



**INAOE**

# **Selectividad y Efectividad de la Terapia Fotodinámica en Melanoma: Rol de Especies Reactivas de Oxígeno y Antioxidantes**

Por

**Ing. Rocío Ivonne Pérez González**

Tesis sometida como requisito parcial para obtener el  
grado en

**Maestría en Ciencias y Tecnologías Biomédicas**

por el

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

Noviembre 2024

Tonantzintla, Puebla

Supervisada por:

**Dra. Teresita Spezzia Mazzocco**

**Dr. Ricardo Lozano Rosas**

© INAOE 2024

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



---

## *Agradecimientos*

---

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los doctores:

A la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco por aceptarme en su equipo de trabajo para poder realizar esta tesis de maestría, por su apoyo y paciencia a lo largo de este proyecto.

Al Dr. Ricardo Lozano Rosas por apoyarme para poder realizar los experimentos.

A la técnico del laboratorio de Terapia Fotodinámica Mayra Félix Salazar Morales por apoyarme en el laboratorio, por ayudarme a entender mejor la técnicas de laboratorio y siempre ayudarme cuando lo necesite.

Al Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica (INAOE), y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo que me brindaron para realizar la maestría.

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

A la Dra. Dalia Ramírez Ramírez por apoyarme en la medición de mis experimentos en CIBIOR

A la Dra. Maricruz Anaya de CIBIOR por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al M. en C. Elvis A. García Cortés, del INAOE, por ayudarme con la revisión de mis pósteres y presentaciones para seminarios.

## ***DEDICATORIA***

Con todo mi cariño y amor, quiero dedicar este trabajo a mis padres y hermanos, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente.

A los chicos del laboratorio, gracias por hacer mi estancia en el INAOE mucho más amena. Sus conversaciones, consejos, y el cafecito compartido fueron fundamentales para sobrellevar este tiempo, así como el apoyo que me brindaron en cada etapa del proceso.

A mi querida amiga Rebeca, por su incondicional apoyo, sus valiosos consejos y su amistad sincera.

A Mayra, quien me cuidó como una madre, haciéndome sentir cerca de casa cuando más lo necesitaba.

A Fani, por compartir su conocimiento conmigo y ayudarme a resolver mis dudas con paciencia y dedicación.

Y finalmente, a Pedro, Eli, David, Dora, Isra, Checo y a todos mis amigos en INAOE por hacer que mi estancia fuera una experiencia inolvidable y llena de gratos momentos.

---

## *Resumen*

---

La terapia fotodinámica (TFD) se posiciona como una estrategia terapéutica innovadora y prometedora. Sin embargo, su plena implementación enfrenta desafíos relacionados con la comprensión de los mecanismos moleculares que sustentan su efectividad. Este estudio tuvo como objetivo analizar los efectos redox de la TFD empleando 3 fotosensibilizadores (Fs) en células de melanoma (A375) y fibroblastos (WS1), evaluando la eficiencia de los tratamientos, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la actividad de antioxidantes clave como la superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión reducido (GSH). Se confirmó la internalización de los tres Fs (AM, RB, Cur) y la eficiencia de la TFD para reducir la viabilidad celular y generar un desequilibrio redox en las células. El tratamiento con AM-TFD redujo selectiva y significativamente la viabilidad celular en A375, pero no en WS1. La TFD con RB o con Cur, no fueron selectiva. Sin embargo, se destaca la TFD con Cur (3  $\mu$ M) como la que redujo más la viabilidad celular (90%). Este trabajo destaca el papel fundamental de las ERO y los antioxidantes en la eficacia de la TFD, subrayando cómo el desequilibrio redox inducido selectivamente en células cancerosas puede potenciar la muerte celular, contribuyendo al desarrollo de terapias más efectivas y específicas para el cáncer.

---

## *Abstract*

---

Photodynamic therapy (PDT) stands out as an innovative and promising therapeutic strategy. However, its full implementation faces challenges related to understanding the molecular mechanisms underlying its effectiveness. This study aimed to analyze the redox effects of PDT using three photosensitizers (PSs) in melanoma cells (A375) and fibroblasts (WS1), evaluating treatment efficiency, reactive oxygen species (ROS) generation, and the activity of key antioxidants such as superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH). The internalization of the three PSs (MB, RB, Cur) was confirmed, as well as the efficiency of PDT in reducing cell viability and inducing redox imbalance in cells. Treatment with MB-PDT selectively and significantly reduced cell viability in A375 cells but not in WS1 cells. In contrast, PDT with RB or Cur lacked selectivity. However, Cur-PDT (3  $\mu$ M) achieved the highest reduction in cell viability (90%). This work highlights the critical role of ROS and antioxidants in the efficacy of PDT, emphasizing how selectively induced redox imbalance in cancer cells can enhance cell death, contributing to the development of more effective and targeted cancer therapies.

---

## *Índice*

---

1	Introducción .....	11
1.1	Antecedentes.....	11
1.2	Planteamiento del problema .....	12
1.3	Justificación.....	13
1.4	Objetivos.....	13
1.4.1	Objetivo general .....	13
1.4.2	Objetivos específicos.....	13
2	Marco Teórico.....	14
2.1	Cáncer y TFD .....	14
2.1.1	Cáncer.....	14
2.1.2	Melanoma.....	16
2.1.3	Fibroblastos en la regulación de los melanocitos y el desarrollo del melanoma 17	
2.1.4	TFD.....	18
2.1.5	Principio básico de la TFD .....	18
2.2	Muerte celular producida por TFD.....	20
2.2.1	Apoptosis.....	20
2.2.2	Autofagia .....	21
2.2.3	Necrosis .....	21
2.3	Fotosensibilizadores en la TFD .....	22
2.3.1	Características del AM .....	23
2.3.2	Características del RB .....	23
2.3.3	Características de la Cur.....	24
2.4	Equilibrio REDOX en células de cáncer .....	24
2.4.1	Producción de ERO .....	24
2.4.2	ERO endógenas y antioxidantes.....	25
2.4.3	SOD, CAT Y GSH .....	27
2.4.4	ERO y el cáncer.....	28
2.5	Estado del arte .....	30
3	Metodología .....	33

3.1	Material biológico .....	33
3.1.1	Mantenimiento de las líneas celulares .....	33
3.1.2	Cultivo celular .....	34
3.2	TFD.....	34
3.2.1	Dispositivos lumínicos .....	35
3.2.2	Activación del AM .....	35
3.2.3	Activación del RB .....	35
3.2.4	Activación de la Cur .....	35
3.3	Medición de viabilidad celular por ensayo MTT .....	36
3.4	Rastreo del Fs .....	36
3.5	Detección de las ERO.....	36
3.6	Antioxidantes.....	37
3.6.1	Detección de SOD .....	38
3.6.2	Detección de GSH .....	39
3.6.3	Análisis estadístico .....	41
4	Resultados .....	42
4.1	Rastreo del Fs .....	42
4.2	Efecto de la TFD en la viabilidad celular .....	44
4.3	ERO generadas por TFD .....	49
4.4	Medición de SOD generado por TFD.....	53
4.5	Medición de GSH generado por TFD.....	55
5	Discusión.....	58
6	Conclusiones .....	61
7	Trabajo futuro.....	62
8	Referencias .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

---

## *Índice de Figuras*

---

Figura 1. En el proceso de formación de un tumor una célula se multiplica de forma descontrolada, dando lugar a la formación de un tumor [9].	15
Figura 2. Anatomía de la piel con melanocito [16].	16
Figura 3 Etapas del melanoma [16].	17
Figura 4. Diagrama de Jablonski ilustrando las fotorreacciones de tipo I y tipo II de un Fs después de la excitación con luz [25].	19
Figura 5. Localización del Fs en relación con la vía de muerte celular, activada durante la TFD [27].	20
Figura 6. Generación y efectos de las ERO [38].	25
Figura 7. Generación y gestión genérica de ERO en melanocitos y melanoma [40].	27
Figura 8. Fuentes, regulación y resultados biológicos de las ERO [44].	30
Figura 9. a) línea celular de melanoma A375, b) línea celular de fibroblastos WS1.	33
Figura 10. a) Dispositivo emisor de luz roja, b) dispositivo emisor de luz azul, c) dispositivo de luz emisor verde.	35
Figura 11. Parámetros seleccionados para clasificar la producción de ROS en la línea A375 basados en la fluorescencia obtenida con el CV.	37
Figura 12. Concentración de Fs internalizado en a) células A375 y b) células WS1.	43
Figura 13. Línea celular A375 con Fs en microscopio de contraste de fase a 40X. a) sin Fs, b) con AM incubadas a una concentración de 20 $\mu\text{M}$ c) con RB incubadas a una concentración de 1 $\mu\text{M}$ y d) con Cur incubadas a una concentración de 20 $\mu\text{M}$ .	43
Figura 14. Línea celular WS1 con Fs en microscopio de contraste de fase a 20X. a) sin Fs, b) con AM incubadas a una concentración de 20 $\mu\text{M}$ c) con RB incubadas a una concentración de 1 $\mu\text{M}$ y d) con Cur incubadas a una concentración de 20 $\mu\text{M}$ .	44
Figura 15. Porcentaje de viabilidad celular tras la TFD con AM en línea celular a) A375 y b) WS1.	45
Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular tras RB-TFD en línea celular A375 a: a) 5 $\mu\text{M}$ y 10 $\text{J}/\text{cm}^2$ , b) 3 $\mu\text{M}$ y 10 $\text{J}/\text{cm}^2$ y c) 1 $\mu\text{M}$ y 30 $\text{J}/\text{cm}^2$ .	46
Figura 17. Porcentaje de viabilidad celular tras RB-TFD en línea celular WS1: a) 3 $\mu\text{M}$ y 10 $\text{J}/\text{cm}^2$ y b) 1 $\mu\text{M}$ y 30 $\text{J}/\text{cm}^2$ .	47
Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular tras Cur-TFD en línea celular A375 a: a) 12 $\mu\text{M}$ y 20 $\text{J}/\text{cm}^2$ , b) 6 $\mu\text{M}$ y 20 $\text{J}/\text{cm}^2$ , c) 3 $\mu\text{M}$ y 10 $\text{J}/\text{cm}^2$ y d) 1.5 $\mu\text{M}$ y 5 $\text{J}/\text{cm}^2$ .	48
Figura 19. Porcentaje de viabilidad celular tras Cur-TFD en línea celular WS1 a: a) 3 $\mu\text{M}$ y 10 $\text{J}/\text{cm}^2$ y b) 1.5 $\mu\text{M}$ y 5 $\text{J}/\text{cm}^2$ .	49
Figura 20. Comparación de los niveles medios, altos y bajos de ERO en la línea celular A375 tras la TFD-AM, haciendo la comparativa con los 4 grupos.	50
Figura 21. Comparación de los niveles medios, altos y bajos de EROS en la línea celular A375 tras la TFD-RB, haciendo la comparativa con los 4 grupos.	51
Figura 22. Comparación de los niveles medios, altos y bajos de EROS en la línea celular A375 tras la TFD-Cur, haciendo la comparativa con los 4 grupos.	52

Figura 23. Porcentaje de SOD expresada en células A375 en a) AM-TFD, b) RB-TFD y c) Cur-TFD. ....	54
Figura 24. Porcentaje de SOD expresada en células WS1 en a) FTD-AM, b) FTD-RB y c) FTD-Cur. ....	55
Figura 25. Porcentaje de GSH en células A375 tras a) FTD-AM, b) FTD-RB y c) FTD-Cur .....	57

---

## *Índice de tablas*

---

Tabla 1. Características principales de los Fs empleados en TFD [31, 32].....	23
Tabla 2. SOD estándar.....	38
Tabla 3. Preparación de soluciones estándar de glutatión GSH mediante diluciones seriadas de la solución de glutatión de 50 µM. ....	40
Tabla 4. Resumen de estudios previos sobre los efectos de la TFD sobre el efecto REDOX (SOD, GSH y ERO) en células de cáncer. ....	60
Tabla 5. Efectos de la TFD sobre viabilidad celular, ROS y Antioxidantes en células A375 y WS1. ....	61

---

## *Índice de gráficas*

---

Gráfica 1. Curva de calibración para detectar la concentración de SOD intracelular. ....	39
--	----

---

## *Índice de acrónimos*

---

·OH	Radical hidroxilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Azul de metileno
CAT	Catalasa
Cur	Curcumina
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fs	Fotosensibilizador
GSH	Glutatión reducido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
RB	Rosa de bengala
SOD	Superóxido dismutasa
TFD	Terapia Fotodinámica

---

## Capítulo I

---

### 1 Introducción

#### 1.1 Antecedentes

Según el Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés), el cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada de células, las cuales pueden diseminarse a otras partes del cuerpo. Un ejemplo de ello es el melanoma, un tipo agresivo de cáncer de piel que se origina en los melanocitos. Además, en la piel contiene fibroblastos, células que mantienen el equilibrio celular y reparan tejidos.

Un aspecto crucial en el desarrollo y progresión del cáncer es el aumento excesivo de las ERO. Estas moléculas altamente reactivas, como los radicales libres como el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), se generan como subproductos del metabolismo celular generado en la mitocondria, así como de las vías de señalización aberrantes en las células cancerosas [1]. A niveles moderados, las ERO desempeñan funciones reguladoras importantes en procesos celulares como la proliferación, la apoptosis y la respuesta inmune. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo crónico, las ERO pueden causar daño oxidativo a los componentes celulares, incluidos los lípidos, las proteínas y el ácido desoxirribonucleico (ADN), lo que contribuye al desarrollo y progresión del cáncer [2, 3, 4, 5].

Para contrarrestar los efectos de las ERO, las células poseen un sistema de defensa antioxidante intrínseco, que incluye enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT y antioxidantes no enzimáticos GSH. Estos antioxidantes actúan coordinadamente para neutralizar las ERO y mantener el equilibrio REDOX en las células cancerosas [2].

A pesar de los avances en la comprensión de los mecanismos de estrés oxidativo en el cáncer, aún existen lagunas significativas en nuestro conocimiento sobre cómo el desequilibrio REDOX contribuye a la progresión o eliminación tumoral, y cómo se regulan los antioxidantes en este contexto. Entre los tratamientos alternativos contra el cáncer se encuentran la TFD, la cual es una tecnología médica que emplea fuentes de luz (láseres o dispositivos con diodos emisores de luz) para la activación de fármacos sensibles a la luz (fotosensibilizadores), con el fin de tratar el cáncer y otras enfermedades de manera no quirúrgica y mínimamente invasiva. Esta terapia utiliza el oxígeno presente en las células dañadas, el cual reaccionara con el fotosensibilizador (Fs) cuando irradiado por una fuente de luz, que debe emitir longitudes de onda dentro del espectro visible [6].

A medida que se profundizó en el mecanismo de acción de la TFD, se descubrió que su efectividad está intrínsecamente ligada al equilibrio REDOX dentro de las células. En las células cancerosas, este equilibrio suele estar alterado, con un aumento en la producción de ERO, lo que contribuye a la proliferación celular y la progresión tumoral. La TFD aprovecha este desequilibrio REDOX para inducir la muerte celular. Este exceso de ERO provoca daño oxidativo a componentes celulares esenciales como membranas, proteínas y ADN, lo que desencadena la apoptosis o necrosis de las células tumorales [7].

Por tanto, este estudio tiene como objetivo proporcionar una visión detallada de los efectos biológicos de la TFD en el equilibrio REDOX celular. Estos hallazgos podrían tener implicaciones significativas para la optimización de la TFD como tratamiento contra el cáncer, así como para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas y personalizadas para los pacientes con cáncer.

## **1.2 Planteamiento del problema**

El melanoma es una de las formas más agresivas de cáncer de piel, con alta capacidad de proliferación, resistencia a terapias convencionales y una marcada tendencia a la metástasis, lo que lo convierte en una de las principales causas de mortalidad asociada al cáncer de piel. Estas características subrayan la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras y efectivas que ofrezcan mayor selectividad y eficacia.

La TFD ha emergido como una opción prometedora para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluido el melanoma, debido a su capacidad para inducir muerte en células tumorales mediante la producción de ERO. Sin embargo, la implementación efectiva de esta técnica enfrenta desafíos significativos, particularmente en la comprensión detallada de sus mecanismos moleculares. Aspectos como el impacto diferencial de la TFD en células cancerosas y no cancerosas, los cambios en los niveles de ERO y la actividad antioxidante, así como el balance REDOX de las células tratadas, permanecen insuficientemente explorados.

La eficacia de la TFD depende en gran medida de la capacidad del Fs para acumularse preferentemente en células tumorales, generar ERO en cantidades suficientes y desestabilizar el sistema REDOX sin causar daño significativo a células no cancerosas [8]. Por lo tanto, resulta esencial identificar las dosis óptimas de Fs como RB y Cur para maximizar la eficacia de la TFD, evaluar su potencial citotóxico en células tumorales y sanas, y analizar su capacidad para alterar los sistemas antioxidantes de las células de melanoma. La comparación de estos efectos entre células de melanoma y fibroblastos sanos permitirá profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de la TFD, contribuyendo así al desarrollo de estrategias terapéuticas más específicas y efectivas contra el cáncer.

### **1.3 Justificación**

El melanoma es una de las principales causas de mortalidad por cáncer de piel, lo que resalta la urgencia de desarrollar estrategias terapéuticas más eficaces y precisas. Entre las alternativas emergentes, la TFD ha demostrado ser una herramienta prometedora en la lucha contra el cáncer, gracias a su capacidad para inducir daño dirigido a células tumorales mediante la generación regulada de ERO.

No obstante, la optimización de la TFD implica superar retos fundamentales, entre ellos, la identificación de Fs que aseguren una mayor acumulación en células malignas y que provoquen un desequilibrio REDOX localizado, maximizando la destrucción de células cancerosas mientras se preservan los tejidos sanos. Además, es esencial profundizar en los mecanismos moleculares que determinan la susceptibilidad diferencial de las células al tratamiento, lo que permitiría perfeccionar su eficacia y minimizar posibles efectos adversos.

Dado que el melanoma presenta características particulares, como una alta capacidad de proliferación y resistencia a diversas terapias, este estudio contribuye al desarrollo de estrategias más específicas que aprovechen el desequilibrio REDOX como un mecanismo clave para la eliminación de células tumorales.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar la efectividad, selectividad y efecto REDOX de la TFD con diferentes Fs sobre células de melanoma.

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Seleccionar las dosis óptimas de RB y Cur para maximizar la eficacia de la TFD en línea celular de melanoma.
- Evaluar el potencial citotóxico de tres fotosensibilizadores: AM, RB y Cur en células de melanoma y fibroblastos.
- Rastrear los tres fotosensibilizadores en las dos líneas celulares.
- Medir el efecto REDOX en la línea celular de melanoma.
- Comparar el efecto citotóxico en las dos líneas celulares.

---

## *Capítulo II*

---

Este capítulo introduce los conceptos básicos del cáncer, destacando el melanoma como un modelo representativo de tumores con un desequilibrio REDOX analiza la interrelación entre el cáncer y el estrés oxidativo. Se describen los principios fundamentales de la TFD y los mecanismos moleculares subyacentes a la muerte celular que induce, incluyendo apoptosis, necrosis y autofagia. Asimismo, se evalúan las propiedades de los Fs empleados en el presente trabajo y su capacidad para generar ERO. Finalmente, se exploran las funciones de los antioxidantes clave (SOD, CAT y GSH) en el contexto de la progresión tumoral y los avances reportados en la literatura reciente sobre este enfoque terapéutico.

## **2 Marco Teórico**

### **2.1 Cáncer y TFD**

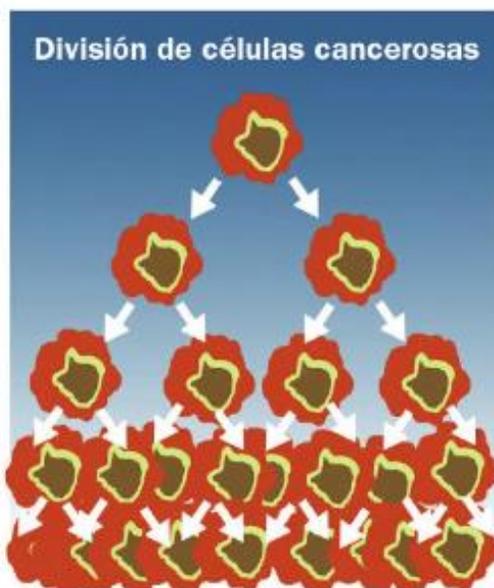
#### **2.1.1 Cáncer**

Se define al cáncer como un fenómeno que se origina cuando un conjunto de células del cuerpo humano crece de forma descontrolada. Las células que forman una masa única sin capacidad para invadir órganos vecinos o a distancia se les denominan tumores benignos. Por otro lado, los tumores malignos son aquellos que tienen la capacidad de invadir otros tejidos, liberando partes de las células tumorales al torrente sanguíneo o linfático [9].

Una célula sana crece a un ritmo controlado y permanecen en el área donde se ha originado; se divide, lo que conlleva a la formación de otras dos exactamente iguales a la original, con sus mismas características y por último muere de forma ordenada. La pérdida del correcto funcionamiento de este sistema puede desencadenar un crecimiento desordenado de las células y el desarrollo del cáncer. Una célula normal se convierte en cancerosa cuando existe una alteración en los genes contenidos en el ADN, a estas alteraciones se les conoce como mutaciones. La mayoría de las veces que se daña el ADN entran en acción ciertos mecanismos que repararán daño celular o activarán muerte celular. Sin embargo, las células cancerosas eluden estos mecanismos, lo que provoca una división celular descontrolada con alteraciones en el ADN (Figura 1) [9, 10].

Aunque el proceso normal de división celular garantiza la renovación y reemplazo celular, en ocasiones células anormales o dañadas se multiplican inapropiadamente, formando tumores que pueden ser benignos o malignos. Los tumores malignos, conocidos como carcinomas, tienen la capacidad de invadir tejidos circundantes y propagarse a otras áreas del organismo, un fenómeno denominado metástasis. En contraste, los tumores benignos no se extienden a tejidos cercanos y, por lo general, no reaparecen después de ser removidos. El cáncer es considerado como una enfermedad compleja que involucra la formación de

tumores, tanto malignos como benignos, y puede tener graves implicaciones para la salud y la vida de las personas afectadas. Aunque se han realizado avances significativos en la comprensión de los mecanismos subyacentes al cáncer y en el desarrollo de estrategias terapéuticas, su incidencia y mortalidad siguen siendo elevadas [11].



*Figura 1. En el proceso de formación de un tumor una célula se multiplica de forma descontrolada, dando lugar a la formación de un tumor [9].*

Según la Organización Mundial de la Salud, así como la Organización Panamericana de la Salud, el cáncer constituye una de las principales causas de mortalidad en América, cobrando 1,4 millones de vidas en el 2022, lo que representa el 45,1% de las muertes en individuos menores de 69 años. Estimando 4,2 millones de casos de cáncer en Américas en 2022, y se proyecta que aumentará a 6,7 millones para el año 2045 [12]. Se estima que cada año en México el cáncer provoca la muerte de 90 mil personas, ubicándolo como la tercera causa de muerte [13]. Y según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, entre enero y agosto de 2020, se registraron 683,823 muertes en México. De estas, 9% se debieron a tumores malignos (un total de 60,421 fallecimientos). En 2019, hubo 747,784 defunciones, y el 12% de ellas se atribuyó a tumores malignos (un total de 88,683 fallecimientos). La distribución porcentual por sexo muestra que hay más fallecimientos en mujeres (51%) que en hombres (49%) debido al cáncer. Las tasas de defunciones por tumores malignos varían según la edad. En los grupos más jóvenes (antes de los 30 años), las tasas son bajas, pero aumentan con la edad. Por ejemplo, en hombres mayores de 80 años, la tasa de defunción es de 1,140.10 por cada 100,000 hombres, mientras que en mujeres es de 674.43 por cada 100,000 mujeres [14].

### 2.1.2 Melanoma

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que se origina en los melanocitos, las células responsables de producir melanina, el pigmento que da color a la piel. Los melanocitos se encuentran principalmente en la capa basal de la epidermis (Figura 2), la capa más profunda de la piel. A diferencia de otros cánceres de piel, como los carcinomas de células basales y escamosas, que son menos agresivos y rara vez se diseminan, el melanoma es invasivo y tiene una mayor propensión a metastatizar, es decir, a propagarse a tejidos circundantes y órganos distantes, lo que lo convierte en la forma más mortal de cáncer de piel. Los melanomas malignos pueden surgir en cualquier área de la piel, aunque tienden a desarrollarse más comúnmente en lunares preexistentes. Este cáncer, a pesar de representar solo el 1% de todos los cánceres de piel, es responsable de más del 80% de las muertes por cáncer de piel, debido a su naturaleza agresiva y alta tasa de metástasis. [15].

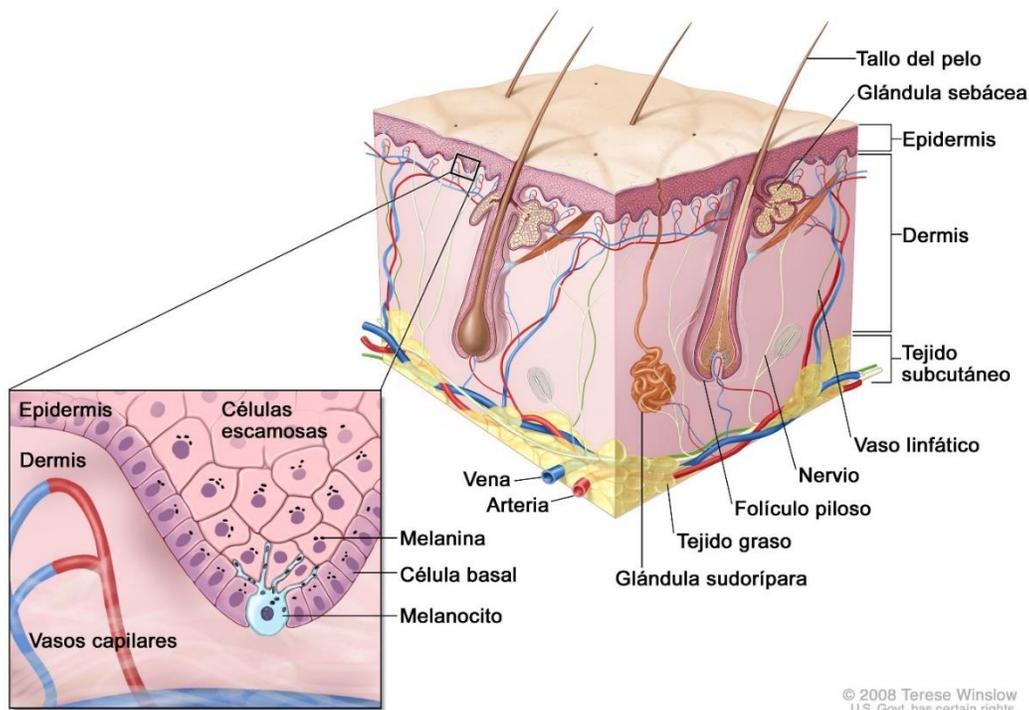


Figura 2. Anatomía de la piel con melanocito [16].

Según el Instituto Nacional del Cáncer el melanoma es clasificado en cinco etapas, las cuales dependerán de la profundidad de penetración de la piel así como la extensión del tumor (Figura 3):

- Etapa 0: El melanoma está confinado a la capa superior de la piel (epidermis) y la lámina basal permanece intacta. En esta etapa temprana, el melanoma es superficial y no ha invadido capas más profundas.

- Etapa I: Conocida como melanoma in situ, el cáncer sigue localizado en la epidermis, sin penetrar aún otras capas de la piel.
- Etapa II: El tumor tiene un grosor de menos de 1 mm y ha penetrado la lámina basal, extendiéndose a la dermis papilar, la capa superior de la dermis.
- Etapa III: En esta etapa, el espesor del tumor varía entre 1 y 2 mm y alcanza la interfase entre la dermis papilar y la dermis reticular.
- Etapa IV: El melanoma se ha extendido más allá de la dermis reticular, y las células cancerosas han migrado a al menos un ganglio linfático o a tejidos cercanos. Esta etapa también puede incluir metástasis en órganos distantes como los pulmones, otros órganos internos o ganglios linfáticos alejados. La afectación puede llegar hasta la grasa subcutánea, lo que indica una enfermedad avanzada y de peor pronóstico.

### ¿Qué grosor tiene el cáncer?

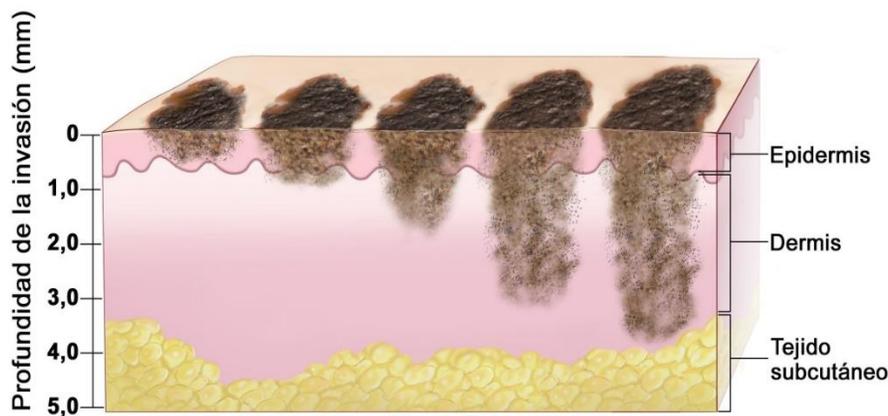


Figura 3 Etapas del melanoma [16].

#### 2.1.3 Fibroblastos en la regulación de los melanocitos y el desarrollo del melanoma

Los fibroblastos son las células más abundantes en la dermis y desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis cutánea y en la regulación de los melanocitos. Además de sintetizar y remodelar la matriz extracelular (MEC), los fibroblastos participan activamente en la comunicación intercelular mediante la secreción de factores de crecimiento, citocinas y otras señales paracrinas que modulan el comportamiento de los melanocitos [17].

Los fibroblastos participan en el microambiente cutáneo, creando una interfaz física y química que influye en la adaptación y crecimiento tumoral. A diferencia de los melanocitos, que se especializan en la producción de melanina y presentan una mayor sensibilidad a factores externos como la radiación ultravioleta, los fibroblastos tienen una respuesta antioxidante más robusta y no están sujetos a la regulación de la pigmentación [18].

Además, los fibroblastos, aunque no son células tumorales, pueden convertirse en fibroblastos asociados al cáncer bajo la influencia de señales producidas por células de melanoma, promoviendo la remodelación de la MEC y favoreciendo la migración tumoral. Este proceso muestra cómo los fibroblastos, en su estado basal o transformado, son capaces de responder de manera significativa a las condiciones del melanoma, lo que los convierte en un modelo representativo del comportamiento celular en tejidos no tumorales cercanos a la lesión. [19].

#### **2.1.4 TFD**

Los tratamientos contra el cáncer se basan en varios factores, entre ellos el tipo de tumor, grado de remoción, la metástasis, localización, tolerabilidad del paciente, edad y el estado de salud general. En consecuencia, los planes de tratamiento más frecuentes incluyen cirugía, inmunoterapia, terapia dirigida, quimioterapia y TFD. Desde el 2006 la TFD ha sido autorizada para el tratamiento de lesiones cutáneas precancerosas y de algunos cánceres cutáneos epiteliales. Actualmente se implementa para tratar enfermedades dermatológicas no tumorales, enfermedades infecciosas en la piel como el acné. La TFD ha demostrado eficientes resultados en la inactivación de virus, hongos, bacterias, en tratamientos para la psoriasis y el cáncer. La TFD consiste en la eliminación de células patógenas generalmente mediante apoptosis. [20, 21].

La TFD combina el uso de un fármaco fotosensible o mejor conocido como un fotosensibilizador (Fs), una fuente de luz y oxígeno molecular para dirigir y destruir selectivamente las células cancerosas, mientras minimiza el daño a los tejidos circundantes. Ofreciendo varias ventajas sobre los tratamientos convencionales, como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. En primer lugar, es mínimamente invasiva y puede aplicarse de manera localizada, lo que reduce el riesgo de efectos secundarios sistémicos. En segundo lugar, la TFD puede ser repetida en el tiempo sin provocar resistencia celular, lo que la convierte en una opción especialmente prometedora para el tratamiento de tumores recurrentes o metastásicos [22, 23]

La TFD es una técnica médica que hace uso de un láser, u otras fuentes de luz que van desde la luz visible hasta la infrarroja, para la activación del Fs y de este modo tratar procesos precancerosos y cancerosos, mediante un proceso no quirúrgico y de invasión mínima. [22]. Las principales fuentes de luz empleadas son láseres, LEDs y lámparas, seleccionándose según la ubicación del objetivo, el espectro de absorción del Fs y la dosis de luz requerida [21].

#### **2.1.5 Principio básico de la TFD**

Como ya hemos mencionado para que la TFD pueda ser llevada a cabo se necesitan tres componentes esenciales: un Fs, luz y oxígeno molecular en niveles ambientales. El Fs es administrado en las células las cuales, al ser expuestas a la luz, absorben la energía de los

fotones, lo que resulta en un estado energético elevado. Esta absorción ocurre cuando el Fs es expuesto a la luz con longitudes de onda específicas, donde los fotones tienen una energía que coincide con los estados energéticos disponibles del Fs. Cuando esto sucede, el Fs puede pasar de su estado fundamental energético a un estado excitado singlete altamente inestable. Desde este estado excitado, el Fs puede liberar la energía absorbida en forma de calor, que puede utilizarse para inducir daño celular y/o fluorescencia. Alternativamente, el Fs excitado puede pasar a un estado excitado triplete más estable a través de un proceso llamado cruce entre sistemas. A partir de aquí, el Fs puede regresar a su estado fundamental estable mediante fosforescencia, emisión de calor o transferencia directa de energía al oxígeno, dando como resultado la producción de oxígeno singlete en estado excitado ( $^1O_2$ ), conocido como reacción de tipo II. Además, el Fs excitado en su estado triplete puede transferir electrones o hidrógenos a otras moléculas biológicas cercanas en lo que se conoce como reacción de tipo I. Esta interacción forma radicales o iones radicales, que pueden reaccionar posteriormente con el oxígeno presente en la célula, generando ERO, como el  $O_2^-$ , el radical hidropéroxido ( $HOO\cdot$ ),  $H_2O_2$  y el  $HO\cdot$ . Se considera que la mayoría de los Fs participan en reacciones de tipo II en lugar de reacciones de tipo I debido a su simplicidad mecánica. Ambas reacciones tanto de tipo I como de tipo II pueden generarse de forma simultánea, y la relación entre ellas depende principalmente del tipo de Fs empleado, la concentración del sustrato y la disponibilidad de oxígeno. Como resultado de la reacción fotodinámica, se activan diversos mecanismos moleculares que conducen a diferentes modalidades de muerte celular, reclutamiento y activación de células inmunes y daño vascular. Todo esto se puede apreciar de mejor forma a través del diagrama de Jablonski mostrado en la Figura 4 [24, 25].

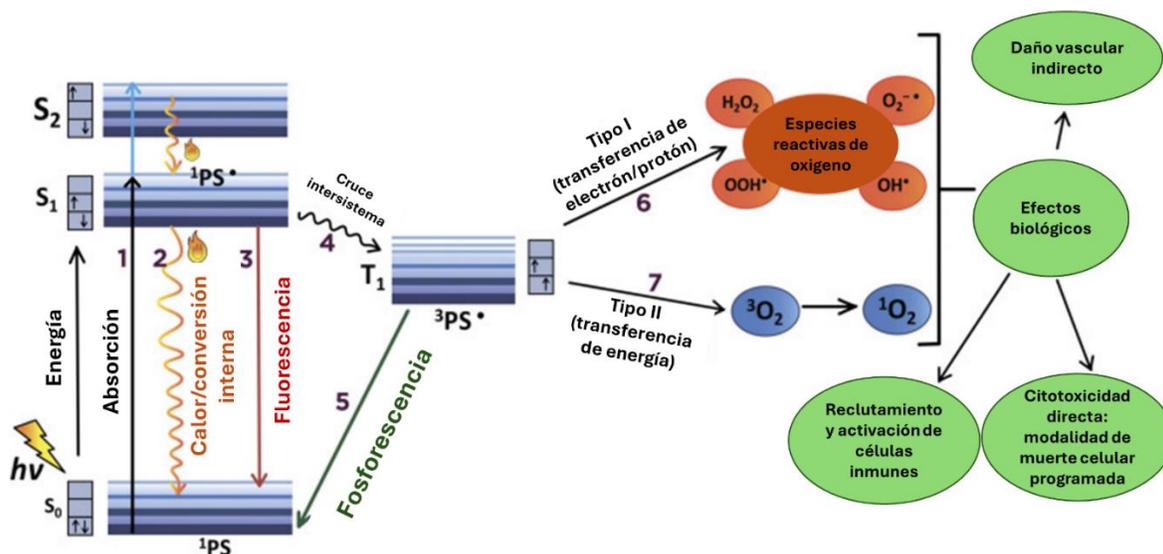


Figura 4. Diagrama de Jablonski ilustrando las fotorreacciones de tipo I y tipo II de un Fs después de la excitación con luz [25].

## 2.2 Muerte celular producida por TFD

Tradicionalmente, la muerte celular inducida por la TFD se clasificaba en: apoptosis, muerte celular asociada con autofagia y necrosis [26].

La muerte celular producida dependerá de donde se encuentre localizado el Fs (Figura 5). Cuando existe un daño celular directo podemos decir que se genera apoptosis, esto ocurre cuando el Fs se localiza en la mitocondria, retículo endoplasmático (RE) y el núcleo. Por otro lado, la autofagia se produce cuando el Fs se encuentra en el citoplasma y en los lisosomas. Y por último la necrosis es evidente cuando existe una desintegración de la membrana celular causada por el Fs [27].

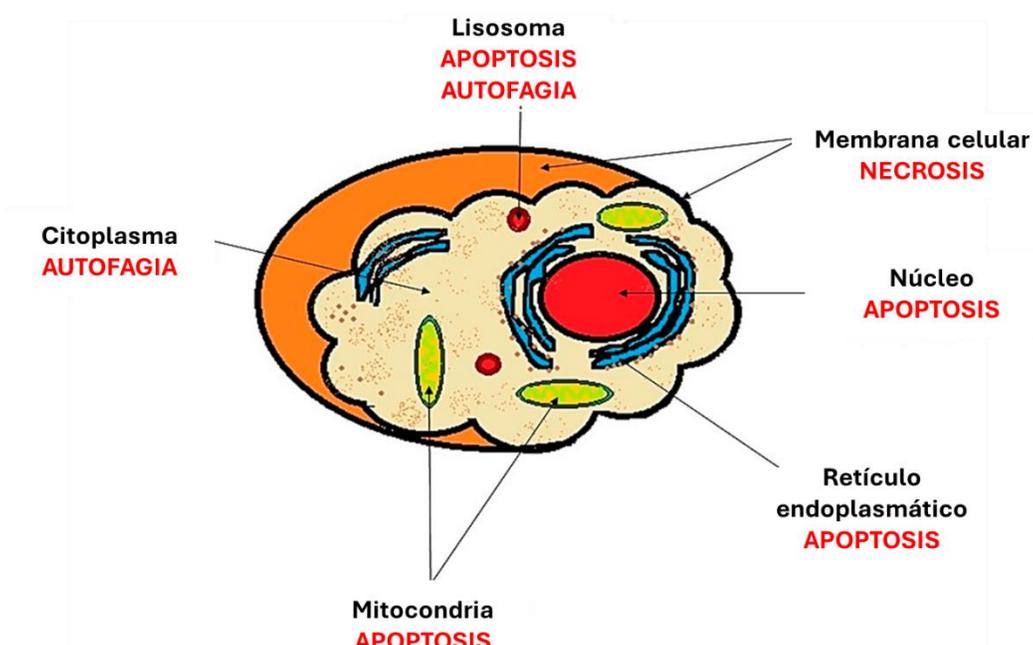


Figura 5. Localización del Fs en relación con la vía de muerte celular, activada durante la TFD [27].

### 2.2.1 Apoptosis

La apoptosis representa un proceso de autorregulación celular que ocurre en respuesta a diversos estímulos. Está acompañada de cambios morfológicos característicos, como la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina, el redondeo celular, la fragmentación nuclear y la formación de vesículas en la membrana plasmática, entre otros. La apoptosis se lleva a cabo mediante la activación secuencial de un conjunto de enzimas, incluyendo caspasas y endonucleasas específicas de cisteína aspartato. Este proceso puede clasificarse como intrínseco o extrínseco [27].

La apoptosis intrínseca es un tipo de muerte celular regulada que se desencadena por diversos factores intracelulares, como el daño en el ADN, la presencia de ERO, el estrés en el RE, el estrés de replicación y la privación de factores de crecimiento. Este tipo de apoptosis es independiente de receptores y se facilita mediante la activación de proteínas como Bid, que, al ser escindida, transfiere señales a las mitocondrias, desencadenando la liberación de citocromo c y la formación de la plataforma de activación apoptótica 1 (Apaf-1), lo que finalmente conduce a la activación de caspasas y, por ende, a la muerte celular programada [28, 27, 29].

Por otro lado, la apoptosis extrínseca se inicia por la activación de receptores transmembrana, como el receptor Fas, y conlleva la formación de un complejo de señalización que activa la caspasa 8, lo que a su vez activa otras caspasas, culminando en la apoptosis [28, 27, 29].

### **2.2.2 Autofagia**

La autofagia es un proceso celular que puede actuar de dos maneras: como un mecanismo de supervivencia, donde elimina el material celular dañado, y como un mecanismo de muerte, especialmente en condiciones de daño orgánico permanente. En ambos casos, se forman vesículas membranosas llamadas autofagosomas, que encapsulan el material dañado, incluidos orgánulos y parte del citosol. Posteriormente, los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para degradar este contenido, dando lugar a los autolisosomas. Este proceso permite la eliminación de material dañado y la reutilización de nutrientes reciclados [28].

En la TFD, la autofagia puede desempeñar un papel dual: puede promover la supervivencia celular o inducir la muerte celular, según la magnitud de la citotoxicidad generada durante el tratamiento. La autofagia interviene al reciclar mitocondrias o retículo endoplásmico dañados antes de que se active la apoptosis. No obstante, cuando la citotoxicidad alcanza un nivel óptimo, tanto la vía apoptótica como la autofagia pueden resultar en la muerte celular. Además, se ha observado la presencia de autofagia en células que muestran resistencia a la apoptosis [27].

### **2.2.3 Necrosis**

La muerte por necrosis se caracteriza como un evento no programado, considerado un suceso accidental que ocurre cuando hay una deficiencia de energía. Este tipo de muerte puede desencadenarse por estrés mecánico, térmico o químico, lo que resulta en un fallo en la permeabilidad de la membrana plasmática y la liberación desordenada de componentes celulares al exterior [30].

Existen tres razones principales que explican por qué ocurre la necrosis:

- En primer lugar, la falla energética en la membrana celular provoca la apertura de las bombas ATP, lo que conlleva a la entrada de cationes al citosol y causa un hinchamiento celular (oncosis), seguido por el rompimiento de la membrana.
- El segundo mecanismo es la sobreproducción de ERO. En condiciones normales, las células producen ERO en cantidades reguladas, pero en presencia de patologías, la mitocondria aumenta su producción, lo que puede dañar organelos como los lisosomas, el RE y las membranas mitocondriales y celulares, resultando en necrosis.
- La tercera forma de necrosis ocurre debido a la entrada excesiva de calcio al medio intracelular. Esta entrada activa proteasas sensibles al calcio, como las calpaínas, lo que conduce a una concentración excesiva de calcio y la apertura de un poro en la membrana mitocondrial (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial). Esto causa la liberación de citocromo c a la membrana externa, lo que resulta en la incapacidad de producir Adenosín trifosfato a través de la cadena respiratoria

Las características principales de la necrosis incluyen la rápida pérdida de los potenciales de membrana, ruptura de la membrana plasmática, dilatación de organelos citoplasmáticos y, en ocasiones, ligera condensación de la cromatina o pérdida del núcleo [30].

### **2.3 Fotosensibilizadores en la TFD**

Un Fs es una molécula sensible a la luz utilizada en la TFD, así como en otros procesos para eliminar virus y bacterias. Al elegir un Fs adecuado, se busca que se acumule selectivamente en los tejidos enfermos, genere especies químicas citotóxicas e induzca el efecto biológico [22]

Aunque no existe un Fs ideal, Gallegos (2015) nos menciona en su libro que hay nueve requisitos que debe cumplir para su uso en la TFD [22].

#### Características fisicoquímicas

1. Pureza, estabilidad química y fotoestabilidad, esto ayuda o permite extender el tiempo de fotoirradiación,
2. Solubilidad en agua con anfifilicidad que asegura tanto el transporte en sangre sin precipitarse y sin agregarse y la penetración efectiva a través de la bicapa de lípidos.
3. Rendimiento cuántico alto con la finalidad de generar oxígeno singulete.
4. Un alto coeficiente de absorción molar en longitudes de onda de 600-850 nm en la región de la luz roja, que puede penetrar más el tejido siendo la energía suficiente para producir estados tripletes.

#### Características biológicas

5. Alta selectividad para ser retenido en el tejido tumoral.

6. Acumulación rápida en las células tumorales en organelos diferentes al núcleo.
7. No generar citotoxicidad en la oscuridad
8. No tener efecto mutagénico, irradiado o no irradiado
9. Eliminación rápida en los pacientes por fotodegradación, metabolización y excreción

Tabla 1. Características principales de los Fs empleados en TFD [31, 32]

Fotosensibilizador	ex [nm]	Solvente
<i>Derivados de hermatoporfirina</i>	632	Agua
<i>Ácido 5 - aminolevulínico</i>	635	Buffer Fosato (1%)-tritón (100X)
<i>Verteporfirina</i>	690	Buffer Fosato (1%)-tritón (100X)
<i>Etil etiopurpurina de estaño</i>	660	-
<i>Temoporfin</i>	652	-
<i>Texafirina</i>	732	-
<i>Hipericina</i>	590	Buffer Fosato (1%)-tritón (100X)
<i>Rodamina</i>	511	Agua
<i>Poficeno</i>	590	-
<i>Ftalocianina</i>	670-680	Agua pesada
<i>Azul de metileno</i>	668	Agua
<i>Rosa de Bengala</i>	540	Agua
<i>Curcumina</i>	420-430	-

### 2.3.1 Características del AM

El AM (*trihidrato (dimetilamino) de cloruro del phenazathionium 3,7-Bis*), es un colorante de la familia de las fenotiazinas, utilizado ampliamente en el campo clínico. Mostrando actividad in vivo contra varios tipos de tumores al interactuar con luz roja. El espectro de absorción del AM depende de la dimerización. La forma monómera y dímera tienen distinto espectro de absorción, el tipo monómero presenta pico de absorción en 664 nm y el tipo dímero en 590 nm. El AM tiene la capacidad de acumularse en la mitocondria. La generación de ERO en este organelo causadas por la TFD induce a la activación de la apoptosis [33].

### 2.3.2 Características del RB

El RB (*4,5,6,7-tetrachloro-20,40,50,70-tetraiodofluoresceindisodio*) es un colorante perteneciente a la familia de los xantenos. Este compuesto, soluble en agua y biocompatible, se utiliza en la práctica clínica como agente diagnóstico para trastornos oftalmológicos y evaluación de la función hepática [34]. Dado que posee una carga aniónica, el RB no puede penetrar la membrana lipídica. Se ha propuesto un mecanismo de acción para este compuesto en diversas células cancerosas. En TFD, el RB actúa como Fs, activando el receptor de muerte Fas mediante la acción del oxígeno singulete. Este proceso está implicado en la señalización de vías extrínsecas de apoptosis. Presenta un pico de absorción máximo en el rango de 540-550 nm [35].

### 2.3.3 Características de la Cur

La Cur| ((1 E, 6 E) – 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) – 1,6-heptadieno-3,5-diona)) es un compuesto polifenólico natural. Posee la característica de ser insoluble en agua y fácilmente soluble en disolventes orgánicos como ácido acético, cetonas, álcalis y cloroformo. La Cur ha demostrado poseer propiedades fotodinámicas, lo que significa que puede generar ERO cuando se activa por la luz en presencia de oxígeno. Demostrando selectividad hacia las células cancerosas [36]. Además de su capacidad para inducir la muerte en células cancerosas, la Cur también ha mostrado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que pueden ayudar a mitigar el daño oxidativo inducido por la TFD en las células sanas circundantes. Sin embargo, la Cur enfrenta desafíos en términos de su solubilidad en agua y su biodisponibilidad en el cuerpo humano. Tiene un pico de absorción principal alrededor de 420-430 nm. Sin embargo, este pico puede cambiar ligeramente dependiendo del disolvente (agua, etanol, etc.) [37].

## 2.4 Equilibrio REDOX en células de cáncer

### 2.4.1 Producción de ERO

Las ERO se pueden generar tanto por factores endógenos como exógenos. La mitocondria es la principal fuente de producción de ERO endógenas las cuales contribuyen al estrés oxidativo intracelular. El desarrollo de ERO ocurre en la cadena transportadora de electrones, específicamente en la membrana interna de la mitocondria durante la fosforilación oxidativa al crear ATP. Por otro lado, las ERO exógenas son producidas por factores como la contaminación del aire, el humo del tabaco, la radiación UV y algunos medicamentos. En Figura 6 se puede apreciar de mejor forma como es que los niveles de ERO afectan las células:

- Niveles basales las ERO funcionan como segundos mensajeros intracelulares. Esto significa que actúan como señales dentro de la célula, regulando una variedad de procesos celulares importantes como: proliferación celular, diferenciación celular, muerte celular programada, respuesta inmune, mantenimiento del equilibrio REDOX y señalización celular.
- Niveles moderados de ERO pueden ser beneficiosos para las células cancerosas al aumentar su metabolismo y activar la señalización del crecimiento, favoreciendo la proliferación celular. Aunque los antioxidantes generalmente neutralizan las ERO, un exceso de ERO puede superar la capacidad antioxidante, causando un estado de estrés oxidativo que promueve la progresión del cáncer.
- Niveles elevados de ERO pueden ser perjudiciales para las células. Altas concentraciones pueden causar daño en el ADN, lo que puede llevar a apoptosis. Este tipo de muerte celular es un mecanismo importante para eliminar células dañadas o

anormales, pero un exceso de ERO puede desencadenar este proceso de manera excesiva y contribuir a la muerte celular [38].

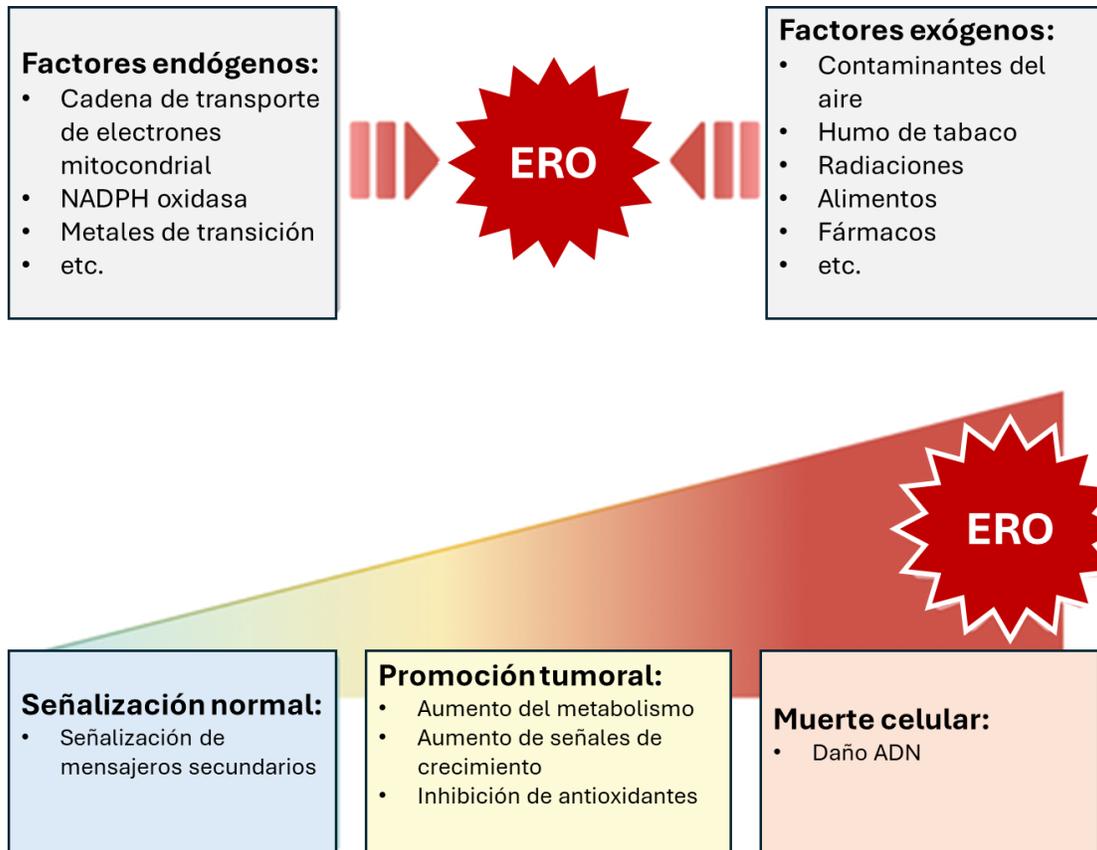


Figura 6. Generación y efectos de las ERO [38].

#### 2.4.2 ERO endógenas y antioxidantes

Las principales fuentes de ERO en células de melanoma son las mitocondrias, la familia de las oxidasas de NADPH (NOXs) y los melanosoma (Figura 7). En la mitocondria, la cadena transportadora de electrones, ubicada en la membrana interna, genera ERO principalmente en los complejos I, II y III. Estos complejos producen  $O_2^-$  al transferir un electrón al oxígeno molecular. El  $O_2^-$  generado en la matriz mitocondrial es rápidamente convertido en  $H_2O_2$  por la superóxido dismutasa 2 (MnSOD o SOD2). Mientras tanto, el complejo III también libera  $O_2^-$  hacia el espacio intermembranoso, donde puede atravesar los canales de anión dependientes de voltaje (VDAC) (Figura 6) y llegar al citosol, donde se convierte en  $H_2O_2$  mediante la acción de la superóxido dismutasa 1 (Cu/ZnSOD o SOD1). Por otro lado, la NADPH oxidasa 2 (NOX2), localizada en la membrana plasmática, transfiere electrones desde el NADPH intracelular hacia el  $O_2$  en el espacio extracelular, generando  $O_2^-$  el cual puede ser dismutado a  $H_2O_2$  por la superóxido dismutasa extracelular (ECSOD o SOD3), lo que facilita la entrada del  $H_2O_2$  a la célula debido a su capacidad para difundir libremente a

través de las membranas. Las enzimas SOD son extremadamente eficientes, con una de las mayores tasas catalíticas conocidas (kcat/KM), lo que hace que la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno sea altamente dependiente de la difusión [39, 40].

En los melanosomas, organelos responsables de la síntesis de melanina, la tirosinasa, una enzima clave en este proceso, también genera  $O_2^-$  como subproducto de la oxidación de la tirosina. Este superóxido puede ser convertido en  $H_2O_2$  por la SOD1. Además, la melanina producida por los melanosomas puede actuar como un antioxidante, protegiendo a las células del exceso de ERO. Sin embargo, la acumulación excesiva de ERO en estos organelos, como el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), resultante de la reacción entre superóxido y óxido nítrico ( $NO$ ), puede inducir la oxidación y nitrosilación de proteínas, causando daño celular [40].

El  $H_2O_2$  producido tanto en las mitocondrias como por las NOX puede ser transformado en  $HO\cdot$  mediante la reacción de Fenton, en presencia de iones de hierro ( $Fe^{++}$ ) o cobre ( $Cu^{++}$ ), teniendo una vida media corta y no poseen la capacidad de difundirse lejos de su sitio de producción. En contraste, debido a su capacidad para atravesar membranas, el  $H_2O_2$  interactúa con residuos de cisteína en proteínas clave involucradas en rutas de señalización como NRF2, AP1, APEX1, HIF y NFkB, regulando procesos de daño celular, apoptosis, reparación y proliferación [40].

Por otro lado, el GSH y desempeña un papel crucial en la defensa antioxidante celular, actuando como un cofactor de la glutatión peroxidasa (GPX), convirtiendo el  $H_2O_2$  en agua ( $H_2O$ ), lo que ayuda a mantener el equilibrio REDOX celular. El GSH también participa en la regeneración de otras moléculas antioxidantes y en la detoxificación de radicales libres, protegiendo a las células del daño oxidativo. Durante estos procesos, el GSH se oxida a glutatión disulfuro (GSSG), el cual puede ser regenerado a GSH por la glutatión reductasa (GR), cerrando así el ciclo antioxidante. Del mismo modo CAT convierte el  $H_2O_2$  en agua  $H_2O$  y  $O_2$  [40].

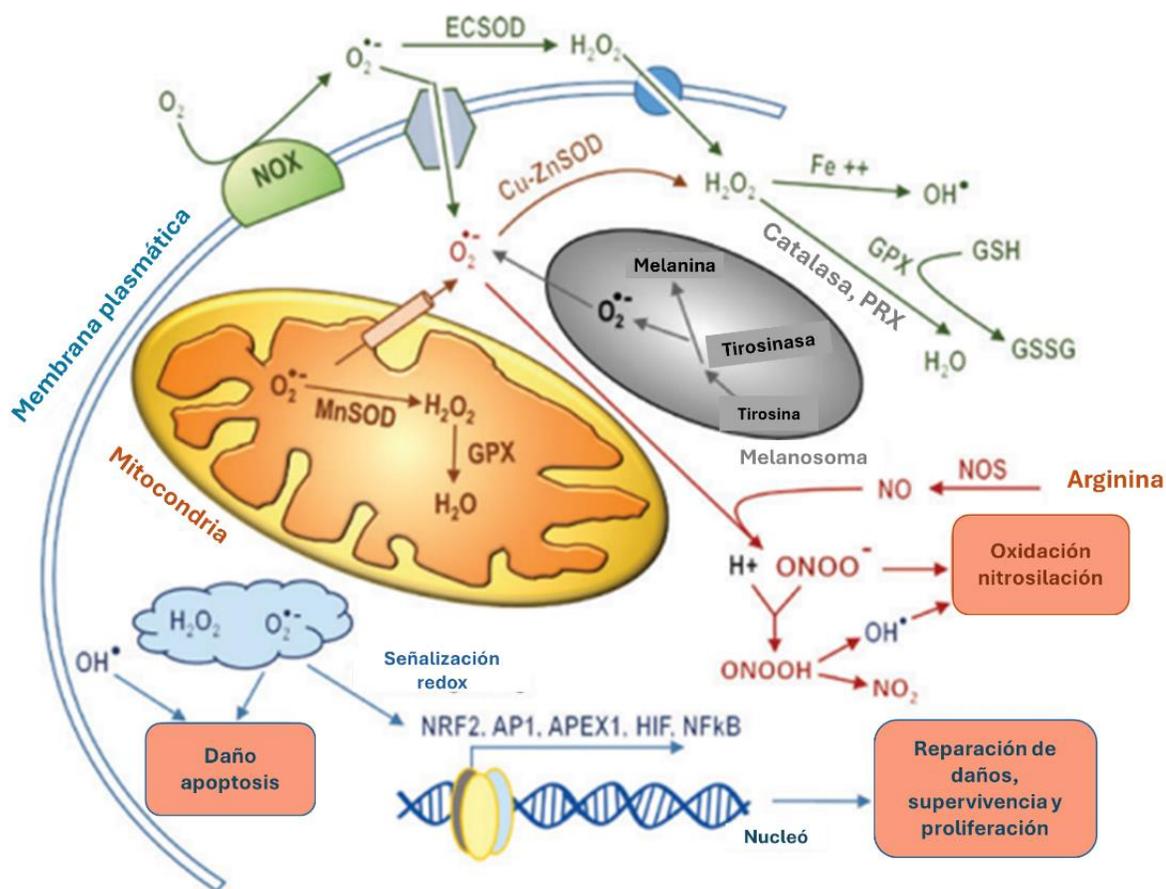
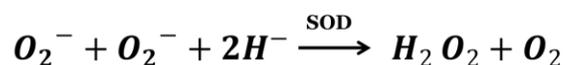


Figura 7. Generación y gestión genérica de ERO en melanocitos y melanoma [40].

### 2.4.3 SOD, CAT Y GSH

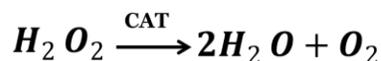
Las SOD son la primera línea de defensa contra las ERO, presenta la característica de ser metaloenzimas, ya que en sus centros activos hay iones metálicos con diferentes valencias. El proceso de catálisis es el siguiente:



Dos moléculas de O<sub>2</sub><sup>-</sup> reaccionan entre sí, en presencia de dos protones (H<sup>+</sup>), se forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. La SOD actúa en dos pasos, alternando entre dos estados de oxidación de un metal en su centro activo (que puede ser cobre, zinc, manganeso o hierro):

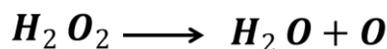
- En el primer paso, la SOD reduce un O<sub>2</sub><sup>-</sup> a O<sub>2</sub>.
- En el segundo paso, oxida otro O<sub>2</sub><sup>-</sup> para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [41, 42].

Posteriormente si los niveles intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son altos la CAT cataliza la descomposición en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>

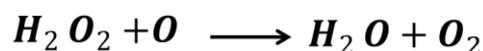


CAT es enzima tetramérica que contiene un grupo hemo en su centro activo. El mecanismo general de la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sigue dos etapas:

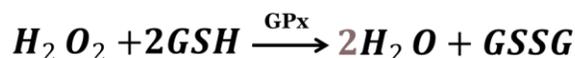
- Primera etapa: El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se une al grupo hemo de la catalasa y se oxida, liberando una molécula de agua.



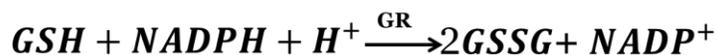
- Segunda etapa: El átomo de oxígeno (O) reactivo resultante oxida una segunda molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, liberando otra molécula de agua y oxígeno molecular [42, 41].



Por otro lado, si los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son bajos, entra en acción el antioxidante GSH con ayuda de la enzima GPx.



Durante esta reacción dos moléculas de 2GSH se oxidan y se convierten en GSSH como fuente de electrones. El GSSG es restaurado a su forma reducida (GSH) por la enzima GR utilizando NADPH como fuente de electrones:



Este ciclo es crucial para mantener un equilibrio REDOX en la célula, ya que GSH es necesario para neutralizar continuamente ERO. La proporción GSH/GSSG es un indicador importante del estado REDOX celular y de la capacidad de la célula para enfrentar el estrés oxidativo [42, 43].

#### 2.4.4 ERO y el cáncer

Los ERO son moléculas con vida corta que contiene electrones desapareados, los cuales se forman por la reducción parcial del oxígeno molecular. Derivados del oxígeno que comprenden radicales libres de oxígeno altamente inestables, como el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y OH•, que pueden convertirse rápidamente en no radicales más estables y libremente difusibles, como

el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tanto  $\text{O}_2^-$  como  $\text{H}_2\text{O}_2$  han sido los ERO más estudiados en el cáncer, siendo esta última molécula de señalización mejor descrita [44, 45].

Los niveles elevados de ERO en las células cancerosas son una característica distintiva de muchos tipos de cáncer. Esto está involucrado tanto en la iniciación como en la progresión del cáncer. Estas células tienden a exhibir un aumento en la producción de ERO debido a su alta tasa de metabolismo y su estado de estrés oxidativo crónico. Esta sobrecarga de ERO puede ser el resultado de múltiples factores, como la activación de vías de señalización oncogénicas, la hipoxia (falta de oxígeno) en el microambiente tumoral, la disfunción mitocondrial, el aumento en el metabolismo celular y el daño al ADN [44].

A pesar de que los ERO pueden causar daño celular, las células cancerosas han desarrollado mecanismos adaptativos para sobrevivir y prosperar en un entorno con niveles elevados de ERO, evitando la muerte celular tumoral. Una de las estrategias clave es mantener un equilibrio entre la producción de ERO y los antioxidantes endógenos, que actúan para neutralizar las ERO y prevenir el daño celular. Las células cancerosas a menudo sobreexpresan antioxidantes como la SOD, CAT y GSH, que ayudan a mantener un estado REDOX favorable para el crecimiento y la supervivencia celular (Figura 8). Estas enzimas son las encargadas de neutralizar los ERO al convertirlas en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

Además, las células cancerosas pueden activar vías de señalización específicas, como la vía del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (NRF2), que regula la expresión de genes antioxidantes y de respuesta al estrés oxidativo. Esto les permite adaptarse mejor a las condiciones de estrés oxidativo y promover su supervivencia y proliferación incluso en presencia de altos niveles de ERO.

En conjunto, la capacidad de las células cancerosas para mantener un equilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes les permite sobrevivir en un entorno caracterizado por un estrés oxidativo crónico. Esta adaptación les confiere una ventaja selectiva y contribuye a su capacidad de evadir la muerte celular inducida por ERO, lo que ha llevado a la noción de que estas células pueden ser "inmortales" en cierto sentido, ya que son capaces de resistir las condiciones adversas del microambiente tumoral [46, 39, 38, 47].

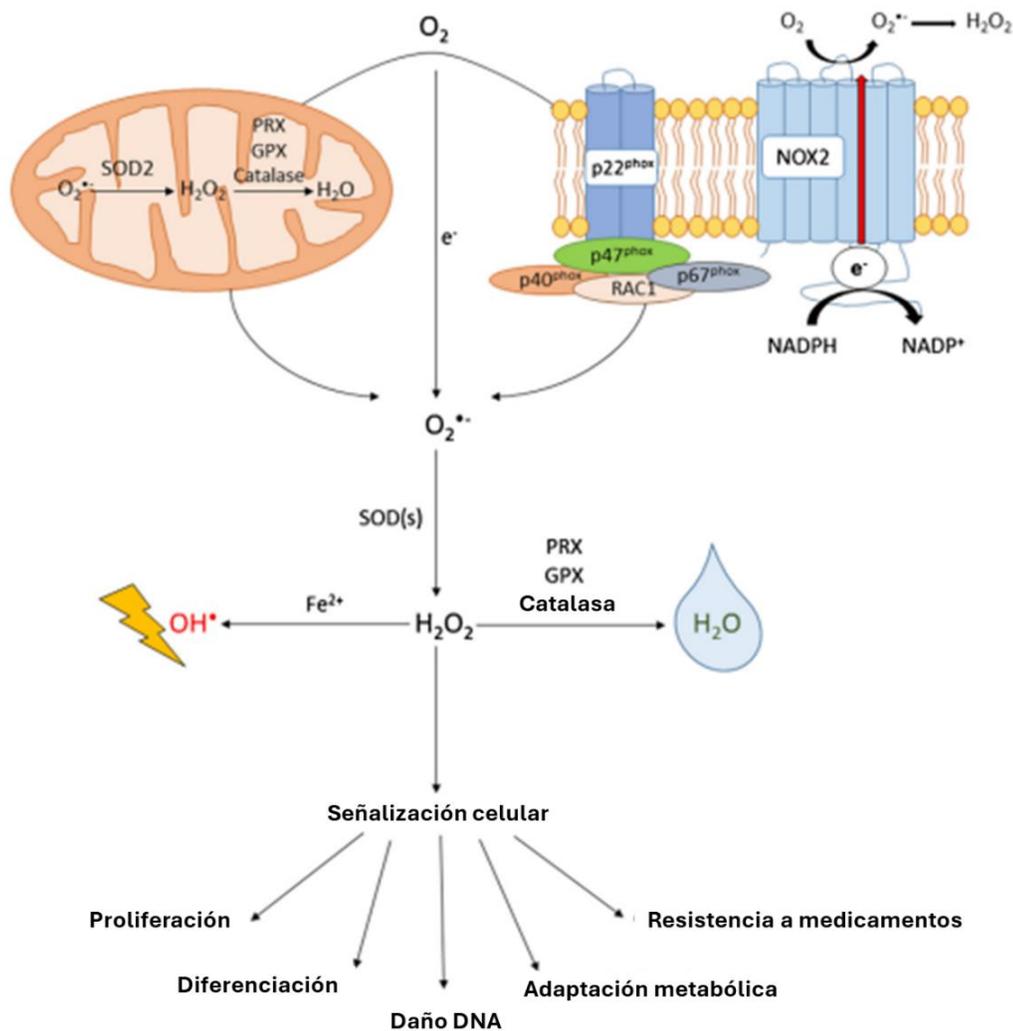


Figura 8. Fuentes, regulación y resultados biológicos de las ERO [44].

## 2.5 Estado del arte

La TFD tuvo sus orígenes en Munich, Alemania, en 1900 gracias a los descubrimientos del estudiante de medicina Oscar Raab. Mientras investigaba los efectos de los colorantes de acridina en protozoos, descubrió casualmente durante una tormenta eléctrica que, al combinar este colorante con la luz, estos microorganismos morían [10].

Raab continuó con sus experimentos y estableció que la propiedad citotóxica de este colorante se debía a la generación de ERO inducidas por la luz. Posteriormente, estos colorantes conocidos como Fs fueron empleados en tratamientos dermatológicos por Herman Von Tappeiner, profesor de Raab, y por Jesionek en 1904. Estos estudios confirmaron el requerimiento de oxígeno y Fs para que estas reacciones se llevaran a cabo, nombrando a esta reacción como "acción fotodinámica" [11].

En 1950, se iniciaron estudios con hematoporfirina como Fs, obteniendo respuestas favorables. No obstante, fue hasta 1970 que la TFD se aplicó con éxito a tratamientos de cáncer cutáneo y otros sistemas, gracias al trabajo de Dougherty y sus colaboradores [12, 13].

En 1985 H. Sies et al., en su artículo “Oxidative stress: damage to intact cells and organs”, los autores examinan los mecanismos mediante los cuales el estrés oxidativo daña a células y órganos, centrándose en los radicales libres y ERO. Destacan cómo las células sufren daño cuando hay un desequilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes, lo que resulta en la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. El concepto de "estrés oxidativo" se vuelve crucial para entender una variedad de enfermedades crónicas entre ellas el cáncer, destacando la importancia del mecanismo de acción de GSH para neutralizar ERO [15].

En 1993, Church et al., publican su artículo titulado “Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells”, investiga el papel de la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) en la regulación del comportamiento maligno en células de melanoma humano UACC-903. Este estudio sugiere que la sobreexpresión de MnSOD tiene efectos significativos sobre el crecimiento de las células de melanoma, su capacidad tumorigénica y su estructura mitocondrial, abriendo la puerta a nuevas investigaciones sobre el papel de MnSOD en la tumorigénesis del melanoma [48].

Meyskens, F.L et al., en 1997 en el trabajo titulado “Luminol-Enhanced Chemiluminescent Response of Human Melanocytes and Melanoma Cells to Hydrogen Peroxide Stress” sugieren que las enzimas antioxidantes SOD y CAT tienen un papel crucial en la regulación del equilibrio oxidativo en las células de melanoma. Las diferencias en la actividad de estas enzimas y en la producción de ERO entre melanocitos y células de melanoma pueden ser clave para entender la progresión del melanoma y podrían ser un objetivo terapéutico potencial para tratar esta enfermedad [16]. En 2021 publicaron el estudio “Aberrant REDOX regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes” en el cual destacaron la regulación aberrante del estrés oxidativo en el melanoma y su papel en la progresión del cáncer [17].

En 2003 Farmer y Meyskens en su estudio con melanina como pro-oxidante describen la interacción entre la producción excesiva de ERO y la limitada capacidad de las células de melanoma para neutralizar estos radicales, debido a una actividad reducida de SOD y CAT en células de melanoma, apuntando que el generar un desequilibrio entre ERO y estas enzimas antioxidantes podría ser una estrategia prometedora para inducir la muerte celular selectiva en el melanoma [18].

Un estudio hecho en 2015 por E. Piskouno et al., observó que el estrés oxidativo, mediado por un aumento en los niveles de ERO, inhibía la metástasis de células de melanoma. Los niveles elevados de ERO dieron como resultado una disminución de los niveles de GSH. La

relación entre GSH y ERO ayuda a entender cómo el estrés oxidativo influye en la progresión del melanoma y su capacidad para metastatizar [19].

En 2018 un estudio publicado por Jelena Pantic Bisevac et al., concluyeron que el estrés oxidativo tiene un papel significativo en la progresión del melanoma. La reducción de la capacidad antioxidante en las etapas avanzadas del melanoma sugiere que las terapias que modulan el estrés oxidativo podrían ser beneficiosas para inhibir la progresión y la metástasis del melanoma. Los autores sugieren que la inhibición del estrés oxidativo podría tener potencial como estrategia terapéutica [20].

Un estudio publicado en 2022 por Larissa et al. subrayan la importancia de las enzimas antioxidantes relacionadas con el mecanismo REDOX en la progresión del melanoma, su influencia en la resistencia a los tratamientos, y su potencial como dianas terapéuticas. El texto refuerza la idea de que comprender y manipular estos mecanismos REDOX es crucial para desarrollar tratamientos más efectivos para tratar el melanoma [21].

---

## Capítulo III

---

En este capítulo se presenta la información correspondiente a los materiales utilizados en esta investigación, así como la descripción de los métodos que se llevaron a cabo. Los métodos incluyen el cultivo y mantenimiento de las células, la optimización de las dosis de FS y luz para la TFD, la medición de viabilidad celular por ensayo MTT, la medición de ERO por citometría de flujo, así como también la medición de los antioxidantes (GSH, SOD).

### 3 Metodología

#### 3.1 Material biológico

Se trabajó con una línea celular de melanoma A-375 (ATCC® CRL-1619™). Esta es una línea celular que exhibe morfología epitelial aislada de la piel de una paciente de 54 años con melanoma maligno (Figura 9a).

También se hizo uso de una línea celular de fibroblastos WS1 (ATCC® CRL-1502™). Línea celular aislada de la piel de una donante mujer afrodescendiente (Figura 9b).

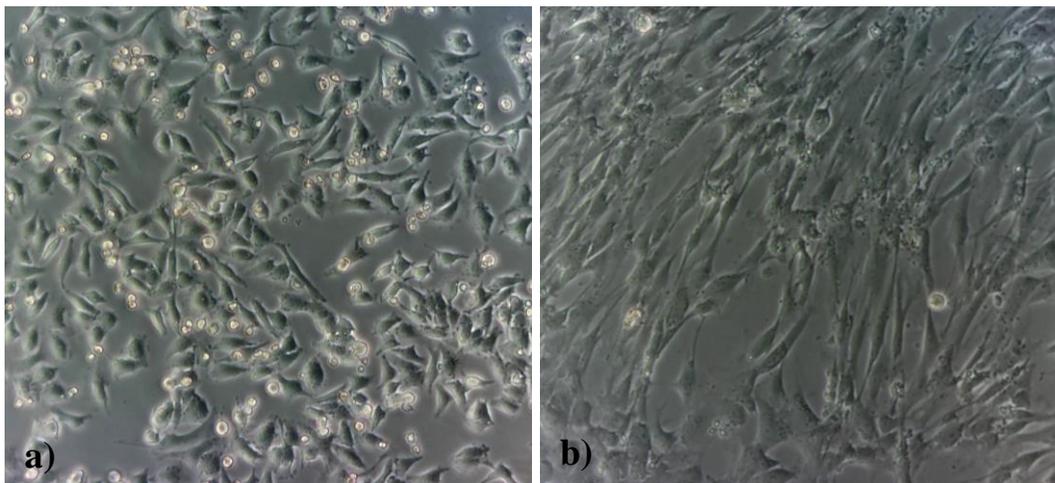


Figura 9. a) línea celular de melanoma A375, b) línea celular de fibroblastos WS1.

##### 3.1.1 Mantenimiento de las líneas celulares

Para mantenimiento de los cultivos, se sembró la línea celular de melanoma A-375 en botellas de poliestireno para cultivo (Techno Plastic Products #90025) en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco) adicionado con 10% suero fetal bovino (E.R), 1% de piruvato de sodio (Gibco), 1500 mg/L de bicarbonato de sodio (KARAL) y 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma Aldrich), se incubaron a 37°C con atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> hasta formar una monocapa confluyente de células al 80%.

Para el caso de los fibroblastos fueron cultivados en botellas de poliestireno para cultivo en Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC, 30-2003) adicionado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina, se incubaron a 37°C con atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> hasta formar una monocapa confluyente de células al 80%.

### 3.1.2 Cultivo celular

Se esperó a que las células sembradas en botellas de cultivo tuvieran el 80% de confluencia para posteriormente ser lavadas dos veces con buffer fosfato salino (PBS) (Omnichem) y consecutivamente tripsinizadas con 500 µL de tripsina (Trypsin-EDTA gibco) a una concentración de 1:10.

Para la línea celular de melanoma A375, fueron sembradas 20,000 células por pozo en una placa de 96 pozos, para poder realizad la TFD se dejaron en incubación por 24 horas a 37 °C

Para la línea celular de fibroblastos se sembraron 5,000 células por pozo y se dejó en incubación durante 48 horas a 37 °C para poder llevar a cabo la TFD.

## 3.2 TFD

Se utilizaron tres Fs solubles en agua y con un espectro de absorción dentro del rango visible. RB (MEYER #632-69-9), AM (MEYER #7220-79-3), Cur (Sigma-Aldrich #SLBN7214V). Se realizaron 4 diferentes ensayos para poder evaluar la eficiencia de la TFD:

- TFD: este grupo se incubó con Fs en oscuridad durante una hora, se realizaron dos lavados con PBS, se añadieron 100 µl de PBS y se irradió. Se retiró el PBS y posteriormente, se incubó con el medio correspondiente para cada línea celular durante 24 horas para evaluar la viabilidad celular
- Control Viabilidad (CV): a este grupo no se le aplicó ningún tratamiento: las células fueron incubadas únicamente con PBS en la oscuridad, se realizaron dos lavados con PBS, posteriormente se añadió el medio de cultivo correspondiente para cada línea celular y se incubó durante 24 horas para medir la viabilidad celular.
- Control Fotosensibilizador (CF): al cultivo celular se le adicionó únicamente el Fs: se siguió el mismo procedimiento que en el ensayo de TFD, pero sin irradiación. Esto permitió evaluar la viabilidad celular en ausencia de tratamiento fotodinámico.
- Control Irradiación (CI): las células únicamente fueron irradiadas a la longitud de onda correspondiente al experimento, se realizó el mismo proceso que en el ensayo de TFD, pero sin aplicar el Fs.

### 3.2.1 Dispositivos lumínicos

Se emplearon tres dispositivos lumínicos, diseñados y elaborados en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica. Estos dispositivos cuentan con una placa disipadora de calor, un soporte para microplacas de 96 pozos y un arreglo de 12 LED's.

- Dispositivo de ancho de banda de 600-650 nm emitiendo una luz roja (Figura 10a) con una intensidad de salida promedio de 17.64 mW.
- Dispositivo de ancho de banda es de 490-540 nm emitiendo una luz verde (Figura 10b) con una intensidad de salida promedio de 24.8 mW.
- Dispositivo de ancho de banda corresponde 460-480 nm emitiendo luz azul (Figura 10c) con una intensidad de salida promedio de 28 mW.



Figura 10. a) Dispositivo emisor de luz roja, b) dispositivo emisor de luz azul, c) dispositivo de luz emisor verde.

### 3.2.2 Activación del AM

Se empleó AM a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  y la activación de este se realizó mediante un dispositivo emisor de luz roja irradiado a una dosis de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

### 3.2.3 Activación del RB

Para en Fs RB se emplearon 3 distintas concentraciones para la línea celular A375, las cuales fueron: 1  $\mu\text{M}$  con 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 3 y 5  $\mu\text{M}$  con 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Para el caso de las células WS1 se emplearon la concentración de 1  $\mu\text{M}$  con 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  y 3  $\mu\text{M}$  con 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  y para la activación de este se realizó mediante un dispositivo emisor de luz verde.

### 3.2.4 Activación de la Cur

Las concentraciones de Cur evaluadas en la línea celular A375 las cuales fueron de 1.5  $\mu\text{M}$  con 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 3  $\mu\text{M}$  con 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 6 y 12  $\mu\text{M}$  con 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Para el caso de la línea WS1 fueron a 1.5  $\mu\text{M}$  con 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  y 3  $\mu\text{M}$  con 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , para la activación se empleó el dispositivo emisor de luz azul.

### **3.3 Medición de viabilidad celular por ensayo MTT**

Una vez transcurridas las 24 horas de incubación para cada ensayo se procedió a la medición de viabilidad para ello se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS, después se añadieron 100  $\mu$ l del medio correspondiente a cada línea celular el cual contenía solución de trabajo de MTT (Sigma Aldrich) al 20%, se incubaron por 4 horas, se retiró la solución de MTT y después se añadió isopropanol con un pH 4 y se agitó durante 15 minutos a 470 rpm en un agitador de placas (Scientific). Se tomó medición en un lector de microplacas (BIO-RAD iMark™) y se hizo la lectura dual de absorbancia a 595 y 655 nm.

### **3.4 Rastreo del Fs**

El cultivo celular se incubó hasta obtener una confluencia del 80%, posteriormente se tripsinizó y se sembraron  $1 \times 10^6$  células para el caso de A35 y 250,000 células para WS1, en frascos de cultivos con medio correspondiente para cada línea celular, posteriormente se incubó por 24 horas para el caso de las células A357 y 48 horas para las células WS1, a 37°C en un ambiente con 5% CO<sub>2</sub>.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación correspondiente, las células fueron expuestas a los tres Fs por 1 hora con las mismas condiciones de crecimiento. Posterior a esta hora se realizaron dos enjuagues con PBS, se tripsinizaron las células para obtener el botón celular. Las células fueron lisadas por presión osmótica al resuspender el pellet con 200  $\mu$ L de agua inyectable (PISA) y sonicación (Luzeren) por 15 minutos. Se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos y se retiraron 100  $\mu$ L del sobrenadante para medir la absorbancia.

### **3.5 Detección de las ERO**

El kit de ensayo de ERO se utilizó según las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich MAK142-1KT). Se midieron las ERO intracelulares, específicamente radicales superóxido e hidroxilo. Se excitó a 640 nm y se midió la emisión a 675 nm.

Una vez realizada la TFD se incubaron las células por 1 hora con la finalidad de permitir la generación de ERO, posteriormente las células fueron levantadas de los pozos con ayuda de una espátula de goma, se recolectaron en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante mediante decantación y se adicionaron 100  $\mu$ l de medio, de modo que se tuviera un volumen aproximado por tubo de 200  $\mu$ l. Se añadieron 0.2  $\mu$ l de la mezcla de reacción maestra (buffer de ensayo y reactivo detector de ERO). Se incubó con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 30 minutos en oscuridad. Las células se resuspendieron, filtraron y colocaron en un tubo para citometría y se realizaron las lecturas de las muestras en el citómetro de flujo (BD FACS Canto II).

Se realizó un control de autofluorescencia partiendo del ensayo CV, pero con la diferencia de que no se adicionó la mezcla de reacción maestra.

Con base en el histograma generado por la citometría de flujo, las células se dividieron en tres poblaciones distintas según la intensidad de fluorescencia, lo que reflejó los niveles intracelulares de ROS (bajos, medios y altos). Esta clasificación se realizó tomando en cuenta la autofluorescencia, el CV y la TFD, como se observa en la Figura 19, basado en el análisis de histogramas de citometría de flujo, se definieron tres rangos de clasificación de ERO:

- **Bajos ERO:** Valores de fluorescencia similares o ligeramente superiores a la autofluorescencia y ubicados hasta aproximadamente  $10^{3.2}$  en la escala logarítmica.
- **Medios ERO:** Rango intermedio, comprendido entre aproximadamente  $10^{4.0}$  -  $10^{4.3}$
- **Altos ERO:** Valores superiores a  $10^{4.3}$ , característicos de un incremento significativo en los niveles de ERO, como resultado de la exposición a la TFD.

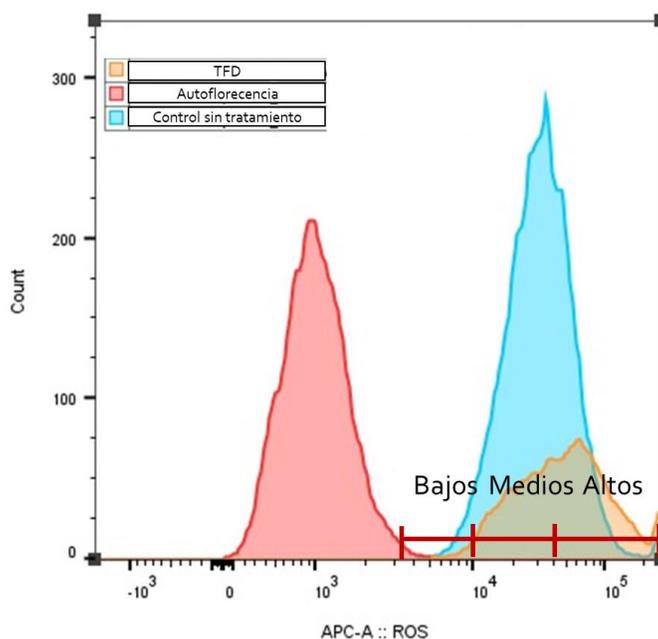


Figura 11. Parámetros seleccionados para clasificar la producción de ROS en la línea A375 basados en la fluorescencia obtenida con el CV.

### 3.6 Antioxidantes

Para la medición de cada uno de los antioxidantes se emplearon kits de detección y se siguió la metodología descrita por el fabricante para cada uno.

### 3.6.1 Detección de SOD

#### 3.6.1.1 Lisado celular

El kit de ensayo de para detección de SOD se utilizó según las instrucciones del fabricante (Cayman CHEMICAL). Este kit utiliza una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir una dismutación del 50% del radical superóxido medida con el cambio en la absorbancia por minuto a 25°C y pH 8. El ensayo de SOD mide los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD).

Para poder medir las SOD, las células fueron sometidas a lisado celular de la siguiente forma, una vez realizada la TFD se incubaron las células por 1 hora con la finalidad de permitir la generación de SOD, se retiró el medio de los pozos, se lavó con PBS y se adicionaron 100 µl de PBS frío a cada pozo, posteriormente las células fueron levantadas de los pozos con ayuda de una espátula de goma, se recolectaron en un tubo eppendorf y centrifugaron a 1500 gx por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante por decantación y se adicionaron 100 µl de PBS frío, los tubos se llevaron a baño ultrasónico por 15 segundos, se llevaron a centrifugación a 1,500 gx por 5 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf y colocó en frío para su posterior análisis.

#### 3.6.1.2 Preparación de estándar

Se diluyeron 20 µl del estándar de SOD con 1.98 ml de tampón de muestra diluido para obtener la solución madre de SOD. Se tomaron siete tubos de ensayo de vidrio limpios y marcados de A-G. Agregando la cantidad de solución madre de SOD y tampón de muestra diluido a cada tubo como se describe en la tabla 2.

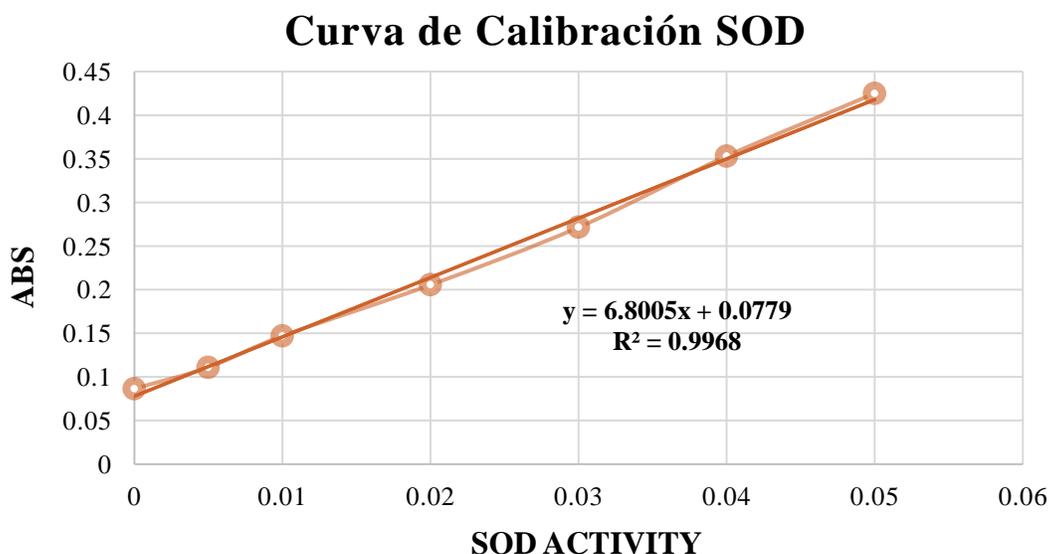
Tabla 2. SOD estándar.

Tubo	Solución madre SOD (µl)	Tapón de muestra diluido (µl)	Actividad final de SOD (U/ml) en pozo
A	0	1,000	0
B	20	980	0.005
C	40	960	0.010
D	80	920	0.020
E	120	880	0.030
F	160	840	0.040
G	200	800	0.050

Se tomaron 200 µl de la solución de detector de radicales diluido y 10 µl de muestra de cada uno de los tubos mencionados en la tabla 2. Se adicionaron 20 µl de xantina oxidasa diluida, se agito suavemente la placa, se incubó por 30 minutos a 25°C y se midió en lector de microplacas a 450 nm.

### 3.6.1.3 Lectura de la absorbancia de la muestra

Para medir las SOD se empleó el sobrenadante obtenido del lisado celular, del cual se tomaron 10  $\mu$ l de cada una de las muestras, 200  $\mu$ l de solución de detector de radicales y 20  $\mu$ l de xantina oxidasa diluida, se agitó suavemente y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, se llevó a lectura en lector de microplacas a 450 nm. Para poder saber la concentración obtenida de las SOD, los resultados obtenidos en la absorbancia fueron interpolados con la curva de calibración (Gráfica 1).



Gráfica 1. Curva de calibración para detectar la concentración de SOD intracelular.

## 3.6.2 Detección de GSH

### 3.6.2.1 Lisado celular

Para medir la GSH, las células fueron sometidas a lisado celular de la siguiente forma. Una vez realizada la TFD se incubaron las células por 1 hora con la finalidad de permitir la generación de GSH, se retiró el medio de los pozos, se lavó con PBS y se agregaron 50  $\mu$ l de PBS, las células fueron desprendidas de los pozos con ayuda de una espátula de goma estéril, las células se recolectaron y fueron pasadas a tubos eppendorf, se centrifugaron a 600 grx por 5 minutos, el sobrenadante se retiró por decantación, se midió el volumen del pellet y se adicionó SSA 5% 3 veces el volumen del sobrenadante. Se vortexó 15 segundos y se llevó a congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos hasta que se congelaron y posteriormente se descongelaron en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$ , este procedimiento se repitió dos veces. Las muestras se dejaron reposar por 5 minutos a  $2-8^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se llevaron a centrifugación a 10,000 grx por 10 minutos, se tomaron 300  $\mu$ l del sobrenadante y se pasaron a otro tubo eppendorf y se mantuvieron a  $2-8^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### 3.6.2.2 Curva estándar

Se diluyeron 5 µl de solución Stock GSH Estándar en 995 µl de SSA 5%, dando como resultado una solución de GSH a 50 µM. Partimos de esta concentración para realizar las diluciones para la curva estándar como se muestra en la tabla 3, con un volumen total de 10 µl por pozo.

Tabla 3. Preparación de soluciones estándar de glutatión GSH mediante diluciones seriadas de la solución de glutatión de 50 µM.

Número de pozo	1	2	3	4	5
GSH Concentración (µM)	50	25	12.5	6.25	3.125
GSH Solución (µl)	50	25 (del pozo 1)	25 (del pozo 2)	25 (del pozo 3)	25 (del pozo 4)
5% SSA (µl)	Nada	25	25	25	25
nmoles GSH en 10 µl de muestra	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312

Una vez obtenidas las diluciones de GSH se adicionaron 150 µl de la mezcla trabajo, se mezcló mediante pipeteo suave y se incubó durante 5 minutos, posteriormente se adicionaron 50 µl de NADPH y se llevó a lectura en el lector de microplacas a 412 nm con lecturas cinéticas a intervalos de 1 minuto durante 5 minutos.

### 3.6.2.3 Lectura de la absorbancia de la muestra

En una placa de 96 pozos, fueron colocados 10 µl de muestra de cada uno de los ensayos, se adicionaron 150 µl de mezcla trabajo, se mezcló mediante pipeteo suave y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 50 µl de NADPH y se llevó a lectura en lector de microplacas a 412 nm con lecturas cinéticas a intervalos de 1 minuto durante 5 minutos.

También se generó un blanco empleando SSA 5%, siguiendo la misma metodología hecha para las muestras.

Para obtener la concentración de GSH, se obtuvo una pendiente por cada ensayo (absorbancia vs tiempo). La ecuación empleada fue la siguiente:

$$\text{nmoles GSH por ml de muestra} = \frac{\Delta A / \text{min}(\text{muestra}) * \text{dil}}{\Delta A / \text{min}(1\text{nmol}) * \text{vol}}$$

Donde:

$\Delta A / \text{min}(\text{muestra})$  = pendiente generada por la muestra (después de restar los valores generados por la reacción del blanco).

$\Delta A/\text{min}(1\text{nmol})$  = pendiente calculada a partir de la curva estándar para 1 nmol de GSH.

**dil** = factor de dilución de la muestra original.

**vol** = volumen de la muestra en la reacción, expresado en ml.

### 3.6.3 Análisis estadístico

Para comparar los grupos: CV, CF, CI y TFD, se calcularon las medias y las desviaciones estándar. Las comparaciones estadísticas entre los grupos control y tratamiento se realizaron de acuerdo con los supuestos de normalidad de los datos.

En los casos donde los datos cumplieron con los supuestos de normalidad, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Tukey para identificar diferencias significativas específicas, utilizando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

Para los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los grupos que no cumplieron con la normalidad fueron: AM-TFD A375, RB-TFD 5  $\mu\text{M}$  A375 y RB-TFD 1  $\mu\text{M}$  A375.

---

## Capítulo IV

---

Este capítulo presenta los hallazgos obtenidos en los experimentos, destacando cómo la TFD afecta la viabilidad celular, los niveles de ERO, así como los niveles de SOD y GSH en las células tratadas. Los resultados muestran que la TFD con diferentes Fs induce un aumento en la producción de ERO y reduce la actividad antioxidante en las células de melanoma, lo que conduce a la muerte celular selectiva.

### 4 Resultados

#### 4.1 Rastreo del Fs

Los resultados obtenidos en la línea celular A375 indicaron que la concentración de AM internalizado fue de 6  $\mu\text{M}$ , de una concentración inicial de 20  $\mu\text{M}$ , lo cual representa un 31% de internalización. En el caso de RB, de una concentración incubada de 1  $\mu\text{M}$ , se internalizó 0.68  $\mu\text{M}$ , equivalente al 68%. Para Cur, se detectó una internalización de 1  $\mu\text{M}$  de los 1.5  $\mu\text{M}$  incubados, lo que representa un 70% (Figura 12a). Estos valores sugieren una internalización relativamente eficiente de los tres fotosensibilizadores (Fs) en las células A375, lo cual fue corroborado mediante observación microscópica (aumento de 40X) posterior al periodo de incubación (Figura 13).

En la línea celular WS1, la concentración de fotosensibilizadores internalizados mostró diferencias notables respecto a A375. Para AM, la concentración internalizada fue de 4.2  $\mu\text{M}$  de un total de 20  $\mu\text{M}$  incubados, lo que representa un 21% de internalización. En el caso de RB, se detectaron 0.58  $\mu\text{M}$  internalizados de 1  $\mu\text{M}$  incubado, equivalente al 58%, mientras que para Cur, la internalización fue de 0.8  $\mu\text{M}$  de los 1  $\mu\text{M}$  incubados, representando un 53% (Figura 11b). Estos resultados sugieren una internalización menos eficiente en las células WS1 en comparación con las A375, si bien se comprobó la presencia de los tres Fs dentro de las células mediante observación microscópica (aumento de 20X) posterior al periodo de incubación (Figura 14).

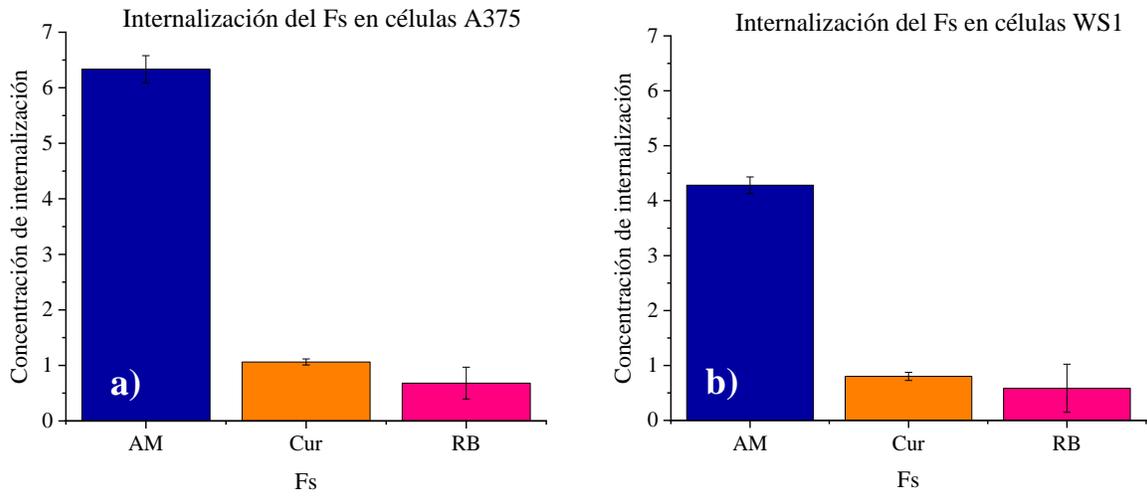


Figura 12. Concentración de F5 internalizado en a) células A375 y b) células WS1.

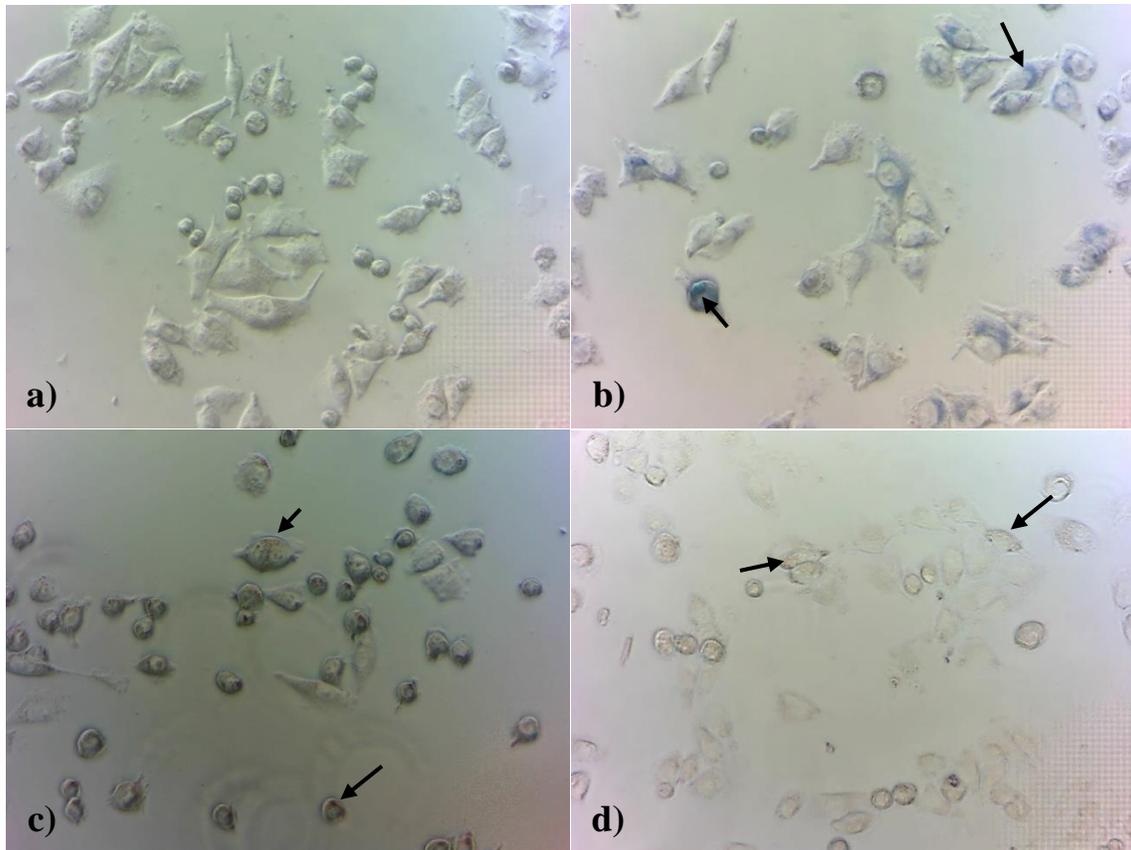
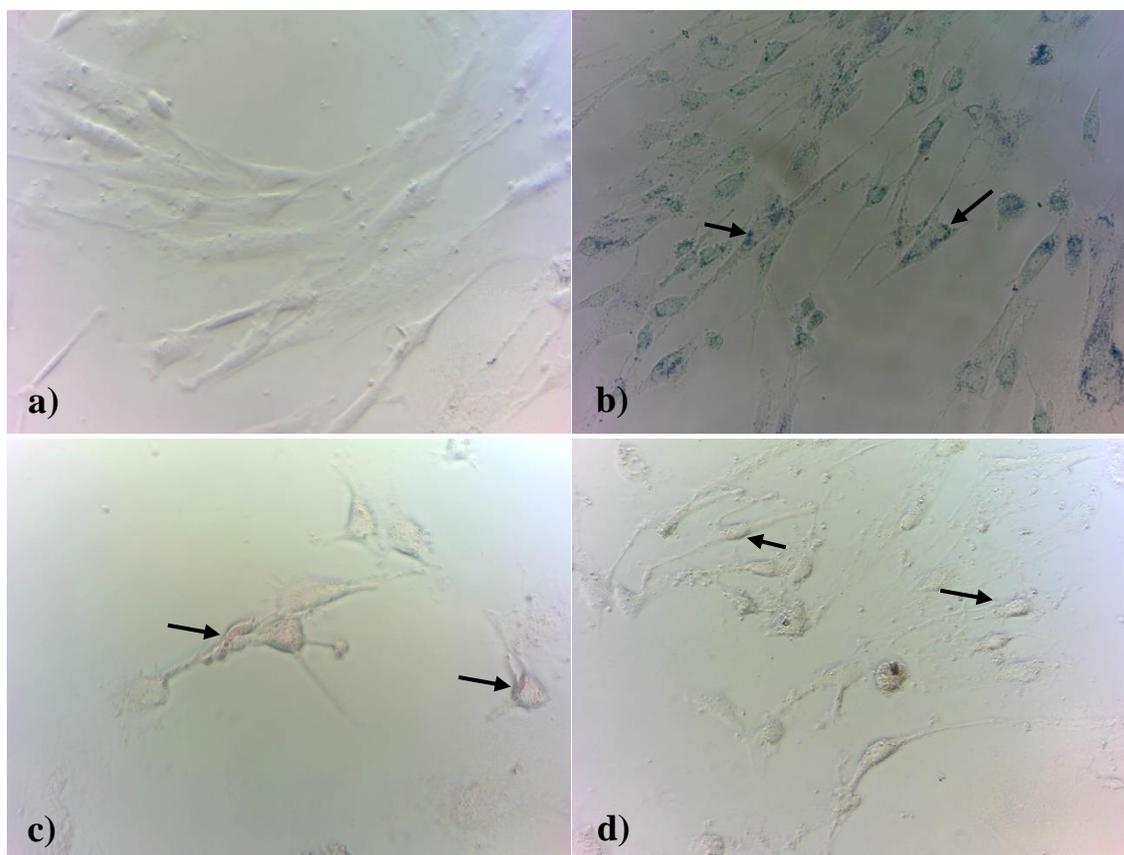


Figura 13. Línea celular A375 con F5 en microscopio de contraste de fase a 40X. a) sin F5, b) con AM incubadas a una concentración de 20 μM c) con RB incubadas a una concentración de 1 μM y d) con Cur incubadas a una concentración de 20 μM.



*Figura 14. Línea celular WS1 con Fts en microscopio de contraste de fase a 20X. a) sin Fts, b) con AM incubadas a una concentración de 20  $\mu$ M c) con RB incubadas a una concentración de 1  $\mu$ M y d) con Cur incubadas a una concentración de 20  $\mu$ M.*

## 4.2 Efecto de la TFD en la viabilidad celular

Los resultados obtenidos tras la aplicación de TFD con AM a una concentración de 20  $\mu$ M y una dosis de luz de 60 J/cm<sup>2</sup> en células A375 mostraron una disminución significativa (\*) en la viabilidad celular en comparación con el CV. En el grupo tratado con TFD, la viabilidad celular se redujo aproximadamente al 30%, mientras que los grupos de CF y CI mantuvieron viabilidades superiores al 80%. Esto sugiere que ni la dosis de luz ni el Fts por sí solos causaron daño en las células A375 (Figura 15).

En contraste, en la línea celular WS1, no se observó una disminución significativa en la viabilidad celular en ninguno de los grupos (CF, CI, o TFD), en comparación con el CV. Esto indica una resistencia mayor de las células WS1 al tratamiento bajo las condiciones de TFD aplicadas, como se muestra en la Figura 15b.

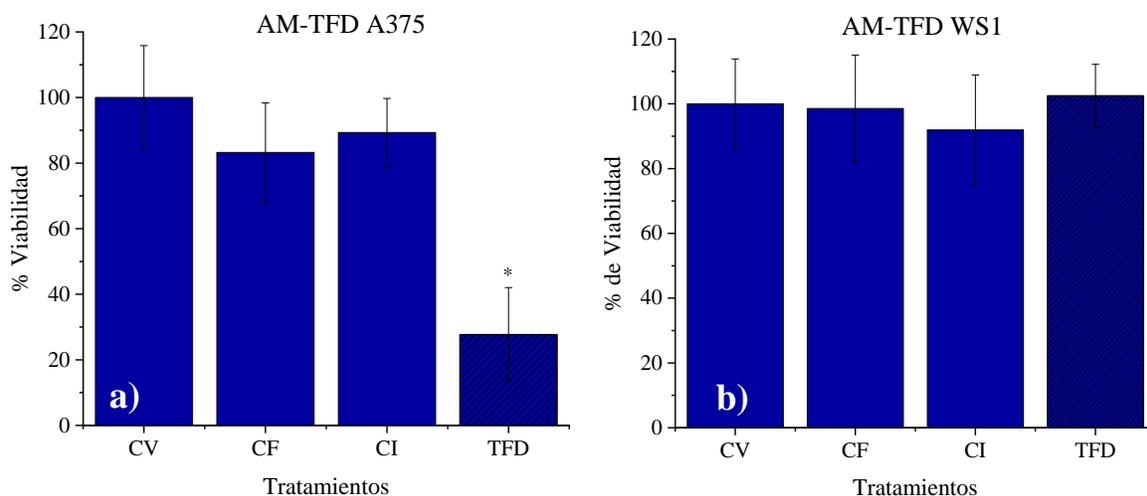


Figura 15. Porcentaje de viabilidad celular tras la TFD con AM en línea celular a) A375 y b) WS1.

La selección de la dosis óptima de RB en la TFD se realizó utilizando tres dosis diferentes en la línea celular A375.

Dosis de 5  $\mu\text{M}$  con 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ : En esta condición (Figura 16a), se observó una disminución significativa (\*) en la viabilidad celular del grupo CF en comparación con el CV, con una reducción al 63%, lo que sugiere que el RB por sí solo tiene un efecto citotóxico sobre las células A375. En el grupo CI, la viabilidad celular se mantuvo en el 90%, indicando que la dosis de luz aplicada no causó un efecto dañino por sí misma. El tratamiento con TFD resultó en una disminución (\*) adicional de la viabilidad celular al 23%.

Dosis de 3  $\mu\text{M}$  con 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ : Los resultados obtenidos (Figura 16b) indicaron una reducción significativa (\*) en la viabilidad celular en el grupo tratado con TFD, alcanzando un 7% en comparación con el CV. El grupo CF mostró también una disminución significativa (\*) en la viabilidad celular al 77%, lo que refuerza la observación de un efecto dañino del RB sin irradiación. El CI, sin embargo, mantuvo la viabilidad celular sin cambios relevantes, lo cual confirma que la dosis de luz empleada no generó daño significativo.

Dosis de 1  $\mu\text{M}$  con 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ : En esta condición, tanto CF como CI no presentaron diferencias significativas respecto al CV, mientras que el tratamiento con TFD redujo la viabilidad celular al 5% (Figura 16c), demostrando que esta combinación de dosis y energía fue la más efectiva para reducir significativamente (\*) la viabilidad celular en las células A375.

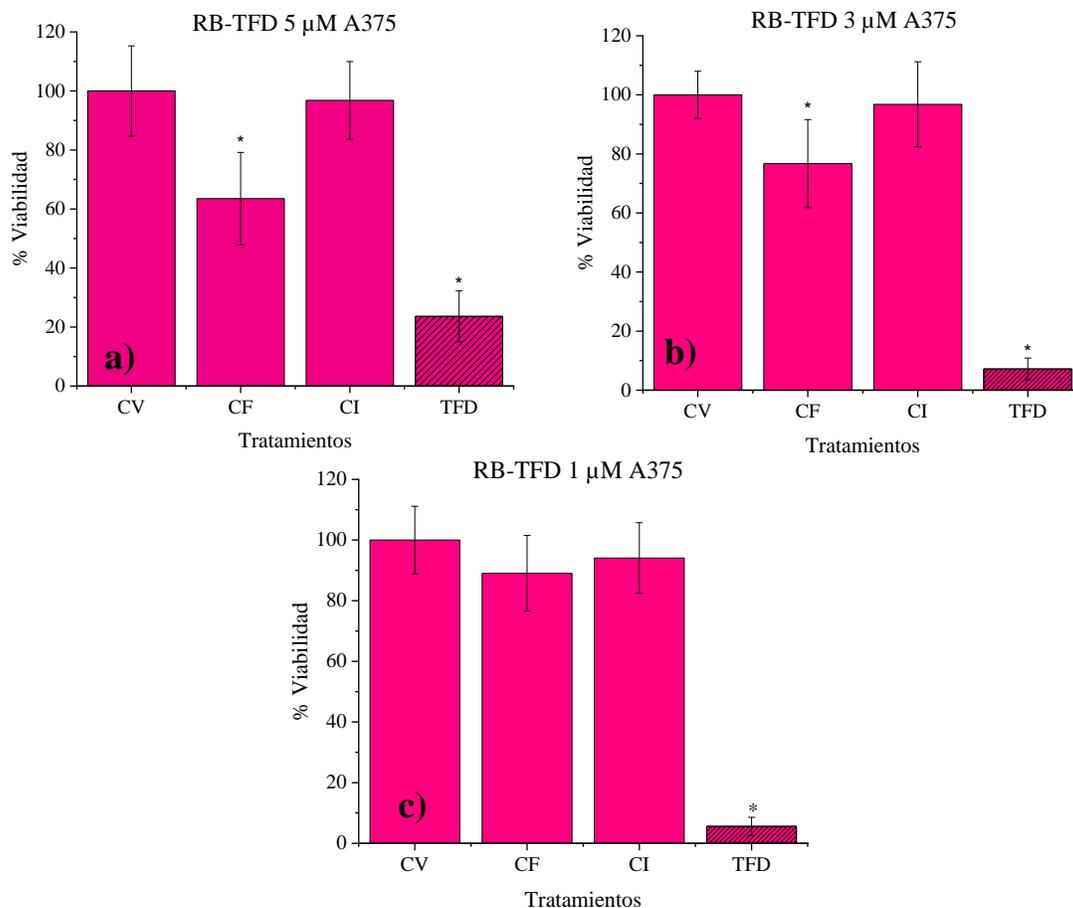


Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular tras RB-TFD en línea celular A375 a: a) 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , b) 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  y c) 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Para la línea celular WS1, inicialmente se evaluó la TFD con RB a 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Los resultados mostraron una disminución significativa (\*) en la viabilidad celular, no solo en el grupo tratado con TFD, sino también en CF y CI. En el grupo tratado con TFD, la viabilidad alcanzó el 17%. Estos hallazgos sugieren que tanto CF y CI, como la TFD a 3  $\mu\text{M}$  de RB con 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , generan un daño considerable en las células WS1, lo cual se puede observar con mayor detalle en la Figura 17a.

Por otro lado, la TFD con RB a 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  en células WS1 mostró una disminución significativa (\*) en la viabilidad celular en comparación con CV (Figura 17b). Tanto CF como CI mostraron una viabilidad celular del 70%, lo que sugiere un efecto citotóxico moderado en ambas condiciones. Sin embargo, en el grupo tratado con TFD, la viabilidad celular se redujo de manera drástica al 10%. Estos resultados indican que tanto CF como CI afectan la viabilidad celular, pero la combinación de ambos en el tratamiento TFD produce una reducción significativa en la viabilidad celular de las células WS1, induciendo un efecto citotóxico más pronunciado.

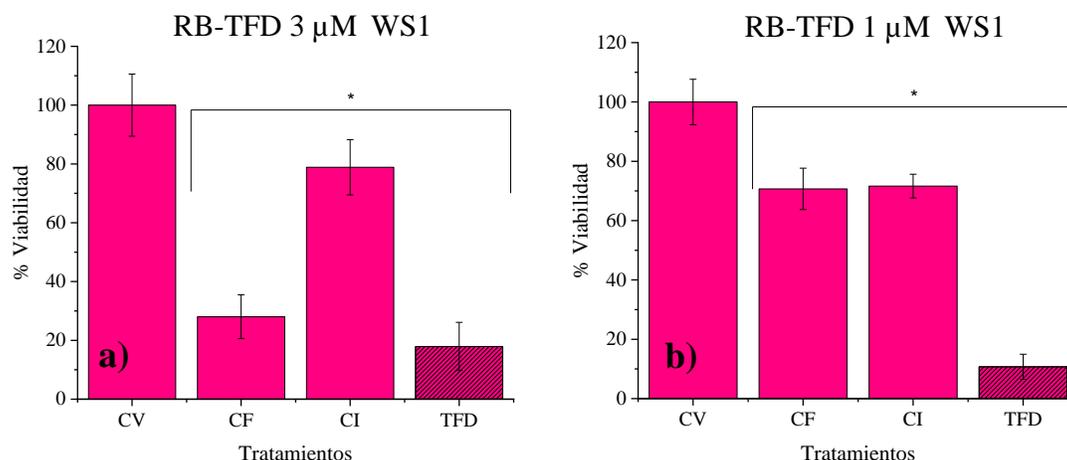


Figura 17. Porcentaje de viabilidad celular tras RB-TFD en línea celular WS1: a) 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  y b) 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

La selección de la dosis óptima de Cur en la TFD se realizó mediante la evaluación de cuatro concentraciones diferentes en la línea celular A375.

La primera dosis aplicada fue de 12  $\mu\text{M}$  con 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Como se observa en la Figura 18a, tanto la TFD como los grupos CF y CI redujeron significativamente (\*) la viabilidad celular en comparación con el CV. En el grupo tratado con TFD, la viabilidad celular se redujo al 20%, mientras que en el CF se redujo al 49% y en el CI al 62%. Estos resultados indican que, además de la TFD, tanto la Cur a 12  $\mu\text{M}$  como la dosis de luz azul de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  generaron un daño significativo en las células A375.

La segunda dosis evaluada fue de 6  $\mu\text{M}$  con 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Los resultados obtenidos (Figura 18b) revelaron una disminución significativa (\*) en la viabilidad celular en el grupo tratado con TFD, alcanzando un 9%. En el grupo CF, la viabilidad se redujo al 69%, mientras que en el CI fue del 60%.

Para la tercera dosis, se utilizó una concentración de 3  $\mu\text{M}$  con 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Los resultados mostrados en la Figura 18c indican que tanto CF como CI y TFD presentaron una disminución significativa (\*) en la viabilidad celular en comparación con el CV. El grupo CF alcanzó una viabilidad del 74%, el CI del 60%, y el grupo tratado con TFD mostró una reducción más pronunciada al 8%. Estos hallazgos sugieren que, además de la TFD, tanto la Cur a 3  $\mu\text{M}$  como la dosis de luz azul de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  contribuyeron al daño celular en las células A375.

Finalmente, la cuarta dosis evaluada fue de 1.5  $\mu\text{M}$  de Cur con 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Como se muestra en la Figura 18d, ni CF ni CI mostraron diferencias significativas en comparación con el CV. Sin embargo, el grupo tratado con TFD mostró una reducción significativa (\*) en la viabilidad celular al 15%, siendo esta la dosis más adecuada para inducir el efecto deseado en la TFD.

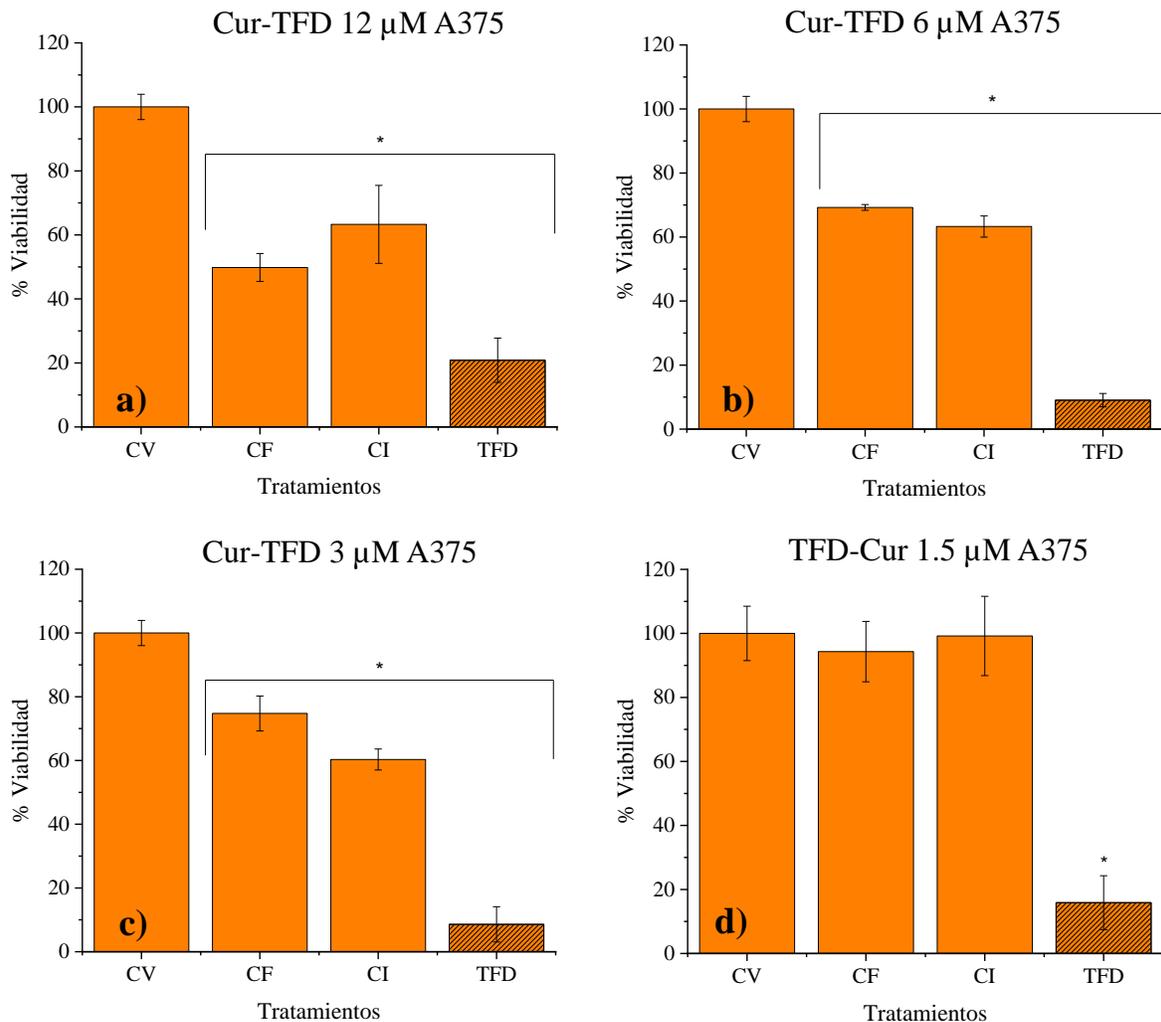


Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular tras Cur-TFD en línea celular A375 a: a) 12  $\mu\text{M}$  y 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ , b) 6  $\mu\text{M}$  y 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ , c) 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  y d) 1.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Para la línea celular WS1, los resultados obtenidos con Cur a 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  se presentan en la Figura 19a. Se observó una disminución significativa en la viabilidad celular en comparación con el CV, tanto en el grupo CI como en el grupo tratado con TFD. En el grupo CI, la viabilidad celular disminuyó al 80%, mientras que en el grupo TFD se redujo al 26%. Por otro lado, el CF no mostró una diferencia significativa, manteniendo un 89% de viabilidad celular. Estos resultados sugieren que tanto la TFD como la dosis de luz verde empleada en CI contribuyen al daño celular en las células WS1.

Con respecto a Cur a 1.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  en WS1, los resultados (Figura 19b) indicaron que los grupos CF y CI provocaron una disminución moderada en la viabilidad celular en comparación con el CV, alcanzando un 94% de viabilidad en ambos ensayos. Sin embargo, en el grupo tratado con TFD se observó una reducción significativa de la viabilidad celular,

disminuyendo al 10%. Estos hallazgos sugieren que, aunque CF y CI producen un leve efecto citotóxico, la combinación de ambos factores en TFD logra un impacto mucho mayor en la reducción de viabilidad en células WS1.

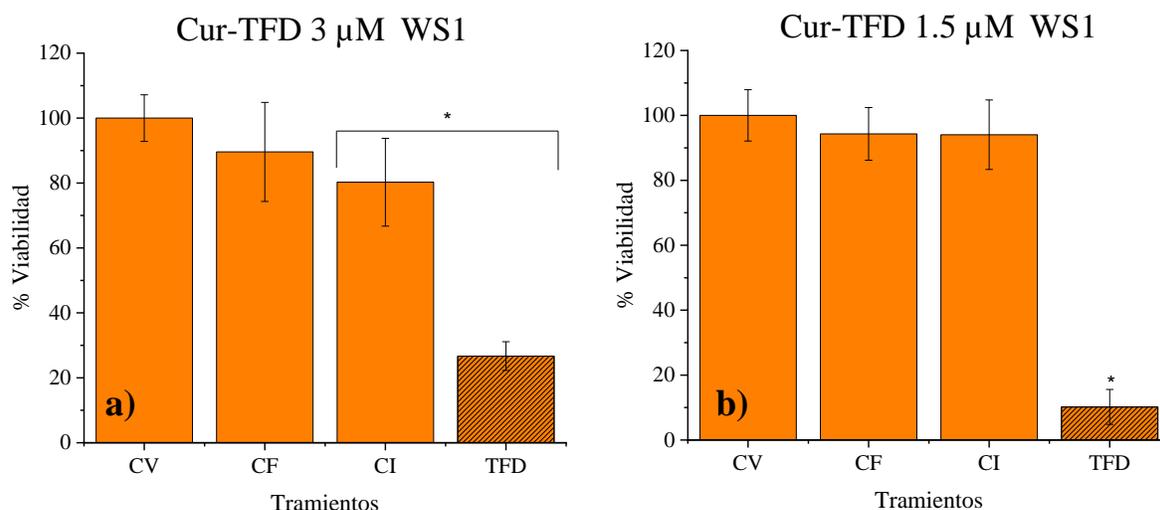


Figura 19. Porcentaje de viabilidad celular tras Cur-TFD en línea celular WS1 a: a) 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  y b) 1.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

### 4.3 ERO generadas por TFD

A continuación, se presentan los análisis de citometría de flujo, que muestran los niveles de ERO en la línea celular A375.

Los resultados obtenidos de la medición de ERO en TFD con AM a 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  indicaron lo siguiente.

Los niveles bajos de ERO en los cuatro grupos se mantuvieron por debajo del 3%, sin diferencias significativas, como se aprecia en la Figura 20a.

El análisis comparativo de los niveles de ERO en las células A375 evidenció una diferencia significativa (\*) en el nivel medio de ERO, causado por la TFD con 20  $\mu\text{M}$  de AM y 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  de luz roja, en comparación con el CV. Los controles CF y CI no mostraron diferencias significativas como se observa en la figura 20b.

En cuanto a los niveles altos de ERO, el CV presentó aproximadamente un 20% de ERO en este rango. El grupo CF mostró un incremento en los niveles altos de ERO, aunque sin alcanzar una diferencia significativa. Por su parte, el CI no presentó cambios significativos en comparación con el CV. Sin embargo, la TFD sí mostró un aumento con diferencia significativa (\*) en los niveles altos de ERO, triplicando el porcentaje respecto al CV, lo cual se puede observar claramente en la Figura 20c.

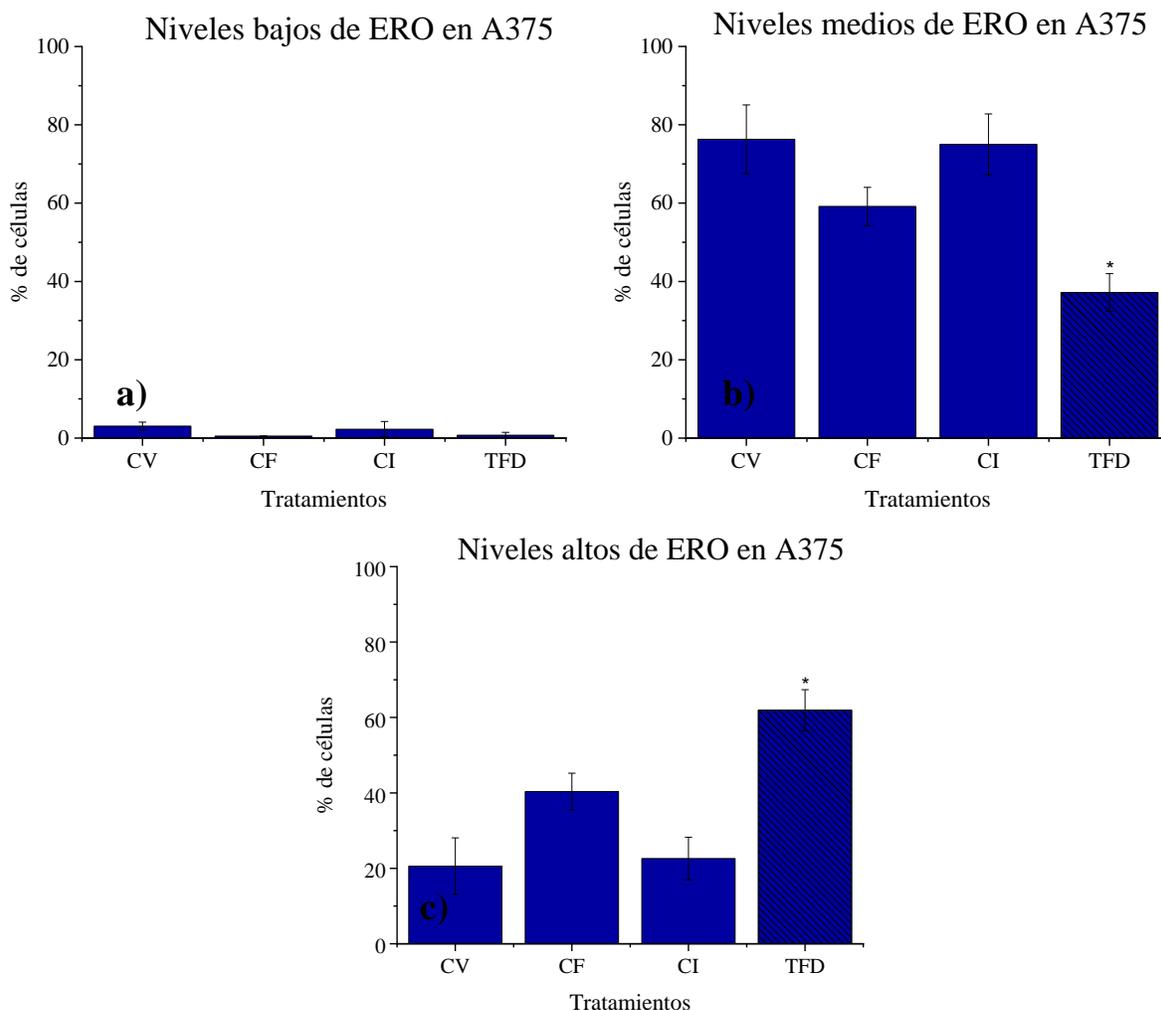


Figura 20. Comparación de los niveles medios, altos y bajos de ERO en la línea celular A375 tras la TFD-AM, haciendo la comparativa con los 4 grupos.

En el análisis del nivel bajo de las ERO entre los cuatro grupos, se observó que todos los grupos de control mantuvieron niveles muy similares. Aunque el grupo de la TFD mostró una ligera disminución, esta no fue significativa, manteniendo sus niveles por debajo del 3%, como se puede ver en la Figura 21a.

En el análisis de la expresión del nivel medio de las ERO, considerando los cuatro grupos (Figura 21b), el CV representó los niveles basales en la línea celular A375. El grupo CF, sometido únicamente a RB a 1  $\mu\text{M}$ , no mostró una disminución significativa en el porcentaje de ERO. Por otro lado, el CI, que correspondió únicamente a la dosis de luz verde a 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ , tampoco presentó cambios significativos en este aspecto. En contraste, la TFD sí afectó el nivel medio de ERO, mostrando una disminución con diferencia significativa (\*) con respecto a CV.

En lo que respecta a los niveles altos de ERO, el CV presentó solo un 16% de ERO en este rango. Aunque el CF mostró un aumento en los niveles altos de ERO, este cambio no fue significativo. El CI, por su parte, no presentó diferencias significativas en comparación con el CV. Sin embargo, la TFD exhibió un aumento significativo (\*) en el nivel alto de ERO, casi cuadruplicando su nivel en comparación con el CV, como se aprecia de manera más clara en la Figura 21c.

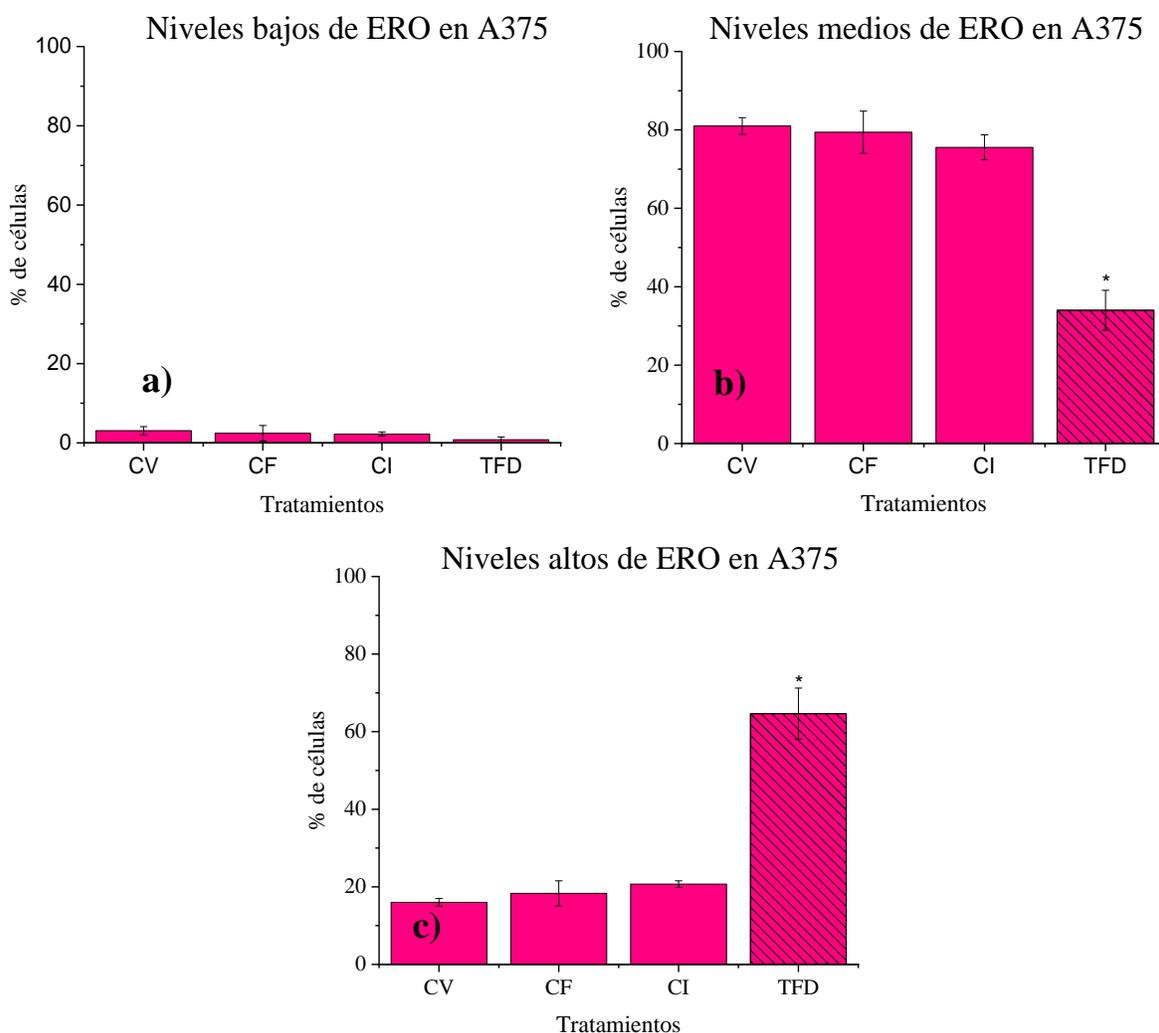


Figura 21. Comparación de los niveles medios, altos y bajos de EROS en la línea celular A375 tras la TFD-RB, haciendo la comparativa con los 4 grupos.

Los niveles bajos de ERO en los cuatro grupos, a pesar de mostrar una ligera disminución, no fueron significativos, manteniéndose por debajo del 3.5%, tal como se observa en la Figura 22a.

En el análisis de la expresión del nivel medio de las ERO tomando en cuenta los cuatro grupos, la Figura 22b muestra que el CV presenta los niveles basales de ERO en la línea

celular A375. El CF, correspondiente a Cur a 1.5  $\mu\text{M}$ , no mostró un cambio significativo en el porcentaje de niveles de las ERO. De manera similar, el CI, que representa la dosis de luz azul a 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , tampoco mostró un cambio significativo en el porcentaje de las ERO. En contraste, la TFD presentó una disminución significativa (\*) en el nivel medio de ERO con respecto a CV.

En cuanto al nivel alto de ERO, el CV mostró solo un 18%. En el grupo del CF se observó un aumento en los niveles altos, aunque sin alcanzar significancia estadística. El CI no presentó cambios significativos en comparación con el CV. Sin embargo, en el grupo tratado con TFD, los niveles altos de ERO aumentaron significativamente, cuadruplicándose en comparación con el CV, como se aprecia en la Figura 22c.

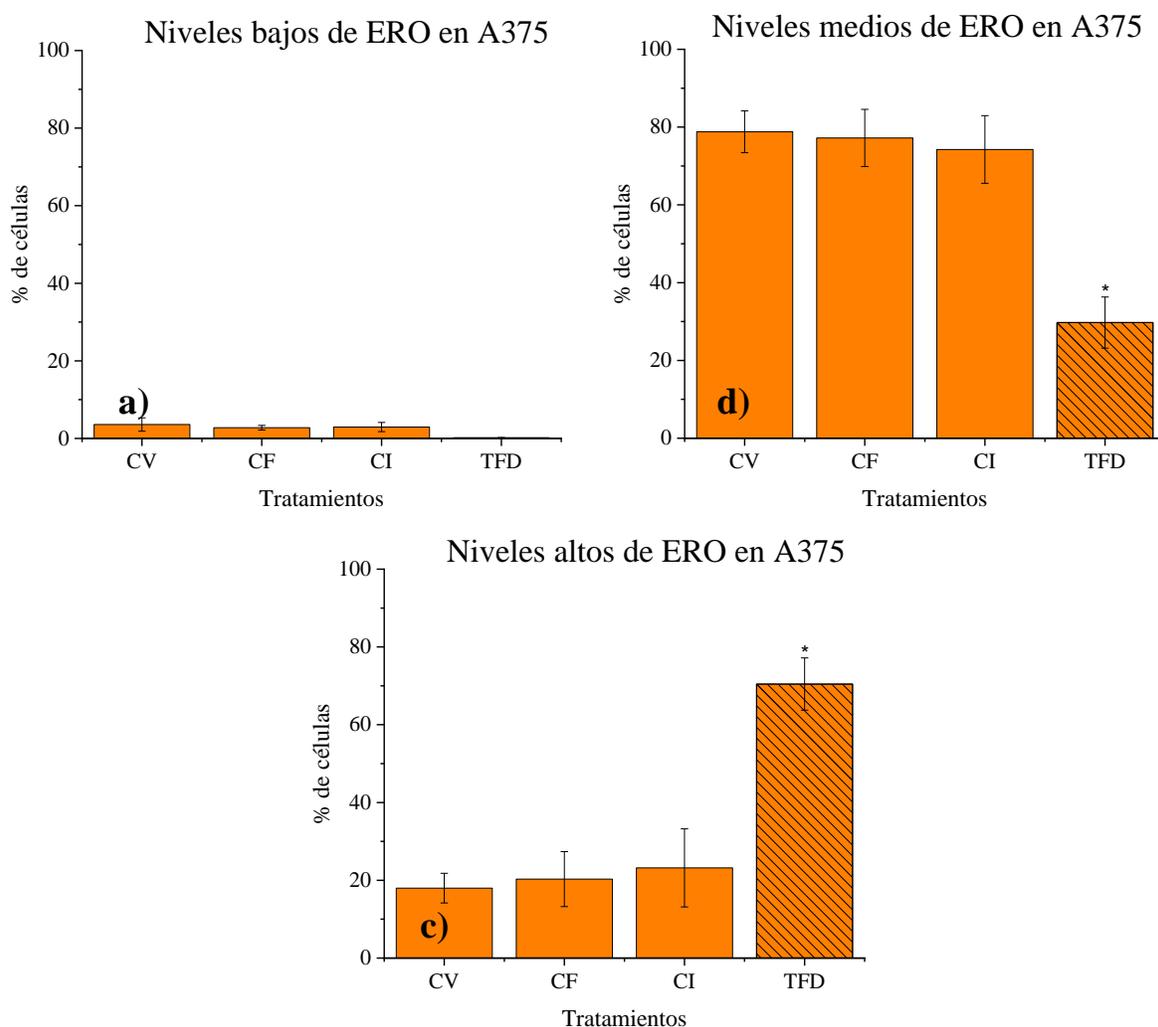


Figura 22. Comparación de los niveles medios, altos y bajos de EROS en la línea celular A375 tras la TFD-Cur, haciendo la comparativa con los 4 grupos.

#### 4.4 Medición de SOD generado por TFD

Se presentan los resultados de la concentración de SOD expresada en porcentaje con respecto a la concentración obtenida en U/ml, medida tras la TFD con AM a 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ , para la línea celular A375 (Figura 23a). En las condiciones basales del CV, la concentración de SOD fue de 0.0375 U/ml, correspondiente al 100%. En el CF, los niveles de SOD mostraron un ligero aumento del 2%, alcanzando una concentración de 0.0384 U/ml, pero sin mostrar una diferencia significativa con respecto al CV. Para el CI, se observó un aumento del 15% en la concentración, alcanzando 0.0434 U/ml, lo que indica un cambio significativo (\*) con respecto al CV. Por último, en el grupo de la TFD, la concentración de SOD mostró un aumento significativo del 30% comparada con el CV, alcanzando una concentración final de 0.0490 U/ml.

Para el caso de la TFD con RB a 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ , los datos presentados en la Figura 23b muestran que ambos controles (CI y CF) arrojaron un aumento significativo (\*) en comparación con el CV. Para el caso del CF, la concentración final fue de 0.0416 U/ml, mostrando un aumento del 11%, y para el CI, fue de 0.0424 U/ml, aumentando un 13%. En cuanto a la TFD, se observó un aumento significativo (\*) con respecto al CV, alcanzando una concentración final de 0.0444 U/ml, lo cual indica un aumento del 21%.

Los resultados de TFD con Cur a 1.5  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  (Figura 23c) mostraron que el CF y el CI no tuvieron cambio significativo en cuanto a su concentración al compararse con el CV. El CF presentó una concentración final de 0.0397 U/ml, aumentando un 5%. Por su parte, el CI mostró una disminución del 0.5%, alcanzando una concentración de 0.0373 U/ml. En contraste, la TFD presentó un aumento significativo (\*) respecto al CV, dando como resultado una concentración final de 0.0466 U/ml, lo que representa un incremento del 21%.

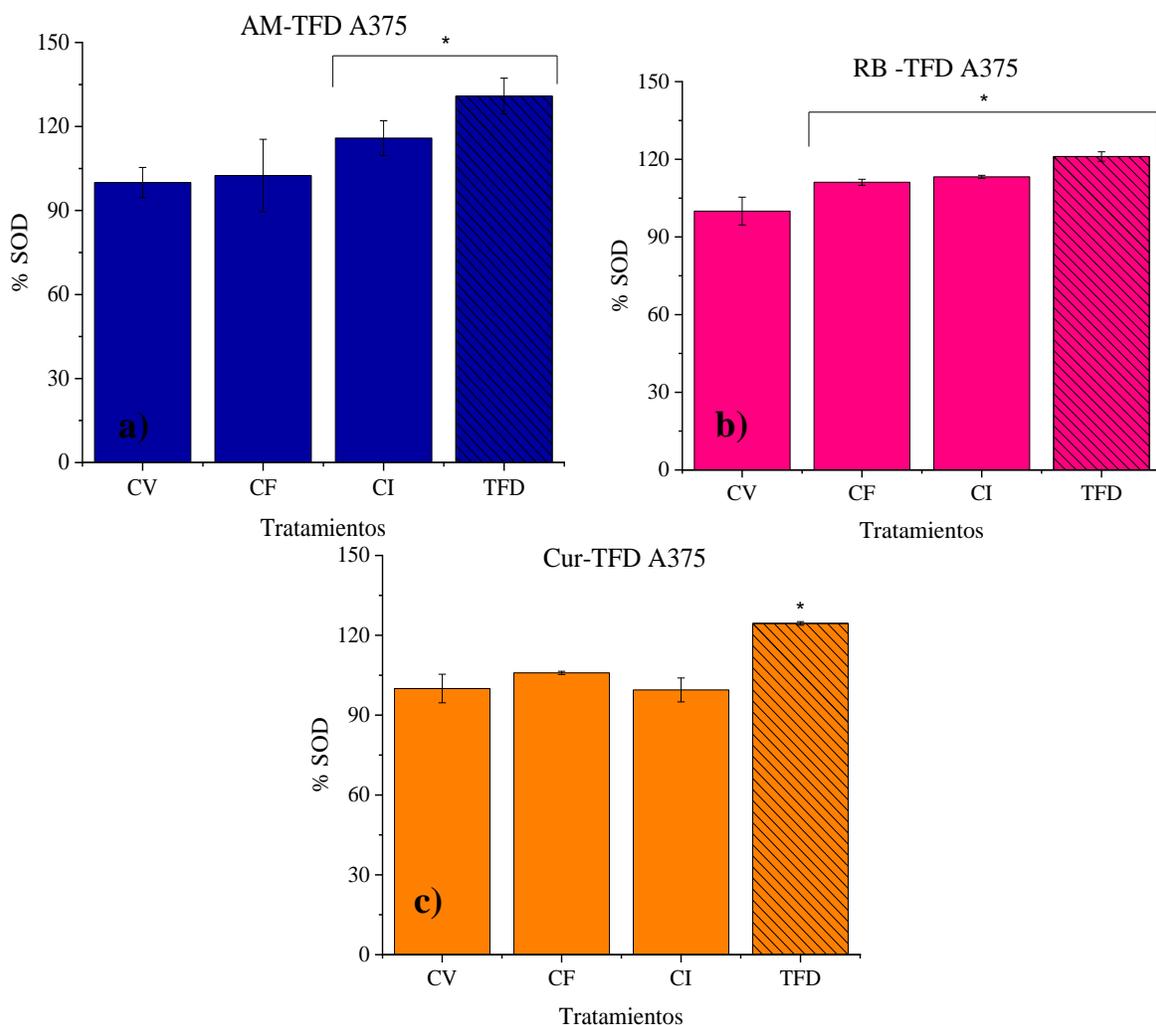


Figura 23. Porcentaje de SOD expresada en células A375 en a) AM-TFD, b) RB-TFD y c) Cur-TFD.

Para la línea celular WS1 sometida a la TFD con AM a 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  (Figura 24a), se observaron los siguientes resultados. En las condiciones basales del CV, la concentración de SOD fue de 0.0354 U/ml. En el CF, los niveles de SOD mostraron un aumento del 17%, alcanzando una concentración de 0.0417 U/ml, lo que indicó una diferencia significativa (\*) en comparación con el CV. Para el CI, se registró un aumento del 25%, alcanzando una concentración de 0.0448 U/ml, lo cual también presentó un cambio significativo (\*) con respecto al CV. Por último, en el grupo de la TFD, la concentración de SOD mostró un aumento significativo (\*) del 36% en comparación con el CV, obteniéndose una concentración final de 0.0480 U/ml.

Para la TFD con RB a 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ , los datos mostrados en la Figura 24b revelan que ambos controles (CI y CF) presentaron un aumento significativo (\*) en comparación con el CV. En el caso del CF, la concentración final fue de 0.0426 U/ml, lo que representa un aumento del 20%. Para el CI, la concentración fue de 0.0449 U/ml, con un aumento del 26%. En cuanto a la TFD, se observó un aumento significativo (\*) del 43% con respecto al CV, resultando en una concentración final de 0.0508 U/ml.

Los resultados de la TFD con Cur a 1.5  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ , presentados en la Figura 24c, indican que tanto el CF como el CI mostraron un cambio significativo (\*) en su concentración en comparación con el CV. El CF evidenció un aumento del 13%, alcanzando una concentración final de 0.0403 U/ml. En el caso del CI, el incremento fue del 26%, resultando en una concentración de 0.0446 U/ml. Por otro lado, la TFD mostró un aumento significativo (\*) del 42% con respecto al CV, alcanzando una concentración final de 0.0503 U/ml.

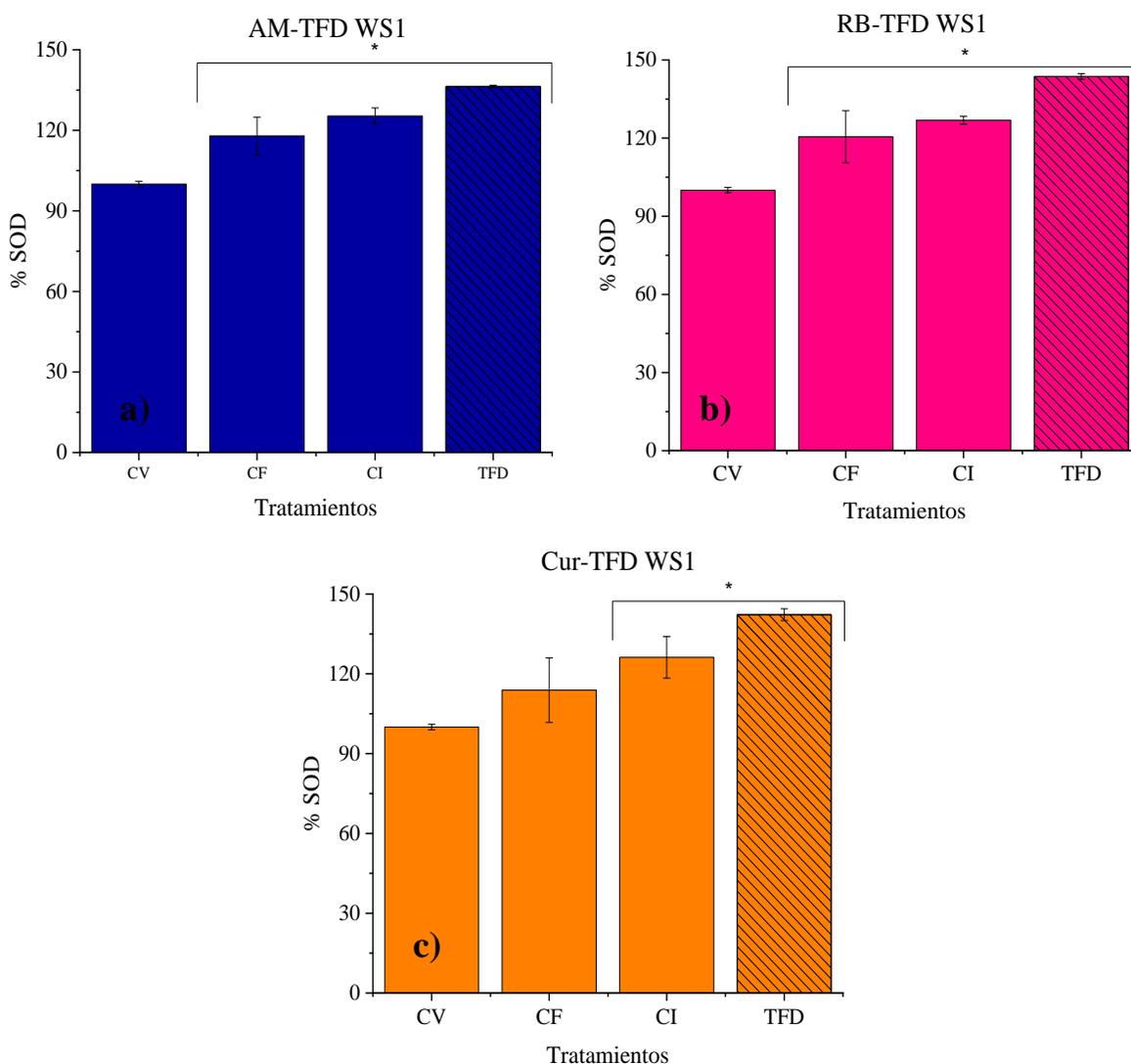


Figura 24. Porcentaje de SOD expresada en células WS1 en a) FTD-AM, b) FTD-RB y c) FTD-Cur.

#### 4.5 Medición de GSH generado por TFD

A continuación, se presentan los resultados de la concentración de GSH, expresada en nmoles por ml, medida tras la aplicación de la TFD con AM a 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  en la línea celular A375 (Figura 25a). En las condiciones basales del CV, la concentración de GSH fue de 17.6 nmoles por ml, que se presenta como el 100%. En el CF, los niveles de GSH no se vieron

afectados, manteniéndose en 17.2 nmoles por ml, lo que representa una disminución del 0.5%. Para el CI, se observó un ligero aumento del 8% en la concentración, alcanzando los 18.6 nmoles por ml. Por último, en el grupo de la TFD, la concentración de GSH mostró una disminución significativa (\*) del 68% en comparación con el CV, reduciéndose a 6.6 nmoles por ml.

Los resultados de la concentración de GSH, expresada en nmoles por ml, medida tras la aplicación de la TFD con RB a 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  en la línea celular A375 (Figura 25b), indican que tanto el CF como el CI no mostraron una disminución significativa en la concentración de GSH en comparación con el CV. Sin embargo, el grupo de TFD-RB resultó en una reducción significativa (\*) en los niveles de GSH. La concentración de GSH en el CF fue de 17.1 nmoles por ml, representando un 96% de la concentración inicial, mientras que en el CI fue de 16.4 nmoles por ml, lo que corresponde al 93% de la concentración final. En contraste, tras la TFD-RB, la concentración de GSH disminuyó notablemente hasta 4.4 nmoles por ml, lo que representó un 25% de la concentración final.

Finalmente, se presentan los resultados de la concentración de GSH después de aplicar la TFD con Cur a 1.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  en la línea celular A375 (Figura 25c). En este caso, tanto el CF como el CI no evidenciaron una disminución significativa en la concentración de GSH en comparación con el CV. No obstante, el grupo de TFD-Cur resultó en una reducción significativa (\*) en los niveles de GSH. La concentración de GSH en el CF fue de 13.7 nmoles por ml, lo que representó un 77% de su concentración inicial, mientras que en el CI fue de 14.8 nmoles por ml, alcanzando una concentración final del 83%. En contraste, tras la aplicación de la TFD-Cur, la concentración de GSH disminuyó considerablemente hasta un 44%, dando como resultado una concentración de 7.9 nmoles por ml.

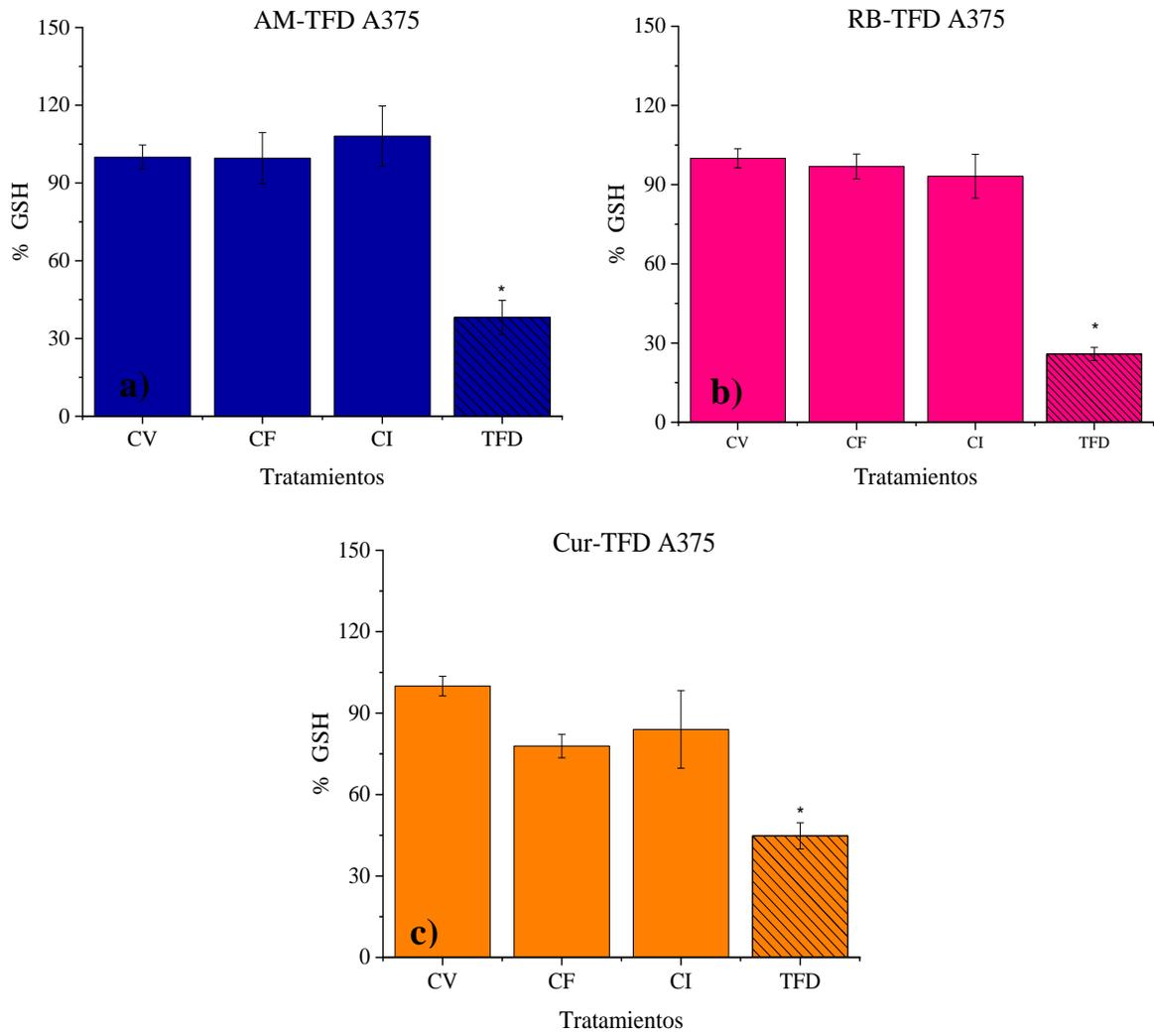


Figura 25. Porcentaje de GSH en células A375 tras a) FTD-AM, b) FTD-RB y c) FTD-Cur

---

## Capítulo V

---

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos en relación con estudios previos sobre TFD, destacando la importancia del desequilibrio REDOX en la eficacia del tratamiento. Se plantea que la TFD podría ser optimizada mediante la selección adecuada de fotosensibilizadores y longitudes de onda para maximizar la generación de ERO en células cancerosas sin afectar a las células sanas.

### 5 Discusión

En esta investigación, se evaluó por primera vez la respuesta REDOX tras la aplicación de la TFD en células de melanoma A375, utilizando tres Fs distintos: AM, RB y Cur. Este análisis permitió observar diferencias significativas en la especificidad y efectividad de cada Fs para inducir estrés oxidativo y afectar los sistemas antioxidantes intracelulares en células A375.

Los resultados mostraron que la TFD-AM tiene una alta selectividad hacia las células de melanoma A375, favoreciendo la producción de ERO y creando un desbalance REDOX crítico, que induce daño significativo en las células tumorales. Este efecto se manifestó en un incremento en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y una reducción en los niveles de glutatión (GSH), debilitando así las defensas antioxidantes y potenciando la citotoxicidad inducida por ERO. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que sugieren que AM tiene una alta afinidad por las mitocondrias en células cancerosas, donde, al ser activado por la luz, promueve la liberación de proteínas pro-apoptóticas que inducen apoptosis. Por ejemplo, Mariño-Ocampo et al. documentaron una captación preferente de AM en las mitocondrias de células cancerosas en comparación con células sanas. [49], y Chen et al. confirmaron que la TFD-AM induce apoptosis mitocondrial en una línea de melanoma murino [50].

En contraste, en las células sanas WS1, la exposición a AM no generó un impacto significativo en la viabilidad celular, aunque sí se observó un aumento en la actividad de SOD. Este aumento podría interpretarse como una respuesta adaptativa al estrés oxidativo, protegiendo a las células de daños mayores. Esto resalta la capacidad de AM para diferenciar entre células malignas y benignas, minimizando el daño en tejidos sanos y destacando su potencial como un Fs selectivo y seguro para la TFD en células de melanoma. Este comportamiento diferencial entre A375 y WS1 se suma a la evidencia de que AM podría ofrecer una alternativa más precisa en la terapia anticancerígena, un hallazgo que es altamente relevante para el desarrollo de tratamientos selectivos contra el cáncer.

A diferencia de AM, RB y Cur mostraron una distribución intracelular menos específica, lo cual resultó en efectos citotóxicos tanto en células cancerosas como en fibroblastos WS1,

limitando su efectividad para una terapia selectiva. En células tumorales, RB genera ERO de forma generalizada dentro de la célula sin dirigirse a un organelo específico, lo que ocasiona efectos citotóxicos en células tanto malignas como sanas [51]. De manera similar, Cur muestra cierta afinidad por células tumorales debido a sus propiedades lipofílicas, pero no se acumula en estructuras intracelulares clave, como las mitocondrias, lo que reduce su capacidad de selectividad en la TFD. Esto aumenta el riesgo de daño en células sanas y sugiere que la especificidad observada en AM no se encuentra en otros Fs comunes en la TFD” [52].

Estudios previos ya habían señalado la limitada selectividad de RB y Cur como una barrera para su aplicación selectiva en cáncer. Las células no cancerosas, como fibroblastos y queratinocitos, también absorben RB, especialmente en condiciones de alta densidad celular o bajo dosis elevadas de Fs y luz [53, 54]. Estos datos destacan la ventaja de AM en términos de especificidad y seguridad en comparación con otros Fs.

La TFD con los tres Fs indujo una reducción en los niveles de GSH en A375, probablemente debido a la generación de ERO, que oxida el GSH y lo convierte en GSSG, agotando así esta defensa antioxidante en las células tumorales. Este agotamiento de GSH aumenta la vulnerabilidad de las células cancerosas al daño oxidativo y podría mejorar la eficacia de la TFD [55]. En el caso de Cur, Hosseinzadeh et al. encontraron que la TFD con Cur también reduce los niveles de GSH en células de melanoma, lo cual favorece la citotoxicidad por ERO. [56].

La actividad de SOD mostró una respuesta variable entre células cancerosas y sanas. En WS1, el aumento de SOD tras la TFD parece ser una respuesta adaptativa al estrés oxidativo, un mecanismo de protección que preserva la viabilidad celular frente al daño. Esto concuerda con lo reportado por Dolgachev et al., quienes observaron que los fibroblastos MEF Sod2+/+ aumentan su actividad de SOD bajo estrés oxidativo para proteger su viabilidad [57]. En A375, sin embargo, el incremento en SOD fue limitado, lo que junto con la reducción de GSH compromete las defensas antioxidantes y facilita la inducción de apoptosis en estas células.

Este estudio aporta una visión integral sobre la TFD en células de melanoma, comparando los efectos de AM, RB y Cur en la generación de ERO y el impacto en sistemas antioxidantes como SOD y GSH. Los resultados sugieren que AM es un Fs prometedor para la TFD de melanoma debido a su especificidad mitocondrial y su capacidad para inducir un desbalance REDOX selectivo en células tumorales sin afectar significativamente a las células benignas. La comparación entre los tres Fs utilizados aporta una perspectiva sobre la efectividad y los límites de cada agente, sentando las bases para futuras investigaciones que busquen optimizar la especificidad y seguridad de la TFD en el tratamiento del cáncer.

La Tabla 5 muestra un resumen de estudios previos sobre los efectos de la TFD en diversas líneas celulares de cáncer, enfocados en el cambio en los niveles de SOD, GSH y ERO. Esta

tabla proporciona un contexto de referencia y permite comparar cómo distintos Fs afectan el estado REDOX en diferentes tipos de células cancerosas. En comparación con estos estudios, nuestros resultados con AM en células de melanoma A375 demuestran una alta especificidad en la generación de ERO y en la disminución de GSH, diferenciándose de los efectos más generalizados observados en otras líneas celulares y con otros Fs.

*Tabla 4. Resumen de estudios previos sobre los efectos de la TFD sobre el efecto REDOX (SOD, GSH y ERO) en células de cáncer.*

Línea Celular	Fs o Tratamiento	Cambios en SOD	Cambios en GSH	Cambios en ERO	Referencia
A549 (cáncer de pulmón)	Redaporfin	Disminución	Disminución	Aumento	[58]
HeLa (cáncer de cuello uterino)	Derivados solubles de C60 (WSFD)	Disminución	Disminución	Aumento	[59]
Hep-2 (cáncer de laringe)	9-Hydroxypheophorbide (9-HPbD)	-	Disminución	Aumento	[60]
Células tumorales Ehrlich	Derivado de Hematoporfirina (HPD)	Aumento	-	Aumento	[61]
Cáncer de mama ER+	Nanosistema con Doxorrubicina y Ferric Cloruro (DFTA)	Aumento	Disminución	Aumento	[62]
Cáncer de mama MBA-MD-231	MOF basado en Cu (MOF-2)	-	Disminución	Aumento	[63]
Melanoma A375	Depleción de CD147 e inducción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Disminución	-	Aumento	[64]
Melanoma A375	Catecol-diphenylbutadien o activado por tirosinasa	-	-	Aumento	[65]

La TFD disminuyó la CV en la línea A375 con AM, RB y Cur. En A375, la TFD generó un aumento significativo en ERO (↑↑) y en la actividad antioxidante de SOD (↑↑), mientras que GSH no mostró cambios. En WS1, la TFD con RB y Cur también redujeron la viabilidad, pero AM no mostró efecto citotóxico en esta línea celular. Los niveles de ERO en WS1 no se vieron afectados; sin embargo, hubo un incremento en SOD (↑↑), mostrando una respuesta adaptativa antioxidante, y una disminución en GSH (↓↓↓), exponiendo un agotamiento de la capacidad antioxidante en células sanas

Este análisis sugiere que AM podría tener una selectividad hacia células A375, minimizando el impacto en células no cancerosas (WS1), a diferencia de RB y Cur, que afectan tanto a células tumorales como a fibroblastos (tabla 5).

*Tabla 5. Efectos de la TFD sobre viabilidad celular, ROS y Antioxidantes en células A375 y WS1.*

	Células	Disminución de la viabilidad tras TFD	ERO	Antioxidantes	
				SOD	GSH
AM	A375	✓	↑↑↑	↑	↓↓
	WS1	X	-	↑↑↑	-
RB	A375	✓	↑↑↑	↑	↓↓↓
	WS1	✓	-	↑↑↑	-
AM	A375	✓	↑↑↑	↑	↓↓
	WS1	✓	-	↑↑↑	-

## 6 Conclusiones

La TFD empleando AM como fotosensibilizador afecta selectivamente a las células de cáncer de melanoma (A375) sobre células sanas de fibroblastos (WS1).

Las dosis óptimas encontradas para la evaluación de la TFD con RB fueron: 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Y con Cur 1.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

La inhibición de la viabilidad celular ocasionada por la TFD con RB o Cur, fueron muy similares en ambas líneas celulares (cerca al 90%).

La TFD ocasionó un desbalance importante en el sistema REDOX de las células de melanoma: la producción de ERO fue notoria para los 3 tratamientos de TFD (con RB, Cur o AM) así como la disminución de GSH, la cual fue especialmente evidente con TFD-RB, seguido de TFD-AM y por último de TFD-Cur.

En todos los tratamientos de TFD, la concentración celular de SOD se vio incrementada, especialmente en las células de fibroblastos.

## 7 Trabajo futuro

Medición de GSH y ERO en células WS1: Incluir la evaluación de los niveles de GSH y ERO en células de fibroblasto WS1 tras la TFD con los tres Fs. Esto permitirá comparar la respuesta REDOX en células sanas frente a células de melanoma.

Comparación de la respuesta antioxidante entre células sanas y tumorales: Analizar cómo los sistemas antioxidantes, incluyendo SOD y GSH, responden diferencialmente en células benignas y malignas, lo que ayudará a validar la selectividad de los fotosensibilizadores hacia células tumorales.

Exploración de otros antioxidantes en WS1: Ampliar el estudio a otros antioxidantes celulares presentes en WS1, como la catalasa, para comprender mejor los mecanismos de defensa oxidativa en células sanas frente a los efectos de la TFD.

Optimización de la especificidad de la TFD: Usar los datos de los puntos anteriores para ajustar la TFD y reducir posibles daños en células sanas, mejorando la especificidad y seguridad del tratamiento.

Evaluación de la modulación antioxidante: Investigar cómo la modulación de antioxidantes en células WS1 afecta su viabilidad y resistencia a la TFD, lo que podría ofrecer estrategias adicionales para proteger tejidos sanos durante el tratamiento.

## 8 Referencias

- [1] Colleen R. Reczek, Navdeep S. Chandel, «The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer.,» *Annual review of cancer biology*, vol. 1, n° 1, pp. 79-98, Mar 2017.
- [2] L. He , S. Farrar , J. Linbao, L. Tianyi y M. Xi, «Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species,» *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 44, n° 2, pp. 532-553, Jan. 2017.
- [3] R. R. Collen y N. S. Candelabro, «ROS-dependent signal transduction,» *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 33, pp. 8-ñ13, 2015.
- [4] C. Magdalena y Y. A. Tak , «Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis,» *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 48, n° 6, pp. 749-762, Mar 2010.
- [5] G. Y. Liou y P. Storz, «Reactive oxygen spice in cancer,» *Free Radical Research*, vol. 44, n° 5, pp. 479-496, 2010.
- [6] I. P. Nacional, « Terapia Fotodinámica Proyecto de VPH ENCB.,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.encb.ipn.mx/proyectovph/terapia-fotodinamica.html>. [Último acceso: 21 Mar 2024].
- [7] S. K. Shanma , Y. Y. Huang y M. R. Hamblin, «Melanoma Resistance to Photodynamic Therapy.,» *Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics*, p. 229–246, 2014.
- [8] Z. Zijian , S. Jibin y C. Xiaoyuan, «Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy,» *Chemical Society Reviews*, vol. 45, n° 23, pp. 6597-6626, 2016.
- [9] T. M. Maraculla y F. J. Ramos, *Comprender el Cáncer*, Barcelona: Amat Editorial, 2009.
- [10] N. Catherine Sánchez, «Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer,» *Revista Médica Clínica Las Condes*, vol. 24, n° 4, pp. 553-567, Julio 2023.
- [11] I. N. d. Cáncer, «¿Qué es el cáncer?,» Instituto Nacional del Cáncer, 05 May 2021. [En línea]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> . [Último acceso: 21 Mar 2024].
- [12] Paho.org, «Cancer,» Paho.org, 20 Mar 2024. [En línea]. Available: <https://www.paho.org/es/temas/cancer>. [Último acceso: 23 Mar 2024].
- [13] S. d. Salud, «How is Mexico in cancer?,» Gob.mx., 2024. [En línea]. Available: <https://www.gob.mx/salud/articulos/how-is-mexico-in-cancer>. [Último acceso: 23 Mar 2024].
- [14] INEGI, «Comunicación Social Comunicado de Prensa,» INEGI, 02 Feb 2023. [En línea]. Available: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf). [Último acceso: 23 Mar 2024].

- [15] S. Kalyan , A. Barsouk, J. S. Aluru, R. Prashanth y A. Barsouk, «Epidemiology of Melanoma,» *Medical Sciences*, vol. 9, n° 4, pp. 63-63, 2021.
- [16] Cancer.gov, «Tratamiento del melanoma,» 2023 August 2023. [En línea]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/paciente/tratamiento-melanoma-pdq#:~:text=El%20melanoma%20es%20una%20enfermedad,cualquier%20lugar%20de%20la%20piel..>
- [17] W. Yinjuan , C. Viannet, S. Robin, J. Y. Berthon y P. Humbert, «Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation,» *Journal of dermatological science (Amsterdam)*, vol. 88, n° 2, pp. 159-166, 2017.
- [18] W. Choi , R. Wolbert, W. Gerwat, T. Mann, J. Batzer y Christofer, «The fibroblast-derived paracrine factor neuregulin-1 has a novel role in regulating the constitutive color and melanocyte function in human skin,» *Journal of Cell Science*, vol. 123, n° 18, pp. 3102-3111, 2010.
- [19] K. Aoto, K. Ito y S. Aoki, «Complex formation between platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  and transforming growth factor  $\beta$  receptor regulates the differentiation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts,» *Oncotarget*, vol. 9, n° 75, pp. 34090-34102, 2018.
- [20] C. Vicentini, J. B. Tylcz, C. Maire, S. Mordon y L. Mortier, «Terapia fotodinámica. EMC-Dermatología,» vol. 51, n° 3, pp. 1-8, 2017.
- [21] A.-G. Niculescu y A. M. Grumezescu, «Photodynamic Therapy - An Up-to-Date Review,» *Applied sciences*, vol. 11, n° 8, pp. 3626-3626, April 2021.
- [22] E. R. Gallegos, *Terapia Fotodinámica: teoría y práctica*, Mexico, DF: Instituto Politecnico Nacional , 2015.
- [23] G. M. Gurcan , G. Emre y S. Ayan, «Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer– A Review of the Current Clinical Status,» *Frontiers in Chemistry*, vol. 9, Aug 2021.
- [24] R. V. Huis, H. Jeroen, S. Ma, L. J. Cruz, F. Ossendorp y M. J. Jager, «Current Challenges and Opportunities of Photodynamic Therapy against Cancer,» *Pharmaceutics*, vol. 15, n° 2, pp. 330-330, Jan 2023.
- [25] R. Alzeibak, T. A. Mishchenko, N. Y. Shilyagina, I. V. Balalaeva y M. V. Vedunova, «Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future,» *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, vol. 9, n° 1, pp. e001926-e001926, 2021.
- [26] T. Mishchenko, I. Balalaeva, A. Gorokhova, M. Vedunova y D. V. Kryskovol, «Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer?,» *Cell Death and Disease*, vol. 13, n° 5, May 2022.
- [27] D. R. Mokoena, B. P. George y H. Abramse, «Photodynamic Therapy Induced Cel Death Mechanisms in Breast Cancer,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n° 19, p. 10506, 2021.

- [28] C. Donohoe, M. O. Senge, L. G. Arnaut y L. G. Gomes-da-Silva, «Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer*, vol. 1872, n° 2, p. 188308–188308, Dec. 2019,.
- [29] P. M. Bhattarai y H. Kumar, «Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death,» *Journal of Oncology*, vol. 2022, pp. 1-20, Jun. 2022.
- [30] M. L. Escobar, O. M. Echeverría y G. H. Vazquez-Nin, *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis.*, Croatia, 2015, pp. 419-434..
- [31] N. F. Pérez, Artist, *Caracterización de la Muerte Celular Generada por la Terapia Fotodinámica en una Línea Celular de Cáncer de Mama.* [Art]. Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica, 2021.
- [32] M. Lan, S. Zhao, W. Liu, C. S. Lee, W. Zhang y P. Wang, «Photosensitizers for Photodynamic Therapy,» *Advanced Healthcare Materials*, vol. 8, n° 13, May 2019.
- [33] P. J. Tardivo Auro, C. Santos de Olivera , D. Santesso y et al, «Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 2, n° 3, pp. 175–191., Sep 2002.
- [34] S. Zamani, H. M. Seyed , T. Nafise y M. Rstin, «Rose Bengal suppresses gastric cancer cell proliferation via apoptosis and inhibits nitric oxide formation in macrophages,» *Revista de inmunotoxicología*, vol. 11, n° 4, pp. 367-375, 2014.
- [35] S. Zhuang, M. C. Lynch y I. E. Kochevar, «“Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by singlet oxygen,» *FEBS Letters*, vol. 437, n° 1-2, p. 158–162, Oct., 1998.
- [36] L. D. Dias , K. C. Blanco, I. S. Mfouo-Tynga, N. M. Inada y V. S. Bagnato, «Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy.,» *Journal of Photochemistry and Photobiology c Photochemistry*, vol. 45, pp. 100384-100384, 2020.
- [37] L. Xie, X. Ji, Q. Zhang y Y. Wei, «Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer,» *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 146, p. 112567–112567, Feb 2022.
- [38] H. Takada y K. Nakamura, «Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions,» *Cancer Science*, vol. 112, n° 10, p. 3945–3952, Aug 2021.
- [39] A. Chandel y N. S. Glasauer, «Targeting antioxidants for cancer therapy,» *Biochemical Pharmacology*, vol. 92, n° 1, pp. 90-101, Nov 2014.
- [40] E. Obrador, F. Liu-Smith, R. Q. Dellinger, R. Salvador, F. L. Meyskens y J. M. Estrela, «Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma,» *Biological Chemistry*, vol. 400, n° 5, pp. 589-612, 2018.

- [41] A. M. Khan , T. Mousumi, D. Zhen-Zhang y H.-C. Chen, «Antioxidant enzymes and cancer,» *Chinese Journal of Cancer Research*, vol. 22, n° 2, pp. 87-92, 2010.
- [42] J. M. Matés, G. C. Pérez y I. Nuñez de Castro, «Antioxidant enzymes and human diseases,» *Clinical Biochemistry*, vol. 32, n° 8, pp. 595-603, 1999.
- [43] H. M. Zhao, H. H. Ruan y H. T. Li, «Progress in the research of GSH in cells,» *Chinese Science Bulletin*, vol. 56, n° 28-29, pp. 3057-3063, 2011.
- [44] J. N. Moloney y T. G. Cotter, «ROS signalling in the biology of cancer,» *Seminars in Cell & Developmental Biology*, n° 80, pp. 50-64, 2018.
- [45] B. C. Dickson y C. J. Chang, «Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses.,» *Nature Chemical Biology*, vol. 7, n° 8, 2011.
- [46] P. B, «ROS in cancer therapy: the bright side of the moon,» *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 52, n° 2, p. 192–203, Feb 2020.
- [47] E. Cecerska-Heryc, O. Surowska, R. Heryc, N. Serwin, S. Napiotek-Balinska y B. Dotegowska, «Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism,» *Antioxidants*, vol. 10, n° 5, pp. 642–642., Apr 2021.
- [48] S. L. Church, J. W. Grant, L. A. Ridnour, L. W. Oberley, P. E. Swanson, P. S. Meltzer y J. M. Trent, «Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells,» *Proceeding of National Academy of Sciences*, vol. 90, n° 7, pp. 3113-3117, 1993.
- [49] N. Mariño-Ocampo, L. Dibona-Villanueva, E. Escobar-Álvarez, D. Guerra-Díaz, D. Zúñiga-Núñez, D. Fuentealba y J. Robinson-Duggon, «Recent Photosensitizer Developments, Delivery Strategies and Combination-based Approaches for Photodynamic Therapy,» *Photochem. Photobiol*, vol. 99, pp. 469-497, 2023.
- [50] Y. Chen, W. Zheng, Y. Li, J. Zhong, J. Ji y P. Shen, «Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics,» *Cancer Science*, vol. 99, n° 10, pp. 2029-2027, 2008.
- [51] N. Topaloglu, G. Kadikoylu, G. Onak y O. Karaman, «The effect of indocyanine green-based photodynamic therapy on healthy fibroblast and keratinocyte cells,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 31, 2020.
- [52] K. Khorsandi, R. Hosseinzadeh y S. F. Khatibi, «Photodynamic treatment with anionic nanoclays containing curcumin on human triple-negative breast cancer cells: Cellular and biochemical studies,» *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 120, n° 4, pp. 4998-5009, 2028.
- [53] B. Slivinski, F. Manai, C. Martinelli, F. Carriero, C. D'Amato, M. Massarotti y S. Comincini, «Enhanced delivery of rose Bengal by amino acids starvation and exosomes inhibition in human astrocytoma cells to potentiate anticancer photodynamic therapy effects,» *cells*, vol. 11, n° 16, 2022.

- [54] E. Panzarini, V. Inguscio, G. M. Fimia y L. Dini, «Rose Bengal acetate photodynamic therapy (RBAC-PDT) induces exposure and release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in human HeLa cells.,» *PLoS one*, vol. 9, n° 8, 2014.
- [55] Y. Ruan, X. Jian, C. Wang, W. Zhen y X. Jiang, «Methylene Blue Loaded Cu–Tryptone Complex Nanoparticles: A New Glutathione-Reduced Enhanced Photodynamic Therapy Nanoplatform,» *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 5, n° 2, pp. S1-S5, 2019.
- [56] R. Hosseinzadeh, K. Khorsandi, S. E. Homa , M. Habibi y G. Hosseinzadeh, «Preparation of cerium-curcumin and cerium-querceetin complexes and their LEDs irradiation assisted anticancer effects on MDA-MB-231 and A375 cancer cell lines,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 34, 2021.
- [57] V. Dolgachev, L. W. Oberley, T.-T. Huang, J. M. Kraniak, M. A. Tainsky, K. Hanada y D. Separovic, «A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization,» *Biochem Biophys Res Communications*, vol. 332, n° 2, pp. 411-417, 2005.
- [58] H. T. Soares, J. R. Campos, L. C. Gomes-Da-Silva, F. A. Schaberle, J. M. Dabrowski y L. G. Arnaut, «Pro-oxidant and Antioxidant Effects in Photodynamic Therapy: Cells Recognise that Not All Exogenous ROS Are Alike,» *ChemBioChem*, vol. 17, p. 836–842, 2016.
- [59] Z. Hu, C. Zhang, Y. Huang y S. Sun, «Photodynamic anticancer activities of water-soluble C60 derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line,» *Chemico-Biological Interactions*, vol. 195, pp. 86-94, 2012.
- [60] Z. Huankang, S. Bo, T. Joanna y K. M. Xiao, «9-Hydroxypheophorbide  $\alpha$ -mediated photodynamic therapy induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in Hep-2 cells via ROS-mediated suppression of the ERK pathway,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 11, pp. 55-62, 2014.
- [61] V. C. Lyudmila y A. C. Vladimir, «Active oxygen intermediates in the degradation of hematoporphyrin derivative in tumor cells subjected to photodynamic therapy,» *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 93, pp. 94-107, 2008.
- [62] H. Xiong , C. Wang, Z. Wang , Z. Jiang , J. Zhou y J. Yao, «Intracellular cascade activated nanosystem for improving ER+ breast cancer therapy through attacking GSH-mediated metabolic vulnerability,» *Journal of Controlled Release*, vol. 309, pp. 145-157, 2019.
- [63] W. Zhang , J. Lu, X. Gao, P. LI, Y. Ma, H. Wang y B. Tang, «Enhanced Photodynamic Therapy by Reduced Levels of Intracellular Glutathione Obtained,» *Employing a Nano-MOF with CuII as the Active Center*, vol. 57, pp. 4891-4896, 2018.
- [64] J. Li, L. Peng, L. Wu, Y. Kuang, J. Su y M. Yi, «Depletion of CD147 sensitizes human malignant melanoma cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress,» *Journal of Dermatological Science*, vol. 58, pp. 204-210, 2010.

[65] Y. Ji, F. Dai, S. Yan, J.-Y. Shi y B. Zhou, «Identification of Catechol-Type Diphenylbutadiene as a Tyrosinase-Activated Pro-oxidative Chemosensitizer against Melanoma A375 Cells via Glutathione S-Transferase Inhibition,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, n° 32, pp. 9060-9069, 2019.