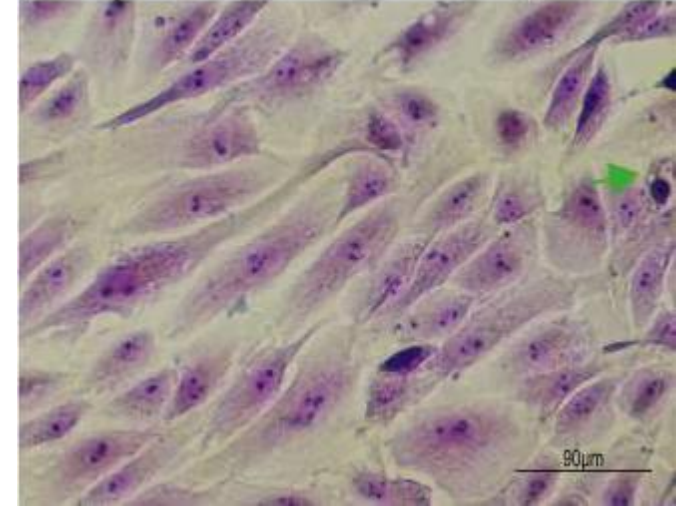


Fig. 4.12 Tinción de Giemsa con la línea celular MCF 10A tomadas con un objetivo de 10x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). Los incisos f, g y h, muestran las células tratadas con TFD a diferentes concentraciones de rosa de bengala (3, 5 y 7 μM respectivamente). En la primera concentración de fotosensibilizador (inciso f), podemos observar células que aumentaron su tamaño (flecha amarilla), y células cuyo núcleo perdió la simetría y se compactó (picnosis). En la segunda concentración (inciso g) pudimos ver cómo cambió la apariencia de la membrana en algunas células. Se observaron células que aumentaron su tamaño (flecha amarilla). En la última concentración (inciso h), las flechas verdes nos señalan células que perdieron la integridad de su membrana, característico de necrosis. Las imágenes de TFD con rosa de bengala no muestran cambios significativos respecto al control.

4.1.4. TFD con rosa de bengala y controles en la línea MCF 10A

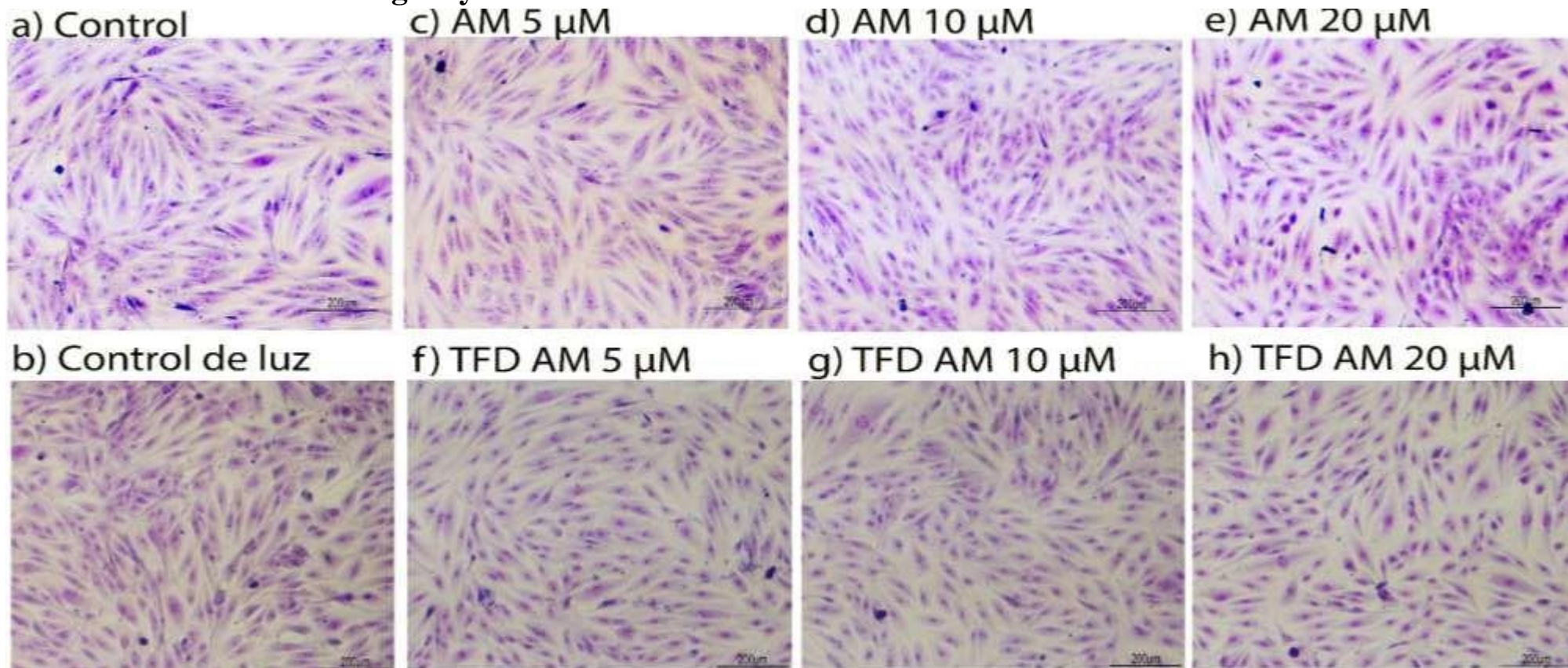
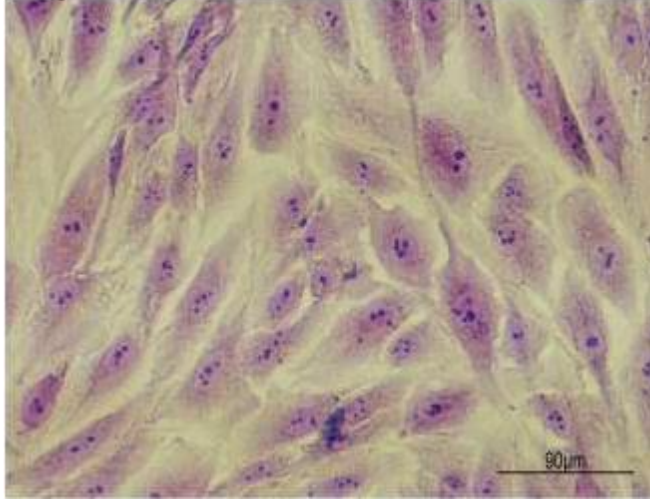


Fig. 4.13 Tinción de Giemsa con la línea celular MCF 10A tomadas con un objetivo de 5x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). En la imagen control (inciso a)), se pudo observar la monocapa celular con una confluencia de hasta el 90%. En el control de luz roja (inciso b)) se observó que hay un pequeño aumento en la confluencia celular. Para las diferentes concentraciones de fotosensibilizador (incisos c, d y e), se observó que la confluencia se asemejó a la del control. En las concentraciones de TFD (incisos f, g y h), no se vio ningún cambio en la confluencia celular.

a) Control



b) Control de luz

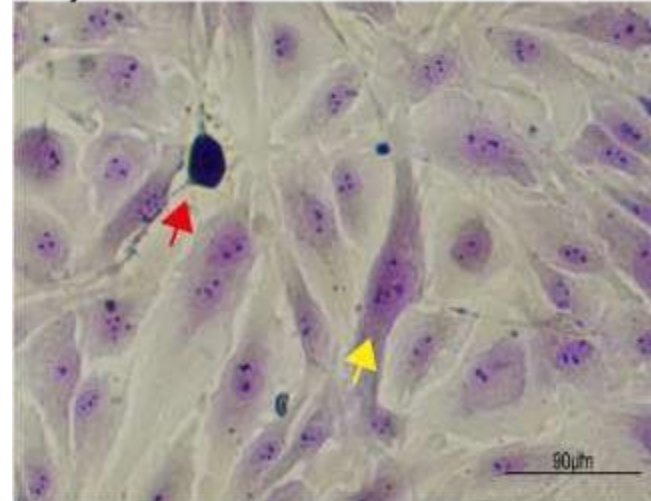
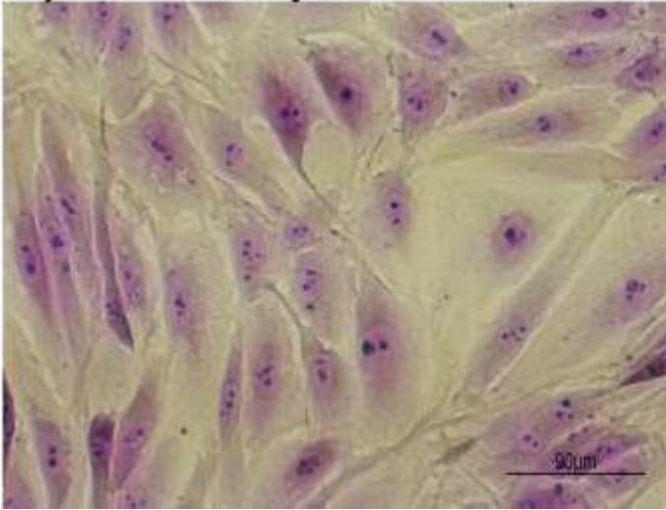
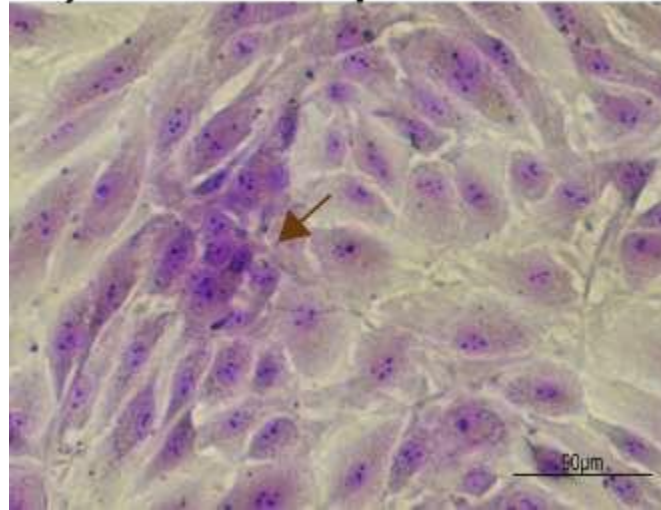


Fig. 4.14 Tinción de Giemsa con la línea celular MCF 10A tomadas con un objetivo de 10x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). Las células control sin tratamiento (inciso a)) mostraron una morfología característica de la línea celular. La imagen control de luz roja (inciso b)), mostró células con compactación (flecha roja), también se puede observar señaladas por flechas amarillas aquellas que tienen una mayor área.

c) AM 5 μM



d) AM 10 μM



e) AM 20 μM

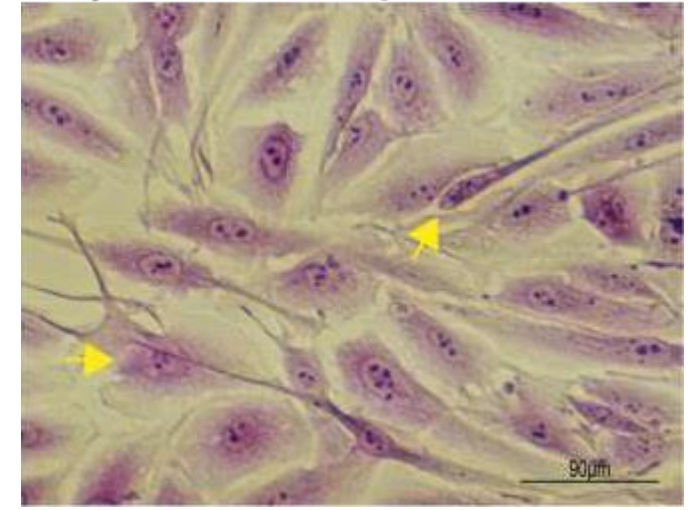
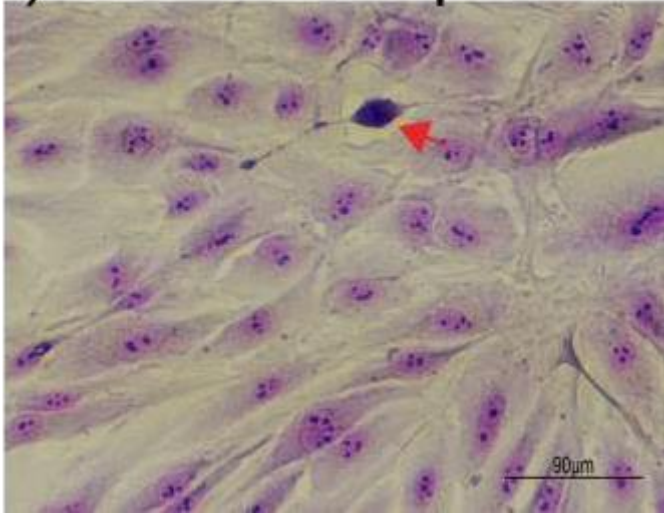
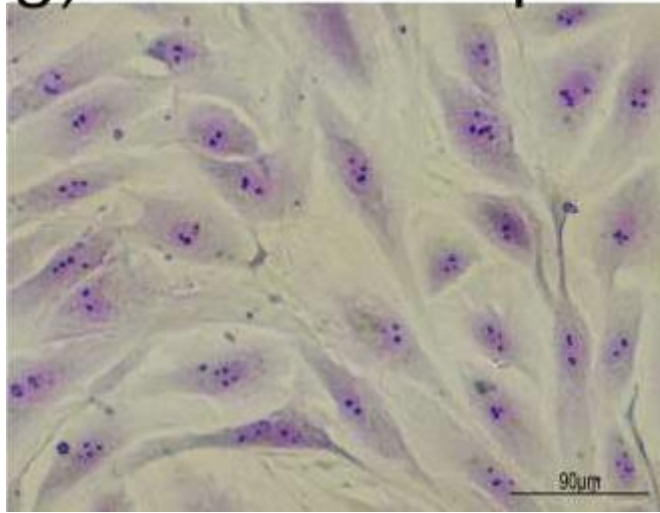


Fig. 4.15 Tinción de Giemsa con la línea celular MCF 10A tomadas con un objetivo de 10x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). En los incisos c, d y e se muestran los controles del fotosensibilizador azul de metileno (AM) a diferentes concentraciones 5, 10 y 20 μM , respectivamente. En el inciso c) no se observaron cambios en la morfología habitual y hubo una disminución de la confluencia respecto al control. En la segunda concentración (inciso d)), se observó un aumento en la confluencia respecto al control, la flecha café nos muestra que en medio del pozo hay un incremento significativo, cuya morfología no muestra anormalidades. En la última concentración (inciso e) de azul de metileno a 20 μM , se pudo observar (indicado por las flechas amarillas), células cuyas membranas sufrieron algún cambio y aumentaron su tamaño.

f) TFD AM 5 μM



g) TFD AM 10 μM



h) TFD AM 20 μM

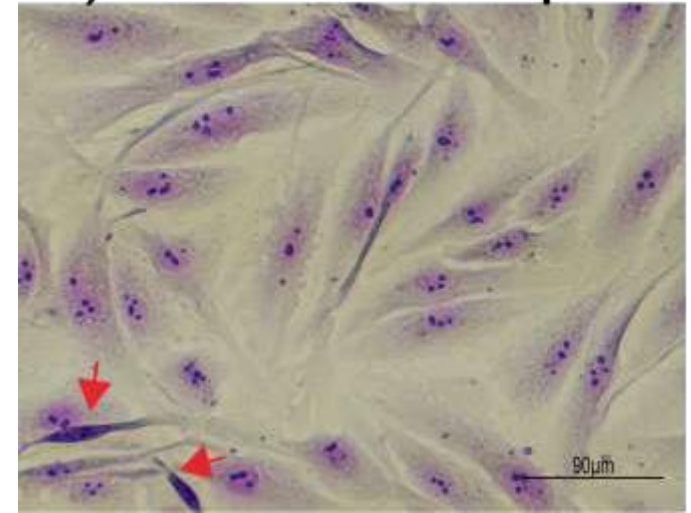


Fig. 4.16 Tinción de Giemsa con la línea celular MCF 10A tomadas con un objetivo de 10x en microscopio óptico (Olympus BH2-RFCA). Las concentraciones de TFD con azul de metileno (AM) (incisos f, g y h) mostraron una disminución de la confluencia, además de que no mostraron cambios significativos en su morfología con respecto al control. Las flechas rojas muestran células cuyas membranas se han compactado.

4.2. Núcleos de la línea MDA-MB-231

Se examinó el efecto de la TFD fotodinámica por medio de la tinción nuclear por Hoechst, la tinción fue débil, sin embargo, fue posible observar los cambios en el núcleo. Como es sabido, durante el proceso de apoptosis, se puede observar cambios en el núcleo celular como la fragmentación, característico de este tipo de muerte, debido a esto, se decidió hacer una tinción nuclear en la línea tumorigénica MDA-MB-231 y observar los cambios producidos por la TFD. Se colocaron flechas rojas para indicar células cuyo núcleo presentó el proceso de fragmentación. Las flechas amarillas indicaron los núcleos que redujeron su tamaño respecto al control, indicaron una picnosis o condensación nuclear.

4.2.1. Núcleos de la línea MDA-MB-231, TFD con azul de metileno y controles.

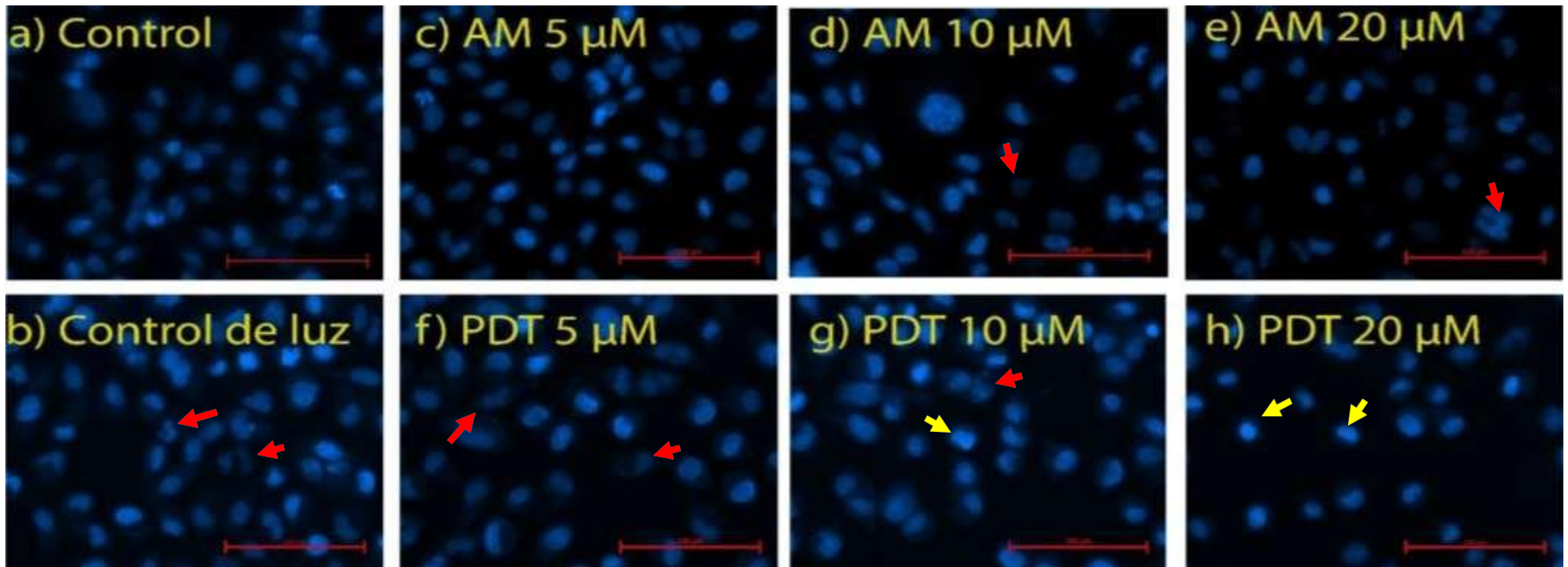


Fig. 4.17 Núcleos de la línea celular MDA-MB-213 tomadas a 40x con el microscopio de fluorescencia Zeiss. El inciso a muestra a las células control sin tratamiento. En el control de luz roja (inciso b), hubo un aumento en células con fragmentación y condensación de la cromatina, también fue posible visualizar algunos núcleos que están en mitosis. En los incisos c, d y e se muestran los controles del fotosensibilizador azul de metileno a diferentes concentraciones 5, 10 y 20 μM , respectivamente. En estas se observó que los núcleos conservaron su tamaño, también hay células en mitosis. Los incisos f, g y h muestran los núcleos de las células que fueron tratadas con TFD. En ellas se puede observar un aumento en los núcleos que presentan fragmentación y pincosis. Hubo una disminución en la confluencia y algunos núcleos tomaron forma de media luna, característico de apoptosis.

4.2.2. Núcleos de la línea MDA-MB-231, TFD con rosa de bengala y controles.

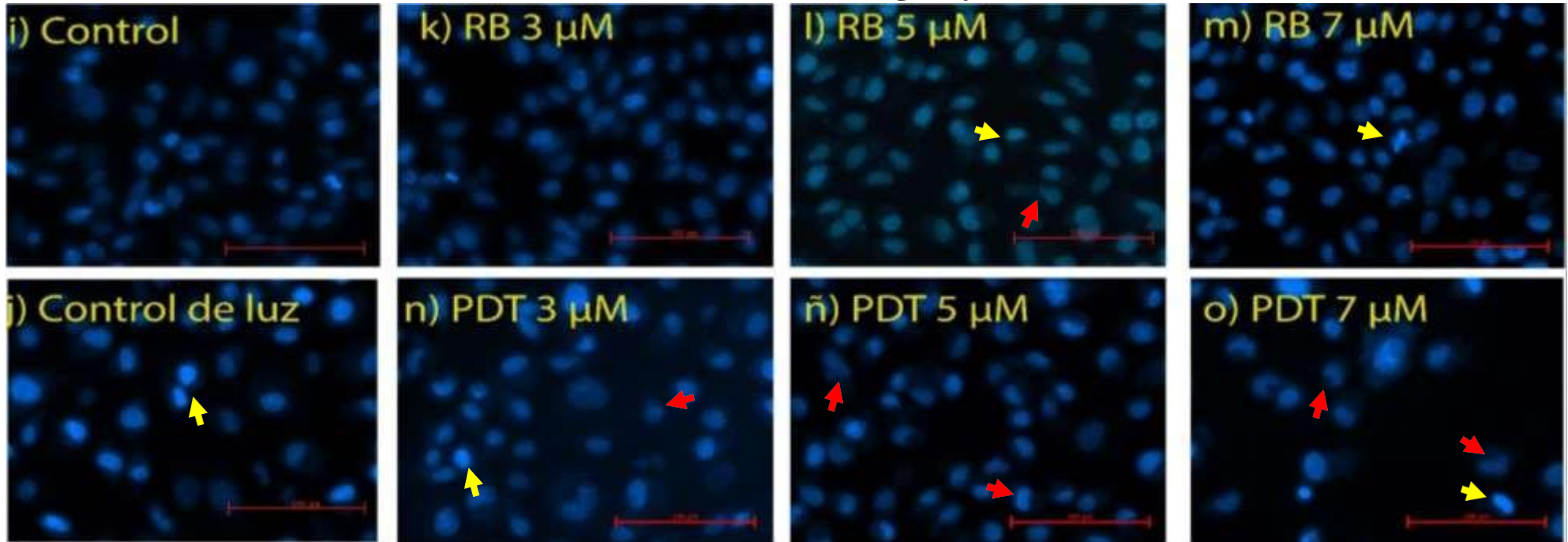
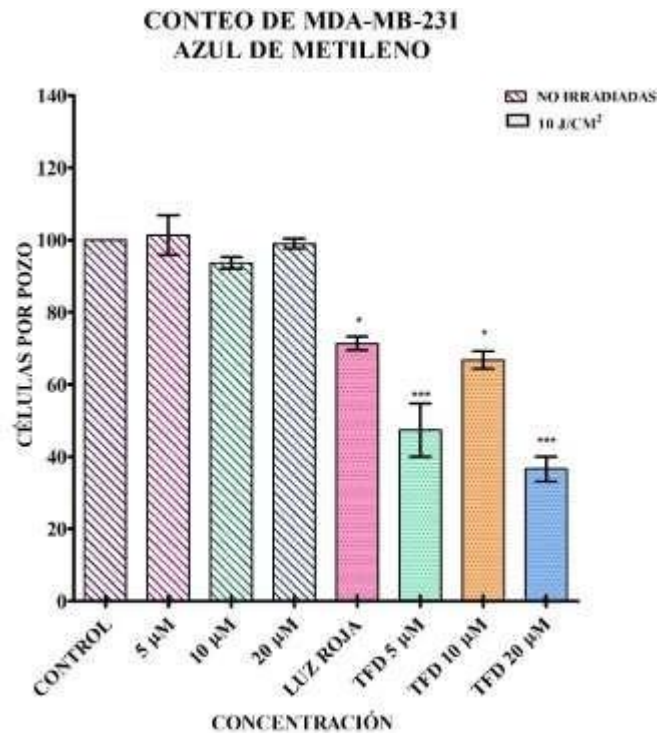


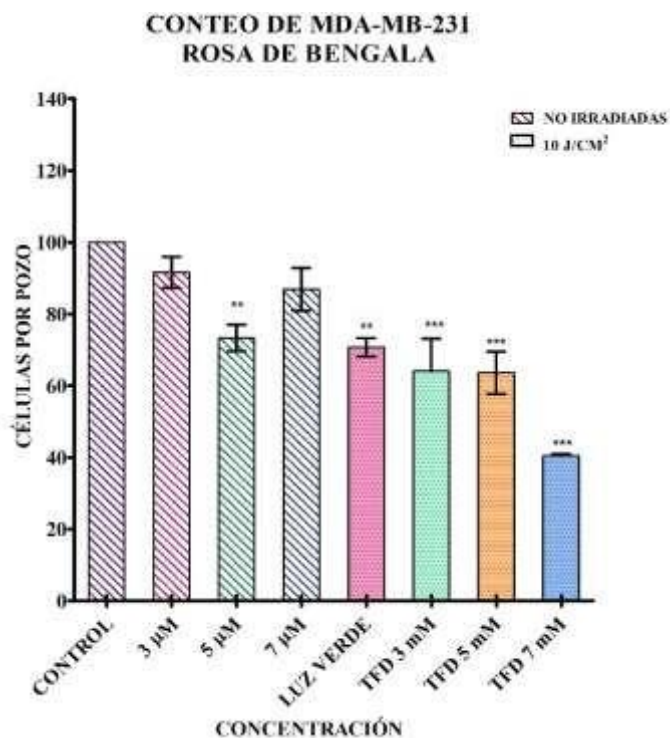
Fig 4.18 Núcleos de la línea celular MDA-MB-213 tomadas a 40x con el microscopio de fluorescencia Zeiss. El inciso a) muestra a las células control sin tratamiento. En el control de luz verde (inciso j)), se ven núcleos con picnosis y condensación de la cromatina. En los incisos k, l y m del control de fotosensibilizador rosa de bengala a diferentes concentraciones 3, 5 y 7 μM , respectivamente, se observó que no hubo cambios drásticos en la morfología de los núcleos respecto al control. Los incisos n, ñ y o muestran los núcleos de las células que fueron tratadas con TFD. En ellas se puede observar núcleos que presentan fragmentación y picnosis. La confluencia disminuyó drásticamente. En la imagen de mayor concentración, 7 μM (inciso o)) de TFD, pudimos apreciar, que la confluencia del pozo disminuyó hasta un 30%, y que los núcleos muestran disminución de su tamaño (picnosis) y aumento en la concentración de la cromatina, característico de apoptosis. El tiempo a las que fueron tomadas estas imágenes, no fue suficiente para visualizar fragmentación en la mayoría de las células tratadas.

4.2.3. Conteo celular de las imágenes de Hoechst por medio del programa Image J



Gráfica. 4.1 Conteo de células por pozo a través del análisis de imagen en Image J. células MDA-MB-213 con TFD azul de metileno, densidad de energía de 10 J/cm²

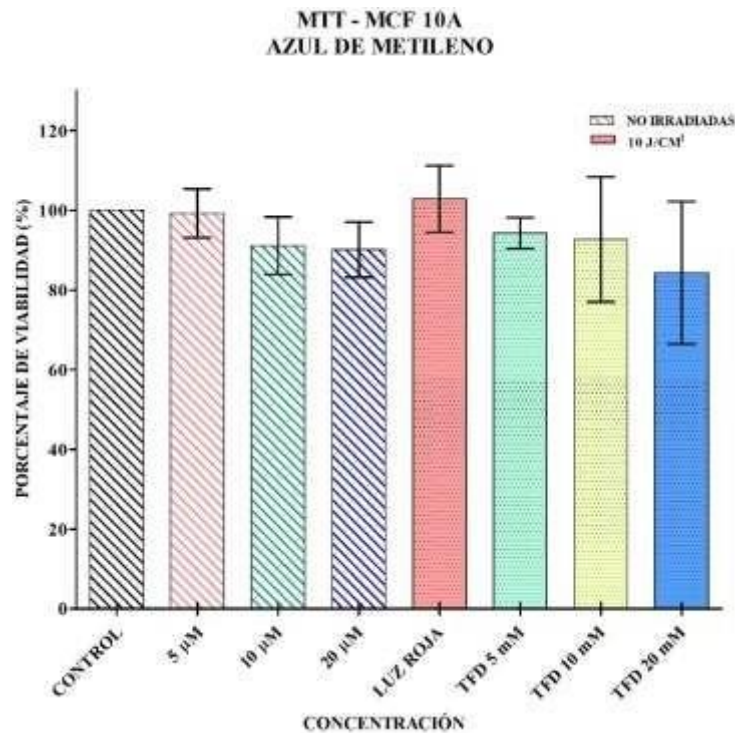
La grafica 4.2 muestra la cantidad de células adheridas al pozo (confluencia) después del tratamiento con TFD utilizando el fotosensibilizador azul de metileno. El control de luz roja (densidad de energía de 10 J/cm²) muestra un cambio significativo (*) en la confluencia sobre esta línea celular. Las dosis de fotosensibilizador 5,10 y 20 μM no muestran cambios estadísticamente significativos en la confluencia respecto al control. Las células tratadas con TFD muestran una pequeña disminución de la confluencia de hasta un 30% a la mayor concentración (20 μM, densidad de energía de 10 J/cm²) y una diferencia estadísticamente significativa (***) respecto al control.



Gráfica. 4.2 conteo de células por pozo a través de análisis de imagen en Image J. células MDA-MB-213 con TFD rosa de bengala, densidad de energía de 10 J/cm²

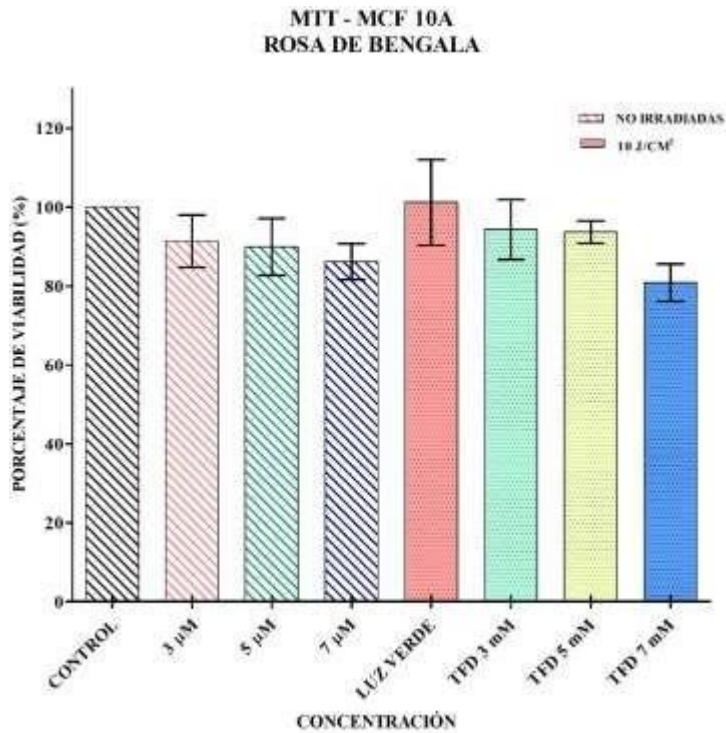
La grafica 4.2 muestra la cantidad de células adheridas al pozo (confluencia) después del tratamiento con TFD utilizando el fotosensibilizador rosa de bengala. El control de luz verde (densidad de energía de 10 J/cm²) muestra un cambio estadísticamente significativo (**) en la confluencia respecto al control sobre esta línea celular. Las dosis de fotosensibilizador 3 y 7 μM no muestran cambios estadísticamente significativos en la confluencia respecto al control, en contra parte, la concentración de 5 μM, si mostró un cambio estadísticamente significativo (**) respecto al control. Las células tratadas con TFD muestran una pequeña disminución de la confluencia de hasta un 40% a la mayor concentración (7 μM, densidad de energía de 10 J/cm²) y una diferencia estadísticamente significativa (***) respecto al control.

4.3. Viabilidad celular medida en la línea MCF 10A por medio de MTT



Gráfica. 4.3 Análisis de viabilidad por medio de MTT en la línea no tumorigénica MCF 10A. TFD con azul de metileno, densidad de energía de 10 J/cm².

Como se puede apreciar en la gráfica 4.3, la actividad mitocondrial de la línea celular MCF 10A no tumorigénica, no se ve afectada por las dosis 5, 10 y 20 µM del fotosensibilizador azul de metileno con respecto a las células control sin tratamiento. El control de luz roja (densidad de energía de 10 J/cm²) no muestra algún efecto significativo en la viabilidad sobre esta línea celular. Las células tratadas con TFD muestran una pequeña disminución de la viabilidad de hasta un 30% a la mayor concentración (20 µM, densidad de energía de 10 J/cm²). El análisis estadístico ANOVA, no muestra diferencia significativa entre las poblaciones.

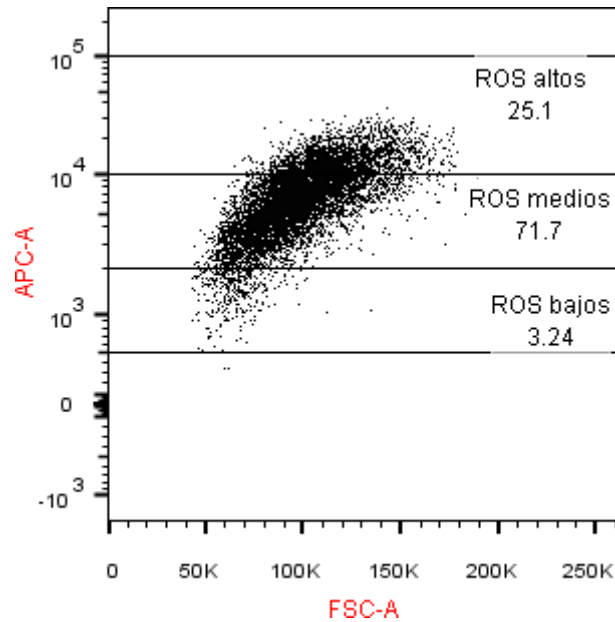


Gráfica. 4.4 análisis de viabilidad por medio de MTT en la línea no tumorigénica MCF 10A. TFD con rosa de bengala, densidad de energía de 10 J/cm².

En la gráfica 4, se puede observar que la actividad mitocondrial de la línea celular MCF 10A no tumorigénica, no disminuye con las dosis 3, 5 y 7 µM de rosa de bengala comparadas a las células control sin tratamiento. Existe un ligero aumento en las células irradiadas con luz verde (densidad de energía de 10 J/cm²), sin embargo, las células sometidas a TFD muestran una pequeña disminución de la viabilidad de hasta un 20% a la mayor concentración de fotosensibilizador (7 µM, densidad de energía de 10 J/cm²). El análisis estadístico ANOVA, no muestra diferencia significativa entre las poblaciones.

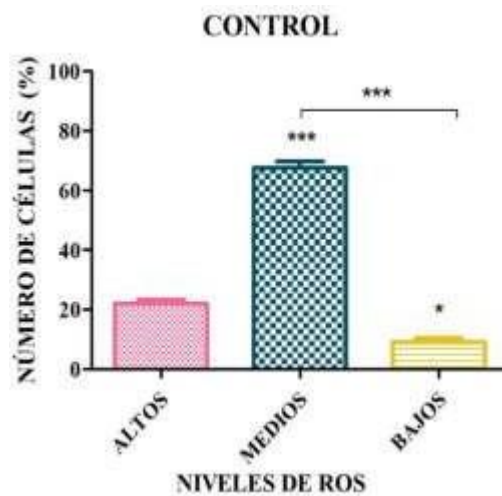
4.4. Medición de ROS generado por TFD

Las gráficas que se muestran a continuación se obtuvieron de las citometrías de flujo referentes a los niveles de ROS en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF 10A. En las gráficas de citometría de flujo se pudieron observar tres poblaciones que fueron definidas por la intensidad de fluorescencia de acuerdo con los niveles de ROS dentro de la célula (bajos, medios, altos) como se muestra en la gráfica 4.5.



Gráfica 4.5 Citometría de flujo para medir ROS en la línea MCF 10A resultados del control sin tratamiento. Se observan diferentes poblaciones definidas como ROS altos, medios y bajos, estos dependen de la intensidad de fluorescencia.

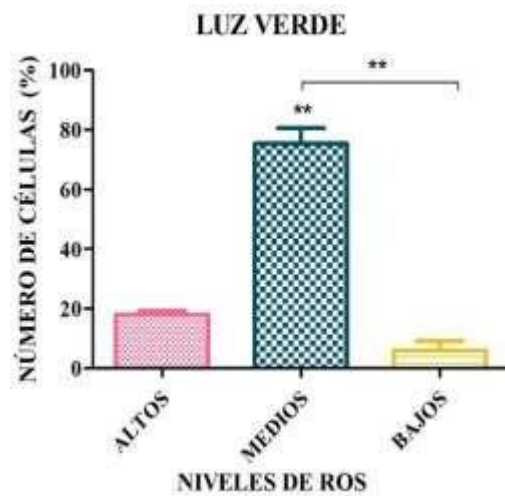
Se realizó un análisis estadístico para todas las concentraciones a continuación, se presentan las gráficas obtenidas:



Gráfica 4.6 Medición de ROS en la línea MCF 10A, es el control sin tratamiento, muestra los estados basales.

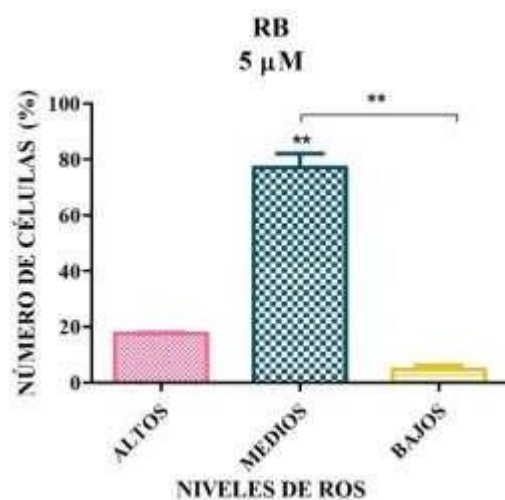
La gráfica 4.6, muestra los niveles de ROS en condiciones normales para la línea no tumorigénica MCF 10A, como podemos apreciar, las células expresaron niveles medios en su mayoría, se realizó el análisis estadístico para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas por las 3 poblaciones de la muestra, se confirmó la diferencia significativa (***) entre la población de niveles altos vs medios y entre los niveles

medios y bajos (***). Los niveles altos vs bajos, tuvieron una diferencia estadísticamente significativa menor (*).



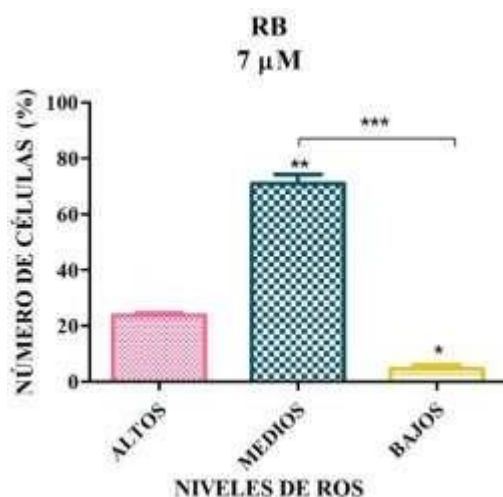
Gráfica 4.7 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra los niveles de ROS en células expuestas a luz verde.

La gráfica 4.7, mostró los niveles de ROS en la línea celular MCF 10A tratadas a una densidad de energía de a 10 J/cm^2 , en la cual se pudo observar con respecto al control el aumento en los niveles medios, una pequeña disminución en los niveles bajos y altos. El análisis estadístico demostró que solo los niveles medios tienen diferencia estadísticamente significativa con los niveles altos (**), los niveles bajos vs los niveles medios también tuvieron diferencia estadísticamente significativa (**).



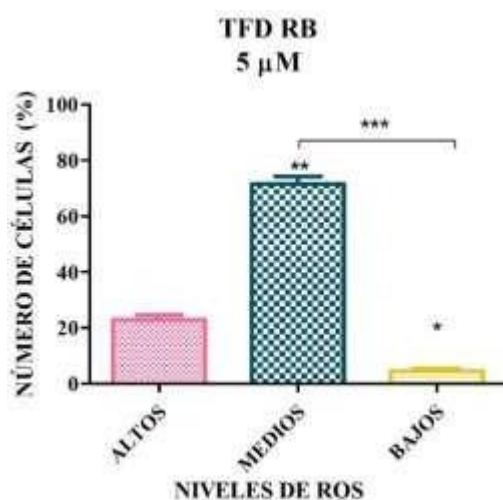
Gráfica 4.8 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra el control de fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a $5 \mu\text{M}$.

La gráfica 4.8, tratamiento de fotosensibilizador sin luz a 5 μM de rosa de bengala (RB), nos mostró que hay una pequeña disminución respecto al control en la cantidad de numero de células con niveles altos de ROS en la línea MCF 10A, como también hubo una disminución en los niveles bajos. Los niveles medios contra los niveles altos demostraron diferencia estadísticamente significativa de (**) y los niveles medios contra los bajos de (**)



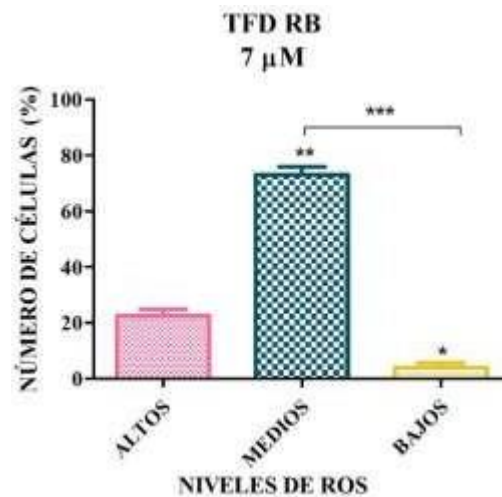
Gráfica 4.9 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra el control de fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 7 μM .

Gráfica número 4.9 de la línea no tumorigénica MCF 10 A, fue tratada con el fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 7 μM en condiciones oscuridad, mostró similitud en la población de nivel alto respecto al control, hubo un pequeño aumento en los niveles medios y una disminución en los niveles bajos. El análisis estadístico demostró que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles altos y medios de (**) y en los niveles altos contra bajos de (*), también mostró que hubo una diferencia estadísticamente significativa mayor entre la población de nivel medio y bajo (***).



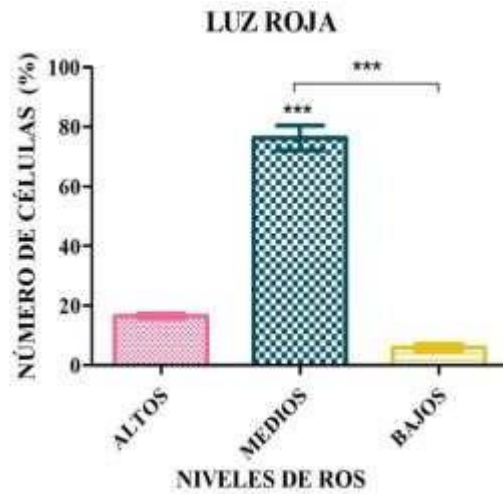
Gráfica 4.10 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra la TFD con fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 5 μM y luz verde

La gráfica 4.10, de la línea MCF 10A, tratada con el fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 5 μM , luz verde, densidad de energía 10 J/cm^2 , describió un comportamiento similar al control, con un ligero aumento en los niveles altos y una disminución en los niveles bajos. El análisis estadístico probó que, respecto a los niveles altos, las poblaciones de medios y bajos tuvieron diferencias estadísticamente significativas (**) y (*) respectivamente, mientras que entre los niveles medios y bajos las diferencias estadísticamente significativas fueron mayores (***).



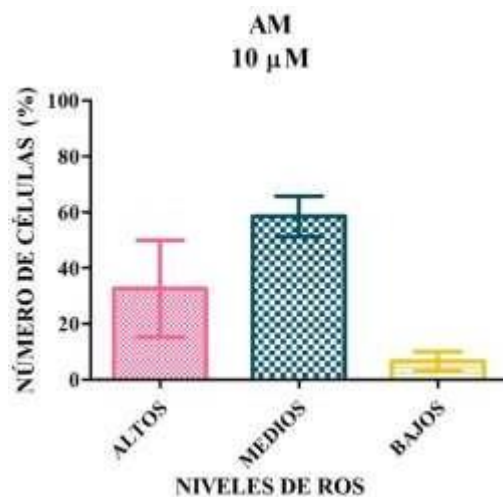
Gráfica 4.11 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra la TFD con fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 7 μM y luz verde.

En la gráfica 4.11 se pudo apreciar el comportamiento de las ROS en la línea MCF 10A, tratada con el fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 7 μM , luz verde, densidad de energía 10 J/cm^2 , fue posible observar que, respecto al control, hubo un aumento en los niveles altos y una disminución en los niveles bajos, también fue posible observar que el análisis estadístico muestra una diferencia estadísticamente significativa de (**) entre niveles altos y medios y de (*) entre niveles altos y bajos. Entre los niveles medios y bajos hubo diferencias estadísticas de (***).



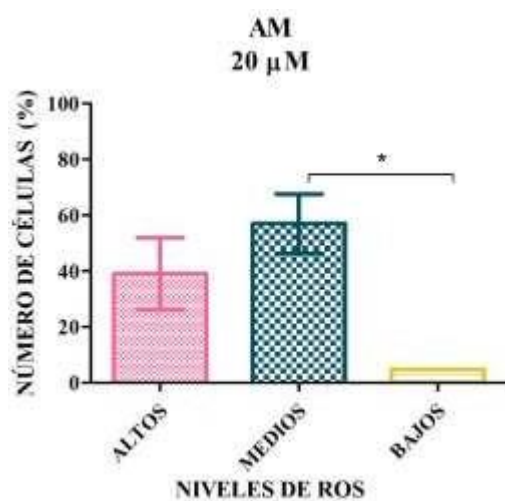
Gráfica 4.12 Medición de ROS en la línea MCF 10A, gráfica control de luz roja, densidad de energía de 10 J/cm².

La gráfica 4.12, muestra los niveles de ROS en la línea celular MCF 10A tratadas a una densidad de energía de 10 J/cm², luz roja, en la cual fue posible observar con respecto al control el aumento en los niveles medios y una pequeña disminución en los niveles bajos y altos. El análisis estadístico demostró diferencias estadísticamente significativas entre la población de altos y medios (***), mientras que, en la población de medios contra bajos, la diferencia fue de (***)



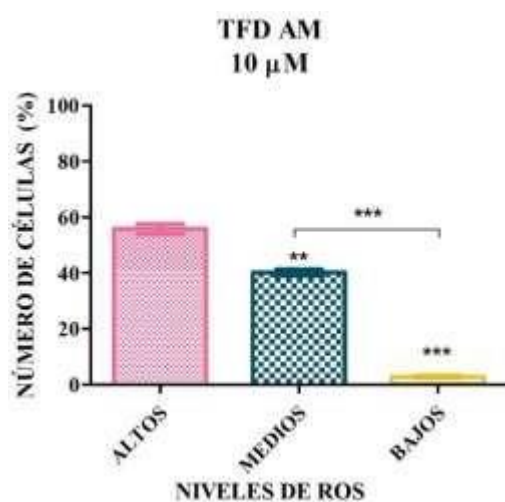
Gráfica 4.13 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra el control de fotosensibilizador azul de metileno (AM) a 10 μM

La gráfica 4.13, nos mostró los efectos del azul de metileno (AM) a una concentración de 10 μM en condiciones de obscuridad en la línea MCF 10A, hubo un aumento marcado en los niveles altos de ROS respecto al control, aumentando hasta un 30 %.



Gráfica 4.14 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra el control de fotosensibilizador azul de metileno (AM) a 20 μM .

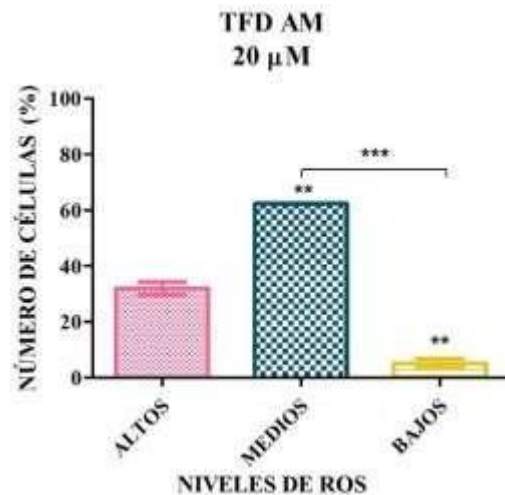
La gráfica 4.14, mostró los efectos del azul de metileno (AM) a una concentración de 20 μM en condiciones de obscuridad en la línea MCF 10A, el aumento en los niveles altos fue parecido a la gráfica 12, sin embargo, hubo una disminución en los niveles bajos. El análisis estadístico mostró que entre la población de medio y bajo hay una diferencia estadísticamente significativa de (*).



Gráfica 4.15 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra la TFD con fotosensibilizador azul de metileno (AM) a 10 μM y luz roja.

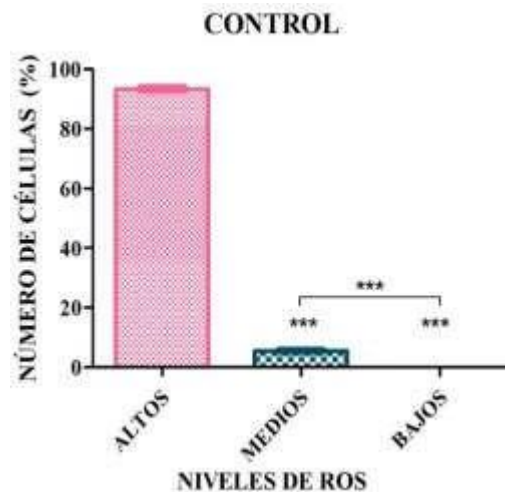
En la gráfica 4.15, de la línea MCF 10A, se observó un aumento drástico en los niveles altos respecto al control. El análisis estadístico mostró que entre la población de niveles altos

contra medios y bajos hubo diferencias estadísticamente significativas de (**) y (***) respectivamente. La población de medios contra bajos, fue (***).



Gráfica 4.16 Medición de ROS en la línea MCF 10A, muestra la TFD con fotosensibilizador azul de metileno (AM) a 20 μ M y luz roja

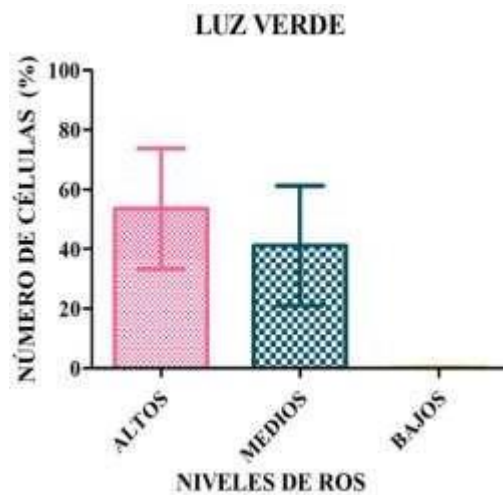
En la gráfica 4.16, de la línea MCF 10A, se observó un aumento drástico en los niveles altos respecto al control. El análisis estadístico mostró que ente la población de niveles altos contra medios y bajos hubo diferencias estadísticamente significativas de (**) y (***) respectivamente. La población de medios contra bajos fue de (***).



Gráfica 4.17 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, es el control sin tratamiento, muestra los estados basales.

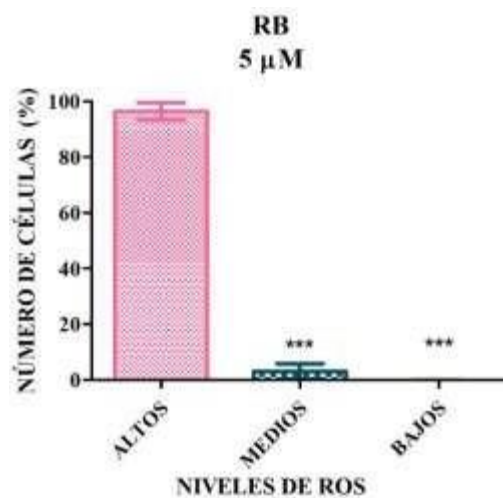
La gráfica 4.17, muestra los niveles de ROS en condiciones normales para la línea MDA-MB-231 triple negativo, en esta gráfica se pudo observar que los niveles altos de ROS predominan. El análisis estadístico ANOVA demostró que las poblaciones de niveles medios y bajos tienen una diferencia estadísticamente significativa (***) respecto a los niveles altos,

también mostró que, entre las poblaciones de niveles medios y bajos, también hay diferencias estadísticamente significativas (***)



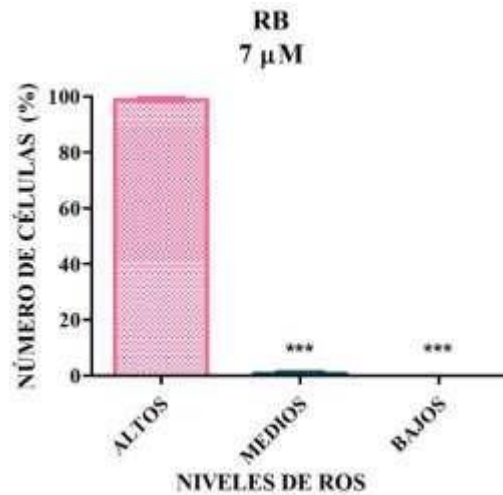
Gráfica 4.18 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra los niveles de ROS en células expuestas a luz verde.

En la gráfica 4.18 se pudo observar una disminución de los niveles altos respecto al control y la inexistencia de niveles bajos de ROS, en la línea MDA-MB-231. Los niveles medios aumentaron significativamente hasta un 60 %.



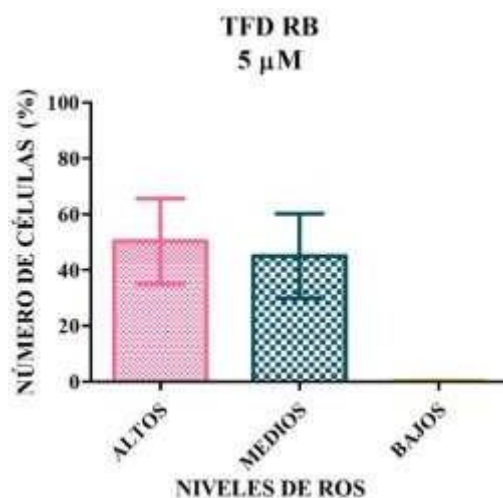
Gráfica 4.19 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra el control de fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 5 µM

En la gráfica 4.19, se observó que aumentan los niveles de especies reactivas de oxígeno en la población de altos, con la línea MDA-MB-231 y el tratamiento de fotosensibilizador sin luz a 5 µM de rosa de bengala (RB), hubo diferencias estadísticamente significativas de (***) entre los niveles altos contra los niveles medios y bajos



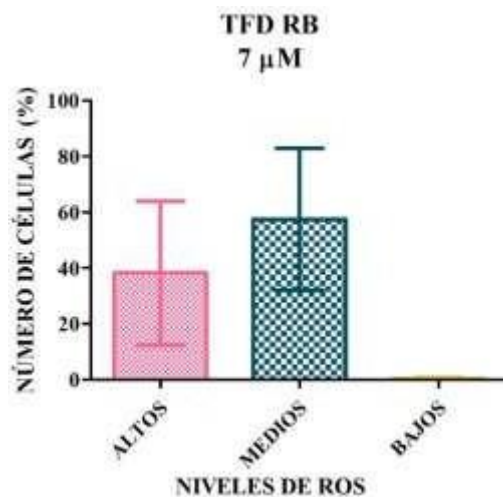
Gráfica 4.20 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra el control de fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 7 μM .

La gráfica 4.20, de la línea MDA-MB-231, tratada con el fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 7 μM en condiciones de oscuridad, mostró un incremento mínimo en los niveles altos de ROS respecto al control y una disminución muy drástica de los niveles medios y bajos. El análisis estadístico de ANOVA demostró que las poblaciones de niveles medios y bajos tuvieron una diferencia estadísticamente significativa (***) respecto a los niveles altos.



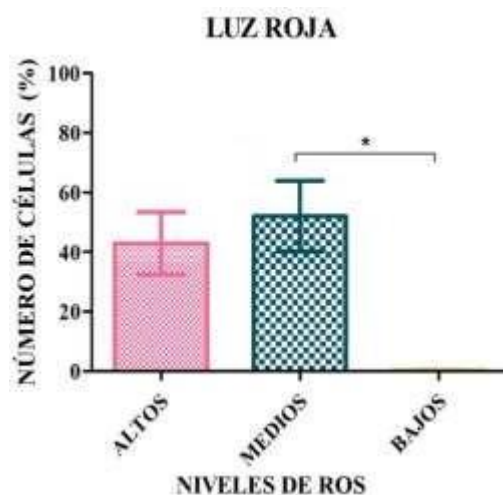
Gráfica 4.21 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra la TFD con fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 5 μM y luz verde

La gráfica 4.21, mostró el comportamiento de la línea MDA-MB-231 tratada con el fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 5 μM , luz verde, densidad de energía 10 J/cm^2 , fue posible observar que, respecto al control, hubo una disminución drástica de los niveles altos, aún mayores al control de luz y un aumento en los niveles medios, también fue posible observar que el análisis estadístico no mostró diferencias entre las poblaciones y que los niveles bajos son casi nulos.



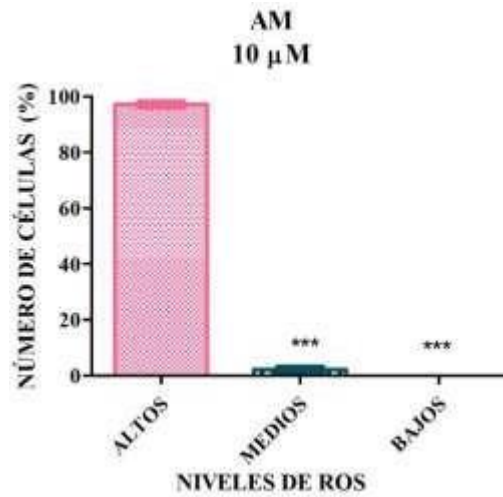
Gráfica 4.22 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra la TFD con fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 7 µM y luz verde

La gráfica 4.22, de la línea MDA-MB-231, tratada con el fotosensibilizador rosa de bengala (RB) a 7 µM, luz verde, densidad de energía 10 J/cm², mostró una disminución notable respecto al control en los niveles altos de ROS, además, de un incremento mayor que cualquier concentración en los niveles medios.



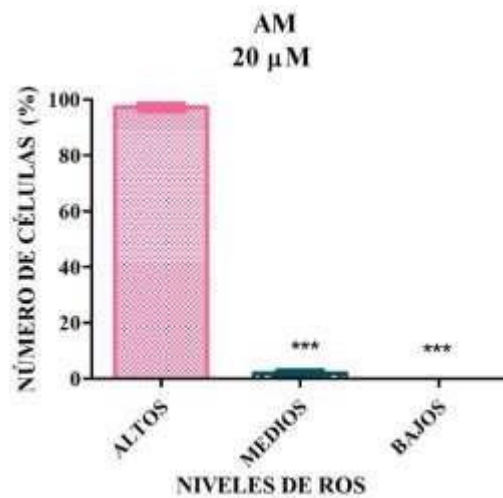
Gráfica 4.23 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, gráfica control de luz roja, densidad de energía de 10 J/cm²

La gráfica 4.23, mostró a la línea MDA-MB-231, tratada a una densidad de energía de 10 J/cm², luz roja. Respecto al control, hubo una disminución en los niveles altos bastante considerable y un aumento en los niveles medios. En comparación de los niveles medios contra los bajos, hubo una diferencia estadísticamente significativa de (*).



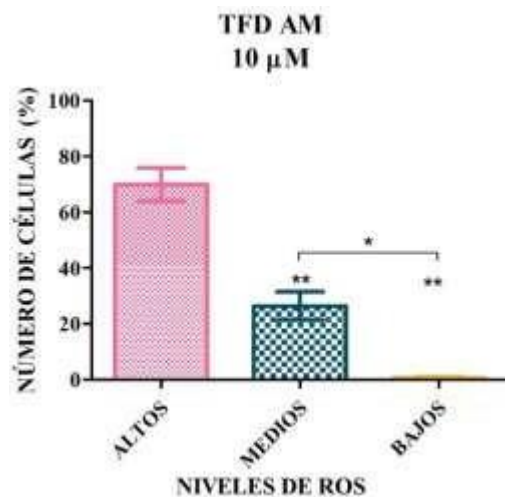
Gráfica 4.24 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra el control de fotosensibilizador azul de metileno (AM) a 10 µM.

La gráfica 4.24, de la línea MDA-MB-231 mostró similitudes con el control, presentó un aumento en los niveles altos, el análisis estadístico demostró que hay diferencias estadísticamente significativas de hasta (***) en las poblaciones de medios y bajos contra el control.



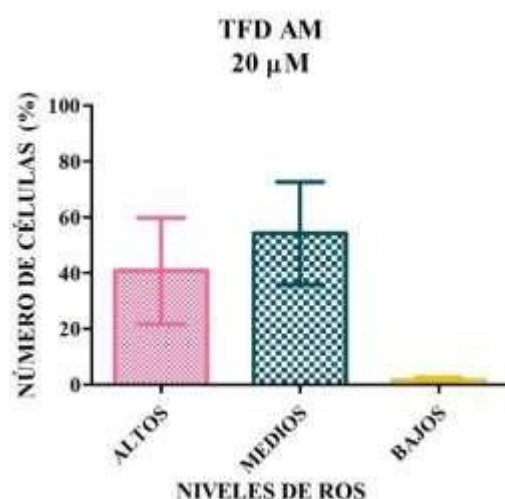
Gráfica 4.25 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra el control de fotosensibilizador azul de metileno (AM) a 20 µM.

La gráfica 4.25, de la línea MDA-MB-231 mostró similitudes con el control y la gráfica 20, por lo tanto, se notó un aumento en los niveles altos, el análisis estadístico demostró que hay diferencias estadísticamente significativas de hasta (***) en las poblaciones de medios y bajos contra el control.



Gráfica 4.26 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra la TFD con fotosensibilizador azul de metileno (AM) a 10 µM y luz roja.

La gráfica 4.26 de la línea MDA-MB-231 con TFD azul de metileno (AM) a 10 µM y luz roja, mostró una disminución en los niveles altos de ROS respecto al control.



Gráfica 4.27 Medición de ROS en la línea MDA-MB-231, muestra la TFD con fotosensibilizador azul de metileno (AM) a 20 µM y luz roja

La gráfica 4.27 de la línea MDA-MB-231 con TFD azul de metileno (AM) a 20 µM y luz roja, mostró una disminución en los niveles altos de ROS, respecto al control.

4.5. Resumen

En el capítulo anterior, se reúnen los principales resultados de la TFD aplicada.

Las imágenes de tinción de Giemsa para la línea MDA-MB-231 una hora después de la aplicación de la terapia muestran muerte celular por apoptosis. Mientras que la línea no tumorigénica no mostró daños. Ambas pruebas a la máxima concentración para los dos fotosensibilizadores.

Tras aplicar la TFD en la línea no tumorigénica, las gráficas de MTT mostraron una disminución de hasta un 20% con 7 μM de rosa de bengala y de hasta un 30%, con azul de metileno a 20 μM .

Las células MDA-MB-231 muestran niveles basales de ROS tan altos como un 95%. Mientras que la línea no tumorigénica muestra niveles altos de ROS tan solo de 20%.

La luz no aumentó los niveles de ROS, sino que disminuyó los niveles en ambas líneas celulares.

La muerte celular programada o apoptosis, está siempre relacionada con la integridad de la membrana celular, que es reflejada en la ordenada forma de expulsar sus componentes al exterior mediante cuerpos apoptóticos, su compactación en comparación a una célula normal y la fagocitosis.

Dos Santos (2017) tras su análisis molecular y morfológico de la línea de cáncer MDA-MB-231, menciona que la TFD con azul de metileno (20 μM y 1.5 μM , irradiadas a 4.5 J/cm^2), produce la muerte por autofagia. En nuestra investigación, hemos utilizado una dosis de luz mayor (10 J/cm^2), la cual ha demostrado no causar necrosis, ya que normalmente se esperaría que a dosis altas de TFD (fotosensibilizador y luz) se inactiven fotoquímicamente proteínas mitocondriales, que son las encargadas de la generación de energía y otros componentes de la cascada apoptótica (proteínas pro-apoptóticas), como también, el efecto directo sobre la membrana celular, causando su rompimiento.

Algunos otros autores también mencionan el uso del azul de metileno como fotosensibilizador *in vitro*. Los resultados de Yongjun chen (2008), demuestran que el azul de metileno utilizado como fotosensibilizador (20 μM) en la línea celular B16-F1 (melanoma de rata) provoca apoptosis. Se reporta que el daño mitocondrial durante el tratamiento provoca una apoptosis intrínseca dada la actividad de las caspasas 3 y 9 directamente.

Barbra B. (1998), menciona la afinidad del fotosensibilizador derivado de azul de metileno (DAM) por acumularse en la mitocondria, y de dos vías por las que la TFD - DAM pueda estar causando muerte apoptótica, la primera vía que propone este artículo, es que la TFD-DAM actúa directamente sobre la mitocondria dañando el mecanismo de glucólisis, la segunda vía es el daño sobre el mecanismo de respiración oxidativa, estas vías se activan dependiendo de la dosis de fotosensibilizador. Si colocaban una concentración de DAM mayor a 0.05 mg/ml y lo irradiaba, el mecanismo que dañaba era el de la glucólisis, entonces las células presentaron apoptosis entre 3 y 6 horas después de la aplicación de la TFD, en cambio, si colocaba 0.05 mg/ml y lo irradiaba, la fosforilación oxidativa se veía afectada, provocando una apoptosis tardía en las células (fibroblastos de hámster), la activación de las dos vías causó la muerte por necrosis; nosotros a una dosis de 20 μM y 10 J/cm^2 , observamos células apoptóticas a 1 h después de la aplicación, lo que nos indicaría

un daño en el mecanismo de la glucólisis, según los mecanismos propuestos por Barbra B. (1998).

Las imágenes tomadas de las células teñidas con Giemsa que se realizaron en este trabajo, demostraron que la toxicidad y la disminución de la confluencia provocada solo por el azul de metileno fue menor en comparación con las provocadas por la TFD completa, donde, a la mayor concentración de TFD con azul de metileno empleado (20 μM), pudimos observar un encogimiento de la membrana plasmática sin rompimiento y cuerpos apoptóticos, indicando la presencia de apoptosis, las imágenes de las células con tinción de Hoechst, también mostraron fragmentación y condensación nuclear, sin embargo, hay algunas células que mostraron en estos dos experimentos, una membrana comprometida, así como núcleos con patrones de oncosis y cariólisis lo que nos hace alusión a muerte celular a través de necrosis, por lo tanto estamos de acuerdo con los mecanismos propuestos por Barbra B. (1998) y Yongjun chen (2008), dado que la TFD con azul de metileno daña directamente la mitocondria provocando una muerte apoptótica, sin embargo también puede resultar en necrosis, como es reportado en los trabajos ya descritos.

El efecto del rosa de bengala utilizado como fotosensibilizador en la línea celular MDA-MB-231 a una concentración de 7 μM , mostró muerte celular por apoptosis, tal y como lo describe Zhuang (1998) quien trabajó con leucemia promielocítica de humano (HL-60) a 30 mW/cm^2 y 3 μM de rosa de bengala, donde propone al receptor FAS implicado en la vía de señalización apoptótica extrínseca, como el principal blanco de la TFD con rosa de bengala. Dado la composición química del fotosensibilizador y su incapacidad de penetrar la membrana celular, la mayor cantidad de oxígeno singulete es generado en el medio extra celular. El autor nos menciona que por medio del daño con oxígeno singulete, este receptor se activa e interacciona directamente con la caspasa 8, la cual activará cascada abajo a la caspasa 3,6 y 7 activando la vía extrínseca de la apoptosis. Dado que el rosa de bengala como fotosensibilizador en la TFD no había sido probado en una línea celular humana triple negativo de cáncer de mama, proponemos que, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, la TFD con rosa de bengala, podría actuar como en el caso reportado por Zhuang, desde fuera de la membrana celular de la línea MDA-MB-231 provocando muerte por apoptosis, cuyos resultados son visibles a 1 h después de la terapia y es una apoptosis temprana.

En cuanto a los resultados obtenidos por las tinciones de Giemsa de la línea MDA-MB-231, la TFD con azul de metileno (20 μM) resultó más eficiente comparada con la TFD con rosa de bengala (7 μM), ya que provocó una apoptosis mucho más avanzada tan solo a una hora después de la terapia, esto también fue posible verse en el conteo de células adheridas a la

superficie, donde la TFD con azul de metileno tuvo una disminución sobre la confluencia celular mayor que la provocada por el rosa de bengala. La TFD con rosa de bengala produjo células apoptóticas en menor medida, se propone que a una mayor dosis de fotosensibilizador pueda aumentar el daño. Fue posible ver una apoptosis mucho más temprana, sin embargo, el rosa de bengala sin luz, resultó ser menos tóxico, puesto que no hubo cambios morfológicos en comparación con los controles de azul de metileno sin luz.

En cuanto al efecto tóxico infligido por las dos TFD descritas en este trabajo, la línea no tumorigénica MCF 10A, medido por el ensayo de reducción de MTT a las 24 h, no mostró cambios significativos en la actividad del succinato deshidrogenasa mitocondrial para la formación de formazán (prueba de MTT) con ninguna de las dos TFD aplicadas. De acuerdo con los resultados obtenidos con las células sometidas a TFD con azul de metileno, existe una pequeña disminución de la viabilidad de hasta un 30% a la mayor concentración (20 μ M), esto mucho menor a los provocados en la línea celular tumorigénica MDA-MB-231 dado el ensayo de MTT reportado por Atenco (2018), donde menciona que la viabilidad por la TFD con azul de metileno (20 μ M) reduce la actividad del succinato deshidrogenasa hasta un 82%. Dos Santos (2018), menciona que la línea no tumorigénica MCF 10A es menos sensible a la TFD con azul de metileno, pues tiene una disminución de la viabilidad de hasta un 52.2% en comparación con la MDA-MB-231 que llega a un 98%, esto concuerda con nuestros resultados ya que también nosotros confirmamos que las células tumorigénicas MDA-MB-231 tienen una mayor respuesta a la TFD con azul de metileno que la línea normal (MCF 10A). La TFD con rosa de bengala, también muestra esta preferencia hacía la línea celular tumorigénica MDA-MB-231, dado el ensayo de viabilidad (MTT) realizado en este trabajo, donde se demostró que existe una pequeña disminución de la viabilidad de hasta un 20% a la mayor concentración (7 μ M), comparado con el trabajo de Atenco (2018), cuyo ensayo de MTT para la línea MDA-MB-231, muestra una disminución de la viabilidad con la TFD con rosa de bengala (7 μ M) hasta un 65%, esta preferencia del fotosensibilizador rosa de bengala hacía las líneas tumorigénicas, no ha sido reportado con anterioridad.

Moloney (2017), menciona que las líneas celulares de cáncer, producen altos niveles de antioxidantes (SOD2/MnSOD) para su supervivencia, el estudio presentado en esta tesis de medición de ROS, demostró que en comparación con la línea no tumorigénica, la MDA-MB-231 triple negativo, en su estado basal, genera ROS en niveles altos, de hasta un 95% de acuerdo a la medición de fluorescencia por citometría de flujo de H₂O₂ y OH⁻, podemos afirmar que las células MDA-MB-231 producen altos niveles de ROS, esto está relacionado con su alta capacidad mutagénica de acuerdo el trabajo reportado por Jezierska-Drutel (2014), en consecuencia, las terapias anticancerígenas que utilizan ROS

como blanco de acción, deben ser capaces de elevar los niveles de estas células más allá de los basales, esto es difícil de obtener dado el alto porcentaje basal que poseen, por lo tanto, se realizó el estudio de los niveles de ROS y se compararon los resultados entre la línea tumorigénica y no tumorigénica, y se observó, que el rosa de bengala sin luz, aumenta los niveles de ROS hasta un 1% en la línea no tumorigénica respecto al control (20 %), sin embargo, en la línea de cáncer, aumenta hasta un 4% en comparación con los niveles basales (95%). Esto quiere decir que el fotosensibilizador por sí solo, si genera un estrés oxidativo, sin embargo, al analizar los efectos morfológicos ocasionados a través de las imágenes de Giemsa, no hay daños visibles al microscopio en ninguna de las dos líneas, por lo tanto, el estrés oxidativo ocasionado por el puro fotosensibilizador no es relevante. El fotosensibilizador azul de metileno sin luz, produjo un aumento en las dos líneas celulares sobre los niveles altos de ROS, la no tumorigénica aumentó hasta un 18% respecto al control (20%), en la tumorigénica aumentó un 3% respecto al control (95%), sin embargo, la línea no tumorigénica no mostró cambios en las imágenes de tinción con Giemsa, mientras que, en la línea celular de cáncer, las ROS producidas con el fotosensibilizador podrían estar influyendo en algún mecanismo de proliferación dado los resultados de las imágenes de Giemsa donde se mostró una confluencia mayor (de hasta un 90%), por ende, se puede suponer que los fotosensibilizadores por sí solos no generan suficiente estrés oxidativo para dañar a las células MDA-MB-231 y que en el caso del azul de metileno, este estrés puede estar activando vías de señalización de proliferación, ya que, según Jezierska-Drutel (2014), las ROS en cáncer pueden ser señalizadores para este tipo de células.

En la línea tumorigénica, el control de luz roja redujo los niveles de ROS altos hasta llegar a un 53% en comparación con el estado basal (95%) y el control de luz verde redujo los niveles altos hasta llegar a un 40% en comparación con el estado basal (95%), esto puede deberse a un aumento de antioxidantes que regulen las ROS como lo menciona Moloney (2017), que permitan a la célula tumoral una disminución de ROS que puedan ser tóxicos para ella y mantener el equilibrio oxidativo.

En la línea no tumorigénica, los niveles altos de ROS se mantuvieron, esto puede deberse a que el estrés generado por la luz no sea suficiente para causarle un daño, esto también corresponde a los mecanismos que tienen las células sanas al responder al estrés oxidativo. Por lo tanto, asumimos, que la luz roja y verde, causan un daño mínimo en la línea tumorigénica, pero no en la no tumorigénica tal y como demuestran los resultados en las imágenes de Giemsa.

La TFD a una dosis de 7 μM con rosa de bengala y la TFD con azul de metileno a una dosis de 20 μM , sobre la línea de cáncer de mama MDA-MB-231, provocaron una disminución en los niveles altos de ROS hasta llegar a un 40% en comparación con el estado basal (95%), esto podría ser a causa de un aumento de antioxidantes dentro de la célula provocado para mantener la estabilidad de la célula, como lo menciona Moloney (2017). Es importante mencionar que dicha TFD con azul de metileno o rosa de bengala, no está aumentando los ROS (peróxido de hidrogeno e hidroxilo) que representan el mecanismo tipo I conocido en la activación fotodinámica, por lo que pensamos que el mecanismo fotodinámico que está provocando los efectos y la muerte celular detectados en éste trabajo no se deben al mecanismo tipo I, sino posiblemente al mecanismo tipo II, que involucra la producción de oxígeno molecular singulete en lugar de ROS, dado al tiempo requerido en este trabajo no se realizaron las pruebas confirmatorias para la detección de oxígeno molecular singulete, sin embargo, se plantea como trabajo futuro.

Una característica importante en esta TFD es el de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete para cada fotosensibilizador, dado que el coeficiente del rosa de bengala (0.76) es superior al del azul de metileno (0.52) según Robert W. Redmond (1999) se puede concluir que las dosis aplicadas a la TFD con rosa de bengala (3,5 y 7 μM) sean menores que las usadas para la TFD con azul de metileno (5, 10 y 20 μM) y así obtener el efecto deseado, sin embargo, creemos que es posible mejorar la efectividad (mayor cantidad de muerte) de la TFD con rosa de bengala aumentando la dosis sin llegar a niveles tóxicos y que nos permita obtener una muerte apoptótica.

Este trabajo abre una línea de investigación sobre los efectos de la TFD en la línea triple negativo de cáncer de mama, como un tratamiento prometedor dado los resultados obtenidos en esta tesis. Dado los pocos avances que existen sobre la TFD en este modelo de estudio, es necesario realizar más experimentos para demostrar con mayor congruencia la efectividad de la TFD (*in vivo*). No fue posible encontrar un trabajo idéntico al reportado en esta tesis. Es importante recalcar que la terapia es mínimamente invasiva y dado los resultados obtenidos en esta tesis, se encontró que la TFD también es selectiva, además de provocar muerte por apoptosis, lo cual nos indica que los efectos de la terapia no son agresivos, más bien que inducen a la célula a una muerte regulada capaz de generar más estímulos para la activación del sistema inmune.

5.1. Resumen

En este capítulo se comparan diferentes trabajos relacionados con los resultados obtenidos en la tesis. En este capítulo se comparan diferentes trabajos relacionados con los resultados obtenidos en la tesis.

De acuerdo con diversos autores, se propone que la TFD con rosa de bengala genera apoptosis por la activación de un ligando de muerte que se encuentra en la membrana celular, ya que el rosa de bengala no penetra dentro de la célula. La TFD con azul de metileno podría tener varios mecanismos implicados en la activación de apoptosis, pues su blanco principal son las mitocondrias. El daño generado por la TFD con azul de metileno depende de la dosis del colorante, pues también puede causar necrosis (pero en menor cantidad). La TFD con azul de metileno y la TFD con rosa de bengala dañan mínimamente a la línea no tumorigénica. Este efecto no había sido reportado para la TFD con rosa de bengala. Los niveles de ROS generados por la línea de cáncer son extremadamente altos comparados con una línea no tumorigénica. Es importante mencionar que la TFD con azul de metileno o rosa de bengala, no está aumentando los ROS (peróxido de hidrógeno e hidroxilo) por lo que pensamos que el mecanismo fotodinámico que provoca la muerte celular es el tipo II que involucra la producción de oxígeno molecular singlete en lugar de ROS.

Conclusiones y trabajo a futuro

- La TFD con azul de metileno (20 μM) y la TFD con rosa de bengala (7 μM), mostraron patrones apoptóticos en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, dado los cambios morfológicos analizados después de 1 hora de la aplicación de la terapia.
- La línea no tumorigénica no mostró daños morfológicos con la TFD aún en la más alta concentración de fotosensibilizador, con rosa de bengala (7 μM) o con azul de metileno (20 μM), analizados después de 1h de la aplicación de la terapia.
- En la actividad mitocondrial medida por el ensayo de MTT después de 24 h. de la aplicación de la TFD, la disminución de la viabilidad celular fue de hasta un 20% a la mayor concentración (7 μM) y con azul de metileno (20 μM) de hasta un 30%, en la línea no tumorigénica.
- Las células MDA-MB-231 producen niveles altos de ROS de hasta un 95%, la no tumorigénica mostró niveles de ROS de apenas el 20%.
- Se confirmó que el nivel de daño o muerte celular provocado por ambos fotosensibilizadores en la TFD no tuvo relación con el incremento de ROS, especialmente en la línea celular MDA-MB-231, ya que esta contiene naturalmente concentraciones elevadas de estas moléculas, por lo que se descarta que el daño celular se deba a la activación fotodinámica tipo I (producción de ROS).
- La TFD a una dosis de 7 μM con rosa de bengala y la TFD con azul de metileno a una dosis de 20 μM sobre la línea de cáncer de mama MDA-MB-231, provocaron una disminución en los niveles altos de ROS hasta llegar a un 40% en comparación con el estado basal (95%).
- Para la línea celular MCF 10A, la TFD con azul de metileno provocó un aumento del 15% respecto al estado basal (20%). Para la TFD con rosa de bengala los niveles de ROS se mantuvieron en un 20%.
- La luz roja y verde generó un estrés oxidativo que disminuyó los niveles de ROS en la línea tumorigénica MDA-MB-231, sin embargo, esta disminución no provocó su muerte. Además, la luz en la línea celular no tumorigénica (MCF 10A), no generaron un aumento en los niveles de ROS.
- La cantidad de muerte observada en la línea MDA-MB-231 fue muy alta, en comparación con la no tumorigénica (MCF 10A) donde no se observaron cambios, por lo tanto, la

terapia fue muy selectiva y efectiva.

- El tipo de muerte observado es apoptosis, así la terapia podría ser categorizada con una respuesta de muerte controlada.

6.1. Propuestas de trabajo a futuro

- Cuantificar los niveles de antioxidantes intra celulares y factores de transcripción sobre las líneas celulares MDA-MB-231 Y MCF 10A para observar la interacción de estas moléculas y su papel en la resistencia a la TFD.
- Cuantificar la generación de oxígeno singulete después de la aplicación de la TFD con azul de metileno y la TFD con rosa de bengala en las líneas celulares MDA-MB-231 Y MCF 10A para confirmar la activación fotodinámica tipo II.
- Determinar la actividad de las caspasas 8, 9 y 3 después de la aplicación de la TFD con azul de metileno y la TFD con rosa de bengala para verificar las vías apoptóticas antes mencionadas.
- Estudiar la activación o desactivación de genes implicados en la proliferación y migración celular después de la aplicación de la TFD en la línea MDA-MB-231.
- Estudiar células troncales de cáncer de mama después de la aplicación de la TFD con azul de metileno y la TFD con rosa de bengala para observar el efecto en este tipo de células.
- Realizar pruebas in vivo utilizando un modelo murino para implementar la TFD en el tratamiento de tumores ocasionados por las células tumorigénica MDA-MB-231.
- Estudiar los efectos inmunológicos en el modelo murino después de la aplicación de la TFD.
- Investigar la razón de la disminución de las ROS en células con concentraciones naturalmente altas, al aplicar la TFD.

L. Jiménez, H. Merchant (2003). *Biología celular y molecular*. Edo. de México: Pearson Educación de México, S.A. de C.V.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25, 486–541

Biología. H. Curtis, S. Barnes, A Schnek, A. Massarini (2008) 7ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

Angosto, M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, (1), 36–64.

Escobar, Ma. L., Echeverría, O. M., & Vázquez-Nin, G. H. (2015). Necrosis as Programmed Cell Death. *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*.

Herrmann, M., Lorenz, H. M., Voll, R., Grünke, M., Woith, W., & Kalden, J. R. (1994). A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Research*, 22(24), 5506.

Eva Ramón Gallegos. (2015). *Terapia fotodinámica: teoría y práctica*. México, DF: Instituto Politécnico Nacional.

Kessel, D. (2012). Subcellular Targets for Photodynamic Therapy: Implications for Initiation of Apoptosis and Autophagy. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 10(0 2), S56.

Kiesslich, T., Tortik, N., Pichler, M., Neureiter, D., & Plaetzer, K. (2013). Apoptosis in cancer cells induced by photodynamic treatment – a methodological approach. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 17(03), 197–209

San-Miguel, A., & Martin-Gil, F. J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3).

Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16), 2891–2906.

Lu, B., Chen, X. B., Ying, M. D., He, Q. J., Cao, J., & Yang, B. (2018). The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Frontiers in Pharmacology*, 8.

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060

Esper, R. C., Medrano, J. A. D. P., Pérez, C. A. P., Rivera, O. I. F., Maldonado, R. N., Mendoza, A. D. Z. Trujillo, A. O. (2016). Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 59(1), 6–18.

García, M., & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7), 351–364

Salazar, M. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 152–166

Ricardo Panigua Manuel Nistal Pilar Sesma Manuel Álvarez-Uría Benito Fraile Ramón Anadón Francisco José Sáez. (2007). *Biología celular*. España: mcgraw-hill - interamericana de españa, s. A. U.

Elena, G. A. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Rev. argent. anestesiología*, 391–401.

Krammer, B., & Verwanger, T. (2014). *Molecular Biological Mechanisms in Photodynamic*

Therapy. Photodynamic Therapy. Springer.

Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28587975, 50-64.

Zhuang, S., Lynch, M. C., & Kochevar, I. E. (1998). Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by singlet oxygen. *FEBS Letters*, 9804192, 158-162.

Zhuang, S., Lynch, M. C., & Kochevar, I. E. (1999). Caspase-8 Mediates Caspase-3 Activation and Cytochrome c Release during Singlet Oxygen-Induced Apoptosis of HL-60 Cells. *Experimental Cell Research*, 250(1), 203–212.

Zamani Taghizadeh Rabe, S., Mousavi, S. H., Tabasi, N., Rastin, M., Zamani Taghizadeh Rabe, S., Siadat, Z., & Mahmoudi, M. (2014). Rose Bengal suppresses gastric cancer cell proliferation via apoptosis and inhibits nitric oxide formation in macrophages. *Journal of Immunotoxicology*, 11(4), 367–375.

Bacellar, I. O. L., Tsubone, T. M., Pavani, C., & Baptista, M. S. (2015). Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20523–20559

Li, D., Li, L., Li, P., Li, Y., & Chen, X. (2015). Apoptosis of HeLa cells induced by a new targeting photosensitizer-based PDT via a mitochondrial pathway and ER stress. *OncoTargets and Therapy*, 8, 703–711.

Oleinick, N. L., Morris, R. L., & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(1), 1–21

Tardivo, J. P., Del Giglio, A., de Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., Tada, D. B., Baptista, M. S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to

clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3), 175.

Gonzalo De Toro. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. Universidad de la Frontera Temuco, Chile., VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, 13

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (s. f.). Cáncer de mama: prevención y control. Carga de cáncer de mama. Recuperado el 16 de julio de 2018, de: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>

INEGI. (2 de febrero de 2018). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero) [Comunicado de prensa], recuperado de https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63

Chen, Y., Zheng, W., Li, Y., Zhong, J., Ji, J., & Shen, P. (2008). Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Science*, 99(10), 2019–2027.

Noodt, B. B., Rodal, G. H., Wainwright, M., Peng, Q., Horobin, R., Nesland, J. M., & Berg, K. (1998). Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. *International Journal of Cancer*, 75(6), 941–948.

S. H., M., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., & Jafari-Anarkooli, I. (2009). Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: role of apoptosis. *Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(4), 855–859.

Cominetti, M. R., Altei, W. F., & Selistre-de-Araujo, H. S. (2019). Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11, 165–178.