



INAOE

EVALUACIÓN DE LA FEOMELANINA COMO FOTOSENSIBILIZADOR EN LA TERAPIA FOTODINÁMICA CONTRA CÉLULAS DE MELANOMA

por

Biol. Estephania Caballero Loaiza

Tesis sometida como requisito parcial
para obtener el
grado de

Maestro en Ciencias y Tecnologías Biomédicas

en el

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y
Electrónica**

Supervisada por

Dra. Teresita Spezzia Mazzocco

Dra. Eva Ramón Gallegos

2024 Tonantzintla, Puebla

©INAOE 2024

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de
reproducir y distribuir copias de esta tesis
en su totalidad o en partes mencionando la
fuente.



INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
Resumen	7
ABSTRAC.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Antecedentes	13
1.2 Planteamiento del problema.....	16
1.3 Justificación.....	16
1.4 Objetivos	17
1.4.1 Objetivo general	17
1.4.2 Objetivos específicos.....	17
1.5 Hipótesis	18
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 Piel.....	19
2.2 Melanina.....	21
2.3 Precursores de la FEO y EU	22
2.4 Síntesis de melanina	23
2.5 Funciones de la melanina.....	26
2.7 Células y cáncer.....	26
2.8 Melanoma	28
2.9 Principales mutaciones en el melanoma	29
2.10 Tratamientos convencionales para el melanoma metastásico.....	31
2.10.1 Cirugía.....	31
2.10.2 Quimioterapia.....	31
2.10.3 Radioterapia.....	32
2.10.4 Terapia biológica	32
2.11 Tratamientos no convencionales para el melanoma.....	32
2.11.1 Terapia molecular dirigida e inmunoterapia	32
2.11.2 Nanofármacos	33

2.11.3 TFD	33
2.12 Mecanismo de acción de la TFD	33
2.13 Mecanismos de muerte celular	35
2.14 Características de los FSs.....	37
2.15 Propiedades fotosensibilizantes de la FEO	38
2.16 Estado del arte	39
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1 Material biológico	45
3.2 Cultivo celular.....	46
3.3 Cuantificación de melanina basal	46
3.4 Extracción de melanina por método ácido-base	47
3.5 Caracterización de la melanina	47
3.5.1 Espectro de absorción UV- VIS	47
3.5.2 Espectroscopía RAMAN	48
3.5.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	48
3.6 Determinación del tiempo de incubación para la absorción máxima del FS.....	48
3.7 Aplicación de la TFD	50
3.8 Fuente de luz	52
Prueba de viabilidad.....	53
3.9 Análisis estadístico.....	53
Capítulo IV RESULTADOS.....	54
4.1 Caracterización de la melanina	54
4.2 Cuantificación intracelular del FS	58
4.5 Eficiencia de la TFD	62
4.6 Efectos en la morfología celular	65
CAPITULO V DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN= Ácido desoxirribonucleico
ALA= Ácido 5-aminolevulínico
ASIP= Proteína de señalización agutí
AM= Azul de metileno
BTZ= Benzotiazina
BTZCA= Benzotiazol
CREB = Gen que codifica para un factor de transcripción
EU= Eumelanina
EROs= Especies reactivas de oxígeno
DHI= 5,6-dihidroxi-indol
DHICA= Ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico
FEO= Feomelanina
FS= Fotosensibilizador
FSs= Fotosensibilizadores
MC1R = Gen receptor de melanocortina-1
MC1Rr = Receptor de melanocortina-1
MIFT = Factor de transcripción asociado a la microftalmia
NIR= Infrarrojo
TFD= Terapia fotodinámica
Tyr= Tirosina
TRP 1 y 2 = Enzimas intermembrana
UME= Unidad melanoepidérmica
UV= Radiación ultravioleta
ZnTPPS4= Zinc-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenil) porfirina
 α MSH= Hormona estimulante de melanocitos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis padres, Julia y Jeronimo. Gracias por el tiempo y la energía que invirtieron en mi educación, por su orientación constante y por permitirme soñar y alcanzar mis metas.

A mis hermanas Julia, Marina y Estrella, les agradezco de todo corazón por creer en mí. Sus palabras de aliento y ánimo fueron fundamentales para mantenerme motivada en los momentos más difíciles.

A mi esposo Hugo y a mis hijos Federico y Juliette, les estoy profundamente agradecida por su infinita paciencia y apoyo, especialmente durante los días más intensos de trabajo. Su comprensión y amor fueron mi mayor fuente de fortaleza.

Quiero darle las gracias a mi tía Paty por su invaluable apoyo en el cuidado de mis hijos cuando yo no podía estar en casa. Su ayuda me permitió concentrarme en mi trabajo, sabiendo que mis hijos estaban en buenas manos.

Agradezco infinitamente a mis tutoras, la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco y la Dra. Eva Ramon Gallegos, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo, por la confianza en este proyecto, por sus enseñanzas y motivación. Su paciencia y guía hicieron posible la conclusión de este proyecto.

A mis sinodales, la Dra. Anabel Socorro Sánchez Sánchez, el Dr. Rubén Ramos García y el Dr. Gabriel Ramos Ortiz por su apoyo, orientación, retroalimentación y por el tiempo dedicado a revisar y evaluar este trabajo.

A la técnico del laboratorios Mayra Salazar Morales por su amistad y por el gran trabajo que desempeña cada día.

Al CONAHCYT y al INAEO por el apoyo financiero que permite que los estudiantes nos dediquemos de lleno a nuestros estudios. A todos ustedes, mi gratitud eterna.

Por último, pero no menos importante, agradezco a mis compañeros de laboratorio por hacer más fáciles los días de trabajo con sus consejos y apoyo incondicional. Gracias a ellos las risas no faltaron.

RESUMEN

La terapia fotodinámica (TFD) representa una alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo varios tipos de cáncer. Este método consiste en la aplicación de un pigmento fotosensibilizador (FS) selectivo a las células cancerosas, el cual, al ser activado por la luz genera especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas EROs desencadenan procesos de muerte celular, lo que permite la destrucción específica de las células malignas sin dañar significativamente el tejido sano circundante.

Este tratamiento ha demostrado ser eficaz en el manejo de diferentes neoplasias malignas. Sin embargo, el melanoma, un tipo de cáncer de piel que, aunque representa solo el 3% de todos los cánceres cutáneos, es responsable del 80% de las muertes relacionadas con el cáncer de piel. La eficacia de la TFD en el tratamiento del melanoma ha sido limitada debido a la presencia de melanina, que absorbe la luz y reduce la efectividad del FS. Esto ha presentado significativos desafíos para su aplicación exitosa, incluyendo la búsqueda de fotosensibilizadores (FSs) capaces de generar suficiente daño celular a pesar de la interferencia de la melanina.

Para superar estas limitaciones, se propone utilizar las propiedades fotosensibilizantes de la feomelanina (FEO), un pigmento extraído del cabello pelirrojo, como FS en la TFD dirigida contra las células de melanoma. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue: Objetivo: Investigar la eficacia de la FEO extraída del cabello pelirrojo como FS en la TFD contra células de melanoma.

De acuerdo con los resultados obtenidos, concluimos que sí es posible utilizar la FEO como un FS efectivo. Su fotoactivación redujo la viabilidad de los cultivos celulares en un 35%. Estos hallazgos sugieren que la FEO podría ser una opción viable para mejorar la eficacia de la TFD en el tratamiento del melanoma.

ABSTRAC

The photodynamic therapy (PDT) represents a promising therapeutic alternative for the treatment of various diseases, including several types of cancer. This method involves the application of a selective photosensitizer pigment to cancer cells, which, when activated by light, generates reactive oxygen species (ROS). These ROS trigger cellular death processes, allowing specific destruction of malignant cells without significantly harming the surrounding healthy tissue.

While PDT has proven effective in managing different malignant neoplasms, its efficacy in treating melanoma a type of skin cancer that accounts for only 3% of all skin cancers but is responsible for 80% of skin cancer-related deaths has been limited. This limitation arises from the presence of melanin, which absorbs light and reduces the effectiveness of the photosensitizer. Overcoming this challenge has been crucial for successful application, necessitating the search for photosensitizers capable of inducing sufficient cellular damage despite melanin interference.

To address these limitations, researchers propose utilizing the photosensitizing properties of pheomelanin (PHEO), a pigment extracted from red hair, as a photosensitizer in PDT targeted against melanoma cells. Therefore, the objective of this study was to investigate the efficacy of PHEO extracted from red hair as a photosensitizer in PDT against melanoma cells.

Based on the obtained results, we conclude that it is indeed possible to use PHEO as an effective photosensitizer. Its photoactivation reduced the viability of cell cultures by 35%. These findings suggest that pheomelanin could be a viable option for enhancing the effectiveness of PDT in melanoma treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la piel. En la imagen se observa la epidermis y la dermis. Los melanocitos están presentes en la capa de las células basales, en la parte más profunda de la epidermis ³⁴	19
Figura 2. Estratos de la epidermis ³⁴	20
Figura 3. Estructuras químicas de los dos tipos de melanina presentes en los animales, EU y FEO	22
Figura 4. Precursores de EU (DHI y DHICA) ⁴¹ y Precursores de FEO (benzotiazina) ⁴²	22
Figura 5. Melanogénesis ⁵¹ y etapas de maduración de melanocitos ³⁹	23
Figura 6. Síntesis de Eu y FEO ⁴⁴	24
Figura 7. Estadios del melanoma ³⁴	29
Figura 8. Transferencia de electrones y energía durante la TFD ⁷⁰	35
Figura 9. Esquema de los mecanismos de fotosensibilización de la melanina ⁷⁷ ...	38
Figura 10. Línea celular A375 melanoma humano	45
Figura 11. Procedimiento para el rastreo del FS	49
Figura 12. Espectro de absorción de los FSs utilizados	49
Figura 13. Metodología de la aplicación de la TFD	51
Figura 14. Fuente de luz acoplada a microplaca de 96 pozos	52
Figura 15. Extractos de FEO a partir de cabello pelirrojo.	54

Figura 16. Espectro de las diferentes muestras de melanina, color negro EU y muestras del 1 - 6 extracciones de FEO, línea vertical azul representa la longitud de onda del dispositivo de iluminación	55
Figura 17. Espectro Raman de las muestras de Melania (excitación con 785 nm), procesadas a través del análisis de la segunda derivada y suavizado de la línea.56	56
Figura 18. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de las muestras de melanina, procesadas con un suavizado de línea.....	57
Figura 19. A) Botón celular con AM, B) células con AM intracelular a 40X	58
Figura 20. A) Absorción del AM a una concentración de 20 μ M con diferentes tiempos de incubación, analizado con ANOVA, la diferencia significativa es respecto primer tiempo de incubación de 30 min *p<0.05	59
Figura 21. Acumulación intracelular de FEO analizado con ANOVA, la diferencia significativa es respecto a la melanina basal “control” *p<0.05.....	60
Figura 22. Figura Acumulación intracelular de EU analizado con ANOVA, la diferencia significativa es respecto a la melanina basal “control” *p<0.05.....	61
Figura 23. Resultados de la viabilidad celular en células de melanoma A375, después de ser sometidas a TFD empleando AM como FS. La diferencia significativa se analizó con respecto al control sin interacción *p<0.05	62
Figura 24. Resultados de la viabilidad celular en células de melanoma A375, después de ser sometidas a TFD empleando EU como FS. La diferencia significativa se analizó con respecto al control sin interacción *p<0.05.....	63
Figura 25. Resultados de la viabilidad celular en células de melanoma A375, después de ser sometidas a TFD empleando AM como FS. La diferencia significativa se analizó con respecto al control sin interacción.....	64

Figura 26. Fotografías de los cultivos células de melanoma A375 expuestos a las melaninas, tomadas a 40x..... 65

Figura 27. Células de A375 a 40x 66

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades provocadas por los cambios en el funcionamiento normal de las células, especialmente los relacionados con el crecimiento y la división celular, causados por daños al ácido desoxirribonucleico (ADN), estas alteraciones pueden ser tanto genéticas como epigenéticas¹, que conducen a la transformación de células sanas a células cancerosas, lo que provoca el aumento descontrolado del número de células y la formación de tumores en los tejidos u órganos donde se originan. A medida que las células cancerosas se multiplican, pueden invadir tejidos circundantes y diseminarse a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo, en un proceso llamado metástasis².

El melanoma es un tipo de cáncer que se origina en los melanocitos, células de la piel especializadas en la producción de melanina, estas células presentan una alta capacidad de metástasis. Los factores de riesgo para el melanoma incluyen la exposición excesiva a la radiación ultravioleta (UV) del sol, uso frecuente de camas de bronceado, antecedentes familiares de melanoma, tener múltiples lunares o nevos atípicos, y un historial personal de quemaduras solares graves. El diagnóstico temprano del melanoma es esencial para una terapia favorable, el cual generalmente se basa en la inspección de cualquier lunar o lesión cutánea sospechosa. En el diagnóstico los aspectos que se evalúan incluyen el tamaño, la forma, el color y los bordes de las lesiones, que se pueden complementar con una biopsia y un análisis patológico que en conjunto ayudan a determinar la etapa de la enfermedad^{3,4}. Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), los cánceres de piel son los más comunes diagnosticados en todo el mundo; en 2020, se estima que se diagnosticaron 325 000 nuevos casos de melanoma en todo el mundo y 57 000 personas murieron a causa de la enfermedad⁵. El tratamiento del melanoma suele incluir la extirpación quirúrgica del tumor, y la elección de otros tratamientos, como la inmunoterapia, la terapia dirigida o la quimioterapia, el tratamiento depende de la etapa del cáncer y de otros factores individuales del paciente⁶.

La terapia fotodinámica (TFD) es una alternativa terapéutica que se basa en tres elementos principales: un FS, luz y oxígeno intracelular, su mecanismo se basa en la activación de un FS en una longitud de onda específica formando EROs u oxígeno molecular excitado que a su vez induce la muerte celular, se considera mínimamente invasivo ya que produce menos efectos secundarios en comparación con los tratamientos convencionales. La TFD ha sido aprobada en muchos países para el tratamiento del pulmón, cáncer de esófago, vejiga, piel, cabeza y cuello⁷⁻⁹. Sin embargo, a pesar de que ha sido probada para el tratamiento clínico del melanoma, sus resultados no han sido favorables^{10,11} debido principalmente a la interferencia óptica¹², mecanismos de defensa antioxidante de la melanina¹³ y a los transportadores ABC (del inglés ATP-binding cassette) que actúan como bombas de flujo que hacen que las células sean capaces de eliminar sustancias tóxicas¹⁴ lo que provoca una reducción en la eficacia de la TFD en células de melanoma.

1.1 Antecedentes

El uso de las propiedades curativas de la luz en terapias de salud tiene una larga historia que se remonta a la antigüedad. Diversas civilizaciones aprovecharon la luz solar para tratar enfermedades de la piel, atribuyéndole efectos terapéuticos. Hace más de 3 000 años, los antiguos egipcios combinaban sustancias extraídas de plantas con la luz solar para tratar lesiones superficiales. En Egipto, India y China, la luz solar se empleaba en el tratamiento de enfermedades cutáneas, como se describe en textos antiguos como el Papiro de Ebers¹⁵ y el Atharva Veda¹⁶, el libro sagrado de la India.

En los primeros años del siglo XIX, la comunidad científica reconocía que la luz UV y la luz azul eran ideales para inducir reacciones químicas. En 1900, Oscar Raab realizó la primera observación científica de la actividad fotodinámica al notar que tintes fluorescentes, como el naranja de acridina, podían matar microorganismos, observó que la combinación de luz y acridina tenía un efecto letal en una especie de paramecio¹⁷. Raab postuló que este efecto se debía a la transferencia de energía de la luz a la sustancia química, similar al proceso de fotosíntesis en las plantas.

Poco después, Von Tappeiner, junto con Jodlbauer (1904) descubrieron que el oxígeno era esencial para desarrollar reacciones mediadas por la luz, introduciendo así el término "efecto fotodinámico." Simultáneamente, investigaron la aplicación de eosina y luz para tratar tumores cutáneos en ratones. A pesar de los resultados prometedores, la TFD fue abandonada por un tiempo debido a la toxicidad de los FS utilizados en ese momento, como la acridina, que mostraba un alto potencial oncogénico^{18,19}.

La biofotónica es un área de investigación interdisciplinaria que se ha centrado en el estudio de la interacción entre la luz y los sistemas biológicos. Este término que ganó popularidad en la década de 1980 tiene como objetivo utilizar la luz para investigar, diagnosticar y tratar una amplia gama de enfermedades y trastornos médicos, así como para el estudio de procesos biológicos a través del uso de la luz, como por ejemplo el desarrollo de técnicas para la obtención de bioimágenes²⁰. La TFD como una técnica biofotónica ha sido beneficiada del desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas, especialmente con la llegada de fuentes láser y luz coherente, lo que ha permitido utilizar la luz de manera eficiente, ya que los procesos que se desencadenan en la TFD dependen de la eficiencia de los sistemas de entrega de luz. Por otra parte, la efectividad de la TFD depende en gran medida de las propiedades del FS utilizado. En los últimos años se han descubierto e identificado compuestos naturales con propiedades fotosensibilizantes que presentan una toxicidad reducida para los tejidos sanos y una menor incidencia de efectos secundarios, esto ha despertado interés por el estudio de los FS de origen natural²¹.

Un ejemplo de un FS de origen natural es la curcumina que es un compuesto antioxidante obtenido de la cúrcuma, conocido por sus propiedades anticancerígenas. Este compuesto aplicado a la TFD a células de melanoma inhibe la proliferación celular e induce la expresión de caspasa-3²².

También se ha demostrado que la TFD implementada con hipericina como FS, un extracto de la hierba de San Juan fue eficaz para inhibir el crecimiento de las células

A375 al generar una pérdida de la integridad de la membrana celular y la externalización de fosfatidilserina²³.

Otro ejemplo de FS de origen vegetal es la riboflavina, las propiedades de la riboflavina como PS se han utilizado con éxito en el tratamiento de muchos cánceres como el melanoma^{24,25}.

Existen otras moléculas cromóforas, endógenas, con un alto potencial para ser usadas como FS, por ejemplo, la FEO, un tipo de melanina que se origina a partir de la tirosina y en presencia de cisteína, caracterizado por ser responsable de los colores rojizos en el reino animal, presentan una alta capacidad para actuar como un potente FS que conduce a una intensa producción de ROS mediante irradiación con luz UV-visible^{26,27}.

Contrario a algunos estudios que han demostrado los efectos fotoprotectores de la melanina, también se han reportado efectos fotosensibilizantes propios de este pigmento cuando se expone a la luz²⁸, son pocos los trabajos en los que se ha probado la FEO como un FS, recientemente se utilizó la FEO para la inactivación de bacterias²⁹ pero no se ha puesto a prueba su capacidad como FS en la TFD aplicada a cultivos celulares humanos. Por lo tanto, en este trabajo se presenta por primera vez el uso de la FEO como FS en la TFD contra células de melanoma.

1.2 Planteamiento del problema

La TFD se ha probado como una alternativa terapéutica en el tratamiento del melanoma con algunos resultados prometedores, pero generalmente se considera que el melanoma es resistente a la TFD debido a la presencia de melanina, este pigmento confiere resistencia tanto a tratamientos convencionales como a la TFD³⁰

A pesar de los avances en la TFD contra células de melanoma, se han encontrado dificultades debido a las propiedades antioxidantes de la eumelanina (EU) (un tipo de melanina), el secuestro de los FSs dentro de los melanosomas, defectos en las vías apoptóticas y el flujo de FSs a través de transportadores de membrana dependientes de ATP.

Además, la melanina es un pigmento biológico sintetizado en el melanocito, que exhibe una fuerte absorción de luz en la región UV-VIS, por lo que puede presentar dificultades al momento de la fotoactivación de un FS exógeno, por la competencia por la absorción de la luz entre la melanina y el FS, afectando el mecanismo de acción de la TFD. Además, tiene la capacidad de unirse a iones metálicos.

En consecuencia, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para optimizar la TFD para células de melanoma. Una alternativa viable consiste en la exploración de nuevos FSs con propiedades capaces de superar las limitaciones encontradas en los FSs utilizados convencionalmente. Y considerando que la FEO (un tipo de melanina) puede actuar como FS endógeno, dando lugar a la formación de EROs como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, se puede plantear su uso en los procesos de inactivación celular por TFD.

1.3 Justificación

El melanoma es uno de los tipos más agresivos de cáncer de piel, su incidencia está en aumento en muchas partes del mundo. A pesar de que su incidencia mundial es relativamente baja, representando aproximadamente el 3% de todos los casos de cáncer de piel³¹, el melanoma, es responsable del 80% de las muertes relacionadas

con esta enfermedad, lo que plantea un problema de salud pública³². En México la tasa de mortalidad general por melanoma ha aumentado un 78% en los últimos 19 años. Los datos disponibles del año 2016 muestran una tasa media nacional del 0.57% (hombres: 0.65% y mujeres: 0.49%); la entidad federativa con la tasa más alta es la Ciudad de México, el grupo de edad más afectado es el de 60 años o más, con una tasa del 3.7%³³.

El tratamiento del melanoma en las etapas avanzadas de la enfermedad disminuye drásticamente la esperanza de vida del paciente ya que posee una alta capacidad de hacer metástasis, incluso en las etapas iniciales de la enfermedad. Esto hace que el diagnóstico y la terapia temprana sea crucial para controlar la enfermedad. En ese sentido, el diagnóstico oportuno y las terapias efectivas no sólo prolongan la vida de los pacientes, sino que también pueden mejorar significativamente su calidad al reducir el dolor y la morbilidad. El tratamiento del melanoma no sólo beneficia a los pacientes individualmente, sino que también tiene un impacto económico y social positivo al reducir los costos de atención médica a largo plazo y permitir que los pacientes se integren a la sociedad. Por lo tanto, la búsqueda de terapias innovadoras y efectivas para tratar este tipo de cáncer se ha convertido en una prioridad para la comunidad científica y médica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Investigar la eficacia de la FEO extraída de cabello pelirrojo como FS en la TFD contra células de melanoma.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Extraer y caracterizar FEO a partir de cabello pelirrojo.
2. Determinar la dosimetría de luz y los tiempos de incubación óptimos para la FEO extraída, en el proceso de TFD.

3. Evaluar el efecto de los extractos de FEO como FS y comparar con el efecto de la TFD utilizando como modelo de referencia FS al azul de metileno (AM) y EU.

1.5 Hipótesis

La fotoactivación de la FEO inducirá la muerte celular, generando una disminución significativa de la viabilidad en una línea celular de melanoma humano.

La fotoactivación de la FEO no inducirá la muerte celular, y no se producirá una disminución significativa de la viabilidad en una línea celular de melanoma humano.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Piel

La piel, es el órgano más grande de nuestro cuerpo, recubre la superficie corporal y es una defensa del organismo. En la mayor parte de las ocasiones la primera barrera frente a agresiones externas, inorgánicas y orgánicas. Entre las inorgánicas se destaca la exposición a las radiaciones solares, las cuales pueden conducir a foto daño y cáncer de piel. Desde el punto de vista histológico, la piel está constituida por tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (**Figura 1**).

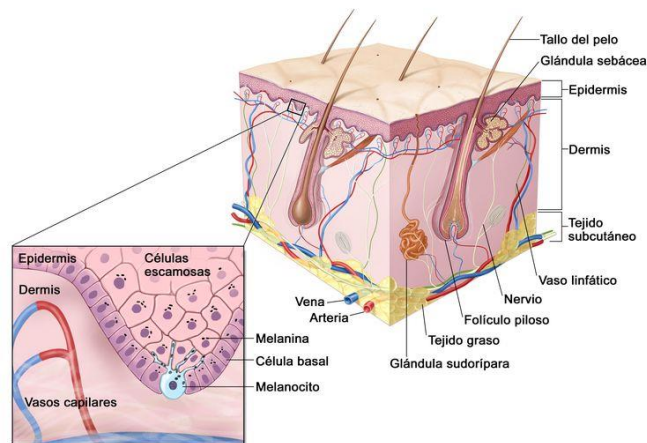


Figura 1. Anatomía de la piel. En la imagen se observa la epidermis y la dermis. Los melanocitos están presentes en la capa de las células basales, en la parte más profunda de la epidermis³⁴

Epidermis: Es la capa más externa y está formada por células epiteliales queratinizadas organizadas en diferentes estratos, es una barrera protectora contra patógenos y lesiones.

Dermis: Situada debajo de la epidermis, la dermis está compuesta por tejido conectivo denso. Aquí se encuentran vasos sanguíneos, folículos pilosos, glándulas sudoríparas y receptores sensoriales.

Hipodermis: Se encuentra por debajo de la dermis, tejido adiposo principalmente. No se considera parte de la piel, sino que fija ésta a los órganos subyacentes³⁵.

La epidermis está formada por estratos celulares (**Figura 2**).

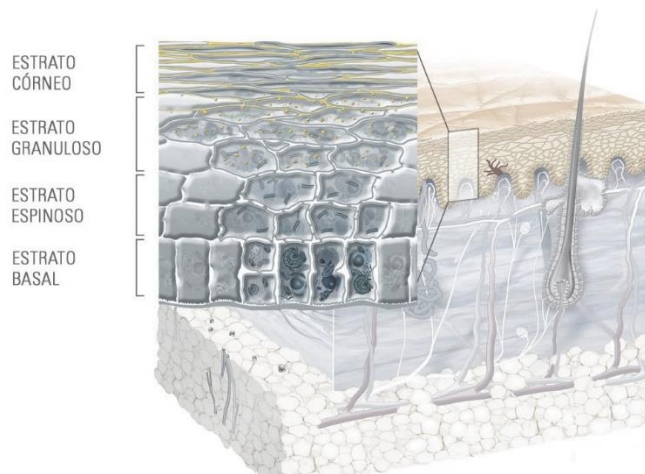


Figura 2. Estratos de la epidermis³⁴

El estrato basal es el más profundo con un espesor de una célula, aquí se encuentran las células troncales de los queratinocitos, estas células se encuentran en constante división. Los melanocitos se localizan en el estrato basal y su principal función es la producción de melanina.

El estrato espinoso está constituido por queratinocitos que expresan queratinas como proteínas características de su citoplasma. En las capas más superficiales del estrato espinoso los queratinocitos cambian su expresión génica y empiezan a producir gránulos de queratohialina formando el estrato granuloso, las células granulosas sufren la degradación de su núcleo y orgánulos, mientras su citoplasma prácticamente se llena de queratina, este estrato está formado por queratinocitos aplanados con numerosos gránulos de queratohialina. Los queratinocitos

representan el 80% de las células en la epidermis y producen queratina, que es la principal proteína estructural de la epidermis.

El estrato córneo es la capa más externa de la epidermis y comprende, en promedio, unas 20 subcapas de células muertas, aplanadas, en función de la parte del cuerpo que recubre la piel. Estas células muertas se desprenden regularmente en un proceso conocido por descamación.

2.2 Melanina

El término "melanina" fue acuñado por primera vez por Berzelius en 1840 para referirse a los pigmentos oscuros presentes en animales. Nicolaus (1969) sugirió una clasificación de las melaninas en tres grupos principales EU, FEO y alomelanina, los dos primeros grupos comprenden pigmentos animales y el segundo abarca la amplia variedad de pigmentos oscuros no nitrogenados de origen vegetal, fúngico y bacteriano³⁶.

Prota propuso un uso más restrictivo del término "melanina" para incluir sólo aquellos pigmentos que se forman intracelularmente por la oxidación de la tirosina y los metabolitos relacionados (Prota, 1995), tomando así tanto el origen biogénico de la tirosina como la actividad metabólica de los melanocitos³⁷. Los melanocitos derivan de la cresta neural. Durante el desarrollo embrionario los melanoblastos migran a diversos sitios incluyendo la piel, donde proliferan y se diferencian en células productoras de melanina. La melanina se encuentra de forma ubicua en todo el reino animal y suele servir de protección contra los factores del estrés ambiental. El pigmento producido por los melanocitos se transfiere a los queratinocitos a través de orgánulos celulares llamados melanosomas a través de dendritas melanocíticas³⁸. Un sólo melanocito puede transferir melanina hasta a cuarenta queratinocitos, lo que forma la llamada unidad melanoepidérmica (UME). El contacto con los queratinocitos regula la síntesis y transferencia de melanina³⁹.

La EU, que prevalece en individuos con cabello negro y castaño y la FEO responsables del cabello rojo y las pecas, tienen una organización común de

unidades repetitivas unidas por enlaces de carbono⁴⁰. Sin embargo, los pigmentos difieren entre sí en términos de propiedades químicas, estructurales y físicas (**Figura 3**).

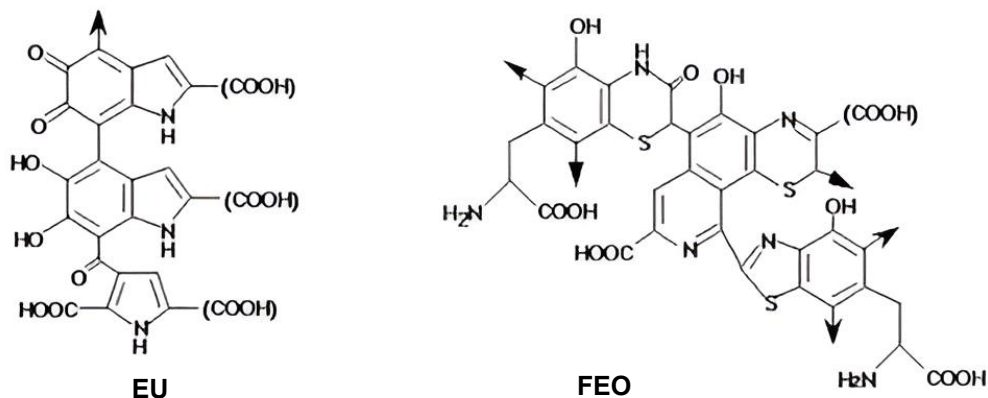


Figura 3. Estructuras químicas de los dos tipos de melanina presentes en los animales, EU y FEO⁴¹

2.3 Precursores de la FEO y EU

La FEO se compone principalmente de benzotiazina (BTZ), que contiene azufre, y derivados del benzotiazol (BTZCA). La fuente principal de azufre para su síntesis es la L-cisteína, siendo esencial para la producción de FEO⁴⁰. En contraste, la EU es un polímero altamente heterogéneo que incluye unidades de ácido 5,6-dihidroxiindol (DHI) y/o ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) (**Figura 4**).

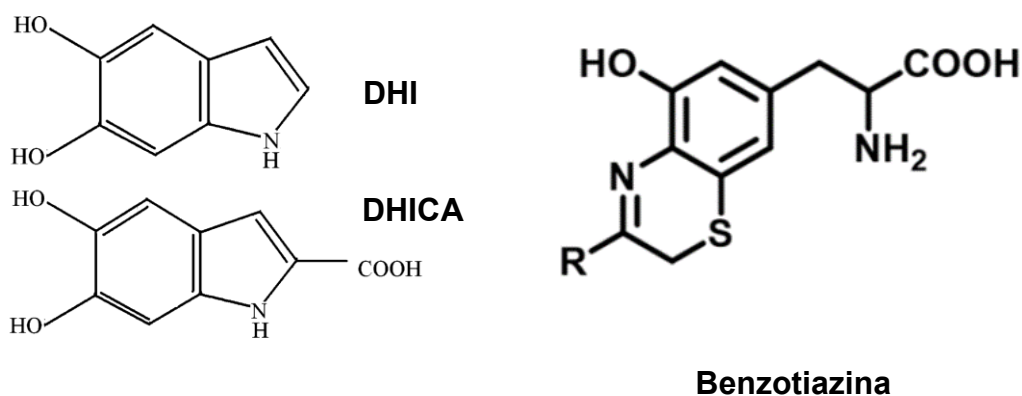


Figura 4. Precursores de EU (DHI y DHICA)⁴² y Precursores de FEO (benzotiazina)⁴³

2.4 Síntesis de melanina

Más de 120 genes participan en la regulación de la pigmentación cutánea, destacando el gen MC1R como un actor clave. Este gen codifica el receptor de melanocortina-1 (MC1Rr), un receptor acoplado a proteínas G compuesto por 317 aminoácidos, expresándose principalmente en la superficie de los melanocitos.

La regulación positiva del gen MC1R ocurre a través de la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH), mientras que factores antagonistas como la proteína señal Agouti (ASIP) y la beta-defensina 3, ejercen una regulación negativa, compitiendo con α -MSH⁴⁴.

La melanina se sintetiza en el melanocito, un orgánulo intracelular especializado, derivado del retículo endoplasmático, el melanosoma (**Figura 5**). Durante la biogénesis de este orgánulo, la enzima tirosinasa se incorpora al melanosoma. La tirosinasa cataliza la conversión del aminoácido tirosina (Tyr) a dihidroxifenilalanina quinona (DQ). Además, se incorporan las proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa (TRP-1 y TRP-2). Estas proteínas desempeñan funciones clave en la melanogénesis, actuando TRP-1 como oxidasa del DHICA y TRP-2 como tautomerasa de la dihidroxifenilalanina cromo (DOPAcromo).

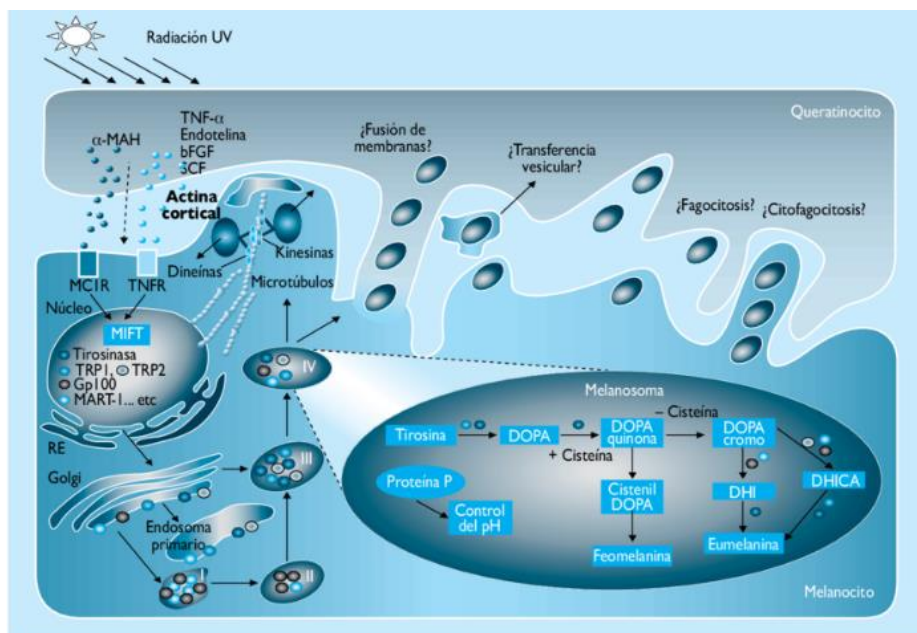


Figura 5. Melanogénesis⁴⁵ y etapas de maduración de melanocitos³⁹

Las vías biosintéticas para la síntesis de FEO y EU inician con el mismo precursor, la tirosina (**Figura 6**). Primero se convierte en un intermediario extremadamente reactivo DQ por la acción de la enzima tirosinasa. Todas las tirosinasas utilizan cobre como cofactor, pero la especificidad del sustrato puede variar entre las especies^{46,47}. Las tirosinasas son enzimas bifuncionales que catalizan la hidroxilación de monofenoles y la posterior oxidación de los difenoles a quinonas. Dentro de los melanosomas, el DQ se cicla para formar leucodocromo y luego se convierte espontáneamente en un intermediario de color naranja conocido como DOPAcromo, el DOPAcromo pierde su ácido carboxílico, formando DHI, cuya polimerización forma EU ⁴⁸. El dopacromo también puede ser reorganizado por TRP1 y TRP2, también llamada dopacromo tautomerasa (DCT), para formar un intermediario carboxilado DHICA. La tirosinasa junto con las dos proteínas relacionadas con la tirosinasa forma un complejo multienzimático dentro de los melanositos facilitando sus interacciones fisiológicas y la disrupción de una de las enzimas, debido a mutaciones, afecta severamente la pigmentación.

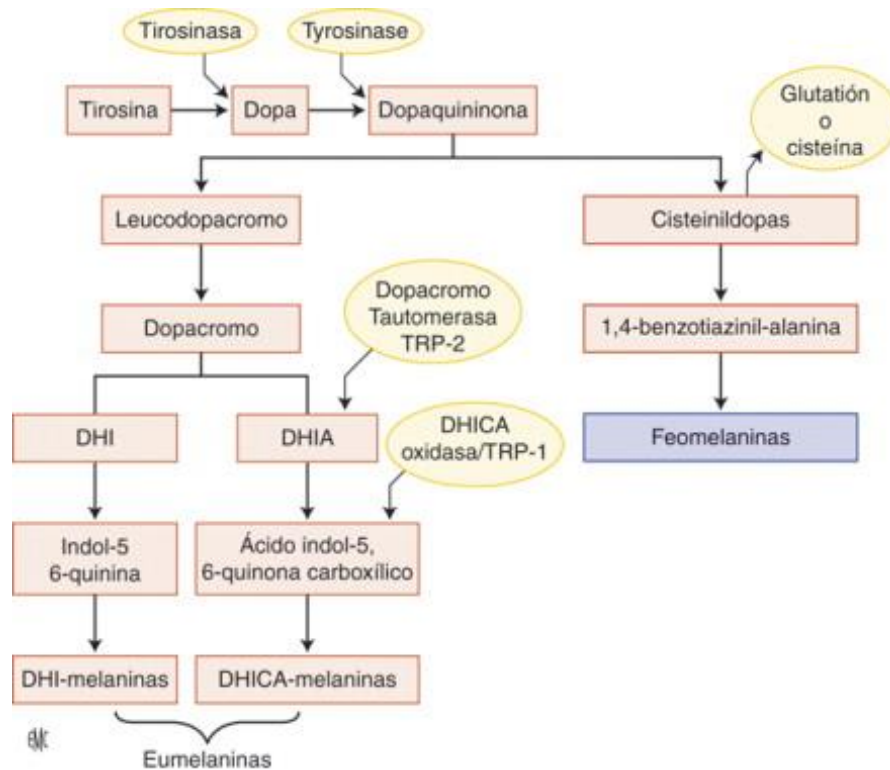


Figura 6. Síntesis de Eu y FEO⁴⁹

En la síntesis de FEO, los grupos sulfhidrilo desempeñan un papel fundamental. Una vez que la DQ se forma de la misma manera que en la síntesis de EU reacciona inmediatamente con los grupos sulfhidrilo para formar cisteinil-DOPA y luego quinona, que luego se convierte en BTZ y BTZCA. Estos productos se polimerizan para producir FEO⁵⁰.

La melanogénesis genera combinaciones variables de EU y FEO, dando lugar a gránulos que coexisten en distintas proporciones dentro de una misma célula⁵¹. A lo largo de todos los tipos de piel, la densidad de melanocitos es uniforme y constante; sin embargo, es la distribución y cantidad específica de melanina lo que determina el matiz y la tonalidad del color de la piel.

La unión de la hormona estimulante de melanocitos (MSH) a su receptor MC1R activa la proteína G ($G\alpha+G\beta+G\gamma$) produciéndose un aumento en los niveles del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPc) por acción del adenilato ciclasa (AC). El AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA). Una vez activa la PKA es capaz de fosforilar a proteínas que actúan como factores de transcripción como la proteína CREB (factor de unión a elementos de respuesta de AMPc) que unida a secuencias de ADN llamados elementos de respuesta a AMPc (CRE), activan la expresión de genes específicos sensibles a AMPc. El factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF) reconoce las secuencias localizadas en las regiones promotoras del gen de la tirosinasa.

Este AMPc desencadena la cascada de señalización que estimula la transcripción de enzimas fundamentales para la síntesis de EU. La proteína ASIP obstaculiza la generación de EU al competir directamente con la unión de MSH a MC1R, bloqueando así la expresión consecutiva del factor de transcripción MITF. La función crítica de MITF radica en activar el promotor de tres enzimas (Tyr, TRP1 y TRP2), cuya ausencia favorece la síntesis de FEO. MITF está específicamente vinculado a la activación de TRP1 y Tyr, excluyendo su participación en TRP2⁵².

Los queratinocitos y melanocitos forman un estrecho nicho, con hasta 40 queratinocitos asociados a un sólo melanocito. Después de la exposición a la

radiación UV, los queratinocitos liberan diversas citoquinas y quimiocinas que impactan en la producción de EU. En respuesta a los rayos UV, los queratinocitos secretan MSH y hormona adrenocorticotrópica, dando señales a los melanocitos para intensificar la melanogénesis.

2.5 Funciones de la melanina

La melanina se caracteriza por sus propiedades físicas y químicas. Presenta un comportamiento antioxidante y de eliminación de radicales libres. La absorción del espectro visible y la radiación UV y la fuerte relajación no radiativa de los estados electrónicos fotoexcitados, están definidas por la estructura molecular, supramolecular y el nivel de agregación de la melanina. Sin embargo, aún hay muchas incógnitas en las relaciones estructura-propiedad-función de la melanina⁴³.

Una de las funciones comúnmente atribuidas a la melanina es la filtración de la radiación UV y protección de las células cutáneas. También se sabe que la melanina actúa como un FS que genera EROs tras la irradiación UV⁵³. Los anillos aromáticos derivados de la tirosina del cromóforo de melanina se excitan al estado singulete, se descomponen en el triplete y transfieren un electrón al oxígeno para producir superóxido (O_2^-)⁵⁴; las melaninas posteriormente eliminan estas especies químicas activas, pero después de la exposición continua y prolongada al sol su capacidad de eliminación puede verse reducida.

2.7 Células y cáncer

El cáncer es un término que describe una gran variedad enfermedades producidas por cambios en los mecanismos reguladores internos de la célula que dan lugar al crecimiento y proliferación descontrolada. Una célula es la unidad estructural y funcional básica de los organismos vivos, capaz de realizar todas las funciones necesarias para la vida. Un conjunto de células que se organizan para realizar funciones específicas formará tejidos y la colección de tejidos formarán una unidad especializada lo que llamamos órgano. Las células de cada uno de los órganos del cuerpo llevan a cabo las funciones como el transporte de oxígeno, la digestión de

nutrientes, la excreción de materiales de desecho, la locomoción y la reproducción. Cuando las células se desgastan o sufren algún daño son reemplazadas por células nuevas, resultado de la mitosis, un proceso altamente regulado por el ADN, una molécula organizada en 46 cromosomas que contienen más de 100.000 genes^{55,56}.

El ciclo celular consta de varias fases, que se pueden dividir en dos principales etapas: la interfase y la mitosis.

Una vez completadas todas estas fases, se obtienen dos células hijas genéticamente idénticas a la célula madre, y el ciclo celular puede comenzar nuevamente con la interfase. Este proceso es esencial para el crecimiento, la reparación y el reemplazo celular en los organismos multicelulares.

Las células cancerosas pueden surgir en diversas etapas del ciclo celular y en diferentes tipos de tejidos u órganos del cuerpo, se originan por mutaciones o daños en el ADN que, si no se reparan adecuadamente, pueden dar lugar a células cancerosas. No todas las células que experimentan mutaciones o daños en el ADN se convierten en células cancerosas, ya que el cuerpo tiene mecanismos de control que pueden detectar y reparar errores en el ADN. Sin embargo, si las mutaciones se acumulan y las células pierden la capacidad de controlar su crecimiento y la mitosis, pueden volverse cancerosas y comenzar a proliferar de manera descontrolada⁵⁷.

El aumento excesivo de las células produce un tumor, estas neoplasias se pueden clasificar como malignas o benignas. En el caso de un tumor maligno, estas células se comportan de forma más agresiva, adquiriendo propiedades de mayor invasividad provocando metástasis.

Los tumores benignos tienen menos tendencia a invadir y tienen menos probabilidades de hacer metástasis. Sin embargo, se dividen de manera descontrolada. Dependiendo de su ubicación, pueden ser tan mortales como las lesiones malignas⁵⁵.

2.8 Melanoma

Los cánceres de piel se clasifican y designan según la célula de origen. Existen tres categorías principales: los carcinomas de células basales, los carcinomas de células escamosas y los melanomas malignos cutáneos. Los dos primeros tipos, también conocidos como cáncer de piel no melanoma o no invasivo, se originan fuera de los melanocitos de la piel y no se extienden a los tejidos saludables circundantes. Por otro lado, los melanomas malignos cutáneos tienden a propagarse a los tejidos circundantes, caracterizándose como metastásicos e invasivos.

El melanoma, un tumor maligno que se origina en los melanocitos situados en las capas más profundas de la epidermis, puede surgir en cualquier área de la piel, aunque tiene mayor propensión a desarrollarse en lunares preexistentes (**Figura 7**), se distinguen cinco etapas de melanoma:

Etapa 0: El melanoma se limita a la capa superior de la piel, y la lámina basal permanece intacta.

Etapa I: Melanoma *in situ*, localizado en la epidermis.

Etapa II: El tumor tiene un grosor de menos de 1 mm, ha penetrado la lámina basal y se ha extendido a la dermis papilar.

Etapa III: El espesor del tumor varía entre 1 y 2 mm, alcanzando la interfase dérmica papilar-reticular.

Etapa IV: El tumor se extiende a la dermis reticular, y las células del melanoma han migrado hacia al menos un ganglio linfático o tejidos cercanos. Se han producido metástasis en los pulmones, otros órganos, áreas distantes de la piel o ganglios linfáticos. La afectación se ha propagado a la grasa subcutánea.

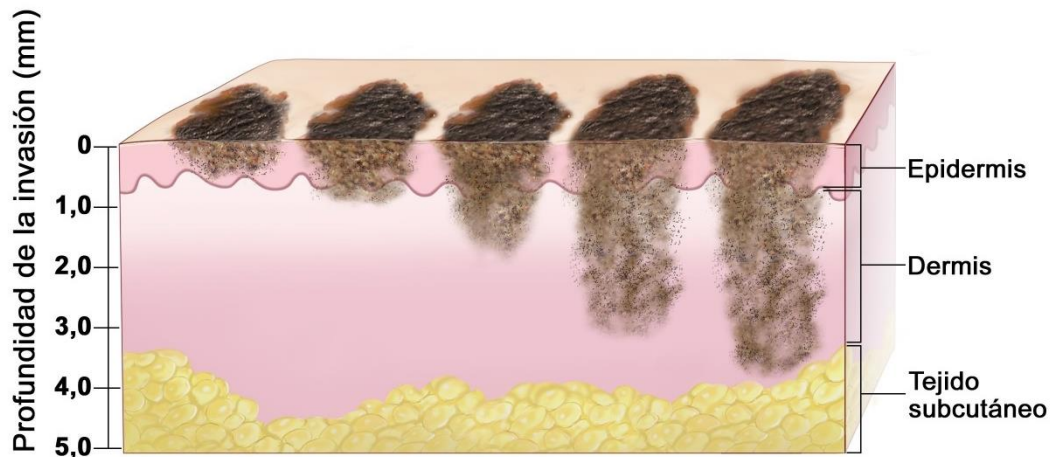


Figura 7. Estadios del melanoma³⁴

La detección temprana del melanoma resulta crucial para mejorar la tasa de supervivencia del paciente. Este tipo de cáncer de piel se caracteriza por su naturaleza invasiva y agresiva, su resistencia a diversos tratamientos, su baja tasa de supervivencia y su propensión a la recurrencia⁵⁸.

2.9 Principales mutaciones en el melanoma

Las mutaciones en el gen BRAF se presentan con frecuencia en hasta 66% de los pacientes con melanoma. Estas mutaciones activadoras en BRAF dan lugar a una activación constitutiva de la función de la quinasa, independientemente de la señalización ascendente del gen RAS. BRAF interactúa con la vía MEK, lo que da lugar a la fosforilación de MEK, lo que conduce a la posterior activación de la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (vía ERK), lo que en última instancia promueve el crecimiento celular e inhibe la apoptosis⁵⁹.

Estudios posteriores han confirmado que la incidencia de mutaciones en BRAF es de aproximadamente 40 a 50% en pacientes con melanoma cutáneo. La mutación más común en BRAF es la sustitución de valina por ácido glutámico en el aminoácido 600 (V600E), que representa entre el 70% y el 88% de todas las mutaciones en BRAF. Las mutaciones menos comunes en BRAF incluyen V600K,

V600R y V600M, que comprenden 11 a 20%, 2 a 5% y 1 a 4%, respectivamente, de mutaciones *en BRAF*. Otras alteraciones no V600 en BRAF se presentan en aproximadamente 5% de todos los melanomas, con mayor frecuencia en los codones 466, 469, 597 y 601, y fusiones *de BRAF*⁶⁰.

La familia RAS incluye 3 protooncogenes primarios, NRAS, KRAS y HRAS, que regulan la proliferación celular y la apoptosis. Las mutaciones NRAS activan constitutivamente MAPK, PI3K y otras vías de señalización celular, causando crecimiento celular, proliferación y disfunción del ciclo celular. Las mutaciones en NRAS se presentan en más del 20% de los pacientes con melanoma cutáneo, con mayor frecuencia en el codón 61 y con menor frecuencia en los codones 12 y 13. Los melanomas con mutaciones en NRAS se relacionan con un curso clínico agresivo y un pronóstico precario. Son más comunes en pieles no expuestas al sol. KIT es un receptor protooncogénico tirosina quinasa que se encuentra en la membrana celular y se une al factor de células madre. Esto activa la proteína KITp, lo que resulta en la activación de múltiples vías de señalización que afectan el crecimiento, la proliferación, la supervivencia y la migración celular. Las mutaciones en KIT se presentan en 1 a 3% de todos los melanomas y se encuentran con mayor frecuencia en el exón 11 o en el exón 13. Las mutaciones KIT se encuentran con mayor frecuencia en melanomas acrales o mucosos (aproximadamente 15% cada uno, y en melanomas vulvovaginales con más frecuencia que en melanomas nasales) y en áreas de daño solar crónico (aproximadamente 2%). Los inhibidores de la tirosina cinasa, en particular el imatinib, han demostrado cierta actividad en el tratamiento del melanoma con mutación en KIT. Las respuestas al tratamiento en pacientes con mutaciones en el exón 11 se presentan en el intervalo de 30 a 50%, aunque la resistencia adquirida por lo general se presenta en el plazo de 1 año⁶¹.

El producto del gen NF1 es una proteína activadora de GTPasa que amortigua la señalización de MAPK mediante la regulación negativa de la actividad de RAS, y las mutaciones y/o la pérdida del gen NF1 conducen a la activación de la vía MAPK. Las mutaciones en NF1 forman el tercer subgrupo genómicamente más común de melanomas, y se notificó que se presentaron en aproximadamente el 14% de las

muestras de melanoma TCGA, incluso hasta el 70% de las muestras de tipo natural BRAF/NRAS. La mayoría de las mutaciones de NF1 conducen a una pérdida de la función de este supresor tumoral, y aproximadamente el 80% de los pacientes tienen una mutación sin sentido, una inserción o una delección que conduce a una proteína truncada⁶².

2.10 Tratamientos convencionales para el melanoma metastásico

Los pronósticos del melanoma metastásico se realizan mediante el uso de un sistema de clasificación de estadificación que evalúa y describe el grado de desarrollo de la enfermedad en los pacientes. Los factores principales de este sistema de estadificación son la localización del tumor primario; tamaño del tumor, número de tumores, compromiso de los ganglios linfáticos; y la ausencia o presencia de metástasis. Los tratamientos convencionales para el melanoma metastásico incluyen cirugía, quimioterapia, radiación y terapia biológica.

2.10.1 Cirugía

El tratamiento principal para el melanoma es la cirugía, mediante la cual se extirpa la lesión con algunos de los tejidos circundantes no afectados para garantizar que se elimine todo el tejido afectado y que no haya células cancerosas presentes en el área para proliferar. La cirugía ofrece la mejor oportunidad de recuperación si el melanoma ha sido diagnosticado en sus primeras etapas y aún no ha tenido la oportunidad de hacer metástasis⁶³.

2.10.2 Quimioterapia

La quimioterapia tiene la capacidad de aliviar, controlar o curar completamente el cáncer de piel; su éxito depende de la gravedad del cáncer en el momento del diagnóstico. La quimioterapia se basa en la administración de medicamentos eficaces para evitar que las células cancerosas proliferen de manera anormal o para ralentizar su tasa de crecimiento general. Los medicamentos quimioterapéuticos para el melanoma metastásico incluyen dacarbazina, paclitaxel, compuestos de

platino y temozolomida. El inconveniente de la quimioterapia es que también causa daño a las células sanas, así como efectos secundarios graves en los pacientes, como fatiga, infecciones secundarias, anemia, náuseas, vómitos y estreñimiento⁶⁴.

2.10.3 Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento contra el cáncer en el que se emplean diversos tipos de radiación ionizante, como los rayos X o los rayos gamma, se emplea para aniquilar las células cancerosas a través de la administración externa o interna. La radioterapia causa efectos secundarios como cambios en la piel, fatiga y náuseas, además de afectar los tejidos sanos circundantes. Dependiendo de la gravedad y el tipo de cáncer, un paciente puede someterse a radioterapia que puede aplicarse en combinación con quimioterapia, y esto a menudo induce efectos secundarios mucho más severos⁶⁵.

2.10.4 Terapia biológica

Los medicamentos que se administran a los pacientes ayudan al sistema inmunitario a combatir el cáncer en lugar de simplemente matar directamente las células que proliferan rápidamente. Este tipo de terapia se utiliza a menudo en combinación con otras terapias. Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) solo ha aprobado 3 agentes biológicos convencionales para el tratamiento del melanoma metastásico avanzado: DTIC, aprobado en 1975; interferón recombinante α -2B, aprobado en 1995; y dosis altas de interleucina 2, aprobada en 1998⁶⁶.

2.11 Tratamientos no convencionales para el melanoma

2.11.1 Terapia molecular dirigida e inmunoterapia

La terapia dirigida utiliza anticuerpos anticitotóxicos contra antígenos de linfocitos T (CTLA-4) para atacar CTLA-4; están sobreexpresados en los linfocitos T activados y actúan como un regulador negativo de la activación de las células T. Esto mejora

la capacidad del sistema inmunitario para destruir las células cancerosas. El problema asociado a este tipo de terapia es que el tratamiento global no es eficaz para todos los pacientes, ya que está influenciado por los efectos secundarios relacionados con el sistema inmunitario y los factores de resistencia. Por lo tanto, para que este tipo de tratamiento del melanoma maligno sea más eficiente, es esencial mejorar la capacidad de focalización molecular del tratamiento, así como superar la resistencia⁶⁷.

2.11.2 Nanofármacos

Los avances recientes en la investigación han explotado el uso de la nanotecnología para el tratamiento del cáncer. Esto mejora la administración y absorción de fármacos dirigidos a las células cancerosas y reduce drásticamente sus efectos secundarios citotóxicos generales en los tejidos normales. Algunos nanofármacos ya han sido aprobados por la FDA para su uso en ensayos preclínicos y clínicos, ya que se ha demostrado que se dirigen y matan directamente las células tumorales o mejoran la administración general de fármacos de quimioterapia dirigida⁶⁸.

2.11.3 TFD

Durante las últimas tres décadas, se ha explorado la TFD como un enfoque no convencional en el tratamiento del cáncer. Este enfoque no convencional presenta ventajas en comparación con los tratamientos convencionales para el cáncer, ya que es menos invasivo. Además, se dirige de manera específica a la región tumoral cancerosa, lo que resulta en una destrucción localizada y limita los efectos secundarios⁶².

2.12 Mecanismo de acción de la TFD

La TFD implica la administración de un agente fotosensible en las células cancerosas objetivo, seguido por la irradiación con luz a una longitud de onda específica para activar el FS. La excitación del FS desencadena la generación de EROs citotóxicas, como el oxígeno molecular singlete (1O_2), radicales hidroxilos y

aniones superóxido. Estas EROs inducen fotocitotoxicidad mediante el estrés oxidativo, provocando daño a las biomoléculas celulares, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que inactiva las células cancerosas.

Existen cuatro mecanismos de fotosensibilización, que se clasifican en directos e indirectos. Los indirectos (denominados así por que no requieren oxígeno) son el mecanismo Tipo I, en el cual las especies radicales se forman mediante la transferencia de electrones desde un FS excitado al oxígeno, y las EROs resultantes oxidan biomoléculas intracelulares como ácidos nucleicos y aminoácidos. También el mecanismo Tipo II, es un mecanismo indirecto, ya que ocurre cuando el oxígeno singulete se forma mediante la transferencia de energía desde el FS excitado al oxígeno molecular.

Por otra parte, los directos (independientes del oxígeno), como el mecanismo Tipo III, donde la interacción entre el FS activado y los radicales libres nativos generan la citotoxicidad. El mecanismo de Tipo IV, ocurre cuando el FS no puede unirse a su objetivo molecular, y solo tras la excitación con luz sufre una remodelación intramolecular (mediante fotoisomerización) que facilita la unión del FS activado a su sitio objetivo celular⁶⁹. El mecanismo que se desencadena depende del tipo de FS. La determinación de este modo de acción se ve influenciada por diversos factores, como la concentración del FS, la ubicación intracelular del FS, la cantidad de trifosfato de adenosina en el interior de la célula, la composición genética de la célula, así como la fluencia y longitud de onda⁷⁰.

La fotosensibilización implica una alteración en el estado energético fundamental (S_0) de cualquier molécula, lo cual se relaciona con su configuración o distribución electrónica de menor energía. Los estados electrónicamente excitados (S_1) de las moléculas se generan al absorber energía, comúnmente en forma de luz. Estas moléculas adquieren configuraciones electrónicas más energéticas que las del estado fundamental. A diferencia de este último, los estados excitados exhiben configuraciones electrónicas de duración limitada y tienden a retornar rápidamente a la configuración de mínima energía del estado fundamental. Una molécula exhibe un estado energético singulete cuando sus dos electrones más externos están

emparejados, es decir, poseen números cuánticos de espín opuestos. Contrariamente, la molécula presenta un estado energético triplete (T_1) cuando sus dos electrones más externos están desapareados o alineados con números cuánticos de espín idénticos. Durante el tiempo de vida de su estado excitado, el FS tiene la capacidad de transferir su exceso de energía a otra molécula presente en el entorno, generando así un estado excitado en esta última. La nueva molécula excitada, durante su tiempo de vida, puede reaccionar con otras especies químicas en el entorno, dando lugar a productos de reacción y finalmente regresando a su estado fundamental tras liberar su exceso de energía al entorno. Cuando una molécula de FS absorbe un fotón, inmediatamente se genera su estado excitado singulete. Este estado evoluciona rápidamente hacia un estado excitado triplete más estable y de mayor duración, que puede colisionar con una molécula de oxígeno en su estado fundamental. Durante esta colisión, mediante un proceso de transferencia de energía por intercambio electrónico, se regenera el FS en su estado fundamental y se forma 1O_2 (Figura 8).

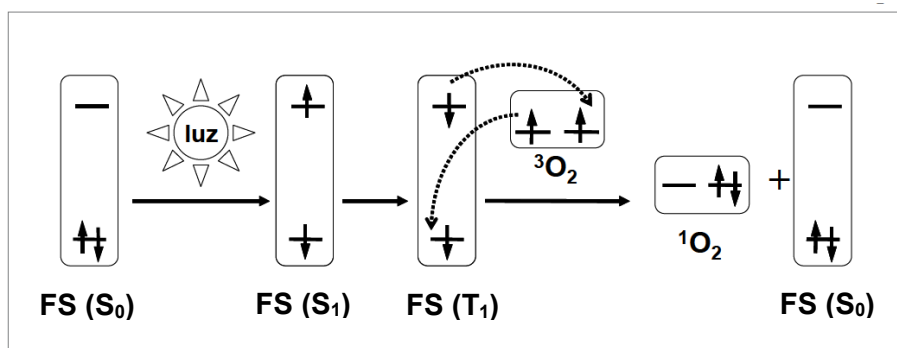


Figura 8. Transferencia de electrones y energía durante la TFD⁷¹

2.13 Mecanismos de muerte celular

La mayoría de las investigaciones sobre los efectos de la TFD se han enfocado en aquellos que llevan a la muerte celular mediante la generación de EROs. Entre estos, el ion superóxido destaca como uno de los principales productos de las reacciones fototóxicas. Dada su vida media extremadamente corta en nanosegundos, esta molécula citotóxica tiene una capacidad de difusión limitada,

alcanzando solo un rango muy reducido de hasta 20 nm en células. Por ende, la localización subcelular del FS determina principalmente qué orgánulos serán afectados^{72 73}.

La apoptosis, un proceso altamente regulado y energéticamente demandante, implica la activación de enzimas hidrolíticas como proteasas y nucleasas, conduciendo a la fragmentación del ADN y la degradación de las estructuras intracelulares. La TFD induce la apoptosis a través de dos vías principales: la vía intrínseca o mediada por mitocondrias, y la vía extrínseca o mediada por el receptor de muerte. La vía mitocondrial predomina cuando el FS se acumula dentro de estos orgánulos, provocando la interrupción del potencial transmembrana mitocondrial y la liberación del citocromo C en el citosol, dando lugar a la formación del complejo apoptosoma. La apoptosis mediada por el receptor de muerte se activa preferentemente cuando el FS se dirige a la membrana celular, desencadenando la multimerización de los receptores de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral especialmente el receptor Fas. El complejo de señalización inductor de muerte compuesto por el receptor Fas, FADD (proteína del dominio de muerte asociado a Fas) y la caspasa 8, emerge como un desencadenante fundamental de la apoptosis. Aunque el papel del gen p53 en la apoptosis inducida por TFD en células tumorales no se comprende completamente, su sobreexpresión resultante de la TFD no parece ser crucial para la muerte celular, sugiriendo una independencia de p53 en este contexto⁷⁴.

En el caso de la necrosis, los componentes citosólicos se liberan en el espacio extracelular a través de una membrana plasmática dañada, provocando una respuesta inflamatoria. Estos productos son posteriormente fagocitados por macrófagos, ya que las membranas intactas inicialmente presentes en las células apoptóticas sirven como barrera. La inflamación aguda generada por la necrosis inducida por TFD podría potenciar la inmunidad al atraer leucocitos del huésped hacia el tumor y aumentar la presentación del antígeno. En este sentido, la necrosis podría ser beneficiosa en el resultado final de la TFD, especialmente en el melanoma, donde la presencia de una alta frecuencia de linfocitos infiltrantes de

tumores se asocia con mejores resultados en pacientes tratados para esta enfermedad⁷⁵.

2.14 Características de los FSs

La mayoría de los FSs tienden a concentrarse en orgánulos celulares distintos al núcleo, reduciendo la probabilidad de inducir carcinogénesis, daño al ADN o mutaciones. En la TFD los FSs se clasifican en tres generaciones, según sus características fotoquímicas y fotofísicas en relación con su mecanismo de acción celular. Los de primera generación suelen provocar daño tisular vascular con efectos secundarios graves, indicando una localización específica limitada en las células diana. Los de segunda generación causan principalmente citotoxicidad en células tumorales, sugiriendo una forma más pasiva de localización en orgánulos como mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico y membrana plasmática. Los efectos secundarios de los FSs de segunda generación son considerablemente menores que los de la primera generación. Los de tercera generación son fármacos fotosintéticos que se han modificado aún más mediante la adición de biomoléculas dirigidas para mejorar su absorción y dirigir la absorción del fármaco a células específicas [87]. Los requisitos esenciales para que un FS produzca eficientemente $^1\text{O}_2$ son los siguientes:

- Absorción intensa de luz UV-Vis, preferiblemente en la región visible entre 400 y 750 nm.
- Alta eficiencia de transición del estado excitado singulete (S1) al estado excitado triplete (T1) del FS Φ_{ISC}
- Tiempos de vida prolongados del estado excitado.
- Elevado rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ ($\Phi\Delta$) en diversos entornos.
- Buena estabilidad térmica y fotoquímica para evitar la descomposición de las moléculas de FS, incluso debido al $^1\text{O}_2$ fotogenerado⁷¹.
- Efectos citotóxicos al fotoactivar la molécula

2.15 Propiedades fotosensibilizantes de la FEO

Las diferencias en la estructura química (**Figura 3**) da como resultado diferencias en las propiedades físicas de los dos tipos de melanina, lo cual sugiere que pueden reaccionar de manera diferente a la excitación por la luz, tanto química como biológicamente. Mientras que la EU actúa como un antioxidante, la FEO es prooxidante⁷⁶. Dicha excitación desencadena la generación de EROs, incluidos radicales superóxido e hidroxilo, mediante la reducción catalizada de oxígeno. Siendo la FEO más eficiente en la producción de oxirradicales que la EU⁷⁷. La excitación del cromóforo de FEO provoca el paso de esta molécula al estado singulete excitado seguida del estado triplete con transferencia de un electrón al oxígeno y la formación del anión superóxido que induce daño oxidativo en el ADN a través de sus productos posteriores, como el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos. La transferencia de excitación al oxígeno daría lugar a $^1\text{O}_2$ capaz de destruir lípidos principalmente hidropéroxido, ácidos nucleicos a través de un residuo de guanina para formar 8-oxo-guanina y aminoácidos (**Figura 9**). Esto explicaría la escasa capacidad fotoprotectora de la piel en el fenotipo pelirrojo.

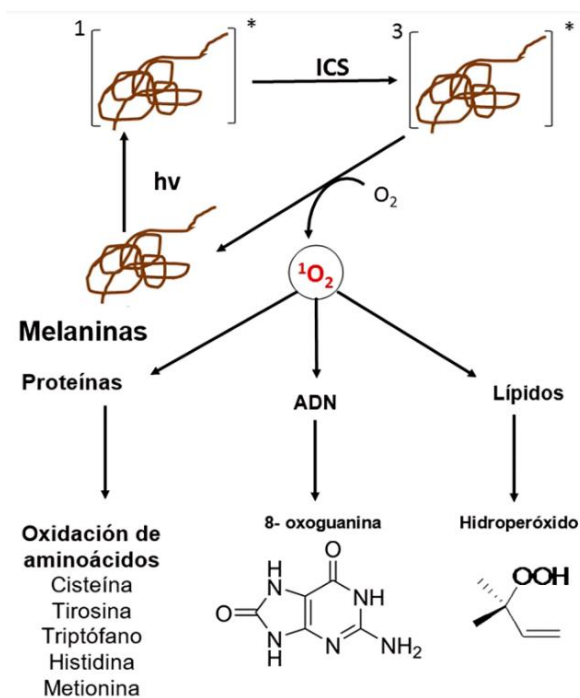


Figura 9. Esquema de los mecanismos de fotosensibilización de la melanina⁷⁸

2.16 Estado del arte

El uso de la luz para el tratamiento de enfermedades tiene sus orígenes en las civilizaciones antiguas. Es a partir de las observaciones de Oscar Raab en 1900 que se propone la idea de la transferencia de la energía de la luz a un pigmento, lo cual da como resultado daño celular. Años más tarde a estos efectos se les llamaron “efectos fotodinámicos”. Siguiendo esta línea de investigación, se puede encontrar los avances importantes de la aplicación de estos principios, en los estudios de Hausmann (1910) ya que demostró que al administrar hematoporfirina (HPD) como FS y exponer la lesión a la luz, logró demostrar la capacidad para destruir las células de la vasculatura tumoral en ratones⁷⁹.

En las siguientes décadas se trabajó en la búsqueda de nuevos FSs, la primera generación de FSs en derivados de la HPD surgió en la década de 1950 con estudios liderados por Schwartz. Descubriendo en sus investigaciones, Schwartz encontró que la HPD no era el componente más activo, sino que los efectos provocados son el resultado de una mezcla de isómeros oligoméricos de porfirinas. Optimizando esta mezcla, Schwartz logró una eficacia superior en los efectos fotodinámicos. En la década de 1960, observaron la acumulación preferencial de HPD en tumores, dando lugar a estudios para detectar tumores mediante fluorescencia⁸⁰.

En la segunda mitad de la década de 1960, Lipson trató con éxito a una mujer con cáncer de mama usando HPD e irradiación tumoral selectiva, marcando el inicio de la TFD oncológica⁸⁰. En la década de 1970, Thomas Dougherty lideró ensayos clínicos de TFD contra el cáncer con HPD, desarrollando formulaciones y métodos de producción a gran escala⁸¹.

Tabla 1. FS con mejores resultados en la TFD contra melanoma

FS	Línea celular	Longitud de onda (nm)	Referencia
ALA	Melanoma humano A375 Carcinoma de piel A431	643	82
ALA	Carcinoma de mama MDA-MB-231 Melanoma humano A375	635	83
ALA	Melanoma de ratón B16	360-410	84
Ruthenium- Porphyrin	Melanoma humano Me300	652	85
Porfirina halogenada	Adenocarcinoma humano WiDr Melanoma humano A375	633	86
Verteoporfina, Fotofrina II Merocianina 540	Melanoma de ratón Cloudman S91/I3 Melanoma humano SKMEL 188	532	87
ZnTPPS4, Cloroaluminio y ALA	Melanoma humano G361	435, 675 y 630	88
Ftalocianina a base de Zn	Melanoma humano Me45	685	89
Hipericina, Tetrasulfonato de cloruro de ftalocianina de aluminio	Melanoma humano A375	594 o 682	90
Ftalocianinas de silicio	Melanoma pigmentado humano SK-MEL-2	670	91
AM y azul de toluidina	Melanoma de ratón B16F10	660	92
Hipericina	UCT Mel-1 y Melanoma humano A375	400 - 315	93
MB - Rutósido	Melanoma humano A375	660	94
Ftalocianina de Zn	Melanoma MeWo y HaCaT	650	95
Verteoporfina	Melanoma de ratón	690	96
ALA	Melanoma de ratón Mel25	420-1400	97
Porfirinas de rutenio	Melanoma humano Me300	652	98
Ftalocianina	Melanoma humano M6	630-780	99
Metaftalocianina y ALA	Melanoma humano A375	680	100

Los primeros estudios de TFD en el tratamiento del melanoma *in vitro* e *in vivo* datan de 1994¹⁰¹ (**Tabla 1**), sin embargo, estas investigaciones toman relevancia partir de 2007 favorecida por el desarrollo de nuevos FSs. Desde entonces los investigadores han explorado diversas combinaciones de FSs y fuentes de luz, así como la optimización de las condiciones de tratamiento. Varios trabajos han demostrado

prometedores resultados en la aplicación de la TFD en modelos celulares *in vitro*. Los principales FSs utilizados en la TFD anti-melanoma incluye porfirinas, ftalocianinas y clorinas (**Tabla 2**), a continuación, se describen algunos trabajos donde se aplicó la TFD contra melanoma y que han reportado buenos resultados.

En el estudio de Ndhundhuma y Abrahamse (2016), se comparó la fotosensibilidad de las células de melanoma humano ante la hipericina a diversas concentraciones, tanto individualmente como con irradiación láser a 682 nm, durante 1, 4 y 24 horas. Se observó una supervivencia celular superior al 60% en todos los tiempos de incubación. La combinación de FSs y láseres resultó en una disminución estadísticamente significativa de la supervivencia celular, demostrando que hipericina es eficaz como inductor de muerte en células de melanoma⁹⁰.

En el estudio de Cai *et al.* (2018), se exploraron los efectos de la TFD con ácido delta-aminolevulínico (ALA) en las células de melanoma humano A375 y no melanoma A431. Se observó que la TFD con ALA inhibió la supervivencia y promovió la apoptosis a través de la vía apoptótica mitocondrial intrínseca, con participación de la vía apoptótica dependiente de caspasa-8 en ambas líneas celulares⁸².

Joanna Nackiewicz *et al.* (2018) investigaron los efectos citotóxicos de la ftalocianina a base de Zn activada con láser de diodo ($\lambda=685$ nm) en células de melanoma y fibroblastos humanos normales. Las concentraciones altas de este FS redujeron la viabilidad celular en aproximadamente un 50%, indicando su potencial para inducir muerte celular por apoptosis inducida por ROS en células de melanoma⁸⁹.

En el estudio de Santos *et al.* (2018), se evaluaron los efectos de la TFD en el melanoma murino B16F10. Los resultados mostraron que la TFD indujo estrés oxidativo, promoviendo la autofagia y reduciendo significativamente la proliferación celular en el melanoma B16F10⁹².

En el estudio de Khorsandi *et al.* (2020), se investigó el efecto del rutósido en la terapia combinada con AM asistida por tratamiento fotodinámico en células de melanoma humano A375. La combinación del AM y rutósido mostró mejores efectos citotóxicos y antiproliferativos en células de melanoma en comparación con cada fármaco por separado, sin afectar significativamente a los fibroblastos dérmicos humanos⁹⁴.

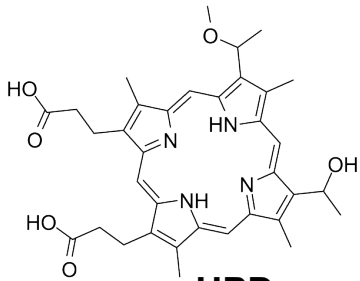
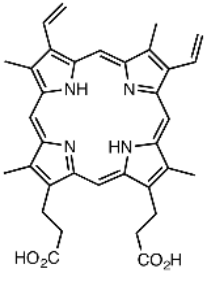
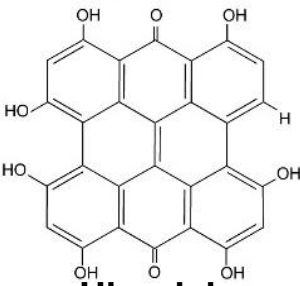
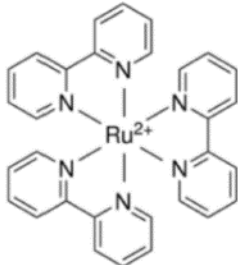
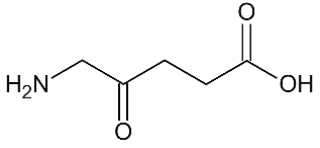
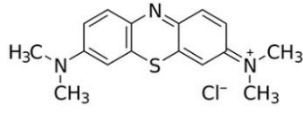
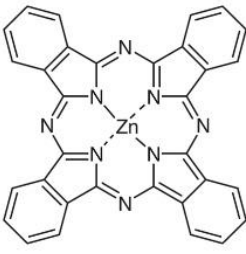
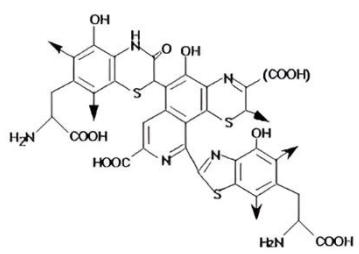
Zeinali *et al.* (2021) investigaron los efectos de la TFD en células de melanoma humano (MeWo) y queratinocitos humanos normales (HaCaT) utilizando Zinc (II)-tetra-terc-butil-ftalocianinato. La TFD con este FS demostró ser citotóxica para las células de melanoma, con bajos efectos en células HaCaT, mostrando su potencial como terapia selectiva para el melanoma. Además, los resultados mostraron que el ZnPc fotoactivado a una concentración de 12,5 μM redujo la viabilidad celular de la línea celular MeWo hasta aproximadamente el 50%. También mostró bajos efectos letales en células HaCaT⁹⁵.

Otros estudios han desarrollado nanopartículas para investigar el potencial de la generación de oxígeno singulete y evaluar el efecto de fototoxicidad en melanoma, como ejemplos tenemos a Da Silva *et al.* que probó nanopartículas de PpIX en una línea celular de melanoma murino, logrando una fototoxicidad excelente sin citotoxicidad en la oscuridad¹⁰².

A pesar de los avances, la TFD para el melanoma todavía enfrenta desafíos importantes. Estos incluyen la necesidad de mejorar la absorción y selectividad del FS, así como la optimización de las dosis, las condiciones de tratamiento y el manejo de la interferencia de la melanina para garantizar la máxima fotoactivación del pigmento.

Por otro lado, algunos trabajos han demostrado los efectos FSs propios de la melanina, siendo más eficiente la fotosensibilización de la FEO en comparación con la EU¹⁰³.

Tabla 2. FS y sus rendimientos cuánticos de estados tripletes.

FS	Rendimiento cuántico (T ₁)	FS	Rendimiento cuántico (T ₁)
 <p>HPD</p>	0.52	 <p>PpIX</p>	0.05
 <p>Hipericina</p>	0.1	 <p>Rutenio</p>	0.5
 <p>ALA</p>	0.1	 <p>AM</p>	0.56
 <p>Ftalocianina de Zinc</p>	0.65	 <p>FEO</p>	No reportado

En el trabajo de Chiarelli-Neto et al. (2014) menciona que la luz visible no es segura para la piel, aunque varias líneas de evidencia sugieren lo contrario, en su trabajo muestra que la luz visible puede dañar los melanocitos a través de la fotosensibilización de la melanina y la generación de oxígeno singulete con la luz UVA (355 nm) y visible (532 nm) la melanina se fotosensibiliza con rendimientos similares, siendo la FEO más eficiente que la EU en la generación $^1\text{O}_2$ y en resistir el fotoblanqueo. La FEO es más eficiente en la producción de oxiradicales que la EU⁷⁸.

En el 2022 Fuentes López *et al.* emplearon nanopartículas de FEO como sensibilizadores para inhibir el crecimiento de la bacteria Gram- negativa *E. coli*, expuesta a la radiación azul y UVA, logrando la inactivación de estas bacterias respecto a su control¹⁰⁴.

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

Líneas celulares: Para el desarrollo de este proyecto se utilizó la línea celular A375 (ATCC® CRL-1619™), es una línea celular de origen humano que se deriva de un melanoma maligno amelanótico; estas son células adherentes que crecen en forma de monocapa, y son ampliamente utilizadas en investigaciones de cáncer de piel y biología celular por su estabilidad genética (**Figura 10**). Se ha utilizado también para estudiar procesos como la proliferación celular, la invasión, la metástasis y la respuesta a tratamientos terapéuticos.

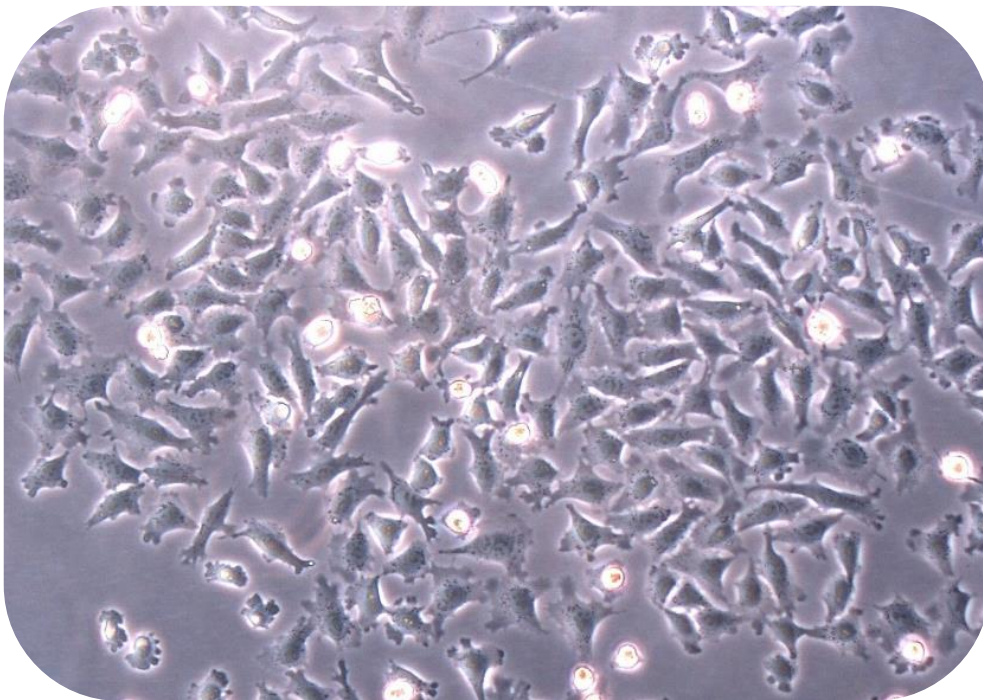


Figura 10. Línea celular A375 melanoma humano

Melanina: Se utilizó melanina extraída del cabello de 13 personas pelirrojas, a través del método de ácido-base. El polvo de melanina se almacenó a temperatura ambiente en ausencia de luz y para su uso se disolvió en DMSO (Sigma Aldrich for molecular biology) en concentración de 10 mg/mL.

3.2 Cultivo celular

El medio base para esta línea celular es el Medio Eagle (Gibco) modificado de Dulbecco (DMEM). Fue complementado con suero bovino fetal (E.R.) a una concentración final del 10%, 1 mM de piruvato de sodio (Gibco), 1500 mg/L de bicarbonato de sodio (KARAL) y 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma Aldrich), incubadas en una atmósfera de humedad y CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C (Termo Scientific MIDI 40).

3.3 Cuantificación de melanina basal

La espectroscopía de absorción es el método más ampliamente utilizado para cuantificar la melanina en una solución. Después de solubilizar la melanina de muestras de células en NaOH 1 M (HYCEL) y DMSO al 10%, la cantidad total de la melanina se estimó espectrofotométricamente analizando la absorbancia en el lector de microplacas (BioRad, iMark Reader).

Procedimiento

Se tomaron 2.5×10^6 células y se centrifugaron a 2 000 rpm durante 10 min, se desechó el medio de cultivo y se lavó el pellet con 0.5 mL de PBS 1X; posteriormente se centrifugó a 2 000 rpm durante 10 min, para desechar el sobrenadante. Las células del pellet fueron suspendidas en 0.2 mL de NaOH 1M con 10% (v/v) de DMSO, y se incubaron por una hora a 80°C agitándose en vortex; por último, las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 min y se procedió a la medición del espectro de absorción del sobrenadante a 410 nm en el lector de microplacas.

3.4 Extracción de melanina por método ácido-base

La extracción ácido-base es la técnica más eficaz para separar compuestos orgánicos a partir de sus propiedades ácidas o básicas, está basada en el empleo de disoluciones ácidas o alcalinas capaces de convertir selectivamente determinadas sustancias en compuestos solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos.

Procedimiento

Las 13 muestras de cabello fueron clasificadas según su color en 6 grupos, posteriormente se procesaron. Primero se cortaron en trozos de 2 a 5 mm para posteriormente lavarlo con acetona (KARAL) 3 veces, se dejó secar a temperatura ambiente (entre los 20 y los 25 °C); posteriormente se pesaron 25 gramos de cabello para sumergirlo en una solución de NaOH al 1 M durante 24 horas a 37°C. La sustancia obtenida se centrifugó a 13 000 rpm durante 8 minutos para eliminar el material insoluble. El sobrenadante se filtró y la melanina se precipitó al bajar el pH a 1,0 con HCl (KARAL) concentrado. El material sólido se lavó con 0.1 M HCl y luego se disolvió en 100 mL de NaOH al 1 M. Se añadió nuevamente HCl para precipitar la melanina. Este proceso de disolución de base, precipitado con HCL, y el lavado en ácido se repitió diez veces, por último, el sedimento se lavó con etanol y se disolvió en metanol para posteriormente dejar evaporar el líquido y producir el polvo de melanina.

3.5 Caracterización de la melanina

3.5.1 Espectro de absorción UV- VIS

Las muestras de melanina: FEO extraída del cabello pelirrojo y EU sintética para cultivo (Sigma Aldrich) se disolvieron cada uno en DMSO a una concentración de 10 mg/mL. Las mediciones de absorción se realizaron en un equipo de Espectroscopia UV-Vis (NanoDrop 2000 thermo Scientific). Se calibró con el DMSO

como blanco, posteriormente se seleccionó el rango de medición de 200 nm a 750 nm. El volumen de la muestra medida fue de 1 μ l.

3.5.2 Espectroscopía RAMAN

La caracterización química de las muestras de melanina se llevó a cabo mediante espectroscopía Raman. Para obtener las señales Raman puras, se restaron las emisiones de fondo de autofluorescencia de los espectros de melanina sin procesar. Los espectros Raman se obtuvieron utilizando el equipo Alpha300 R (WiTec). Las mediciones se realizaron para las muestras de melanina en polvo previamente pegadas sobre una cinta de carbono (UNLINE). Los espectros se obtuvieron desde 1 000 cm^{-1} hasta los 2 500 cm^{-1} . Se espera encontrar las bandas 1 (1 360 cm^{-1}) y banda 2 (1 580 cm^{-1}) que se han atribuido al estiramiento lineal de los enlaces C-C dentro de los anillos aromáticos y al estiramiento en el plano de los anillos aromáticos, respectivamente.

3.5.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis se realizó en el equipo Thermo Scientific™ Nicolet™ iS20 FTIR Spectrometer utilizando el accesorio para polvos ATR con cristal de diamante en el modo de transmitancia, las muestras se analizaron colocándolas directamente sobre el cristal y se realizó una lectura de la transmitancia desde los 700 nm hasta los 3 500 nm.

3.6 Determinación del tiempo de incubación para la absorción máxima del FS

El cultivo celular se incubó hasta obtener una confluencia del 80%, posteriormente se tripsinizó y se sembraron 1 x 10⁶ células en frascos de cultivos nuevos con medio DMEM, posteriormente se incubó por 24 horas, a 37°C en un ambiente con 5% CO₂, (Figura 11).

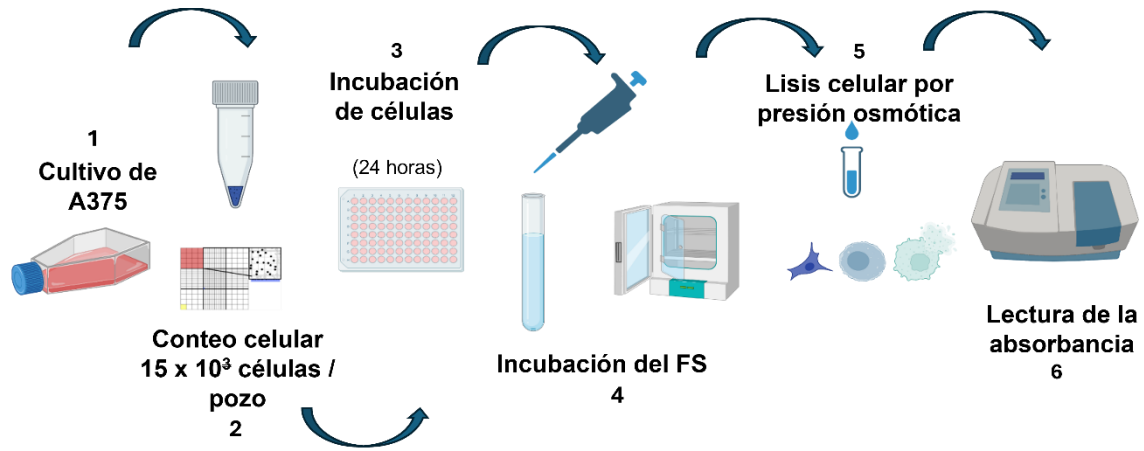


Figura 11. Procedimiento para el rastreo del FS

Después de las 24 horas de incubación las células se expusieron a los FSs, los AM, EU y FEO (los espectros de absorción se muestran en la **(Figura 12)** de acuerdo con los parámetros descritos en la **Tabla 3** “Parámetros utilizados en la TFD contra células de melanoma”. Pasando el tiempo de incubación con cada FS se procedió a tripsinizar las células para obtener el botón celular. Las células fueron lisadas por presión osmótica al resuspender el pellet con 200 μ L de agua inyectable (PISA) y sonicación (Luzeren) por 15 minutos en el caso de AM. La medición de la EU y la FEO se llevó a cabo con la técnica utilizada para la medición de melanina basal. Por último, se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min y se retiraron 100 μ L del sobrenadante para leer la absorbancia.

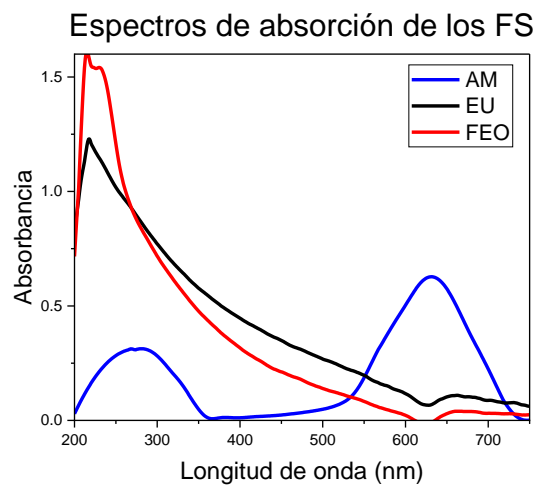


Figura 12. Espectro de absorción de los FSs utilizados

Para llevar a cabo el análisis, las muestras en polvo de FEO fueron disueltas en DMSO a una concentración de 10 mg/mL. Se analizó la FEO extraída de cabello pelirrojo mediante el método de extracción ácido-base.

Tabla 3. Parámetros utilizados en la TFD contra células de melanoma

FS	AM	EU	FEO
Concentración	20 μ M	10 mg/mL	10 mg/mL
Incubación	60 min	24 horas	24 horas
Fluencia	60 J/cm ²	60 J/cm ²	60 J/cm ²
Longitud de onda	630 nm	460 nm	460 nm

3.7 Aplicación de la TFD

Una vez que el cultivo celular alcanzó una confluencia del 80% se procedió a tripsinizar agregando 500 μ L de tripsina (Gibco); se bloqueó la acción de la tripsina agregando 1 mL de medio de cultivo complementado (**Figura 13**). El botón celular se recuperó después de centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavó dos veces con PBS 1X. El pellet se resuspendió con 1 mL de medio de cultivo y se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer (Hausser Cientific). Se sembraron 1.5×10^4 células por pozo en una microplaca (100 μ L por pozo) siguiendo la configuración establecida del dispositivo LED que se describe en la sección 3.8 y se dejaron incubar por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se lavó cada pozo con 100 μ L de PBS 1X y se agregó el FS a la concentración y con el vehículo correspondiente, el FS se dejó incubando (melanina 24 horas y AM 1 hora) dentro de la incubadora (Thermo Scientific Midi 40).

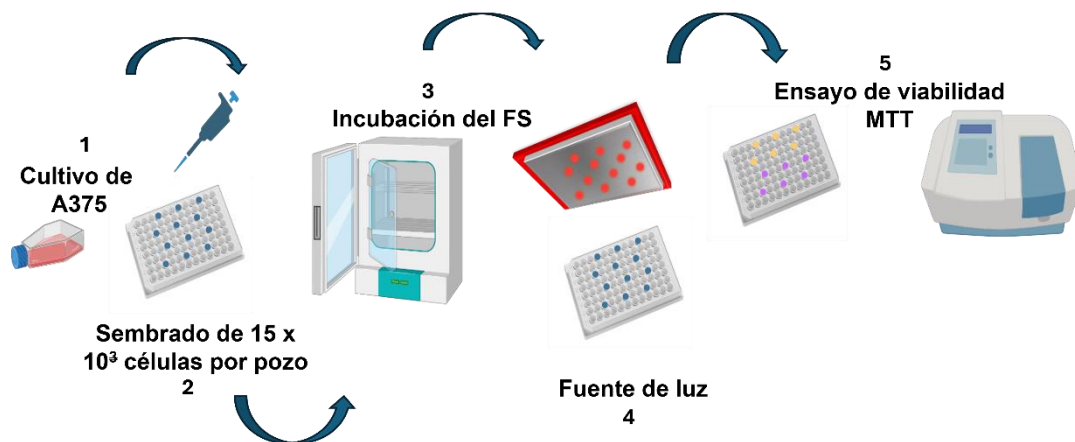


Figura 13. Metodología de la aplicación de la TFD

Posterior a la incubación con el FS, se lavó dos veces con 100 μ l de PBS 1X a cada pozo. Para la irradiación, el cultivo se mantuvo con 100 μ L de PBS. 1X siguiendo con los parámetros establecidos en la **Tabla 3**.

3.8 Fuente de luz

Se emplearon dos dispositivos lumínicos diseñados y elaborados en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica. Estos dispositivos están conformados en cada caso por un arreglo matricial de 12 LED's que emiten a una longitud de onda de 630 nm (rojo) y 460 nm (azul). El diseño del dispositivo permitió acoplarse perfectamente a microplacas de 96 pozos.

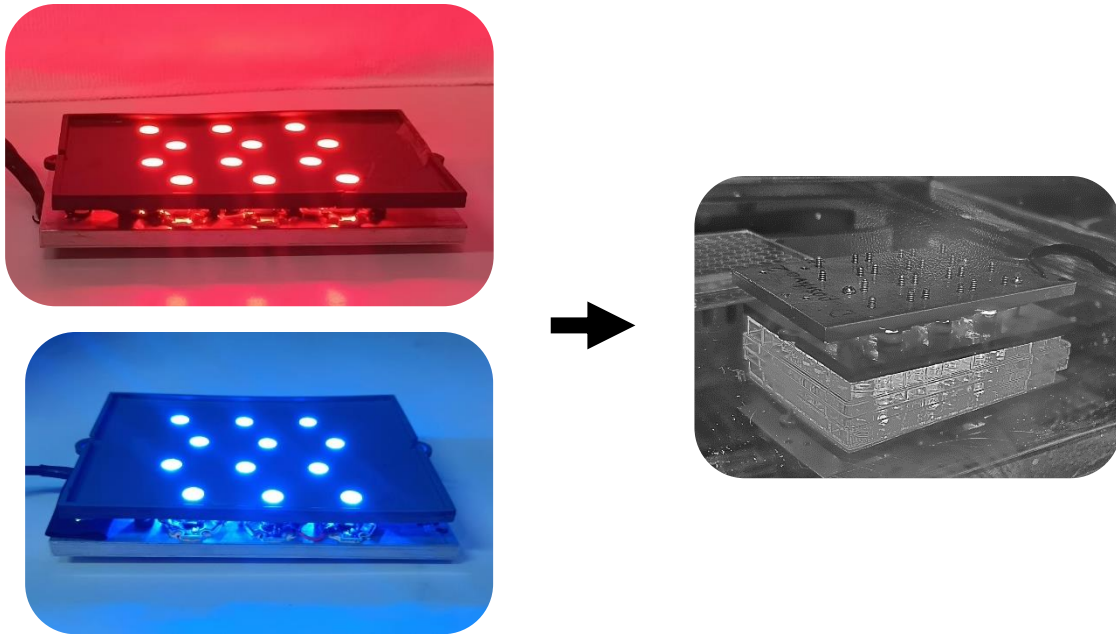


Figura 14. Fuente de luz acoplada a microplaca de 96 pozos

Prueba de viabilidad

La viabilidad celular se midió usando el ensayo colorimétrico de MTT (Sigma Aldrich). Este método permite medir la viabilidad celular basado en la reducción del MTT (sal de tetrazolio de color amarillo) por la actividad del succinato deshidrogenasa mitocondrial y otras reductasas de las células, a una sal de formazan de color azul. Se disolvió la sal de tetrazolio en una solución de PBS 1X a un pH de 7.2 para una concentración de 1 mg/mL. Se esterilizó por filtración con filtro para jeringa de PFTE 0.22 (COBETTER) y se almacenó en refrigeración a -4°C, a cada pozo de las células tratadas y los controles, se les eliminó el medio de cultivo y se les adicionó 100 µL de MTT a una concentración de 100 µg/mL. Las placas se incubaron por 4 h a 37°C, transcurrido ese tiempo se removió el medio y se agregaron 100 µL de isopropanol (KARAL) ácido (pH de 4.0), posteriormente se colocaron las microplacas en un agitador (CScientific) a 100 rpm durante 10 minutos para disolver los cristales del colorante que se formaron. Se realizó la lectura de la absorción a 595 nm y se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Abs. del problema} \times 100}{\text{Abs. del testigo}}$$

Donde:

Abs = Absorbancia a 590 nm

3.9 Análisis estadístico

Para realizar las comparaciones entre los grupos (células sin interacción, control irradiación, control FS, TFD) se calcularon las medias estadísticas, así como la desviación estándar y se calculó el coeficiente de variación. Se llevo a cabo una comparación estadística entre el grupo control y los tratamientos. Para determinar si existía una diferencia significativa entre tratamientos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el método Post hoc de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

4.1 Caracterización de la melanina

El procesamiento de las muestras de cabello resultó en la obtención de un polvo rojizo/marrón (**Figura 15**). Las muestras obtenidas resultaron con un rendimiento promedio de aproximadamente el 3.2% de la masa original del cabello. Las extracciones mostraron solubilidad tanto en soluciones alcalinas (NaOH 1 M) como en DMSO.



Figura 15. Extractos de FEO a partir de cabello pelirrojo.

Una vez disuelta la melanina en DMSO se midió su absorbancia. En la **Figura 16** se presentan los resultados de estas mediciones, los cuales revelan una intensa absorción en la región UV que disminuye hacia el infrarrojo. Las extracciones de FEO presentan un pico máximo promedio en la región de los 256 nm, muy cercano al estándar de EU en el cual el pico máximo es de 260 nm. La tendencia de los espectros coincide con el estándar de EU, excepto por la ausencia del segundo pico que solo está presente en todas las muestras de FEO alrededor de los 270 nm. Las muestras analizadas del 1 al 6 exhiben variaciones en la absorbancia, tomando en cuenta la banda que va de los 450 a 460 nm, las muestras presentan una absorción de 0.12 a 0.25, llegando la EU hasta una absorción del 0.3.

Sin embargo, se destaca que la muestra "5" presentó una absorción más pronunciada en la región del 450 nm en comparación con las muestras 1, 2, 3, 4 y

6. Por lo tanto, la muestra "5" fue considerada como el extracto más adecuado para los siguientes ensayos.

Espectro de absorción de las muestras de melanina

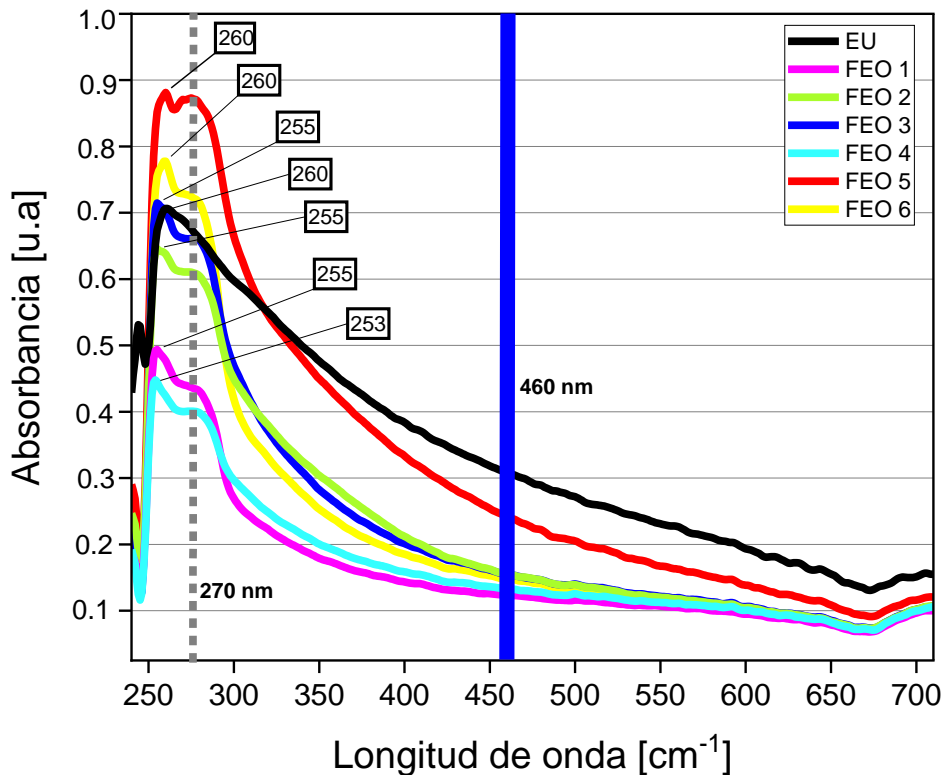


Figura 16. Espectro de las diferentes muestras de melanina, color negro EU y muestras del 1 - 6 extracciones de FEO, línea vertical azul representa la longitud de onda del dispositivo de iluminación

Los resultados de la espectroscopia Raman mostraron una caracterización detallada de las propiedades vibracionales de la melanina de la muestra en polvo confirmando la presencia de melanina en las extracciones de la muestra 5 (**Figura 17**). Los espectros muestran de manera evidente los picos distintivos de la EU, en la región de 1407 cm^{-1} a 1589 cm^{-1} que se atribuyen al estiramiento en el plano de los anillos aromáticos y al estiramiento lineal de los enlaces C-C dentro de dichos anillos, respectivamente. Además, se identifican contribuciones de las vibraciones C-H en los grupos metilo y metileno. También se observan picos máximos en la posición 543 , 1138 y 1448 cm^{-1} los cuales son característicos de la FEO.

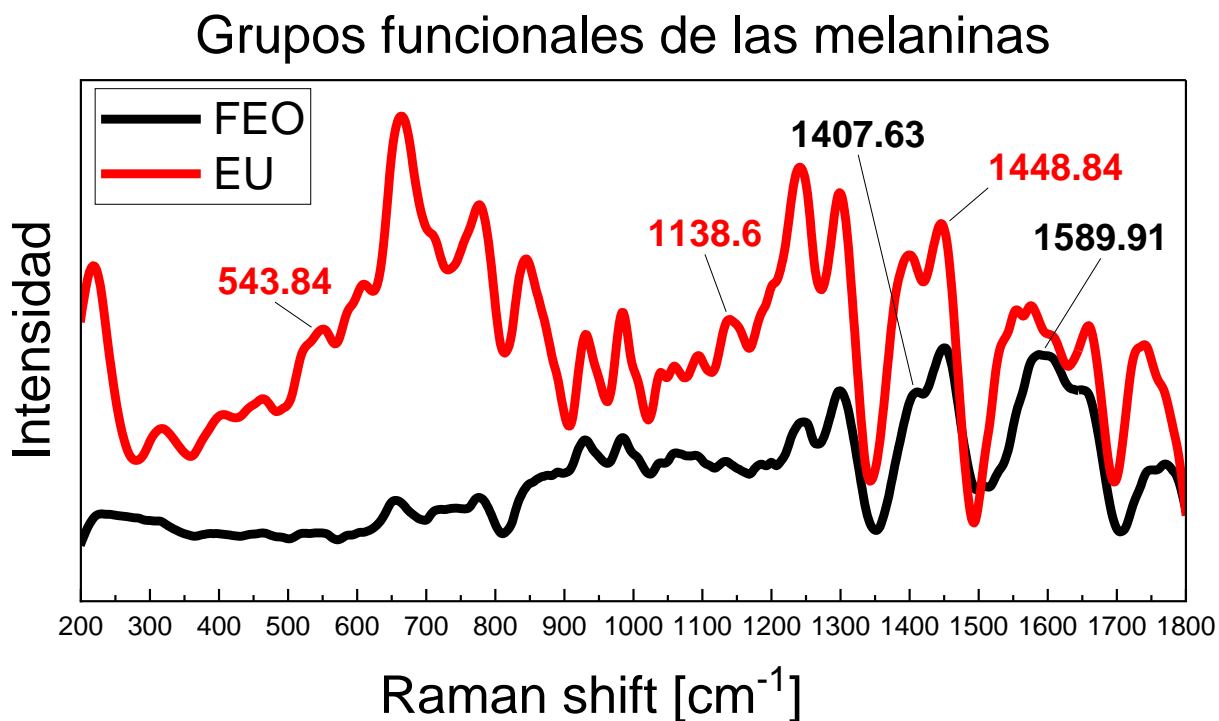


Figura 17. Espectro Raman de las muestras de Melania (excitación con 785 nm), procesadas a través del análisis de la segunda derivada y suavizado de la línea.

Los resultados de espectro infrarrojo FTIR de la muestra 5 y de la melanina comercial mostraron picos en la región de la vibración de estiramiento de los grupos alifáticos C-H, localizándose a 2840 cm^{-1} para la EU y a 2830 cm^{-1} para la FEO. Además, se registraron vibraciones de los enlaces aromáticos C = C y C = O a 1604 cm^{-1} para la EU, mientras que en la FEO se ubicaron a 1635 cm^{-1} (Figura 18).

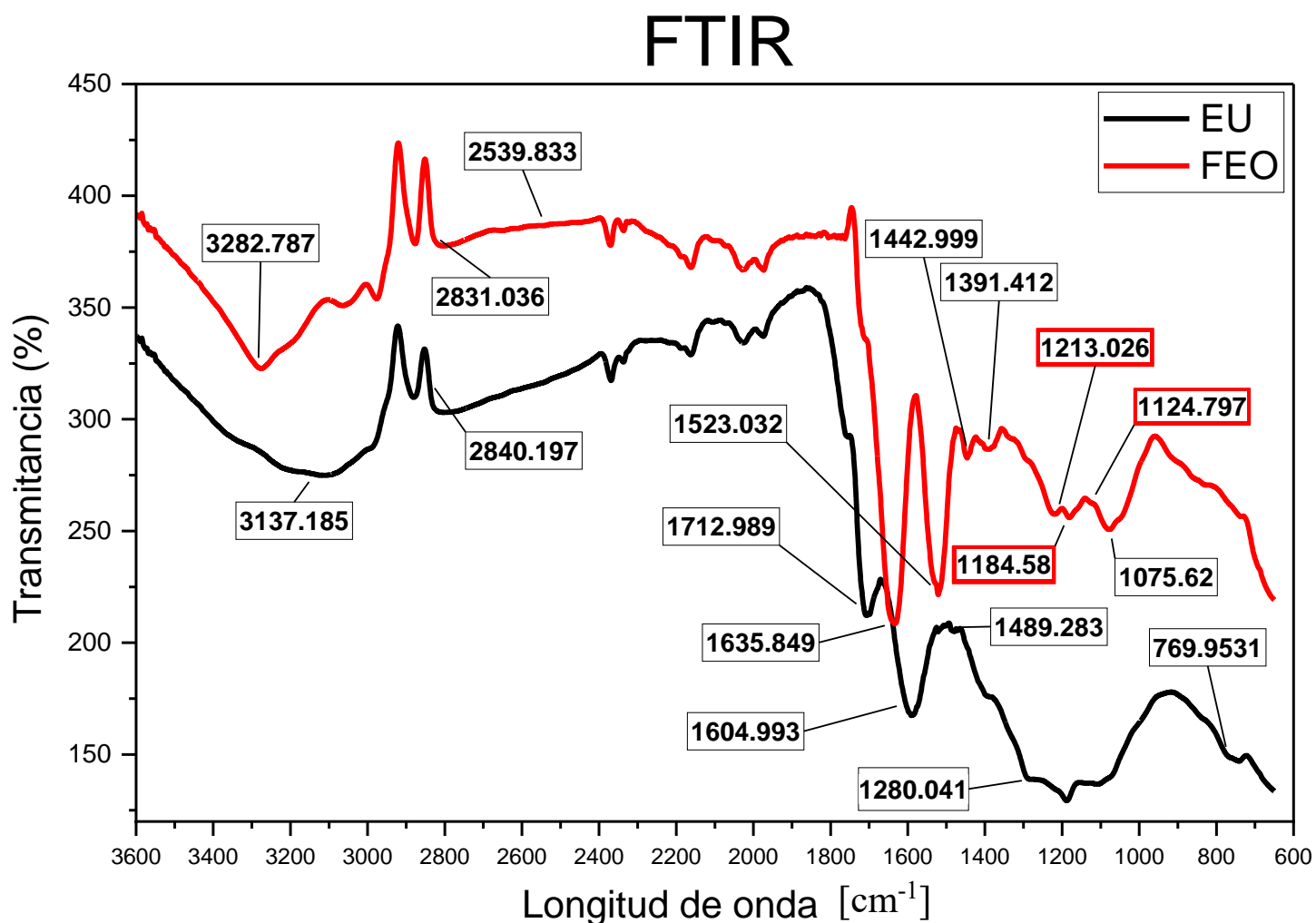


Figura 18. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de las muestras de melanina, procesadas con un suavizado de línea

Las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH y -NH, asociados con funciones amino, amina, amida, ácido carboxílico, fenólico y aromático presentes en los sistemas indólico y pirrólico, mostraron una banda similar con un pico máximo a 3 282 cm^{-1} para la FEO y a 3 137 cm^{-1} para la EU. La región característica de la FEO abarca desde los 1 000 cm^{-1} hasta los 1 300 cm^{-1} , identificándose la vibración de los enlaces S-O, resultado de la oxidación de grupos sulfónicos, evidenciada por picos ubicados en 1124, 1184 y 1213 cm^{-1} . Para diferenciar la EU de la FEO, se observaron vibraciones específicas de la EU, como los enlaces C=O de los ácidos carboxílicos (COOH) en 1712 cm^{-1} y la vibración del enlace C-H en 1280 cm^{-1} . Asimismo, se destaca la vibración de los enlaces C-H de los anillos aromáticos en 769 cm^{-1} . Estas características distintivas permiten una clara discriminación entre la EU y la FEO en el análisis infrarrojo de las muestras.

4.2 Cuantificación intracelular del FS

Las pruebas espectrofotométricas permitieron comprobar la internalización del FS y el periodo de incubación para lograr una máxima concentración intracelular del FS en la línea celular de melanoma A375. En la **Figura 19** se puede observar el botón celular en donde se nota la retención del AM, lo que se confirmó al observar, al microscopio las células del cultivo posterior al periodo de incubación.

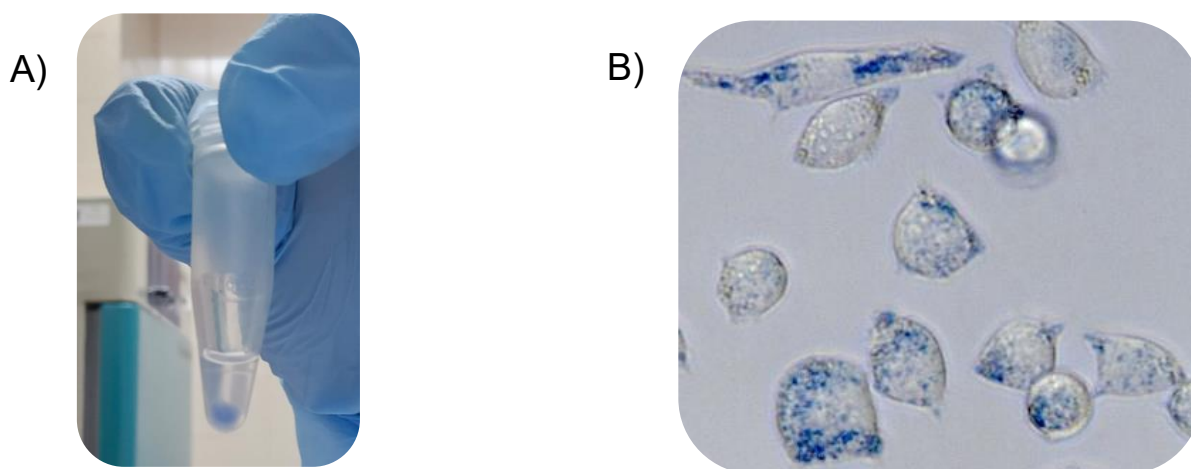


Figura 19. A) Botón celular con AM, B) células con AM intracelular a 40X

Después de exponer las células al AM se evidenció un incremento en la absorción del FS después 30 min, se registró una absorción de 0.23, después de 60 minutos de la incubación, se logró alcanzar un 0.41 (**Figura 20**). Este dato es mayor que la registrada después de 90 minutos de incubación, donde se observó una disminución en la concentración intracelular del FS de un 0.35, por tal razón se eligió el periodo de 60 min como óptimo para la incubación del FS.

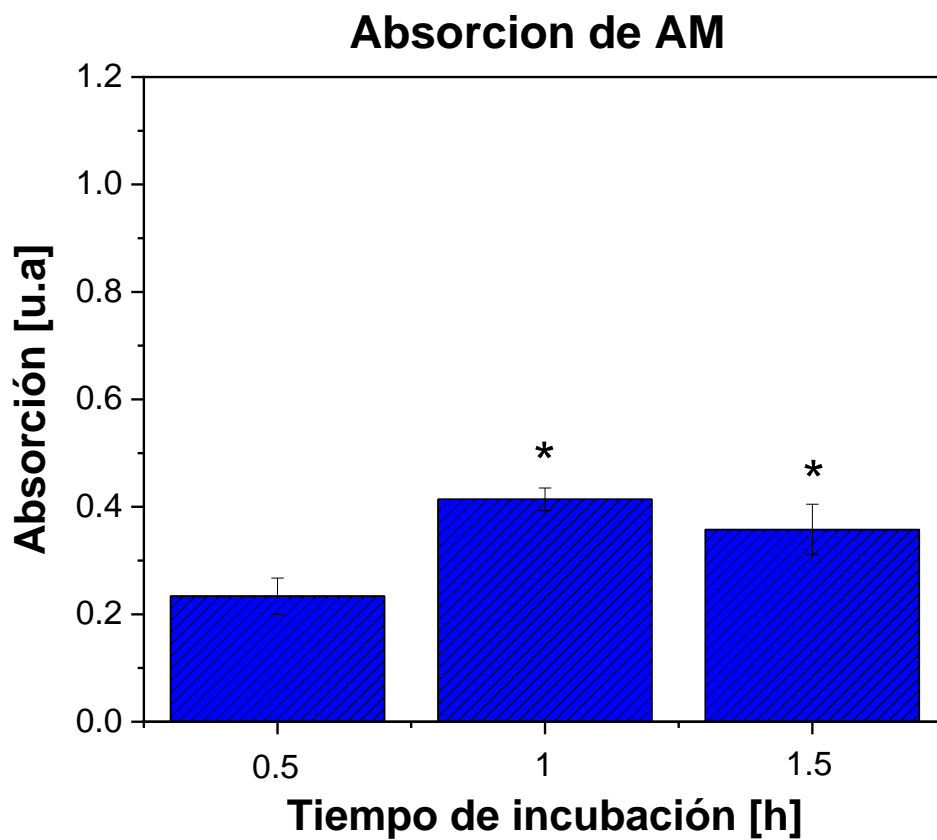


Figura 20. A) Absorción del AM a una concentración de 20 μM con diferentes tiempos de incubación, analizado con ANOVA, la diferencia significativa es respecto primer tiempo de incubación de 30 min * $p < 0.05$

En el caso de las melaninas utilizadas como FSs, los tiempos de incubación necesarios para alcanzar la máxima concentración intracelular fueron mayores que los requeridos para el AM. En primer lugar, se cuantificó la melanina basal de la línea celular A375, resultando en una concentración del 0.08.

Posteriormente las células se expusieron a los extractos de FEO, tras la incubación se pudo observar que el aumento de la FEO intracelular después de los períodos de una y cuatro horas fue mínimo, registrando el valor de 0.01. Debido a esto, se extendió la incubación hasta 24 horas, logrando una concentración intracelular de FEO del 0.5 (**Figura 21**). Este periodo se toma como parámetro para aplicar la TFD.

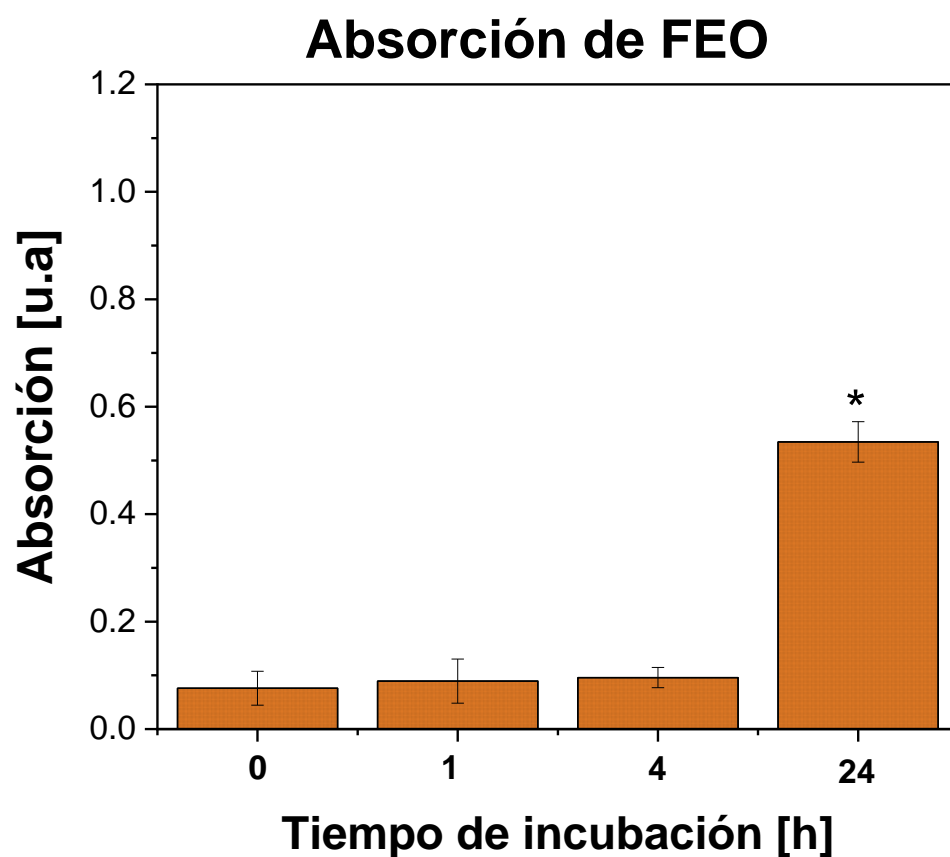


Figura 21. Acumulación intracelular de FEO analizado con ANOVA, la diferencia significativa es respecto a la melanina basal "control" *p<0.05

Posteriormente, tras exponer las células a la EU durante una hora, se observó un incremento del 0.1 en la concentración intracelular de la EU, para unificar los parámetros de la TFD para ambas melaninas, el tiempo de incubación para EU se extendió a 24 horas, en este periodo la concentración alcanzó el 0.95 (**Figura 22**).

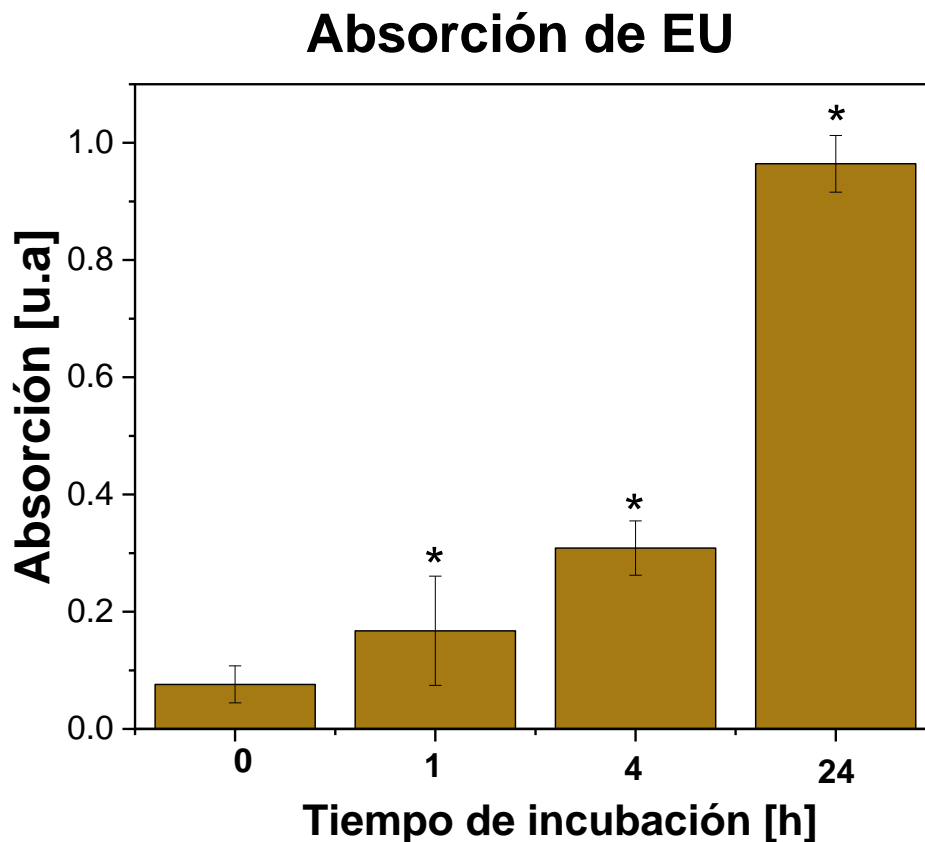


Figura 22. Figura Acumulación intracelular de EU analizado con ANOVA, la diferencia significativa es respecto a la melanina basal "control" *p<0.05

4.5 Eficiencia de la TFD

La TFD aplicada con AM mostró una efectiva inhibición de las células de melanoma, como se ilustra en la **Figura 23**. La viabilidad celular se vio notablemente afectada bajo los parámetros previamente establecidos: una concentración de 20 μM de AM, 60 minutos de incubación e irradiación con una dosis de 60 J/cm^2 con luz a una longitud de onda de 633 nm, resultó en una reducción de la viabilidad celular del 75% en comparación al control sin tratamiento. Comparativamente, el grupo de control FS también mostró una disminución significativa en la viabilidad celular del 15% respecto a las células sin interacción. Además, en el grupo expuesto únicamente a irradiación también exhibió una disminución en la viabilidad celular del 10%.

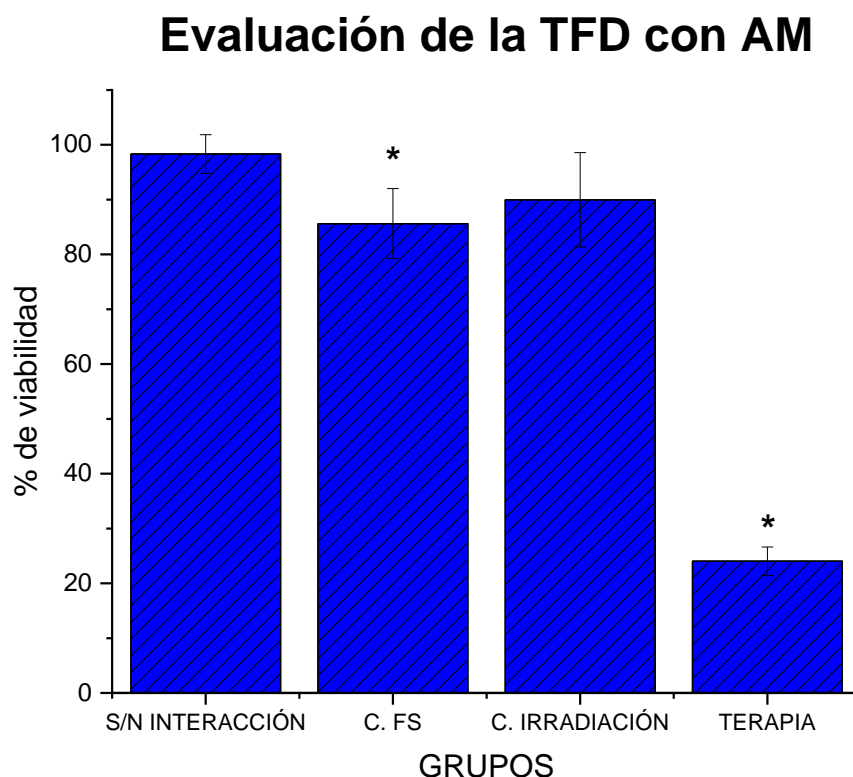


Figura 23. Resultados de la viabilidad celular en células de melanoma A375, después de ser sometidas a TFD empleando AM como FS. La diferencia significativa se analizó con respecto al control sin interacción * $p < 0.05$

En los ensayos de TFD empleando EU como FS, fue notable que a pesar de la eficaz absorción de la EU por las células de melanoma A375, la TFD no afectó significativamente la viabilidad celular como se evidencia en la **Figura 24**, que revela una reducción de la viabilidad celular del 12% en el grupo de TFD a partir de los datos de ensayo MTT. Este resultado también se observó en el grupo tratado solo con DMSO, mostrando una reducción en la viabilidad celular de 20%. Los controles con solo irradiación o solo EU no mostraron diferencias significativas con respecto al control.

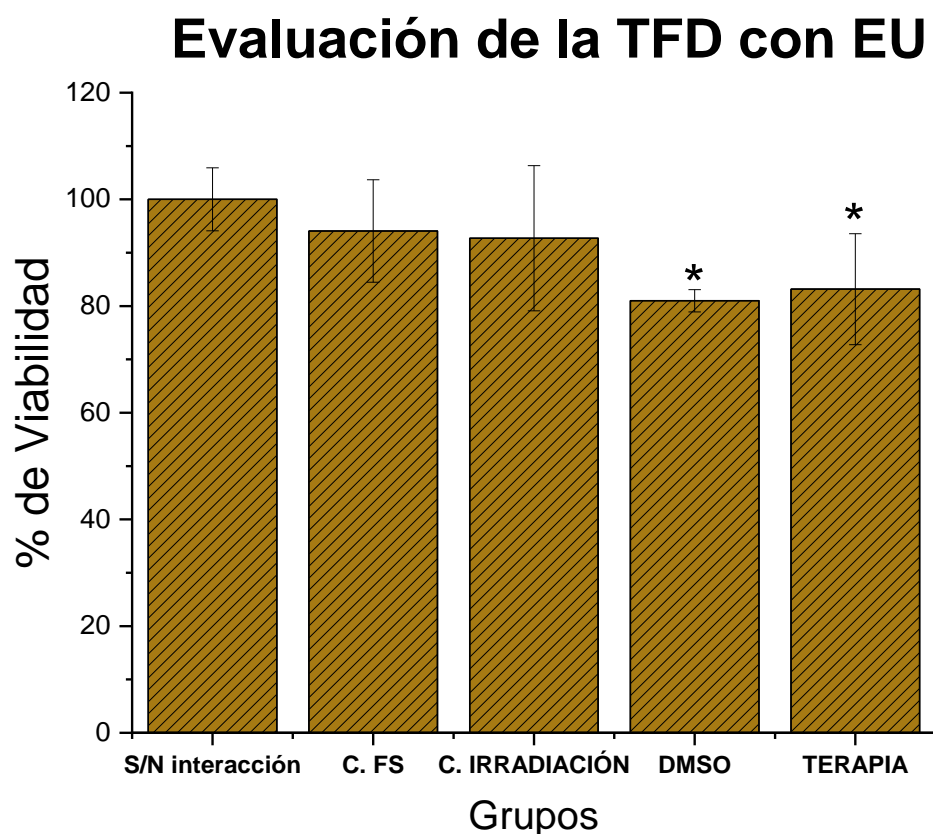


Figura 24. Resultados de la viabilidad celular en células de melanoma A375, después de ser sometidas a TFD empleando EU como FS. La diferencia significativa se analizó con respecto al control sin interacción * $p < 0.05$

Sin embargo, al emplear la extracción de FEO de la muestra 5 como FS, se observó una marcada reducción en la viabilidad celular al aplicar la TFD (**Figura 25**). Se logró una disminución del 50% en la viabilidad celular en comparación con el grupo control de las células sin interacción. Se observó un efecto similar tanto en el control FS, como en las células expuestas a DMSO, con una reducción del 23.5% y 18.5% respectivamente. Tomando en cuenta que estos datos muestran un daño a los cultivos celulares propios del DMSO. Se hace necesario la comparación del grupo de la TFD con el grupo control FS, y se observa una disminución de la viabilidad de un 35%, al restar el daño producido por el DMSO.

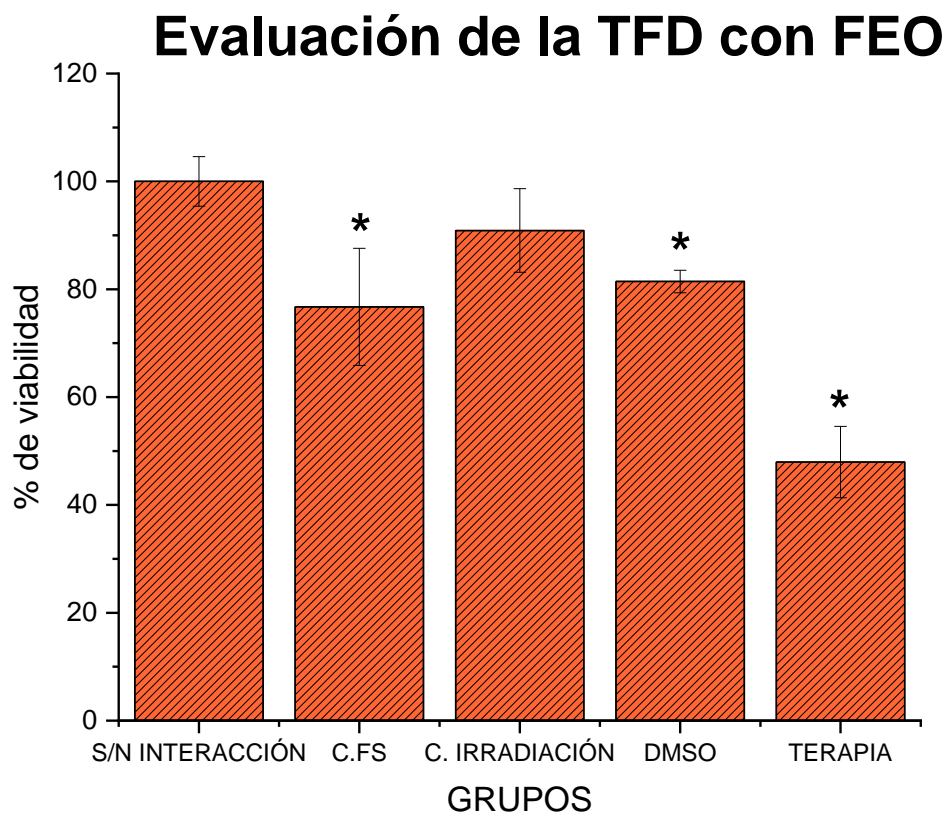


Figura 25. Resultados de la viabilidad celular en células de melanoma A375, después de ser sometidas a TFD empleando AM como FS. La diferencia significativa se analizó con respecto al control sin interacción

4.6 Efectos en la morfología celular

Posterior a la incubación de las células expuestas a las melaninas se presenta un cambio. A través de fotografías de los cultivos celulares, se pueden observar en las células “control” los gránulos presuntivamente de melanina basal que normalmente están presentes en la línea celular A375, resaltando de color rojo zonas en donde aparece las acumulaciones de estos gránulos. En la Figura 26 se observa una notable acumulación intracelular de gránulos, siendo más evidente en las células expuestas a la EU.

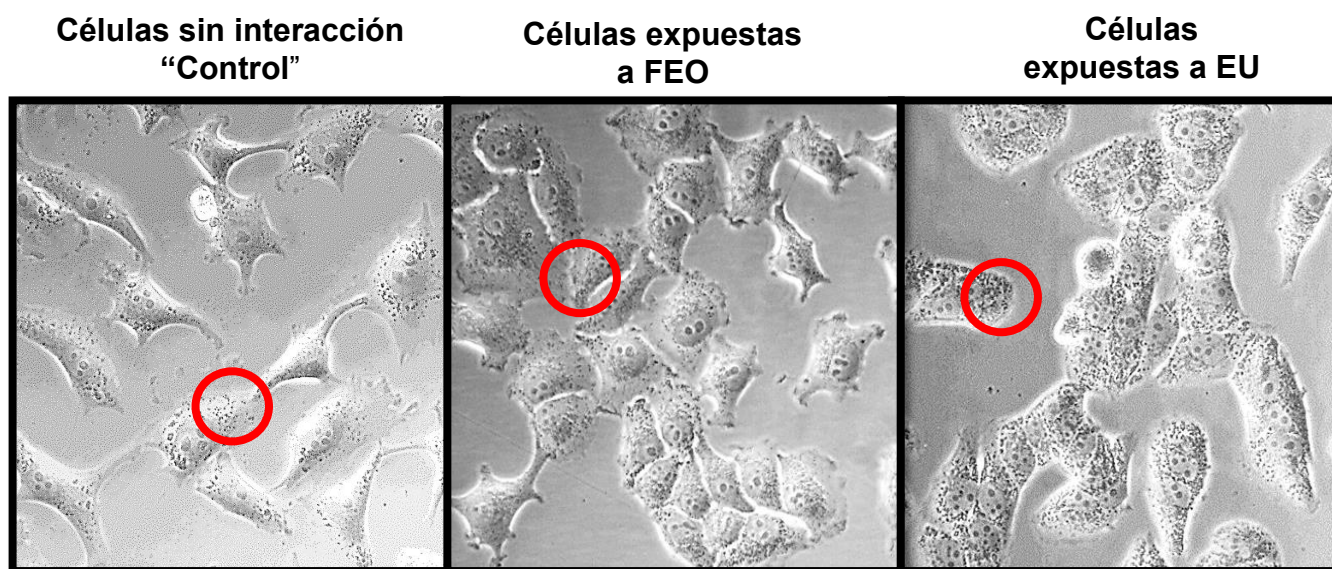


Figura 26. Fotografías de los cultivos células de melanoma A375 expuestos a las melaninas, tomadas a 40x

Por otra parte, las células tras la incubación de 24 horas con las melaninas exhibieron una morfología normal, con membranas celulares intactas y citoplasma que retiene el FS. En contraste con las células de la **Figura 26**, posterior a la irradiación, se puede observar que han perdido la cohesión de la monocapa celular,

acompañada de cambios en el citoesqueleto, manifestados en una morfología más compacta y redondeada.

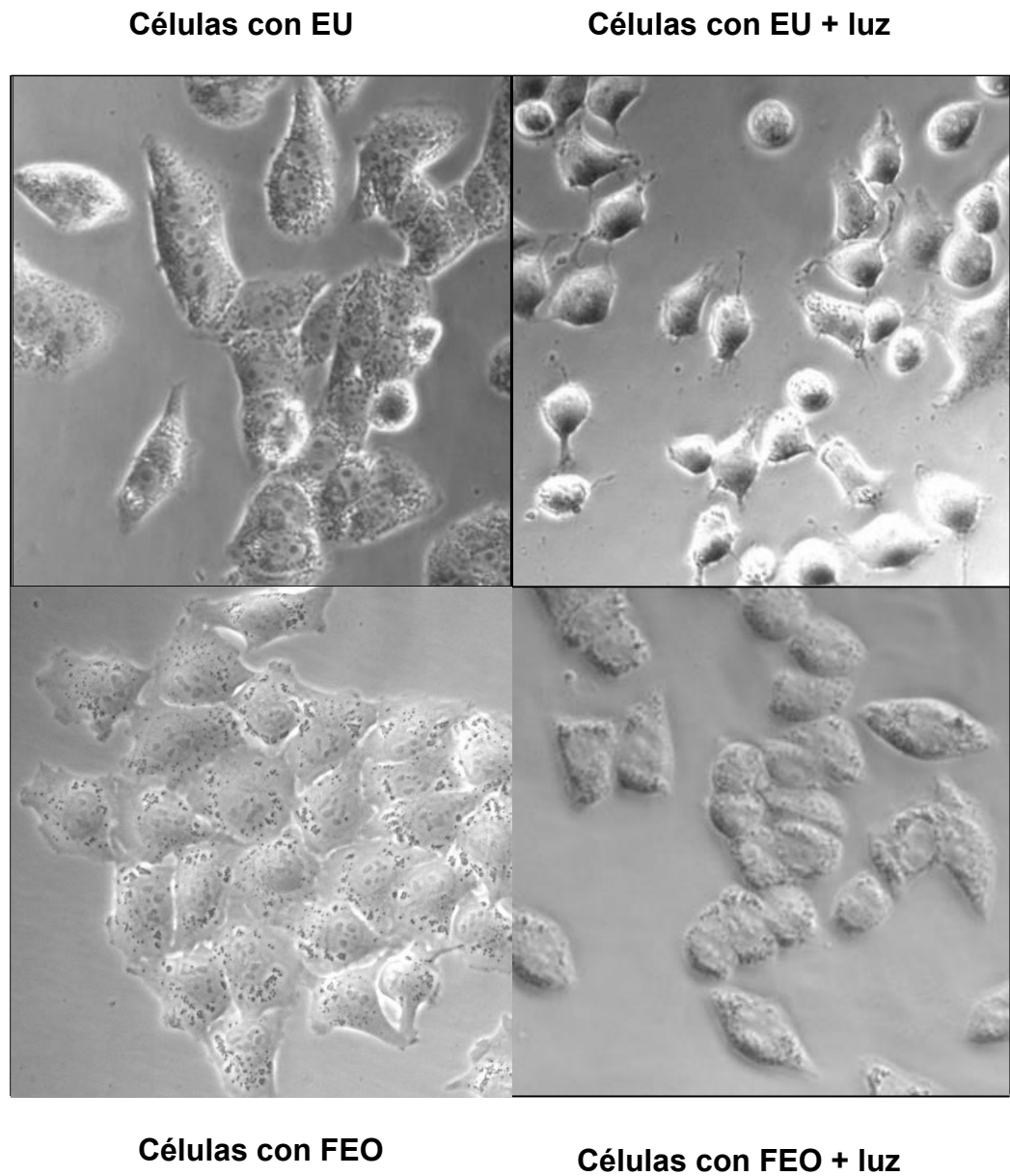


Figura 27. Células de A375 a 40x

CAPITULO V DISCUSIÓN

Varios estudios han demostrado que la acción de la melanina no siempre es fotoprotectora y que, al estar expuesta a la luz, puede generar EROs⁷⁸. De ahí surge la hipótesis de que la melanina, especialmente la FEO (considerada prooxidante)⁷⁶ pueda utilizarse como un FS endógeno debido a que la excitación de este cromóforo provoca el paso de esta molécula al estado singulete excitado seguida de la desintegración al estado triplete con transferencia de un electrón al oxígeno y la formación del anión superóxido que induce daño oxidativo. El mecanismo de citotoxicidad de la FEO ocurre cuando la fracción benzotiazina se oxida a la forma quinona-imina y se generan aniones superóxido a partir del oxígeno molecular. Los aniones superóxido pueden reaccionar rápidamente con antioxidantes, como el glutatión, y esta eliminación de aniones superóxido conduce a la producción de peróxido de hidrogeno (H₂O₂). Se sabe que los aniones superóxido se generan a partir de la melanina, que se acelera mediante la irradiación UVA¹⁰⁵

Estas propiedades se pueden aplicar en la TFD contra melanomas, tomando en cuenta que se ha reportado que estas lesiones presentan una proporción de FEO considerablemente mayor que la de EU.^{106,107}. En comparación con los materiales exógenos, los biomateriales endógenos naturales extraídos de organismos han despertado el interés debido a su capacidad para ser descompuestos y metabolizados en el cuerpo para causar mínimos efectos secundarios, lo cual es esencial para garantizar su bioseguridad *in vitro* e *in vivo*¹⁰⁸

La mayoría de las investigaciones sobre las propiedades fotoprotectoras y fotosensibilizadoras de las melaninas¹⁰⁹⁻¹¹¹ se han enfocado en diversas fuentes de melanina como melanina sintética, melanina de sepia¹¹², hongos¹¹³, cabello¹¹⁴ y plumas¹¹⁵⁻¹¹⁷. Para ello, se han establecido protocolos específicos para la síntesis y/o extracción del pigmento. Entre los métodos de extracción utilizados se encuentran el enzimático y el método ácido-base¹¹⁸. Dado que la FEO no se encuentra pura en la naturaleza y no está disponible comercialmente, para probar

nuestra hipótesis, se recurrió a la extracción de este pigmento por el método ácido–base a partir del cabello de personas pelirrojas.

Se logro obtener un polvo rojizo con un rendimiento promedio de aproximadamente el 3.2% de la masa original del cabello. Este rendimiento es superior al 2.2% obtenido por Krol et al.¹⁰⁹ utilizando el mismo método de extracción, lo que se puede justificar por el grado de purificación logrado por los investigadores, el cual puede diferir por la cantidad de veces que se repitió el proceso de extracción. Por otra parte, inferimos que el contenido de FEO presente en la muestra de cabello, que, a pesar de ser pelirrojo, varía dependiendo de la tonalidad del cabello la cual se relaciona con la proporción EU/FEO sintetizado naturalmente como respuesta a la genética de cada individuo¹¹⁹.

El uso de la FEO como FS en la aplicación de la TFD no ha sido aplicada a células humanas, pero si se ha demostrado que, al exponer células pigmentadas a la luz visible, las melaninas se fotosensibilizan generando daño celular⁷⁸. Recientemente se ha utilizado la FEO para la inactivación de bacterias como *E.coli*¹⁰⁴ logrando reducir las unidades formadoras de colonias al fotoactivar nanopartículas de FEO con luz azul y UV. Otras investigaciones recientes publicadas en marzo del 2024 probaron la TFD multifotónica mediada por melanina, logrando generar una fotocitotoxicidad significativamente mayor al excitar la melanina en aplicación de TFD ocular¹²⁰.

En nuestro estudio, investigamos los efectos de la fotoactivación de la FEO extraída del cabello pelirrojo en una línea celular de melanoma de origen humano, con la finalidad de probar la eficacia de una fuente natural de FEO como un FS y se compararon con los resultados obtenidos utilizando un FS comercial. En nuestro proyecto al probar la TFD por la fotoactivación de la FEO con luz azul, encontramos una disminución de la viabilidad de un 50% en las células de melanoma, la cual atribuimos a las propiedades fotosensibilizantes de este tipo de melanina. Estos resultados se obtuvieron utilizando las extracciones de FEO, las cuales no pasaron por un proceso de purificación para aplicación a los medios de cultivo, a pesar de esto, en este trabajo se evidencia el potencial fotosensibilizante de este tipo de

melanina, creemos que si logramos un grado de purificación mayor al utilizado en estos experimentos se podrían lograr mejores resultados, al generar un mayor desequilibrio en los antioxidantes intracelulares seguidos de una fotoactivación del FS y un incremento de las EROs.

En el control FS encontramos también una reducción de la viabilidad en un 20% la cual atribuimos a que la FEO induce el agotamiento de los antioxidantes independientemente de la exposición a la luz, los cuales son cruciales para la homeostasis celular y las funciones mitocondriales. Panzella et al.¹²¹ probaron extractos de FEO de cabello humano rojo purificada, con la finalidad de probar la interacción entre la FEO y los antioxidantes celulares, encontrando que la FEO promueve la autooxidación del GSH y del NADH. En sus estudios ellos afirman que además del agotamiento de los antioxidantes las reoxidaciones posteriores del pigmento FEO generan EROs. En base a esta información, creemos que al exponer las células a la FEO se generó una disminución de los antioxidantes de las células lo que desencadenó en la disminución en la viabilidad celular en el grupo que no se expuso a la luz. Por otra parte, también podemos observar un efecto en la disminución de la viabilidad celular que atribuimos al uso del DMSO, utilizado como disolvente tanto en el grupo de control FS, terapia y DMSO, el cual al ser utilizado en cultivos celulares a una concentración mayor al 3% causa una disminución de la viabilidad celular^{122,123}. Por lo que también se podrían generar mejores resultados al buscar un disolvente que disminuya los efectos dañinos del DMSO.

Por otra parte, Chiarelli-Neto et al ⁷⁸ observó que la luz visible puede dañar los melanocitos a través de la fotosensibilización de la melanina y la generación de oxígeno ¹O₂, disminuyendo así la viabilidad celular al aumentar la permeabilidad de la membrana, causando tanto la fotooxidación del ADN como la muerte celular necro-apoptótica, siendo la FEO más eficiente que la EU para generar ¹O₂ y resistir el fotoblanqueó, en su trabajo se incrementó la pigmentación intracelular de tres líneas celulares que posteriormente se expusieron a luz visible, lo que resulto en la disminuciones sustanciales en la viabilidad que van de un 25% a 50% demostrando

que la presencia de melanina aumenta la fototoxicidad tanto de la luz visible y la radiación UV.

En contraste, en la aplicación de la TFD por fotoactivación de EU observamos que, a pesar del incremento de la concentración de EU intracelular, la reducción de la viabilidad que obtuvimos en nuestros experimentos fue de aproximadamente 12 %; se considera que esto sucedió debido a la capacidad antioxidante de la EU. Como ya se ha probado y reportado, el $^1\text{O}_2$ inducido por EU estudiada a través de espectrofotometría diferencial y luminiscencia del infrarrojo cercano resuelta en el tiempo, se demostró que la EU fotogeneraba oxígeno singlete cuando se excitaba con luz azul, aunque con un rendimiento muy bajo, también se pudo observar que la melanina tuvo la capacidad de apagar eficazmente el oxígeno singlete ¹⁰⁸.

CONCLUSIONES

El espectro UV-VIS, FTIR Y Raman de las muestras de FEO demostraron que las extracciones realizadas presentan características propias del pigmento de la melanina y evidencian su similitud con el estándar de EU.

El rastreo del FS para el azul de metileno mostro una absorción máxima a los 60 min de incubación a una concentración de 20 μ M y su fotoactivación redujo la viabilidad celular en un 75%.

El rastreo del FS para la EU mostro una absorción máxima a las 24 horas de incubación a una concentración de 0.2 mg/mL y su fotoactivación no redujo la viabilidad celular, sin embargo, el DMSO mostro toxicidad, reduciendo la viabilidad en un 10%.

Para el caso de la FEO se obtuvo una absorción máxima del FS a las 24 horas de incubación, y su fotoactivación redujo la viabilidad célula en un 35%.

La TFD con AM generó una reducción de la viabilidad celular del 75% en comparación al control sin tratamiento.

La TFD con EU generó una reducción de la viabilidad celular del 12% en comparación al control sin tratamiento

Usando las extracciones de FEO como un FS se logró una disminución del 50% en la viabilidad celular en comparación con el grupo de control.

REFERENCIAS

1. Strub, T., Ballotti, R. & Bertolotto, C. The “ART” of epigenetics in melanoma: From histone “alterations, to resistance and therapies”. *Theranostics* vol. 10 1777–1797 Preprint at <https://doi.org/10.7150/thno.36218> (2020).
2. Mittal, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annual reviews* **13**, 395-412. (2018).
3. Abbasi, N. R. *et al.* *Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma Revisiting the ABCD Criteria*. *JAMA* vol. 292 www.jama.com (2004).
4. Brown, E. R. S., Fraser, S. J., Quaba, O., Simms, A. & Stein, A. Cutaneous melanoma: An updated SIGN guideline. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* vol. 47 214–217 Preprint at <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2017.302> (2017).
5. Arnold, M. *et al.* Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol* **158**, 495–503 (2022).
6. Guo, W., Wang, H. & Li, C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6> (2021).
7. Isola, V, Pece, A & Pierro, L. Photodynamic therapy with verteporfin of choroidal malignancy from breast cancer. *American journal of ophthalmology* **142**, 885–887 (2006).
8. Lou, P. J. *et al.* Interstitial photodynamic therapy as salvage treatment for recurrent head and neck cancer. *Br J Cancer* **91**, 441–446 (2004).
9. Lu, Y. gang *et al.* Efficacy of topical ALA-PDT combined with excision in the treatment of skin malignant tumor. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **11**, 122–126 (2014).

10. Turkoglu, E. B., Pointdujour-Lim, R., Mashayekhi, A. & Shields, C. L. PHOTODYNAMIC THERAPY AS PRIMARY TREATMENT FOR SMALL CHOROIDAL MELANOMA. *Retina* **37**, 1319-1325. (2019).
11. Fabian, I. D. *et al.* Primary photodynamic therapy with verteporfin for small pigmented posterior pole choroidal melanoma. *Eye (Basingstoke)* **31**, 519–528 (2017).
12. Hadjur', C., Richard', M., Parat', M.-O., Jardon2, P. & Favier', A. *Photodynamic Effects of Hypericin on Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Melanoma Cells. Photochemistry and Photobiology* vol. 64 (1996).
13. Davids, L. M., Kleemann, B., Cooper, S. & Kidson, S. H. Melanomas display increased cytoprotection to hypericin-mediated cytotoxicity through the induction of autophagy. *Cell Biol Int* **33**, 1065–1072 (2009).
14. Bebes, A. *et al.* Specific inhibition of the ABCG2 transporter could improve the efficacy of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **105**, 162–166 (2011).
15. El-Mofty, A. M. Clinical experience in the treatment of vitiligo with psoralens. *Vitiligo and Psoralens* 147–196 (1968).
16. Wyss P, T. Y. T. B. H. U. History of photomedicine. *In Photomedicine in Gynecology and Reproduction* 4–11 (2000).
17. Raab, O. Uber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Zeitschr Biol* **39**, 524–546 (1900).
18. Tappeiner, V. Uber die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Dtsch. Arch. Klin. Med* **80**, 427–487 (1904).
19. Tappeiner, V. Therapeutische versuche mit fluoreszierrenden stoffe. *Muench. Med. Wochenschr* **47**, 2042-2044. (1903).

20. Gerd Keiser. *Biophotonics*. vol. 1 (20 de julio de 2016, 2016).
21. Mansoori, B. *et al.* Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* vol. 26 395–404 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.033> (2019).
22. Szlasa, W. *et al.* Effects of curcumin based PDT on the viability and the organization of actin in melanotic (A375) and amelanotic melanoma (C32)– in vitro studies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **132**, (2020).
23. Kleemann, B., Loos, B., Scriba, T. J., Lang, D. & Davids, L. M. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photomedicine: Hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death. *PLoS One* **9**, (2014).
24. Akasov, R. A. *et al.* Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide. *Sci Rep* **9**, (2019).
25. Juarez, A. V. *et al.* Riboflavin acetate induces apoptosis in squamous carcinoma cells after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **153**, 445–454 (2015).
26. Bennett, D. C. Ultraviolet wavebands and melanoma initiation. *Pigment Cell and Melanoma Research* vol. 21 520–524 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00500.x> (2008).
27. Ye, T. & Simon, J. D. Ultrafast spectroscopic study of pheomelanin: Implications on the mechanism of superoxide anion formation. *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 6133–6135 (2002).
28. Takeuchi, S. *et al.* Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15076-15081. (2004).
29. Fuentes-López, D., Ortega-Zambrano, D., Fernández-Herrera, M. A. & Mercado-Uribe, H. The growth of *Escherichia coli* cultures under the influence

of pheomelanin nanoparticles and a chelant agent in the presence of light. *PLoS One* **17**, (2022).

30. Hamblin, M. R. *et al.* Melanoma resistance to photodynamic therapy: New insights. *Biological Chemistry* vol. 394 239–250 Preprint at <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0228> (2013).
31. Tripp, M. K., Watson, M., Balk, S. J., Swetter, S. M. & Gershenwald, J. E. State of the science on prevention and screening to reduce melanoma incidence and mortality: The time is now. *CA Cancer J Clin* **66**, 460–480 (2016).
32. Grossman, D. C. *et al.* Behavioral counseling to prevent skin cancer: US preventive services task force recommendation statement. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **319**, 1134–1142 (2018).
33. Armando Hernández-Domínguez, D. *et al.* Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas Correspondencia. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 123–129 (2018).
34. National Cancer Institute. Genética del cáncer de piel. Recuperado de: www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/pro/genetica-cancer-de-piel-pdq. (2024).
35. Marieb, E. Nicpon. *Anatomía y Fisiología Humana*. vol. 9 (Pearson Educación, 2008).
36. Novellino, L., Napolitano, A. & Prota, G. Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides. *Biochimica et Biophysica* **1475**, 295-306. (2000).
37. Prota, G. *et al.* *The Chemistry of Melanins and Melanogenesis*. (1995).
38. Scott, G. Demonstration of melanosome transfer by a shedding microvesicle mechanism. *Journal of Investigative Dermatology* vol. 132 1073–1074 Preprint at <https://doi.org/10.1038/jid.2012.20> (2012).

39. Costin, G.-E. & Hearing, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal* **21**, 976–994 (2007).
40. Prota, G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *Journal of investigative dermatology* **75**, 122-127. (1980).
41. Simon, J. D., Peles, D., Wakamatsu, K. & Ito, S. Current challenges in understanding melanogenesis: Bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell and Melanoma Research* vol. 22 563–579 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00610.x> (2009).
42. Capozzi, V. *et al.* Raman and optical spectroscopy of eumelanin films. in *Journal of Molecular Structure* vols 744–747 717–721 (2005).
43. Cao, W. *et al.* Unraveling the structure and function of melanin through synthesis. *J Am Chem Soc* **143**, 2622–2637 (2021).
44. Le Pape, E., Wakamatsu, K., Ito, S., Wolber, R. & Hearing, V. J. Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**, 477–486 (2008).
45. Valdivia-Silva, J. E. & Ramírez Díaz, C. J. Melanocytes in vitiligo and melanoma: a lesson between autoimmunity and tumor immunity. *Dermatología Peruana* **23**, (2013).
46. Palumbo, A., D'ischia, M., Misuraca, G., Prota, G. & Schultz, T. M. *Structural Modifications in Biosynthetic Melanins Induced by Metal Ions. Biochimica et Biophysica Acta* vol. 964 (1988).
47. Panzella, L., Napolitano, A. & D'Ischia, M. Is DHICA the key to dopachrome tautomerase and melanocyte functions? *Pigment Cell and Melanoma Research* vol. 24 248–249 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00771.x> (2011).

48. Napolitano, A., Panzella, L., Leone, L. & D'Ischia, M. Red hair benzothiazines and benzothiazoles: Mutation-inspired chemistry in the quest for functionality. *Acc Chem Res* **46**, 519–528 (2013).
49. Montaudié, H., Bertolotto, C., Ballotti, R. & Passeron, T. Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis. *EMC - Dermatología* **48**, 1–11 (2014).
50. D'Ischia, M., Napolitano, A. & Pezzella, A. 5,6-dihydroxyindole chemistry: Unexplored opportunities beyond eumelanin. *European Journal of Organic Chemistry* 5501–5516 Preprint at <https://doi.org/10.1002/ejoc.201100796> (2011).
51. Chen, C. T. *et al.* Excitonic effects from geometric order and disorder explain broadband optical absorption in eumelanin. *Nat Commun* **5**, (2014).
52. Tachibana, M. Review: Pigment Gene Focus MITF: A Stream Flowing for Pigment Cells. *PIGMENT CELL RES* **13**, 230–240 (2000).
53. Hill, H. Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioessays* **14**, 49–56 (1992).
54. Chedekelt, M. R., Smith, S. K., Postf, P. W., Pokorat, A. & Vesselt, D. L. *Photodestruction of Pheomelanin: Role of Oxygen (Superoxide/Skin Cancer)*. *Biochemistry* vol. 75 (1978).
55. Meza-Junco, J., Montañó-Loza, A., Aguayo-González, Á., Rincón, S. Z. & Residente, D. *Bases Moleculares Del Cáncer*. *Revista de Investigación Clínica* vol. 58 www.medigraphic.com (2006).
56. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* vol. 482 347–355 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature10888> (2012).
57. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* vol. 458 719–724 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature07943> (2009).

58. Martínez-Amores Martínez, B., Vicente Martín, F. J., Durán Poveda, M. & Molina Villaverde, R. Melanoma. *Medicine (Spain)* **12**, 1980–1989 (2017).
59. Rebecca, V. W., Somasundaram, R. & Herlyn, M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. *Nature Communications* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15546-9> (2020).
60. Dumaz, N. *et al.* Atypical BRAF and NRAS mutations in mucosal melanoma. *Cancers* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers11081133> (2019).
61. Guo, W., Wang, H. & Li, C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6> (2021).
62. Honors, C. N., Kruger, C. A. & Abrahamse, H. Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: A review. *Technology in Cancer Research and Treatment* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1177/1533033818791795> (2018).
63. Zuluaga-Sepúlveda, M. A., Arellano-Mendoza, I. & Ocampo-Candiani, J. Actualización en el tratamiento quirúrgico del melanoma cutáneo primario y metastásico. *Cir Cir* **84**, 77–84 (2016).
64. Gallegos Hernández, J. F. & Nieweg, O. E. *Melanoma Cutáneo (MC): Diagnóstico y Tratamiento Actuales CÁNCER: UN FORMIDABLE RETO Correspondencia. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)* vol. 150 www.govame.com (2014).
65. Rodríguez Melendez, Y. *et al.* Caracterización clínica-epidemiológica de pacientes con cáncer de piel no melanoma tratados con radioterapia superficial. (2022) doi:10.1590/SciELOPreprints.5340.
66. Tang, T., Eldabaje, R. & Yang, L. Current status of biological therapies for the treatment of metastatic melanoma. *Cancer Res* **36**, 3229-3241. (2016).

67. Molina, V. L. D., Castellanos, A. P., Arias, L. F. & Olivera, R. M. P. La inmunoterapia en el melanoma maligno: revisión. *Dermatologia Cosmetica, Medica y Quirurgica* **10**, 23–138 (2003).
68. Tang, J. Q. *et al.* Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment. *International Journal of Cancer* vol. 141 646–653 Preprint at <https://doi.org/10.1002/ijc.30708> (2017).
69. Scherer, K. M., Bisby, R. H., Botchway, S. W. & Parker, A. W. New Approaches to Photodynamic Therapy from Type I, II and III to Type IV Using One or More Photons. *Anticancer Agents Med Chem* **1**, (2016).
70. Kwiatkowski, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 106 1098–1107 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049> (2018).
71. Fresnadillo, D. G. (2005). F. y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones. C. 8, 253-269. Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones. in 253-269. (2005).
72. Yoo, J. O. & Ha, K. S. New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 295 139–174 (Elsevier Inc., 2012).
73. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
74. D'Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* vol. 43 582–592 Preprint at <https://doi.org/10.1002/cbin.11137> (2019).
75. Cruz-Martín-del-Campo, S. L., González-Espinosa, C., Ruiz-Quiñonez, A. K. & Carranza-Aguilar, C. J. Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente* **15**, 97–112 (2020).

76. Micillo, R. *et al.* "Fifty shades" of black and red or how carboxyl groups fine tune eumelanin and pheomelanin properties. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms17050746> (2016).
77. Ito, S., Wakamatsu, K. & Sarna, T. Photodegradation of Eumelanin and Pheomelanin and Its Pathophysiological Implications. *Photochemistry and Photobiology* vol. 94 409–420 Preprint at <https://doi.org/10.1111/php.12837> (2018).
78. Chiarelli-Neto, O. *et al.* Melanin photosensitization and the effect of visible light on epithelial cells. *PLoS One* **9**, (2014).
79. Hausmann, W. *Über Die Sensibilisierende Wirkung Des Hämatoporphyrins.* (1913).
80. Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M. Hematoporphyrin Derivative for Detection and Management of Cancer. *J Natl Cancer Inst* **26**, 1–11 (1961).
81. Dougherty, T. J. *et al.* Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Res* **38**, 2628-2635. (1979).
82. Schmidt-Erfurth, U. *et al.* Photodynamic Therapy of Experimental Choroidal Melanoma Using Lipoprotein-delivered Benzoporphyrin. *Ophthalmology* **101**, 89–99 (1994).
83. Ndhundhuma, I. M. & Abrahamse, H. Susceptibility of In Vitro Melanoma Skin Cancer to Photoactivated Hypericin versus Aluminium(III) Phthalocyanine Chloride Tetrasulphonate. *Biomed Res Int* **2017**, (2017).
84. Cai, J., Zheng, Q., Huang, H. & Li, B. 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy inhibits survival activity and promotes apoptosis of A375 and A431 cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **21**, 257–262 (2018).

85. Nackiewicz, J., Kliber-Jasik, M. & Skonieczna, M. A novel pro-apoptotic role of zinc octacarboxyphthalocyanine in melanoma me45 cancer cell's photodynamic therapy (PDT). *J Photochem Photobiol B* **190**, 146–153 (2019).
86. Santos, G. M. P. *et al.* ROS-induced autophagy reduces B16F10 melanoma cell proliferative activity. *Lasers Med Sci* **33**, 1335–1340 (2018).
87. Khorsandi, K., Hosseinzadeh, R. & Chamani, E. Molecular interaction and cellular studies on combination photodynamic therapy with rutoside for melanoma A375 cancer cells: an in vitro study. *Cancer Cell Int* **20**, (2020).
88. Zeinali, S., Tuncel, A., Yüzer, A. & Yurt, F. Imaging and detection of cell apoptosis by In vitro photodynamic therapy applications of zinc (II) phthalocyanine on human melanoma cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **36**, (2021).
89. Darlan Barbosa da Silva *et al.* Protoporphyrin IX (PpIX) loaded PLGA nanoparticles for topical Photodynamic Therapy of melanoma cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **35**, (2021).
90. Takeuchi, S. *et al.* Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15076–15081 (2004).
91. Fuentes-López, D., Ortega-Zambrano, D., Fernández-Herrera, M. A. & Mercado-Uribe, H. The growth of Escherichia coli cultures under the influence of pheomelanin nanoparticles and a chelant agent in the presence of light. *PLoS One* **17**, (2022).
92. Tsai, T. *et al.* ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. *Lasers Surg Med* **41**, 305–315 (2009).
93. Ickowicz Schwartz, D. *et al.* Differentiation-dependent photodynamic therapy regulated by porphobilinogen deaminase in B16 melanoma. *Br J Cancer* **90**, 1833–1841 (2004).

94. Schmitt, F. *et al.* Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **14**, 101–109 (2009).
95. Nio Serra, A. *et al.* In Vitro Photodynamic Activity of 5,15-bis(3-Hydroxyphenyl)porphyrin and Its Halogenated Derivatives Against Cancer Cells. *Photochem Photobiol* **86**, 206-212. (2010).
96. Nowak-Sliwinska, P. *et al.* Verteporfin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 549–555 (2006).
97. Krestyn, E., Kolarova, H., Bajgar, R. & Tomankova, K. Photodynamic properties of ZnTPPS4, CIAIPcS2 and ALA in human melanoma G361 cells. *Toxicology in Vitro* **24**, 286–291 (2010).
98. Barge, J. *et al.* Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis. *Exp Dermatol* **13**, 33–44 (2004).
99. Davids, L. M., Kleemann, B., Cooper, S. & Kidson, S. H. Melanomas display increased cytoprotection to hypericin-mediated cytotoxicity through the induction of autophagy. *Cell Biol Int* **33**, 1065–1072 (2009).
100. Swavey, S. & Tr, M. Porphyrin and Phthalocyanine Photosensitizers as PDT Agents: A New Modality for the Treatment of Melanoma. in *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma* (InTech, 2013). doi:10.5772/54940.
101. Cordoba, F. *et al.* 5-Aminolaevulinic Acid Photodynamic Therapy in a Transgenic Mouse Model of Skin Melanoma. *Exp Dermatol* vol. 14 (2005).
102. Sweigert, P., Xu, Z., Hong, Y. & Swavey, S. Nickel, copper, and zinc centered ruthenium-substituted porphyrins: Effect of transition metals on photoinduced

- DNA cleavage and photoinduced melanoma cell toxicity. *Dalton Transactions* **41**, 5201–5208 (2012).
103. Schmitt, E. *et al.* Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer Res* **66**, 4191–4197 (2006).
 104. Robertson, C. A., Tech, M. & Abrahamse, H. The In Vitro PDT Efficacy of a Novel Metallophthalocyanine (MPc) Derivative and Established 5-ALA Photosensitizing Dyes Against Human Metastatic Melanoma Cells. *Lasers Surg Med* **42**, 766–776 (2010).
 105. Ito, S. *et al.* Roles of reactive oxygen species in UVA-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid-melanin as studied by differential spectrophotometric method. *Pigment Cell Melanoma Res* **29**, 340–351 (2016).
 106. Del Bino, S. *et al.* Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. *Pigment Cell Melanoma Res* **28**, 707–717 (2015).
 107. Wondrak, G. T., Jacobson, M. K. & Jacobson, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: Mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochemical and Photobiological Sciences* **5**, 215–237 (2006).
 108. Pyo, J., Ju, K. Y. & Lee, J. K. Artificial pheomelanin nanoparticles and their photo-sensitization properties. *J Photochem Photobiol B* **160**, 330–335 (2016).
 109. Krol, E. S. & Liebler, D. C. Photoprotective actions of natural and synthetic melanins. *Chem Res Toxicol* **11**, 1434–1440 (1998).
 110. Bolt, A. A. *Interactions between human melanoprotein and chlorpromazine derivatives. Isolation and purification of human melanoprotein from hair and melanoma tissue.* *Life sciences* vol. 6 (1967).

111. Binsi, P. K., Muhamed Ashraf, P., Parvathy, U. & Zynudheen, A. A. Photo-protective effect of cuttlefish ink melanin on human hair. *J Appl Polym Sci* **139**, (2022).
112. Wang, L. F. & Rhim, J. W. Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink. *LWT* **99**, 17–23 (2019).
113. Liu, Q., Xiao, J., Liu, B., Zhuang, Y. & Sun, L. Study on the preparation and chemical structure characterization of melanin from *Boletus griseus*. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
114. Liu, Y. *et al.* *Comparison of the Structural and Physical Properties of Human Hair Eumelanin Following Enzymatic or Acid/Base Extraction. Original Research Article.*
115. Liu, Q., Xiao, J., Liu, B., Zhuang, Y. & Sun, L. Study on the preparation and chemical structure characterization of melanin from *Boletus griseus*. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
116. Ghiani, S. *et al.* Characterization of human hair melanin and its degradation products by means of magnetic resonance techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry* **46**, 471–479 (2008).
117. Borges, C. R., Roberts, J. C., Wilkins, D. G. & Rollins, D. E. Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: Application to human hair. *Anal Biochem* **290**, 116–125 (2001).
118. Pralea, I. E. *et al.* From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms20163943> (2019).
119. Wakamatsu, K. , I. S. Melanins in vertebrates. *Springer* (2021).

120. Pires, L. *et al.* Femtosecond pulsed laser photodynamic therapy activates melanin and eradicates malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **121**, (2024).
121. Panzella, L. *et al.* Red human hair pheomelanin is a potent pro-oxidant mediating UV-independent contributory mechanisms of melanomagenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* **27**, 244–252 (2014).
122. Sinh Truong Nguyen, Huyen Thi-Lam Nguyen & Kiet Dinh Truong. *Comparative Cytotoxic Effects of Methanol, Ethanol and DMSO Onhuman Cancer Cell Lines. Biomedica Research and Therapy* (2020).
123. Huberman, E., Heckman, C. & Langenbach, R. *Stimulation of Differentiated Functions in Human Melanoma Cells by Tumor-Promoting Agents and Dimethyl Sulfoxide*¹. *CANCER RESEARCH* vol. 39