

75056

**JUAREZ, ANDREA VIRGINIA**

Responde celular y molecular de patologías dermatológicas superficiales al estrés oxidativo.

2015

**75056**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES**

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**RESPUESTA CELULAR Y MOLECULAR DE  
PATOLOGÍAS DÉRMICAS SUPERFICIALES AL ESTRÉS  
OXIDATIVO GENERADO POR RIBOFLAVINA COMO  
FOTOSENSIBILIZADOR EN TERAPIA FOTODINÁMICA**

**BIÓL. ANDREA VIRGINIA JUAREZ**

**DIRECTORA: DRA. PATRICIA PONS**

**CO-DIRECTORA: DRA. VIVIANA ALICIA RIVAROLA**

**CÓRDOBA**

**2015**

75056

<b>MFM</b>
Class
T-1004

## COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

### DIRECTORA:

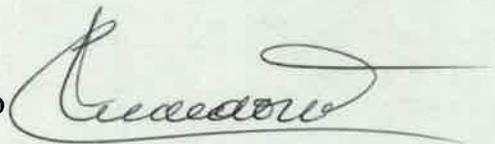
Dra. Patricia Pons

### CO-DIRECTORA:

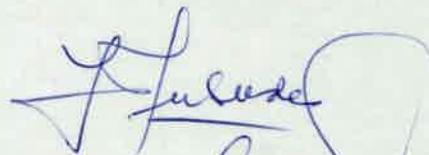
Dra. Viviana Alicia Rivarola

### INTEGRANTES:

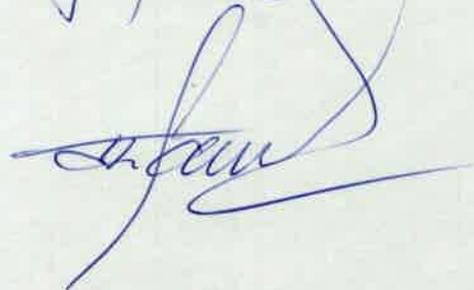
Dra. Cristina Maldonado



Dra. Haydee Fukuda



Dr. Héctor Gauna



*Estoy satisfecho con el misterio de la eternidad de la vida y con el  
Conocimiento, el sentido, de la maravillosa estructura de la existencia.  
Con el humilde intento de comprender aunque más no sea  
Una porción diminuta de la Razón que se manifiesta en la naturaleza”*

*Albert Einstein*

*A mis padres, A mis hermanos, A Matias  
Por brindarme tanto amor  
Y hacerme tan feliz*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las personas que me acompañaron en el camino para llevar a cabo esta tesis y me ayudaron a llegar hasta aquí.

A mis padres, las personas más maravillosas que conozco, por estar siempre, por ser el pilar de mi vida, por su apoyo en todas mis decisiones, y sobre todo por su optimismo constante en cada camino que emprendo! A mis hermanos, excelentes personas y mis mejores amigos, por su amor, compañía, apoyo incondicional y sus consejos constantes, y por mis bellos *sobris*, que han sido siempre mi cable a tierra con sus sonrisas, amor y ternura.

A Matías, amor de mi vida, por su amor incondicional, reflejado en los detalles de la vida, por hacerme tan feliz, por apoyarme cuando más lo necesito y darme ese empuje necesario en momentos críticos.

A la Dra. Patricia Pons, por la dirección de esta tesis, por los momentos vividos y su confianza en mí desde un primer momento, que en muchas ocasiones me permitieron tomar mis propias decisiones. A la Dra. Viviana Rivarola, excelente persona y ejemplar investigadora, por aceptar con buena predisposición la co-dirección.

A la Dra. Alicia Torres, por aceptarme como integrante del Centro brindándome la oportunidad de crecer en el área de la Ciencia.

A los Miembros de la Comisión de Seguimiento Dra. Haydee Fukuda, Dr. Héctor Gauna, y en especial a la Dra. Cristina Maldonado, por brindarme tanto cariño y escucharme siempre que lo necesite.

A la Dra. Ana de Paul, por su confianza y cariño, y por darme la oportunidad de viajar, lo cual me ayudo a crecer como profesional. A Piru y Luci, mis mamás del CME! por su extraordinaria labor, y sobre todo por brindarme tanto cariño, reflejado en las hermosas charlas diarias. A Merce, por instruirme en la microscopia electrónica y enseñarme con tanta dedicación los detalles de la técnica.

A mis grandes amigas conocidas en este trayecto Caro, Ali y Lili, por su constante apoyo, ayuda incondicional y amistad con todas las letras, a Lu y Euge, por sus particulares visiones, por su apoyo y compañía en tantos momentos compartidos. A Amado Quintar, por sus tantas respuestas y consejos, que con su dura sinceridad me mostró siempre la realidad. A Clau, por darme los primeros *tips* dentro del tema de investigación de este trabajo, que lo sentí como propio. A Carito, por su optimismo, buena onda y espontaneidad.

A los Ingenieros Néstor Boetto y Roald Pittau, por su asistencia técnica, por desarrollar los equipos, y por integrarme en sus emprendedores proyectos. A Nati Luna, por su actitud diaria, siempre con una sonrisa irradiando energía positiva.

Al Dr. Jorge Mukdsi, por su excelente desempeño profesional, y por su colaboración en la corrección de este manuscrito. A la Dra. Silvina Gutierrez y al Dr. Juan Pablo Petiti, por su colaboración, respondiendo, en mis comienzos, las dudas que me surgían.

A los Sres. Cristian Giacomelli y Oscar Correa, por su asistencia y buena predisposición en sus trabajos para conmigo.

A los nuevos copados del CME Eze, Flor, Vicky S., Nahuel, Pablo, Gabi, Elena y Sole, por los lindos momentos compartidos.

A los integrantes del laboratorio de Biología Molecular UNRC, por recibirme siempre de la mejor manera, en especial a Lau Milla, por su cariño y colaboración incondicional a lo largo de estos años.

A los Profesores Rodrigo Leal y Alejandra Latini, por abrirme las puertas de sus laboratorios brindándome la oportunidad de adquirir nuevos y valiosos conocimientos. A los integrantes del Lab. de Neuroquímica 3, en especial a Ana Paula, Débora, Filipe, Jhônatas, Isa y Helena, por hacerme sentir parte y enseñarme a trabajar en equipo, aprendiendo que de ese modo se pueden alcanzar grandes metas. A las chicas del LABOX! Deb, Vivi, Aline, Anelise, Karina, Lucila, Rober y Pri, por acompañarme con todo su cariño y brindarme su amistad durante mi estadía en Floripa.

Al Dr. Daniel González Maglio y Dra. Eliana Cela de la Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, por la generosa donación del núcleo reproductor de los animales de experimentación.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>TERAPIA FOTODINÁMICA</b> .....	5
Fotosensibilizadores.....	5
Reacción fotoquímica .....	7
Fuentes de luz.....	8
<b>TFD EN LA CLÍNICA</b> .....	11
Cáncer de piel.....	11
Ventajas de la terapia fotodinámica.....	13
<b>MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LA TFD</b> .....	14
Apoptosis y TFD .....	16
Participación de la familia de la MAPKs en la apoptosis mediada por TFD .....	19
<b>ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y TFD</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
2.1 FOTONSENSIBILIZADORES.....	30
2.2 FUENTE LUMÍNICA .....	30
2.3 CULTIVOS CELULARES .....	31
2.3.1 Cultivo de células humanas de carcinoma escamoso de la línea SCC-13.....	31
2.3.2 Terapia fotodinámica en cultivo de células SCC-13 .....	31
2.3.3 Análisis del efecto de la TFD sobre la viabilidad y proliferación celular .....	33
2.3.4 Caracterización morfológica y bioquímica de la muerte celular.....	35
2.3.5 Estudio de producción de ERO y daño oxidativo generadas por la TFD.....	39
2.4 ANIMALES Y DISEÑOS EXPERIMENTALES .....	43
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	50
3.1 FOTONSENSIBILIZADORES Y FUENTE DE LUZ .....	51
3.2 TERAPIA FOTODINÁMICA EN CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA ESCAMOSO .....	53
3.3. EFECTO DE LA TFD CON RFTA EN MODELOS <i>IN VIVO</i> .....	81
<b>DISCUSIÓN</b> .....	90
<b>CONCLUSIONES</b> .....	109
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b> .....	111
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	114

## RESUMEN

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica, basada en la administración de un fotosensibilizador (FS) seguido de su activación con luz visible. Esta activación promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) induciendo la muerte de células o tejidos tumorales. Esta terapia es empleada principalmente en el tratamiento de enfermedades pre-malignas y malignas; en particular en dermatología está dirigida fundamentalmente al tratamiento de carcinomas del tipo no melanoma y de lesiones precursoras. Si bien la TFD tiene un excelente resultado clínico, los FS aprobados y las lámparas utilizadas para la activación de los mismos, tienen un elevado costo limitando el acceso general a esta terapia. Por lo tanto, la búsqueda de un FS ideal sigue siendo en la actualidad el objetivo de estudio de un gran número de investigaciones.

En el presente trabajo de tesis doctoral nos propusimos como objetivo general abordar el estudio de la eficacia de dos fotosensibilizadores: riboflavina (RF) y su éster derivado tetraacetato de riboflavina (RFTA) en el tratamiento fotodinámico en células humanas de carcinoma escamoso (SCC-13) y células epidérmicas hiperproliferativas de modelos murinos.

La TFD con RF y RFTA aplicada en células SCC-13 provocó una marcada disminución de la viabilidad y de la proliferación, alterando el ciclo celular y generando arresto en las fases G2/M. Asimismo, a nivel ultraestructural se evidenciaron cambios morfológicos característicos de la muerte celular por apoptosis incluyendo condensación de la cromatina, contracción celular, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. En el mismo sentido, la TFD-RFTA indujo un aumento en el número de células TUNEL positivas y en la externalización de fosfatidilserina, ambos indicadores de apoptosis. Además, mediante análisis bioquímicos, se determinó que la apoptosis desencadenada era dependiente de caspasa, observando disminución de la expresión de pro-caspasa 3 y Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) y aumento en la expresión de citocromo c en citoplasma.

Por otro lado, el análisis de la producción de especies reactivas (ER) por la TFD-RFTA, dio como resultado un aumento significativo en los niveles de distintas ER intracelulares, particularmente de anión superóxido, principales inductores de la toxicidad generada por la terapia. Además, pueden promover apoptosis activando diferentes cascadas de señalización, incluida a la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), por lo que evaluamos la relación de estos parámetros luego de la aplicación de la TFD. Estos ensayos demostraron que las ERO generadas con la terapia no indujo cambios

en la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>. En contraste, la aplicación de la TFD-RF o -RFTA promovió un aumento en la expresión ERK1/2 fosforilada asociada al aumento de las ERO.

Finalmente, se abordó el estudio del efecto de la TFD-RFTA sobre la hiperproliferación epidérmica en modelos murinos evaluando los cambios sobre la proliferación y muerte celular. Los resultados revelaron que el tratamiento terapéutico de TFD-RFTA fue efectivo en la disminución de la proliferación epidérmica y aumentó en el número de células TUNEL positivas, indicando que el tratamiento induce un incremento en la muerte de las células.

En conclusión, este trabajo de tesis proporciona nuevos avances en el conocimiento sobre la aplicación RFTA en la TFD como una nueva alternativa de fotosensibilizador. Como así también dar lugar a estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades superficiales de la piel, induciendo principalmente la muerte celular apoptótica, evitando inflamación y daño al tejido sano circundante.

# **INTRODUCCIÓN**

## TERAPIA FOTODINÁMICA

La fotoquimioterapia es una práctica habitual en distintos campos de la Medicina y consiste en la combinación de sustancias fotosensibles y luz. Dentro de ésta se incluye la terapia fotodinámica (TFD), una modalidad terapéutica basada en la fotooxidación de materiales biológicos inducida por la activación lumínica de un fotosensibilizador (FS) localizado selectivamente en células tumorales, de forma que al ser iluminadas con luz de adecuada longitud de onda ( $\lambda$ ) y en dosis suficiente, dichas células resultan dañadas [1].

Este método requiere de la conjunción de tres elementos esenciales a saber, un FS, una fuente de luz y oxígeno [2, 3]. Dichos elementos son individualmente inocuos, pero en combinación pueden iniciar una reacción fotoquímica que culmina en la generación de productos altamente reactivos como especies reactivas de oxígeno (ERO), en especial oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radical anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [4].

Desde hace algunos años esta terapia ha sido aplicada exitosamente en varios campos de la Medicina incluida oncología, oftalmología y dermatología [5]. En particular, en este último campo ha crecido su popularidad, debido principalmente a la facilidad de acceso de la exposición lumínica en la piel y la sencillez del uso tópico de FS sobretodo en el tratamiento de lesiones premalignas y malignas así como en enfermedades inflamatorias e infecciosas.

## FOTOSENSIBILIZADORES

Los FS son moléculas que se activan por la luz y se localizan preferentemente en los tejidos o células diana. Cada FS tiene un espectro específico de acción, que depende de la longitud de onda que absorbe, para producir un estado electrónico excitado, en el que la molécula tiene un alto nivel de energía y es mucho más reactiva. La elección del FS dependerá del tipo de cáncer que se vaya a tratar y del estado clínico del paciente. Los FS utilizados en esta terapia están basados en estructuras tetrapirrólicas similares a protoporfirina contenidas en la hemoglobina. Las cualidades de los FS son muy importantes para la efectividad del tratamiento fotodinámico; un FS ideal debe reunir las siguientes características: a) localizarse específicamente en las células diana; b) presentar distribución homogénea en el tejido a tratar; c) poseer alta liposolubilidad para poder difundir a través de las membranas biológicas; d) que el lapso de tiempo entre su administración y la acumulación máxima en dichos tejidos sea lo más breve posible; e) presentar vida media corta y rápida eliminación de los tejidos normales; f) activación a longitudes de onda con penetración óptima tisular; g) producir alto rendimiento en

la generación de oxígeno singlete o de ERO en general y h) demostrar ausencia de toxicidad en la oscuridad [6].

Estos compuestos son clasificados de acuerdo a sus características en FS de primera, segunda o tercera generación [7]. Los de primera generación derivan de la hematóporfirina (Photofrin), inicialmente fueron usados como FS de administración sistémica por vía intravenosa y la fototoxicidad prolongada resultante, que puede durar entre 6 y 10 semanas, y la poca selectividad tumoral [8], han limitado su uso [9-11].

Con la necesidad de buscar compuestos que tuvieran una absorbancia de mayor longitud de onda para incrementar la penetración tisular y una mejor metabolización en los tejidos para evitar los efectos secundarios, surgieron los FS de segunda generación. Este fue el punto de partida para el uso de la TFD en dermatología por vía tópica, con lo que se evita además la fotosensibilidad generalizada, comenzando con la administración del ácido  $\delta$  aminolevulínico (ALA), el cual ha sido el FS más utilizado en el tratamiento de lesiones cutáneas marcando un importante avance en tal procedimiento terapéutico [12]. En este caso, el ALA es incorporado por todas las células sean en células neoplásicas o malignas, y convertido enzimáticamente a FS activo conocido como protoporfirina IX [8], esto se denomina «fotosensibilización endógena» [12]. Dentro de los FS de segunda generación se encuentran las ftalocianinas que presentan características óptimas para el tratamiento del cáncer. Las mismas cuentan con una absorción de la luz de 660-770 nm, alto rendimiento cuántico para la generación de oxígeno singlete, y acumulación prolongada dentro de las células [7]. Sin embargo, la mayoría de los derivados de ftalocianinas presentan una alta hidrofobicidad, lo que limitan su eficacia clínica [13] y problemas farmacocinéticos como baja distribución en los tejidos derivada de la agregación de la molécula [14].

En este contexto, surgieron los FS de tercera generación, una generación adicional de FS que representa una clase emergente y una nueva área de investigación. Estos son FS de segunda generación conjugados con un transportador que lleva el FS específicamente al tejido tumoral. Estas moléculas portadoras incluyen monosacáridos [15], péptidos [16], lipoproteínas de baja densidad (LDL) [17], anticuerpos [18], nanopartículas poliméricas [19] y polímeros [20] lo que mejora aún más la penetración en la célula a tratar y la selectividad tumoral de estas sustancias.

### ***Mecanismo de la localización tumoral selectiva de los fotosensibilizadores***

El principio de la TFD se basa en la captación selectiva de un FS que se localiza en células o tejidos tumorales específicos [3]. Por lo tanto, el fenómeno por el cual los FS pueden

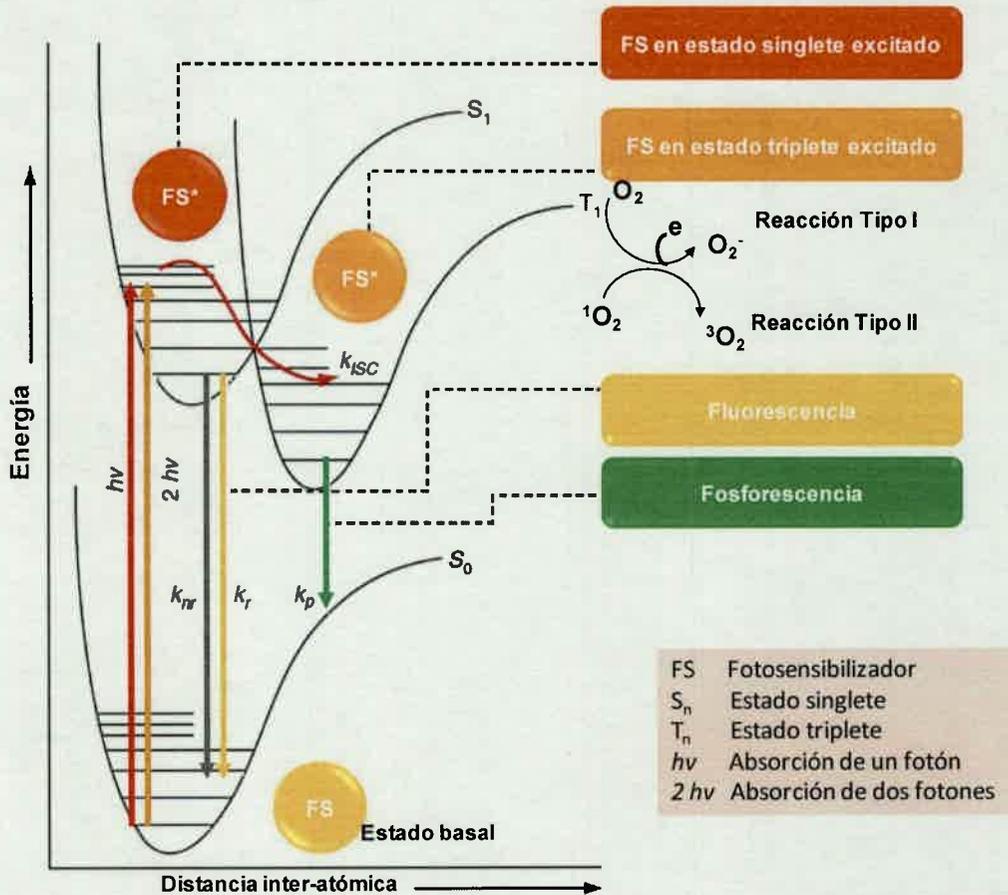
localizarse selectivamente en los tejidos tumorales se ha investigado intensamente desde un comienzo [21] y continúa aún en estudio [22]. Los mecanismos implicados en este proceso son muy complejos ya que se han observado grandes variaciones en la selectividad incluso para con el mismo FS con diferente estructura molecular, en distintos modelos tumorales, durante o después de su aplicación [23]. Los FS con diferentes farmacocinética parecen tener variaciones en la capacidad de localización en el tumor [24], probablemente debido a la acumulación selectiva en la lesión proliferativa a causa de la mayor permeabilidad en la neovascularización [25], ya que se han sugerido algunas propiedades distintivas de las células neoplásicas en comparación con el tejido normal, tales como valores de pH relativamente bajos [26], sobreexpresión de receptores de LDL/E apoB [27] y poco desarrollo de drenaje linfático [28].

## REACCIÓN FOTOQUÍMICA

La fotosensibilización supone la generación, mediante absorción de luz, del estado excitado del FS empleado, de manera que éste, durante el tiempo de vida en esta condición, es capaz de ceder o transferir su exceso de energía a otra molécula presente en el medio circundante, obteniéndose un estado excitado de la misma [29]. La acción fotodinámica consiste básicamente en que tras la absorción de luz, el FS es transformado desde su estado basal a un estado electrónicamente excitado e inestable (estado singlete), con una vida media de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  segundos (Figura 1). El FS excitado puede volver a su estado basal emitiendo luz en forma de fluorescencia o en estado triplete puede interaccionar con moléculas circundantes dando lugar a dos tipos de reacciones fotooxidativas: reacción tipo I por transferencia de electrones, que origina radicales libres del oxígeno, los cuales inician reacciones en cadena de radicales libres [30], y reacción tipo II mediada por la transferencia de energía al oxígeno molecular dando lugar a la formación de oxígeno singlete [31].

Ambas reacciones ocurren simultáneamente y en competición, sin embargo, parece que el oxígeno singlete es el mayor responsable del daño tisular producido durante la TFD. El oxígeno singlete tiene una vida media corta ( $<0,04 \mu\text{s}$ ) y un radio de acción de 5 a 20 nm, un escaso tiempo si tenemos en cuenta el diámetro de una célula tumoral ( $\pm 10 \mu\text{m}$ ). Además, es una molécula muy reactiva que rápidamente reacciona con muchos tipos de biomoléculas, especialmente en las membranas celulares; los lípidos insaturados, el colesterol y algunos aminoácidos, como el triptófano, la histidina y la metionina, son especialmente vulnerables [32]. Dependiendo de la cantidad y localización de las ERO en el tejido diana, estas pueden modificar funciones celulares generando diversos cambios bioquímicos y morfológicos en las

células sobre las que actúa o induce la muerte celular [33-35]. Desde el punto de vista bioquímico, la peroxidación lipídica y la inactivación de las proteínas serían los efectos principales de las ERO producidas en el proceso fotodinámico [36].



**Figura 1.** Diagrama de energía Perrin-Jablonski de un FS que ilustra la reacción fotoquímica. La absorción de un fotón hace que la molécula pase a un estado excitado electrónicamente ( $S_1$ ). Desde allí puede reaccionar con moléculas vecinas, pasando a un estado de transición excitado ( $T_1$ ), o relajarse y regresar al estado  $S_0$ . Los FS en estado  $T_1$  tienen mayor tiempo de vida media que en  $S_1$ ; por lo cual el estado de triplete a menudo media las reacciones biológicamente importantes. El FS en estado triplete puede interactuar con el oxígeno molecular por dos vías, Tipo I y Tipo II, lo que conduce a la formación de ERO y de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), respectivamente. Adaptado de Celli *et. al.* [37].

## FUENTES DE LUZ

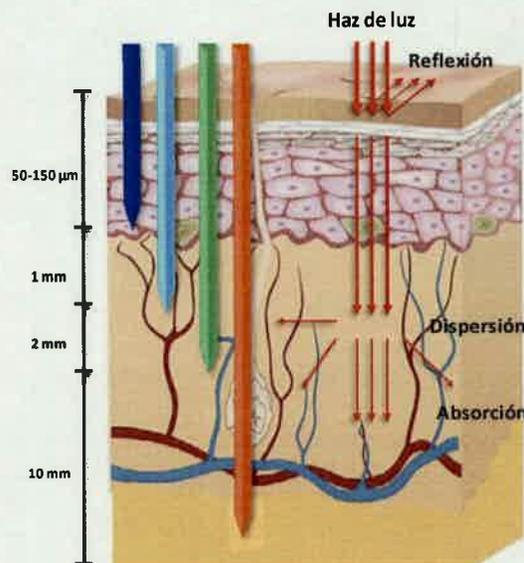
La eficiencia de la TFD depende además de la correcta aplicación de la luz en presencia de oxígeno en el tejido diana [38]. El desarrollo de fuentes de luz con los parámetros dosimétricos adecuados, en general, con láseres o con diodos emisores de luz (LEDs), son los componentes claves de la óptima práctica clínica. Las fuentes de luz deben estar orientadas clínicamente para dar suficiente dosimetría en el tejido a tratar generando efectos secundarios

mínimos en el tejido normal [23]. Sin embargo, los principales obstáculos de los equipos empleados son el costo, la complejidad, la disponibilidad y la falta de tecnología que es sumamente importante para el desarrollo de equipos efectivos [39].

### ***Penetración de la luz en el tejido***

Una fuente de luz con un espectro de emisión que corresponda con el espectro de absorción del FS junto con una adecuada penetración en los tejidos determina una efectividad máxima de la TFD. La penetración de la luz en la lesión depende tanto de la longitud de onda de la luz utilizada (a mayor longitud de onda, más penetración) como del tipo de tejido el cual puede modificar la absorción por los siguientes factores: absorción óptica de cromóforos tisulares endógenos (hemoglobina), la dispersión óptica dentro del tejido y tipo de FS [40].

La región entre 600 y 1200 nm de longitud de onda, se denomina la ventana óptica de tejido ya que longitudes de onda inferiores a 600 nm son absorbidas mayormente por la hemoglobina. Sin embargo, sólo longitudes de onda de hasta 800 nm pueden generar  $^1\text{O}_2$ , porque aquellas mayores no presentan energía suficiente para iniciar una reacción fotodinámica [41]. Los FS pueden tener más de una longitud de onda a la que se producirá suficiente absorción y una cantidad igualmente suficiente de oxígeno singlete producido (eficiencia cuántica). Por lo tanto, el uso de TFD, requiere que se adopten apropiadamente estos factores [42]. En la figura 2, se representa un esquema del tejido de la piel con la variada penetración de la luz de acuerdo a la longitud de onda emitida.



**Figura 2.** Propagación de la luz a través del tejido de piel, se observa que mientras mayor es la longitud de onda, mayor es la penetración en el tejido. Adaptado de Agostinis *et. al.* [4].

### ***Dosimetría de la luz***

La elección de la fuente de luz debe basarse en las características de absorción del FS (espectros de excitación y de emisión) y en el tipo de enfermedad a tratar: ubicación, tamaño de las lesiones, accesibilidad y características del tejido. La eficacia clínica de la TFD depende de la dosis lumínica, de la densidad de potencia y del tiempo de exposición a la luz. El producto de la potencia de la fuente luminosa por el tiempo, equivale a la densidad de energía ( $J/cm^2$ ). Por lo tanto, uno de los requisitos principales para el tratamiento de tumores con TFD es contar con una dosis de luz homogénea y suficiente para irradiar la lesión, la cual debe contar con una adecuada concentración del FS administrado [43]. Se debe tener en cuenta que la intensidad de la luz en el tejido disminuye de forma exponencial con respecto a la distancia que recorre. En cuanto a la dosis de luz a administrar en cada lesión, se debe considerar que con niveles muy bajos se produce un daño tisular subletal que puede ser reparado, mientras que a dosis demasiadas altas se produce una depleción de oxígeno que disminuye la eficacia terapéutica. Por tanto, es necesario ajustar la dosis de luz para cada fuente lumínica y tipo de patología [11].

### ***Mecanismo de acción inducido por la TFD***

La eficacia de la TFD resulta de la conjunción del tipo de muerte celular, el daño vascular, la inflamación y la respuesta inmunitaria del huésped. El daño fotodinámico está en estrecha relación con la localización del FS en el momento de la fotoactivación. En general, las porfirinas con cadenas laterales catiónicas se localizan en la mitocondria, mientras aquellas con un carácter más aniónico se localizan preferentemente en los lisosomas, siendo las primeras más fototóxicas. En cuanto a la forma de inducción de la muerte celular se ha demostrado que los FS que se localizan en la mitocondria inducen apoptosis [44], mientras que los que se ubican en la membrana plasmática causan necrosis con la exposición a la luz [2]. Estudios realizados *in vitro* han comprobado que si se administran dosis bajas de luz, la muerte celular se produce por apoptosis, mientras que si la dosis es alta se produce por necrosis [45].

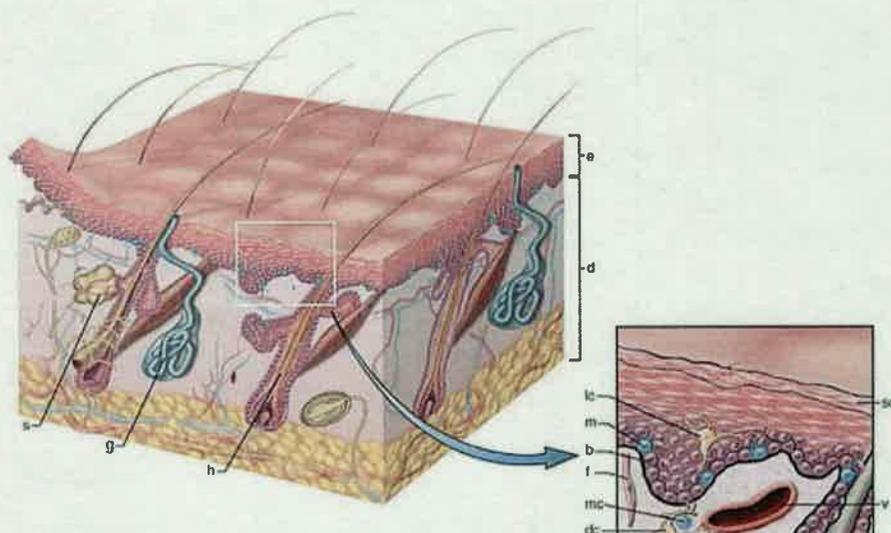
Como un resultado del daño directo inducido por la TFD en el endotelio vascular, se genera hipoxia, anoxia y privación de nutrientes a las células alteradas. La respuesta inflamatoria aguda es el principal proceso de protección involucrado en este contexto. Su rol principal es perturbar la homeostasis, garantizar la eliminación de células dañadas y promover posteriormente la cura local con la restauración funcional del tejido.

## TFD EN LA CLÍNICA

La TFD es una modalidad terapéutica mínimamente invasiva aprobada para el tratamiento clínico de varios tipos de enfermedades oncológicas y no oncológicas [46]. Es un método terapéutico utilizado cada vez con mayor frecuencia en dermatología clínica [47]. Las principales ventajas de la TFD sobre otros tratamientos convencionales contra el cáncer, es que tiene muy baja toxicidad sistémica debido a que los FS solo se activan en presencia de la luz; es capaz de destruir selectivamente las células tumorales y como tratamiento puede ser aplicado ya sea solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como la quimioterapia, la cirugía, la radioterapia o inmunoterapia [48].

### *Cáncer de piel*

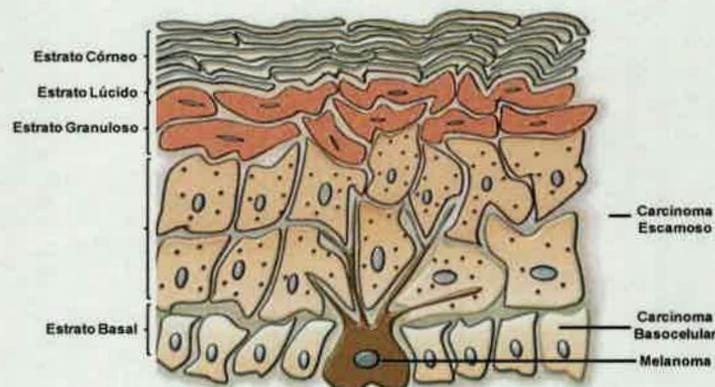
El cáncer de piel es una patología causada por la formación de células malignas en los tejidos de la piel. La piel se compone de tres capas: epidermis, dermis y tejido adiposo subcutáneo. Cada componente tiene una compleja estructura y función, que pueden presentar variaciones de acuerdo a la edad, el género, la raza y la localización anatómica. La epidermis es un epitelio plano estratificado que presenta varios estratos celulares: estrato basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (Figura 3). La mayoría de las células en la epidermis son los queratinocitos (90 a 95%). El resto de las células epidérmicas son no queratinocitos (5 a 10%) e incluyen melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel [49].



**Figura 3.** (A) La piel se compone de una capa epidérmica (e) de la cual se especializan anexos (folículos pilosos, h; glándulas sudoríparas, g; y las glándulas sebáceas, s) y descienden en la dermis subyacente (d). (B) Proyección de la capa epidérmica y dermis superficial subyacente demuestran la maduración ascendente progresiva de las células basales (b) en células epiteliales escamosas del estrato córneo (sc). Melanocitos dendríticos (m) que contienen melanina, células de Merkel que contienen

gránulos neurosecretorios y células dendríticas de Langerhans (LC). La dermis subyacente contiene vasos pequeños (v), fibroblastos (f), células perivasculares (mc) y dendrocitos (DC), potencialmente importantes en la inmunidad y reparación cutánea. Adaptado de Kumar *et. al.* [50].

De acuerdo a las células que los originan, los tumores epidérmicos malignos (TE) se clasifica en melanomas, proveniente de melanocitos, y en no melanoma proveniente de otro tipo de células epidérmicas (Figura 4). Dentro del tipo no melanoma (TENM) se incluyen a: carcinoma basocelular (CBC), carcinoma de células escamosas (CCE) y carcinomas de células de Merkel [51].



**Figura 4.** Esquema de la epidermis indicando sus estratos y los diferentes tipos de tumores epidérmicos malignos según las células que le dan su origen.

El uso más aceptado y amplio de la TFD en el cáncer es en dermatología clínica principalmente para el tratamiento de los TENM. Estas son las neoplasias más comunes que se producen en la población blanca y su incidencia ha ido en constante aumento en todo el mundo desde la década de 1960 [52]. La mayoría de estas lesiones pueden ser eliminadas con éxito con la escisión quirúrgica, pero el desarrollo de metástasis conlleva una alta morbi-mortalidad. Por lo tanto, el diagnóstico precoz y el tratamiento de los TENM son primordiales en la clínica, y la TFD constituye una herramienta terapéutica real para el logro de esos objetivos.

Los CBC crecen lentamente y de forma progresiva. El crecimiento es local pudiendo extenderse a tejidos y estructuras adyacentes, incluyendo nervios, hueso o incluso cerebro en los casos histológicamente más agresivos. Sin embargo la metástasis en este tipo de tumor es extremadamente rara. Los CCE representan la segunda forma más común de cáncer de piel en la población blanca, y son más peligrosos que los CBC, ya que la posibilidad de generar metástasis es mayor. Pueden experimentar tanto crecimiento local como a distancia en forma de metástasis, aunque ésta es infrecuente si se sigue un tratamiento adecuado. Los CCE de labio, oreja y cuero cabelludo presentan una mayor tasa de metástasis, pudiéndose observar adenopatías regionales debidas tanto a una sobreinfección de la lesión como a la diseminación

metastásica [53]. El riesgo de metástasis de los CCE varía con el contexto clínico en el que se presenta la lesión, es menor para los tumores que surgen en la piel dañada por el sol, y tienen menos de 2 cm de diámetro. Para lesiones en la piel no expuesta al sol, la incidencia de metástasis es aproximadamente del 2-3% [54].

Las terapias actuales para los CCE incluyen la escisión quirúrgica, la crioterapia, la electrocirugía, los tratamientos tópicos (5-fluorouracilo e imiquimod), la radiación y la TFD. La TFD es muy recomendada para el tratamiento de los CCE *in situ* [55, 56], ya que se demostró mayor eficacia y menos cicatrices en comparación con la crioterapia o con otros tratamientos tópicos [57]. Además es muy efectiva cuando hay numerosas lesiones especialmente en zonas donde múltiples cirugías se traducirían en la morbilidad (por ejemplo, en las extremidades inferiores) [47]. Además la TFD es muy efectiva para tratar queratosis actínica (QA) [58]. Ackerman y otros han propuesto que las QA son expresiones morfológicas de carcinoma de células escamosas, mientras que Cockerell *et. al.* han sugerido renombrarlas como “neoplasia intraepidérmica queratinocítica” [59]. Estas representan las lesiones más comunes que afectan a los sujetos de piel clara en áreas del cuerpo expuestas al sol, como el rostro y el cuero cabelludo.

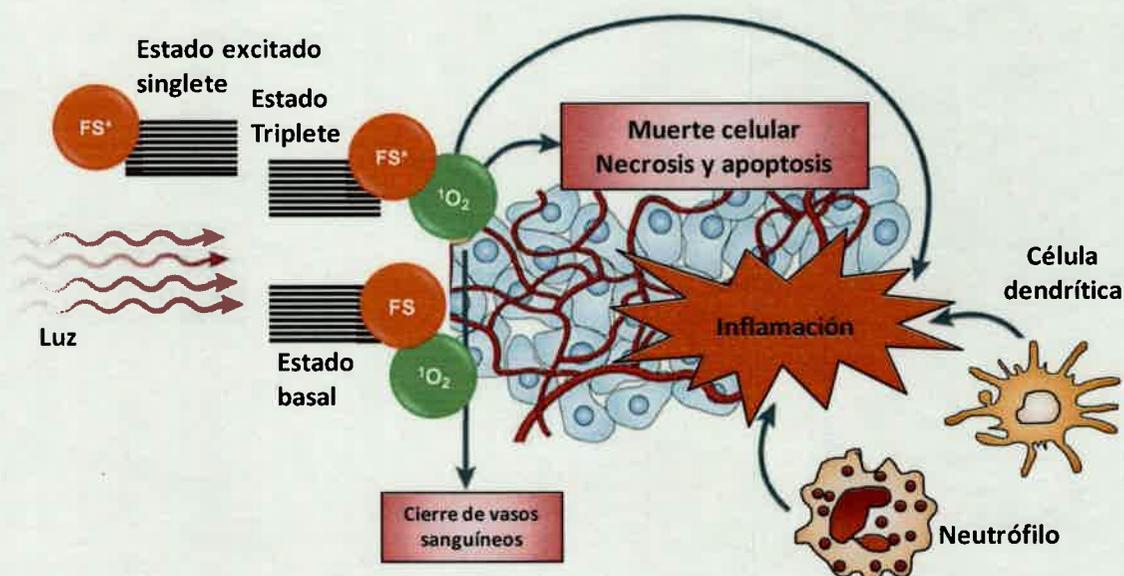
#### ***Ventajas de la terapia fotodinámica***

La mayor ventaja de este tratamiento es que es muy selectivo, lo que permite que sólo se trate el área afectada, presentando excelentes resultados cosméticos. Es una terapia no invasiva y tiene la posibilidad de tratar múltiples lesiones simultáneamente, pudiéndose repetir varias veces, incluso es posible aplicarla en áreas con previa exposición a radiación ionizante. Numerosos estudios demuestran incluso una mejora en el aspecto estético de las zonas tratadas. Uno de los objetivos del uso de esta terapia es la de mejorar diferentes aspectos cosméticos de la piel, especialmente en las zonas más expuestas al sol. Asimismo la TFD tiene un bajo potencial de daño a nivel del ADN ya que se requieren longitudes de onda correspondientes al espectro visible; además, al utilizarse FS que no se acumulan en forma significativa en el núcleo celular, la TFD evita de esta manera inducir mutaciones o carcinogénesis [60].

Esta terapia es muy selectiva, lesionando sólo las células en las que se encuentra la droga y dejando intacto el tejido circundante. Su naturaleza no invasiva, las altas tasas de curación y los excelentes resultados cosméticos son las claves del éxito de esta terapia. Sin embargo, el elevado costo del tratamiento limitan el acceso a la TFD solo a un grupo selecto de pacientes [61, 62].

## MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LA TFD

El grado de fotodaño y la citotoxicidad después de la TFD *in vivo* es multifactorial y depende de las características del FS, su localización en el momento de la irradiación, la dosis administrada, la dosis de luz empleada, el tiempo entre la administración del FS y la irradiación, el tipo de tumor y su nivel de oxigenación [3, 63, 64]. Los efectos antitumorales de la TFD resultan de tres procesos interdependientes: los efectos letales directos sobre las células tumorales, la destrucción de la vascularización del tumor causando isquemia de la neoplasia y la activación de una respuesta inmune no específica [2, 65]. La figura 5 esquematiza el mecanismo de acción de la TFD en células tumorales. Mediante la manipulación de la dosis de luz, el tiempo de iluminación después de la administración del FS o una combinación de éstos, es posible modular el papel desempeñado por cada uno de estos factores en el deterioro final de la lesión proliferativa.



**Figura 5.** Mecanismo de acción de la TFD en tumores. El oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) al reaccionar puede matar directamente las células tumorales mediante la inducción de necrosis y/o apoptosis, destruir la vascularización del tumor, y producir una respuesta inflamatoria aguda que atrae polimorfos nucleares neutrófilos y células dendríticas. Esquema modificado de Castano *et. al.* [66].

La destrucción celular directa del tumor por la TFD es causada por el daño irreversible de sitios vitales subcelulares, como son la membrana plasmática, lisosomas, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (RE). Como la mayoría de los FS no se acumulan en los núcleos celulares, la TFD tiene bajo potencial de causar daños en el ADN, generar mutaciones y carcinogénesis en comparación con otras terapias como la radiación X [64]. En

general se asume que la localización intracelular de los FS coincide con el sitio primario de fotodaño. Puesto que el oxígeno singlete tiene una vida media muy corta en las células, sus dianas intracelulares están situadas cerca de los lugares donde se encuentra el sensibilizador [67]. Algunos estudios han informado sobre la relocalización de ciertos FS después de la irradiación, lo que sugiere que además del sitio principal, el fotodaño puede propagarse rápidamente a otras localizaciones subcelulares [68]. La naturaleza molecular de los sitios de foto-oxidación tiene una profunda influencia en las vías de señalización y en el tipo de muerte celular iniciada por la TFD. Generalmente, los compuestos fotoactivos localizados en mitocondrias o en RE promueven la apoptosis, dentro de un cierto umbral de estrés oxidativo, mientras que aquellos localizados en la membrana plasmática o lisosomas, pueden retrasar o bloquear la muerte celular programada y generar necrosis [69]. Además la autofagia puede ser inducida por la TFD en el intento de reparar y sobrevivir al fotodaño lo cual puede ser convertido en una señal de muerte celular si la respuesta inicial falla [70-72]. Por lo tanto, los mecanismos letales iniciados por el proceso de fotosensibilización incluirán tres principales tipos de muerte celular como apoptosis, necrosis y autofagia.

### ***Necrosis y TFD***

La necrosis de las células cancerosas por la TFD es causada por el daño irreversible en la membrana plasmática y orgánulos intracelulares, tales como mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi y RE. La necrosis puede ocurrir después de una alta dosis de FS y/o de luz, pero esto generalmente se trata de evitar con el fin de suprimir el daño a los tejidos normales. La morfología característica es de oncosis, que define una morfología con hinchazón citoplasmática, ruptura mecánica de la membrana plasmática, dilatación de organelas (mitocondrias, RE y aparato de Golgi), así como la condensación moderada de la cromatina [73].

### ***Autofagia y TFD***

La autofagia presenta vacuolización masiva del citoplasma y no genera condensación de la cromatina. Se caracteriza por el secuestro de material citoplásmico dentro de autofagosomas para su degradación por las enzimas lisosomales. Los autofagosomas por definición, son estructuras subcelulares de doble membrana y contienen partes de citoplasma como citosol y restos de orgánulos [74]. Tal morfología es lo que permite que sean distinguidos por microscopía electrónica de transmisión de otros tipos de vesículas como endosomas, lisosomas

o cuerpos apoptóticos [75]. La fusión entre autofagosomas y lisosomas genera autolisosomas, en los que tanto la membrana interna autofagosomal y su contenido luminal se degradan por hidrolasas lisosomales ácidas. Este proceso catabólico marca la culminación de la vía de la autofagia. Otro marcador de vacuolas autofágicas es la redistribución de una proteína de fusión LC3-GFP en estructuras vesiculares las que pueden ser autofagosomas o autolisosomas [75, 76].

### *Apoptosis y TFD*

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada. Numerosos investigadores la han descrito en el tejido diana posterior a la TFD [64]. Consiste en una cascada de eventos moleculares que conducen a la muerte celular ordenada sin generar una respuesta inflamatoria, por lo que la célula requiere ATP para llevarla a cabo [77-79]. El inicio de la apoptosis involucra una compleja red de vías de señalización, tanto intrínseca como extrínseca en la célula individual, que se regula por factores pro y anti-apoptóticos [77]. Tras la absorción de uno o más fotones, el FS excitado inicia una de las dos reacciones posibles (tipo I y/o II) produciendo ERO [80]. Estas moléculas oxidan diversos sustratos celulares, que afecta a las funciones celulares y que resultan en la muerte celular. La apoptosis es un proceso morfológicamente caracterizado por la condensación de la cromatina, la escisión del ADN cromosómico en fragmentos internucleosomales, el encogimiento celular, la formación de ampollas en la membrana, la formación de cuerpos apoptóticos sin ruptura de la membrana plasmática, la exposición de fosfatidilserina a la cara exterior de la membrana plasmática, y la fagocitosis por las células vecinas.

Los FS localizados en las mitocondrias pueden causar daño inmediato al ser irradiados, ya que interaccionan con una serie de proteínas anti-apoptóticas y proteínas pro-apoptóticas, lo que provoca la liberación de moléculas y la activación de caspasas (por sus siglas en inglés: *cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) [33]. Todas las caspasas se sintetizan como proenzimas o zimógenos y se activan en respuesta a una señal apoptótica ya sea como caspasas iniciadoras o caspasas efectoras [81]. La apoptosis vía caspasa dependiente puede ser extrínseca o intrínseca, en la que las caspasas iniciadoras -8, -10 y -9 activan directamente las procaspasas efectoras -3 y -7 [81].

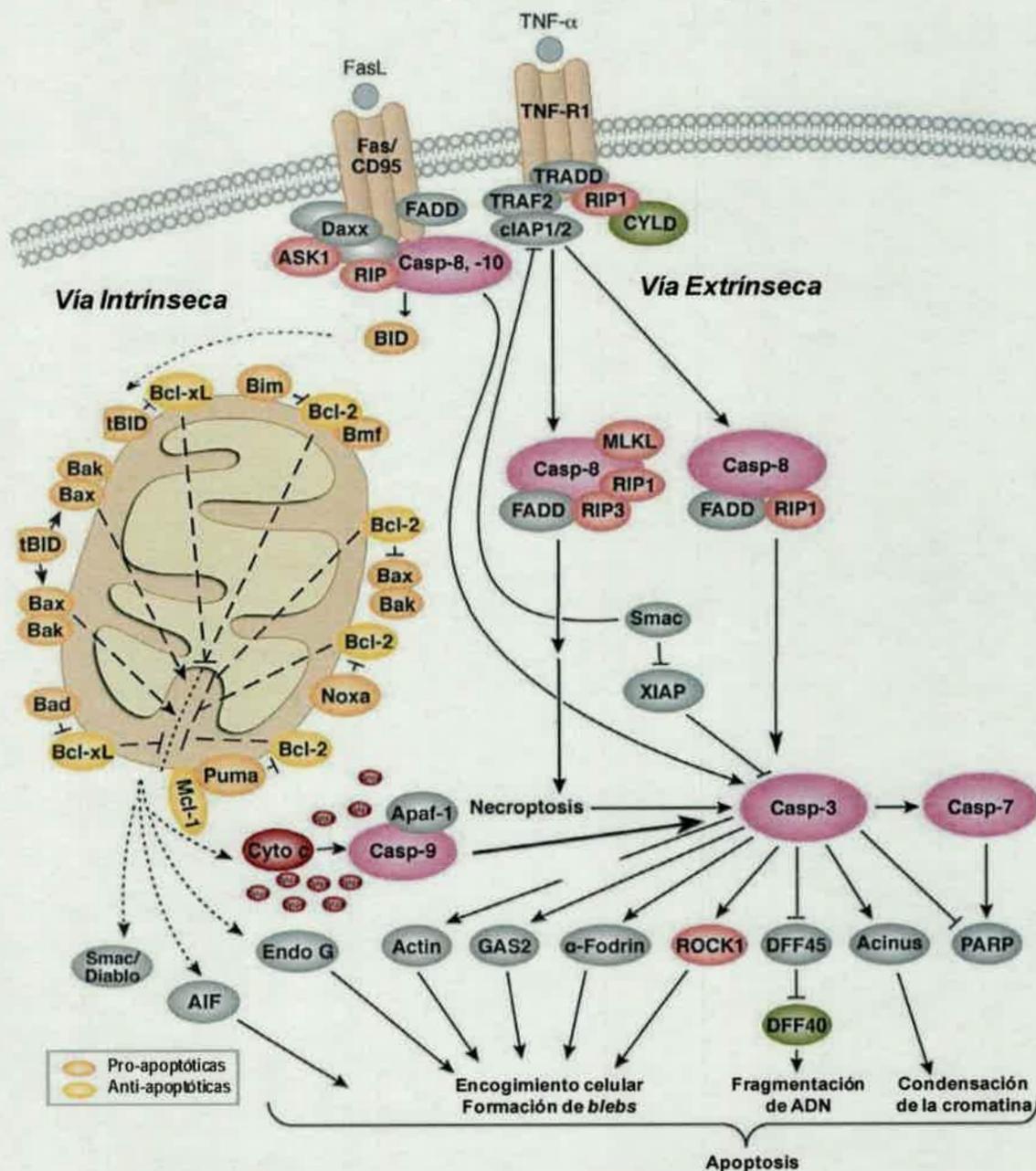
La vía extrínseca es activada por la unión de los ligandos FasL, TNF- $\alpha$  y TRAIL con los receptores de muerte en la superficie celular como Fas, TNF-RI y los receptores TRAIL, respectivamente. Este hecho genera la homotrimerización del receptor que, a través de proteínas adaptadoras (como FADD) y con la formación de un complejo de señalización de inducción de

muerte (DISC) que recluta las caspasas iniciadoras -8 y -10 e inducen su activación por dimerización.

En la vía intrínseca las mitocondrias ocupan un papel central y, aunque son organelas esenciales para la producción de energía metabólica en forma de ATP, numerosos estímulos intrínsecos y extrínsecos activan diferentes vías de señalización para inducir la permeabilización de las membranas mitocondriales (PMM). Esta permeabilización genera la liberación al citosol de varias proteínas apoptogénicas, almacenadas en el espacio intermembrana mitocondrial [82, 83], activadores de caspasas como citocromo c, Omi/HtrA2 y Smac/DIABLO así como factor inductor de apoptosis (AIF) y endonucleasa G (Endo G), que actúan de una manera independiente de caspasas [84]. El citocromo c, mediante la unión a Apaf-1 y en presencia de ATP, conduce al reclutamiento y la activación de la procaspasa-9 a través de la formación de un complejo llamado apoptosoma. Una vez libre en el citosol, Omi/HtrA2 y Smac/DIABLO antagonizan la actividad de los inhibidores endógenos de las caspasas (IAP) promoviendo así la activación de la caspasa, mientras AIF y EndoG translocan al núcleo, donde median la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN a gran escala, de forma independiente de la señalización de caspasas [85, 86]. La inducción de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (MMI) puede consiguientemente generar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y la hinchazón osmótica de la matriz que puede conducir a la ruptura de la membrana mitocondrial externa (MME), posiblemente debido a que la misma tiene un área de superficie más pequeña en comparación con la de la MMI, lo que resulta en la liberación de factores apoptogénicos de las mitocondrias. El desacoplamiento mitocondrial, daría lugar a una drástica caída en los niveles de ATP citosólico, y la consiguiente pérdida de la viabilidad [68]. La figura 6 resume las vías de señalización que conducen a la apoptosis descripta previamente.

La familia de proteínas Bcl-2 han sido consideradas como uno de los principales reguladores en la ruta intrínseca del proceso apoptótico [77]. Debido a la homología compartida entre cuatro regiones conservadas llamadas homología Bcl-2 (BH) dominios 1-4, esta familia es dividida en 3 grupos: uno con actividad anti-apoptótica, es decir que promueven la supervivencia celular e incluye a Bcl-2, Bcl<sub>L</sub>, Bcl<sub>w</sub> y Mcl-1. Los otros grupos presentan actividad pro-apoptótica, uno con dominios BH1-3 como Bax y Bak, y el otro con dominio BH3 como Bim, Bid, Bmf, NOXA, PUMA [79]. El balance entre los miembros pro- y anti-apoptóticos de esta familia influye de manera significativa en la susceptibilidad de las células tumorales malignas a la apoptosis luego de la TFD [87]. Se sabe que la TFD puede inducir fotodaño en las proteínas anti-apoptóticas y activar los miembros pro-apoptóticos

desencadenando la muerte [64]. La activación de Bax y Bak implica la homo-dimerización y oligomerización dentro de la MME, lo que conduce a la formación de poros mitocondriales y a la liberación de proteínas apoptogénicas [88]. Por lo cual alteraciones en la expresión de los miembros de las proteínas de la familia Bcl-2 posterior a la TFD han sido reportadas en diversas líneas celulares y tipos de tumores [89]. Los FS que se acumulan en los lisosomas o en el RE pueden inducir la activación de caspasas mediada por Bax [24].



**Figura 6.** Vías de señalización que conducen a la muerte celular por apoptosis. Dependiendo del tipo de estímulo apoptótico, se pueden activar diferentes vías como la vía extrínseca o intrínseca. La vía extrínseca mediada por los receptores de muerte o la vía mitocondrial o intrínseca, además pueden inducirse otras vías por la liberación mitocondrial de la oxidorreductasa AIF y la endonucleasa mitocondrial Endo G. Adaptado de *Cell Signaling technology*®.

### ***Participación de la familia de la MAPKs en la apoptosis mediada por TFD***

Las MAPKs, proteínas quinasas activadas por mitógenos, integran son una compleja red de señalización celular que en última instancia regula la expresión génica en respuesta a diversos estímulos extracelulares. Las tres familias de MAPK conocidas son: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las quinasas activadas por estrés c-Jun N-terminal (JNK), y la p38<sup>MAPK</sup> [90]. La figura 7 grafica la activación de las diferentes vías de MAPK y los posibles estímulos que conllevan a su activación. La activación de MAPKs por TFD ha sido reportada en varias líneas celulares utilizando diferentes FS [24, 91, 92].

#### ***Vía de las ERK 1/2 en la muerte celular***

Esta familia presenta dos isoformas ERK1 y ERK2 y la cascada es activada por gran cantidad de estímulos tanto extracelulares como intracelulares. A pesar de que la vía de las ERK ha sido siempre relacionada con la supervivencia en la gran mayoría de los tipos celulares, también puede contribuir en la muerte celular [93-95]. Además, se describió que las ERO pueden activar las Raf/MEK/ERK 1/2 e inducir apoptosis [96, 97].

Los mecanismos a través de los cuales la vía de las ERK median la apoptosis, permanece poco conocida y parece ocurrir a diferentes niveles del sistema de transducción de señales. Por un lado se postula que ERK podría actuar en la vía intrínseca de la apoptosis a un nivel por encima de la mitocondria, favoreciendo la liberación de citocromo c con la consiguiente activación de la caspasa 3 y culminando con aquel tipo de muerte celular [98]. Otros estudios indican que ERK 1/2 podría mediar la up-regulación de Bax y p53 inhibiendo la acción de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xl en la mitocondria [99, 100]. Además ERK 1/2 fosforila directamente p53, reforzando su rol pro-apoptótico. Otros datos, también vinculan la vía ERK 1/2 con la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, ya que esta kinasa up-regula la expresión de TNF $\alpha$  y la activación de la caspasa 8 [101].

#### ***Vía de las JNK***

Estas quinasas fueron identificadas originalmente como proteínas quinasas activadas por el estrés (SAPKs). Posteriormente fueron denominadas como JNKs para enfatizar su rol en la fosforilación y activación del factor de transcripción c-jun. Las JNK son activadas en respuesta a citoquinas, radiación UV, la supresión de factores de crecimiento, agentes que dañan la integridad del ADN y algunos factores de crecimiento presentes en el suero [102]. Ante diversas situaciones con estímulos estresantes la activación de las JNK puede tener importantes

influencias a nivel celular, como la expresión alterada de genes, la muerte celular o modificaciones en la proliferación celular. Al igual que las ERK1/2, las JNK pueden relocalizarse en el núcleo luego de su activación, pero en menor proporción que las ERK. El rol de JNK en la apoptosis ha sido bien establecido, sin embargo los mecanismos aún parecen controvertidos y aparentarían ser específicos en cada tejido y ante cada estímulo [97]. Se ha vinculado esta proteína con miembros pro y anti- apoptóticos de la familia Bcl-2, ya sea inhibiendo los anti-apoptóticos, como activando los pro-apoptóticos. También se describió que la caspasa 3 activa JNK [103].

### Vía de $p38^{MAPK}$

La relación entre la muerte celular por apoptosis y la vía  $p38^{MAPK}$  ha sido evaluada en numerosos estudios [89]. La activación de  $p38^{MAPK}$  fue observada en células que están muriendo por apoptosis inducida por diferentes estímulos. Numerosos agentes quimioterapéuticos requieren la activación de  $p38^{MAPK}$ , y la inhibición de ésta quinasa ha sido relacionada con la apoptosis en respuesta al daño en el ADN inducido por diferentes agentes [104]. Por otro lado, la administración de inhibidores de caspasas disminuye la activación de  $p38^{MAPK}$ , por lo que esta tendría un rol ejecutor de la actividad de la caspasa, sin embargo, la sobre-expresión de MKK6 induce un incremento en la actividad de esta enzima, lo que indicaría que también participa como activador corriente arriba de la misma [105]. Otro mecanismo por el cual participaría en la apoptosis es a través de la fosforilación y regulación de Bcl<sub>XL</sub>, y del aumento en la activación de p53 [106].

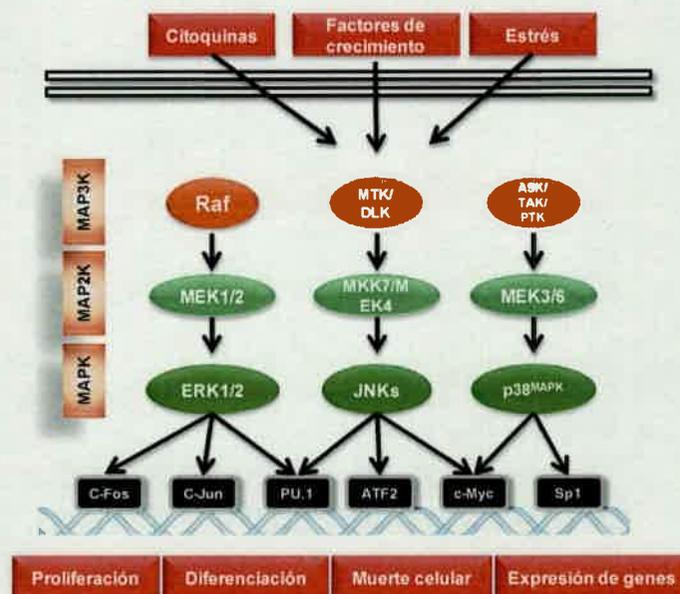


Figura 7. Vías de señalización de las MAPK y los posibles efectos luego de su activación [97].

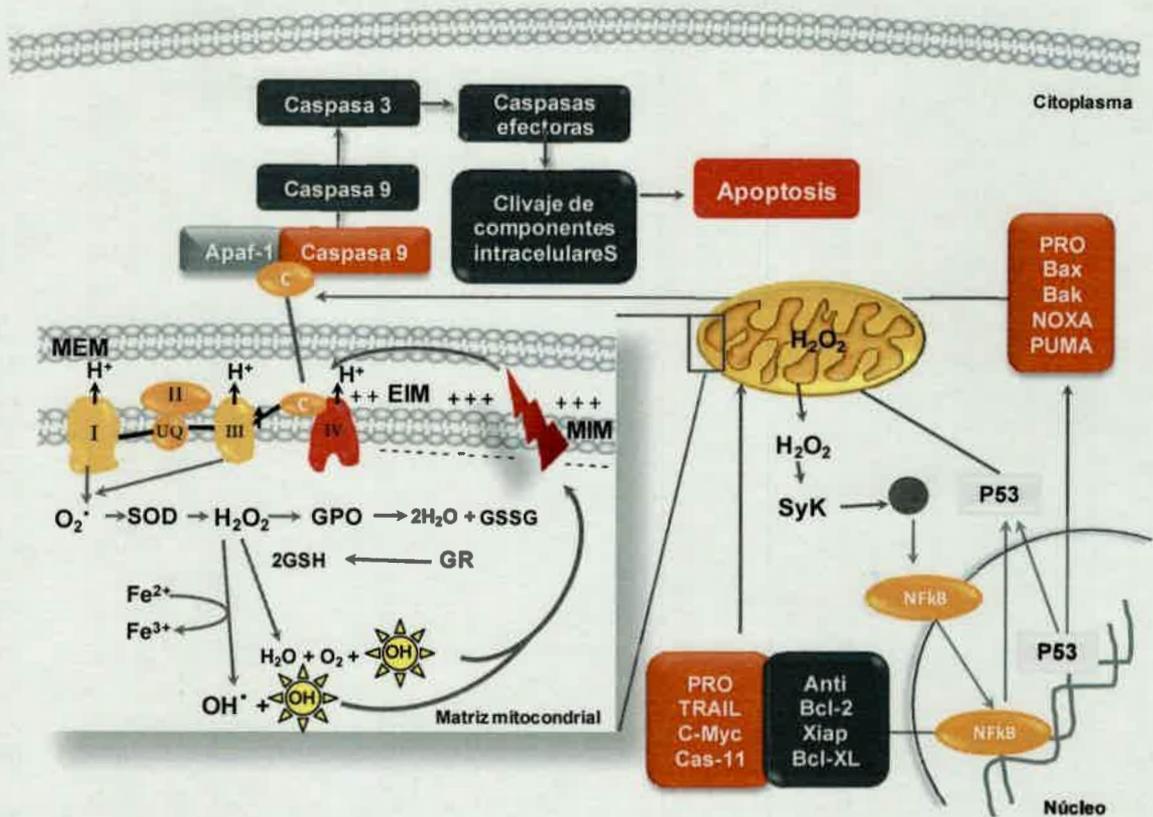
## ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y TFD

La producción de ERO es un mecanismo necesario en múltiples procesos biológicos tales como la señalización celular, el sistema inmune y la contracción muscular [107]. Los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial son los principales generadores de ERO en condiciones fisiológicas, al producirse la oxidación de los sustratos y el transporte de electrones a lo largo de los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones. Algunos de ellos escapan de este sistema provocando la reducción del oxígeno molecular de forma incompleta y dando lugar a la formación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) el cual es liberado a la matriz mitocondrial [108]. Este radical libre puede inducir la producción de nuevas ERO, como el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). Esta molécula, a su vez, en presencia del ion  $Fe^{2+}$  y mediante la reacción de Fenton, puede originar el radical altamente reactivo hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Esta actividad parece estar relacionada con la capacidad de modular el  $\Delta\psi_m$ , porque cuanto mayor sea el valor de la  $\Delta\psi_m$ , mayor es la probabilidad de formación de ERO. Se sabe también que la tasa de producción de ERO es inversamente proporcional a la disponibilidad de ADP intra-mitocondrial [109, 110].

La producción excesiva de ERO induce un estado de daño o estrés oxidativo, lo cual puede inducir la oxidación de los ácidos grasos, proteínas y/o ácidos nucleicos [111]. Frente a este daño oxidativo, la célula dispone de sistemas de defensa antioxidantes con el objetivo de disminuir la concentración de ERO o el daño producido por los mismos. Los sistemas antioxidantes que protegen a la célula pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Entre los primeros se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión-peroxidasa, la peroxirredoxina y la tiorredoxina. Existen varias formas de la SOD: la MnSOD, que se localiza en la matriz mitocondrial, y la Cu,Zn-SOD, que se localiza en el citoplasma celular, catalizando ambas la reacción de dismutación del superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno [112, 113]. La catalasa se localiza preferentemente en los peroxisomas y cataliza la reacción de conversión del peróxido de hidrogeno a agua [114]. La glutatión-peroxidasa se localiza tanto en el citoplasma celular como en la mitocondria, y participa en la reducción del peróxido de hidrogeno y otros peróxidos convirtiendo el glutatión reducido a su forma oxidada [115]. El sistema de las peroxirredoxinas [116] y tiorredoxinas [117] catalizan la reducción de peróxidos, encontrándose en la mitocondria algunos de sus componentes. Entre los sistemas no enzimáticos se agrupan una serie de moléculas que evitan la propagación de las reacciones de los radicales libres, como el glutatión, la vitamina E, la vitamina C, los  $\beta$ -carotenos, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina [118].

La cadena respiratoria (CR) consta de cinco complejos enzimáticos multiproteicos localizados en la membrana mitocondrial interna. Los electrones procedentes de NADH y FADH<sub>2</sub> del ciclo de Krebs y de otras reacciones catalizadas por deshidrogenasas son transferidos al complejo I (NADH - reductasa coenzima Q), el cual transfiere estos electrones a la coenzima Q (CoQ), también llamada ubiquinona. Este complejo tiene una molécula de flavina mono-nucleótido (FMN) como grupo prostético y de seis a siete centros hierro-azufre que participan en la transferencia de electrones. El NADH transfiere dos electrones, y la FMN y la CoQ son capaces de aceptar uno o dos electrones a la vez porque sus formas semiquinona son estables. El complejo II (succinato - coenzima Q reductasa) se compone de cuatro subunidades de proteínas, entre ellas la enzima succinato deshidrogenasa, componente del ciclo de Krebs. En este complejo, los electrones provenientes de FADH<sub>2</sub> son donados a la CoQ desde allí son transferidos al citocromo c a través del Complejo III (coenzima Q-citocromo c reductasa). Este complejo contiene algunas subunidades con centros redox utilizados en la generación de energía y están representadas por citocromo b, un centro de hierro-azufre y citocromo c<sub>1</sub> [119]. El complejo IV (citocromo c oxidasa) transporta los electrones donados por la ferrocitocromo c al oxígeno molecular [120]. La reacción redox del citocromo c y el oxígeno molecular es irreversible, siendo el citocromo c oxidasa una enzima clave en la producción de energía [121]. El complejo V o ATP sintasa es responsable de la síntesis de ATP, está formado por un catalizador soluble que se encuentra en la matriz mitocondrial (F<sub>1</sub>-ATPasa) y un componente de membrana (F<sub>o</sub>-ATPasa), que contiene un canal de protones y es sensible al antibiótico oligomicina [119].

Los complejos I, III y IV, además de participar en la transferencia de electrones, tienen la capacidad de bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranas, formando un gradiente electroquímico. Este gradiente provoca una polarización de la membrana mitocondrial interna, que puede ser revertida por el flujo de estos protones a través de la ATP sintasa (F<sub>o</sub>) sintetizando ATP [119, 122]. ATP sintasa es una enzima funcionalmente reversible que puede catalizar tanto la síntesis y la hidrólisis de ATP [119]. La figura 8 esquematiza la ruta de señalización de apoptosis mediada por estrés oxidativo y la cadena respiratoria mitocondrial con sus respectivos complejos.



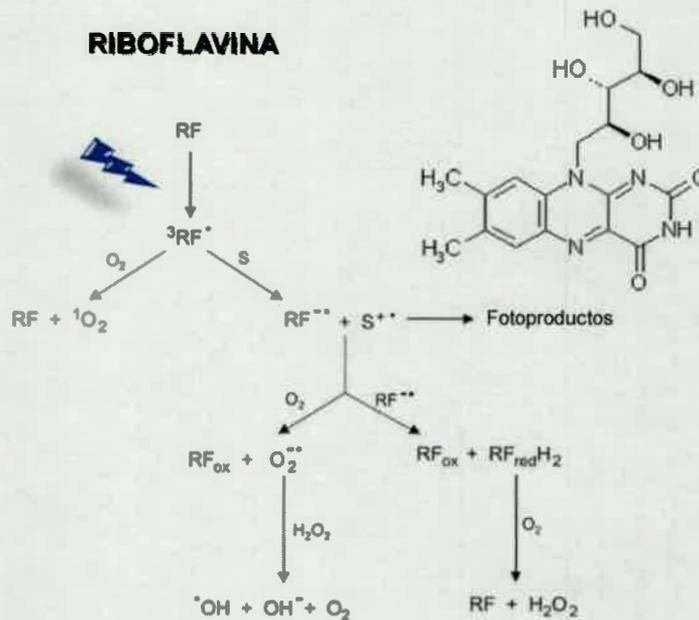
**Figura 8.** Ruta de señalización de apoptosis mediada por estrés oxidativo y mitocondria. Las ERO producidas por la mitocondria puede desencadenar apoptosis por varios mecanismos que pueden involucrar o no la activación de factores de transcripción, capaces de regular la viabilidad celular a través de la expresión de genes tanto pro como anti-apoptóticos. Sea cual sea la vía, el citocromo c sale de la membrana externa mitocondrial y forma el apoptosoma junto con la procaspasas-9 y el Apaf-1, finalmente la apoptosis es desencadenada y ejecutada por caspasas efectoras. Adaptado de Parone *et al.* [123] y Fleury *et al.* [124].

## PLANTEO DEL PROBLEMA

La búsqueda de un compuesto fotosensible ideal para ser empleado en la TFD es un tema de gran interés para numerosos grupos de investigadores [23, 125]. En la actualidad, los FS empleados en la clínica tienen el inconveniente de ser compuestos muy costosos limitando así el acceso de esta terapia a un número selecto de pacientes. Con el objeto de aportar alguna solución a esta problemática, nos hemos propuesto obtener un FS de bajo costo que pueda ser utilizado en el tratamiento fotodinámico.

La riboflavina (RF), es un compuesto hidrosoluble perteneciente al complejo vitamínico B2, químicamente denominado 6,7-dimetil-9-D-1-ribitil isoaloxazina. Este compuesto juega un importante papel biológico como sensibilizador fotoquímico, ya que participa en numerosas

reacciones de óxido-reducción de una amplia gama de sustratos [126, 127]. Es un constituyente natural de los organismos vivos, y existe en dos formas de co-enzimas flavinadenina dinucleótido (FAD) y flavinadenina mononucleótido (FMN) que son usadas en reacciones metabólicas redox por diferentes sistemas enzimáticos.

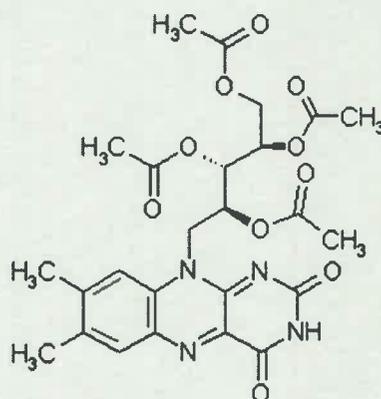


**Figura 9.** Estructura química de la RF y esquema representativo de los mecanismos tipo I y tipo II de RF irradiada en presencia de oxígeno molecular, siendo S un blanco de RF irradiada.

Cuando la RF es fotoactivada por la radiación visible, alcanza un estado triplete excitado, desde el cual puede interactuar directamente con un sustrato para generar intermedios radicales y ERO tales como: anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (mecanismo tipo I). Además, este compuesto fotoactivado puede transferir energía al oxígeno molecular, generando así oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) por un mecanismo diferente (mecanismo tipo II) [127-129] (Figura 9). Este último desempeña un papel importante en la citotoxicidad generada por la TFD [130], ya que el  $^1\text{O}_2$  es una especie altamente reactiva. La RF, además de ser una vitamina esencial, ha sido descrita por su propiedad fotosensible en la TFD como un eficiente inductor de varios procesos celulares tales como la producción de ERO y la muerte de células tumorales [131-136].

Sin embargo, debido al perfil hidrosoluble de la RF, su incorporación en diversos tejidos es baja, por lo tanto, muchos estudios han utilizado ésteres derivados de RF porque poseen mayor hidrofobicidad aumentando su afinidad e incorporación por las células y tejidos

mejorando su penetración [137, 138]. En particular, la riboflavina 2', 3', 4', 5'-tetraacetato (RFTA) conserva las propiedades fotosensibilizantes de RF [139], además la modificación de la cadena de ribosa de la molécula de RF puede cambiar el rendimiento y la vida media de su estado triplete excitado resultando ser una molécula más estable [140]. En la figura 10 presenta la estructura química de este compuesto. Sin embargo, este compuesto todavía no ha sido empleado en TFD. Ambos compuestos presentan espectros de absorción similares, los cuales se encuentran en el rango de 325 a 446 nm de  $\lambda$  [141], por lo tanto, RF y RFTA podrían utilizarse en el tratamiento fotodinámico de lesiones epidérmicas superficiales. El presente estudio se centra en determinar la capacidad de RFTA para promover una mayor captación celular proporcionando una significativa actividad fotoquímica, por lo cual nos hemos propuesto sintetizar dicho compuesto ya que los grupos acetilos aumentarían su capacidad de atravesar las membranas celulares y acumularse en las células.



**Figura 10.** Estructura química de la RFTA, FS que será empleado en TFD, en los diferentes modelos experimentales.

Otro gran inconveniente en la actualidad para la aplicación de la TFD es el costo de las fuentes lumínicas utilizadas para la activación de los FS. Por este motivo se planteó desarrollar una fuente de luz con las longitudes de onda específicas para activar RF y RFTA la cual es de 446 nm. A pesar de que la penetración de la luz en el tejido es baja, existen numerosas patologías superficiales de piel como carcinoma *in situ* de células escamosas y enfermedades psoriasiformes que podrían ser tratadas beneficiosamente con TFD mediada por RFTA empleando luz de 446 nm. Además, es de importancia que en esta terapia se desencadene la muerte celular por un proceso programado, evitando una respuesta inflamatoria en el tejido circundante causada por componentes citosólicos vertidos al espacio intercelular a través de las membranas plasmáticas dañadas de las células necróticas [142].

## **HIPÓTESIS**

La RF y RFTA, compuestos fotosensibles, al ser activados con luz visible de 446nm generan en el interior de las células tumorales, una cadena de reacciones químicas que producen ERO. Estos compuestos producen daño oxidativo causando efectos citotóxicos culminando con la muerte de las células.

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la riboflavina y su éster derivado tetraacetato de riboflavina pueden ser efectivos en el tratamiento fotodinámico de patologías epidérmicas hiperplásicas y neoplásicas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1) Modificar la molécula de riboflavina confiriéndole carácter lipofílico sin que pierda las características fotosensibles.

2) Evaluar el efecto citotóxico de la Terapia Fotodinámica mediado por riboflavina y tetraacetato de riboflavina sobre la viabilidad y proliferación de células epiteliales.

3) Caracterizar los tipos de muerte celular inducidos por Terapia Fotodinámica con riboflavina y tetraacetato de riboflavina, identificando los mecanismos celulares y moleculares implicados.

4) Establecer el tipo de especies reactivas de oxígeno predominante generado por la activación lumínica de riboflavina y tetraacetato de riboflavina.

5) Inducir hiperplasia e hipertrofia farmacológica en epidermis de ratones para revertirla mediante la aplicación del tratamiento fotodinámico con riboflavina y tetraacetato de riboflavina.

6) Evaluar el efecto de la Terapia Fotodinámica con riboflavina y tetraacetato de riboflavina sobre la proliferación en queratinocitos hiperplásicos y neoplásicos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 FOTSENSIBILIZADORES

Los FS utilizados en este estudio fueron riboflavina ( $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y un éster derivado de RF, riboflavina 2', 3', 4', 5'- tetraacetato ( $C_{25}H_{28}N_4O_{10}$ ). La obtención de RFTA se realizó por medio de una reacción de acetilación descrita previamente [139] según modificaciones de la metodología propuesta por Ogasawara *et. al.* [143].

Se añadieron 0,5 g de RF a 100 ml de una solución de anhídrido acético [ $(CH_3CO)_2O$ ] y ácido acético glacial [ $C_2H_4O_2$ ] 1:1. Luego se adicionó gota a gota 1 ml de  $HClO_4$ . La mezcla se mantuvo a 40 °C durante 2 h. La reacción se enfrió a 0°C añadiéndole 10 ml de agua fría en baño de hielo y se realizaron 3 extracciones con 25 ml de  $CHCl_3$  cada una. La fase orgánica se lavó 4 veces con 25 ml de agua fría seguido de 25 ml de una solución saturada de NaCl. El disolvente se evaporó en estufa de 60°C. Tanto el producto como la RF se caracterizaron por espectrofotometría UV-Visible entre 300 nm y 700 nm con una resolución de 1 nm en solución con agua destilada o cloroformo respectivamente, y en medio de cultivo completo a una concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M, pH 7.4.

En estudios en los cuales se emplean FS es de importancia determinar su fotoestabilidad ya que la exposición del FS a la luz puede cambiar sus propiedades de absorción y fluorescencia, lo que indica fotodegradación y/o formación de fotoproductos que resulta en una disminución de la fotoestabilidad [144]. Tales cambios pueden ser evidenciados por la aparición de nuevas bandas en el espectro de absorción específico del FS [145]. La degradación puede ser monitoreada por el cambio o la disminución del pico máximo de absorción del FS. Por este motivo nos propusimos estudiar la fotoestabilidad de RF ( $5 \times 10^{-5}$ ) y de RFTA ( $1,7 \times 10^{-5}$  M), irradiando las solución de dichos compuestos con diferentes densidades de energía (4,5, 9 y 18  $J/cm^2$ ) realizando un espectro UV-visible posterior a cada irradiación.

## 2.2 FUENTE LUMÍNICA

Para realizar el presente trabajo se utilizó una fuente de luz desarrollada en el Departamento de Bioingeniería del Centro de Microscopia Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. La misma cuenta con 96 emisores LEDs (*Light-Emitting Diode*) de alta potencia (1 w) con una longitud de onda de 446 nm, con una superficie de irradiación de 96  $cm^2$  (8 x 12 cm). La intensidad de irradiación de la lámpara a

5cm de distancia es de  $45 \text{ mW/cm}^2$ . Para corroborar el pico de emisión de la misma se realizó un espectro de emisión entre 400 y 500 nm con una resolución de 2 nm. La figura 11 muestra fotografías de la lámpara descrita.



**Figura 11.** Fotografías de la fuente de luz desarrollada con emisores LEDs de alta potencia,  $\lambda$  446 nm.

## 2.3 CULTIVOS CELULARES

### 2.3.1 Cultivo de células humanas normales y tumorales

En el presente trabajo se utilizaron células humanas de la línea celular SCC-13; procedente de carcinoma escamoso facial y la línea celular HaCat de queratinocitos normales. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM alta glucosa (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), 1% de glutamina, penicilina 100 unidades/ml y streptomina 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y 1% de piruvato de sodio 100mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Los cultivos celulares fueron mantenidos a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire.

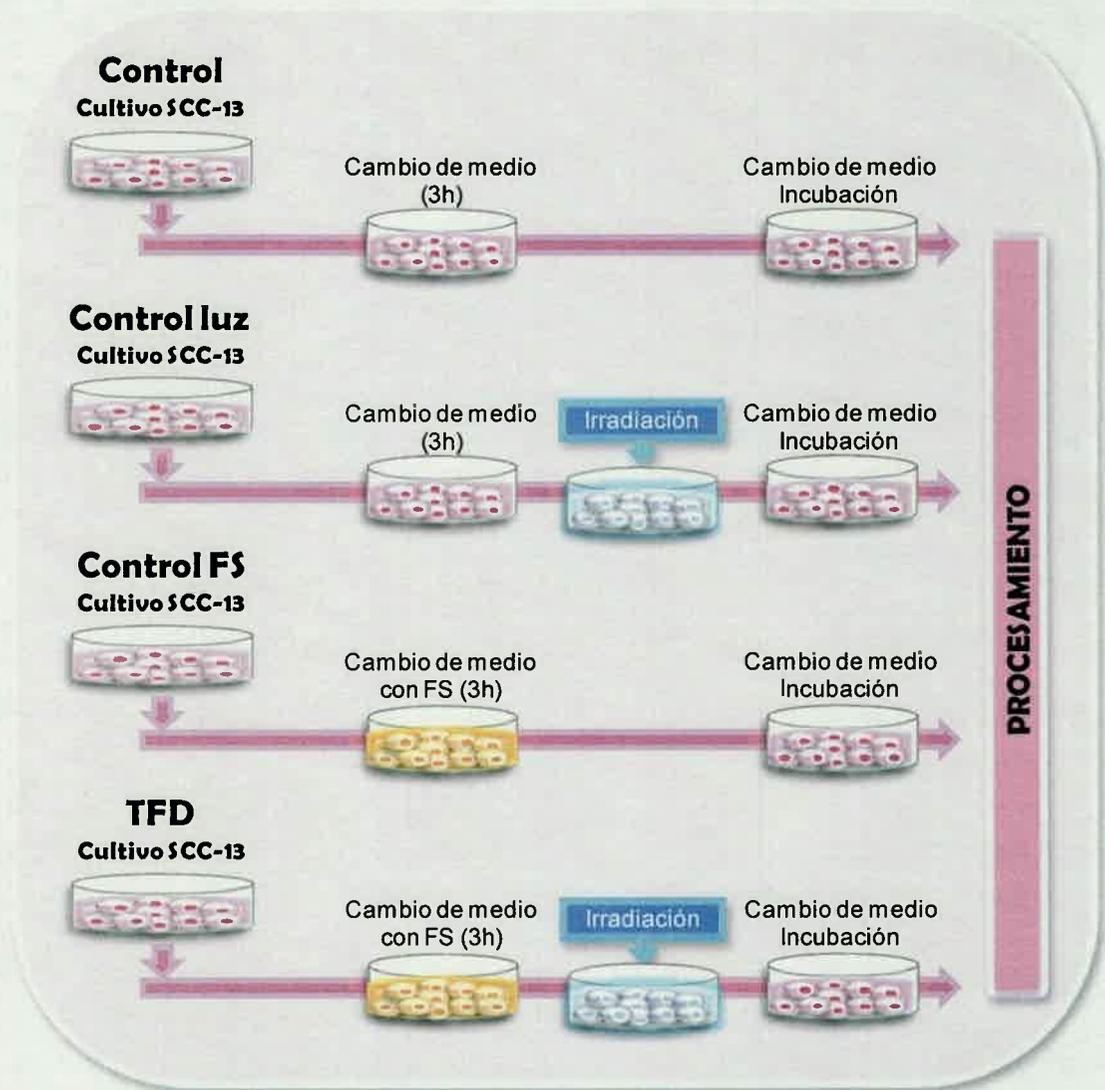
Las células se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^4$  células por pozo en placas de 96 pozos,  $2 \times 10^5$  células por pozo en placas de 6 pozos y  $5 \times 10^4$  células en placas de 24 pozos sobre el mismo plástico o sobre cubreobjetos para técnicas de inmunodetección 24 h antes de su utilización en los distintos protocolos.

### 2.3.2 Terapia fotodinámica en cultivo de células SCC-13

Con el objetivo de determinar la dosis de FS no tóxica en oscuridad sobre células SCC-13, las mismas fueron incubadas con RF o RFTA a diferentes concentraciones (25, 50, 100,

150 o 200  $\mu\text{M}$ ) por 3 h, y posteriormente se realizó el cambio de medio de cultivo e incubación por 24 h.

Para evaluar el efecto sobre la viabilidad celular de los diferentes FS activados con la lámpara en estudio, las células fueron incubadas con los FS durante 3 h e irradiadas a diferentes densidades de energía (4,5, 9, 18 o 27  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Se designaron células *control* a las células que fueron mantenidas en DMEM sin FS y sin irradiación, *control luz* células que fueron irradiadas en ausencia de FS, *control FS* células incubadas con RF o RFTA sin irradiación, y *TFD* a las células incubadas con FS (RF o RFTA) e irradiadas. La figura 12 esquematiza los diseños experimentales descriptos.



**Figura 12.** Esquema de los diferentes diseños experimentales llevados a cabo *in vitro* con células SCC-13.

Una vez finalizados los cultivos celulares, las células tumorales fueron incubadas y procesadas de acuerdo a cada técnica realizada.

### **2.3.3 Análisis del efecto de la TFD sobre la viabilidad y la proliferación celular**

#### **2.3.3.1 Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo de captación del rojo neutro**

Esta técnica de evaluación de citotoxicidad se basa en la inclusión por los endosomas y lisosomas de las células viables de rojo neutro, un colorante supravital, no tóxico. Cambios en la acumulación y retención de dicho colorante implican un daño en las membranas celulares o la muerte de las células ya que no tienen la capacidad de retener dicho colorante en su interior [146]. Para llevar a cabo esta técnica las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos durante 24 h, hasta una confluencia de 70-80%. Luego de realizar los distintos tratamientos, se reemplazó el medio de cada pozo por 100  $\mu$ l de medio con rojo neutro (40  $\mu$ g/ml) y se incubaron durante 2 h. Posteriormente, luego de descartar dicho medio, se realizaron 3 lavados con PBS y se les adicionó solución decolorante (etanol 96%, agua desionizada y ácido acético glacial). Por último se efectuó la determinación analítica en un lector de microplacas equipado con un filtro de 540 nm para medir la absorbancia del colorante extraído de las células. En todos los casos se emplearon 4 pozos como mínimo por tratamiento y se realizaron al menos cuatro ensayos diferentes por tratamiento.

#### **2.3.3.2 Cuantificación de viabilidad celular por ensayo de reducción del MTT**

El MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), compuesto hidrofílico de color amarillo, a formazán, un compuesto azul hidrofóbico. Este proceso es realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. Dicha capacidad de las células de reducir al MTT después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. Por lo cual, para llevar a cabo esta técnica las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos durante 24 h, hasta una confluencia de 70-80%. Luego de realizar los distintos tratamientos, se reemplazó el medio por 100  $\mu$ l MTT (0,1 mg/ml de HBSS) y se incubaron durante 2 h a 37°C. Posteriormente se descartó dicho medio y se adicionó 100  $\mu$ l/pozo de DMSO para disolver los cristales de

formazán. Por último se efectuó la determinación analítica en un lector de microplacas equipado con un filtro de 540 nm para medir la absorbancia. En todos los casos se emplearon 4 pozos como mínimo por tratamiento y se realizaron al menos tres ensayos diferentes por tratamiento.

### 2.3.3.3 Ensayo de la incorporación de bromodeoxiuridina

Para evaluar el efecto de la TFD sobre la proliferación celular se analizó la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) mediante inmunocitoquímica. Células SCC-13, adheridas a cubreobjetos de vidrios de 12 mm y tratadas de acuerdo a cada diseño experimental, se incubaron con BrdU (3 mg/ml) durante 3 h antes de finalizar los protocolos. Posteriormente las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS por 30 min a temperatura ambiente, luego se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% por 10 min. Luego, para bloquear la inmunoreactividad no específica las células fueron incubadas con PBS-BSA al 5% por 30 min a temperatura ambiente, y a continuación con un anticuerpo monoclonal contra BrdU (Amersham; Buckinghamshire, England) toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron las células con un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de ratón (GE Healthcare; Buenos Aires, Argentina) diluido 1/130, durante 1 h a 37°C. Finalmente se realizó la incubación con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC; Vector; Burlingame, USA) durante 30 min a temperatura ambiente. La peroxidasa unida específicamente se visualizó con una solución conteniendo diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0,05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05% en PBS. Después de lavar con agua destilada se realizó la contracoloración con hematoxilina y el montaje de los vidrios con glicerol. A fin de establecer el porcentaje de células BrdU positivas se contaron con microscopio óptico un total de 3.000 células en campos elegidos al azar en 3 cubreobjetos para cada grupo. Los experimentos se realizaron por triplicado, al menos tres réplicas por cada ensayo.

### 2.3.3.4 Análisis del Ciclo Celular

Para realizar el análisis de las diferentes fases del ciclo, células SCC-13 fueron desprendidas empleando la solución TrypLE™ Express (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) y fijadas en etanol/PBS (70% v/v). Posteriormente se realizó la centrifugación de las muestras (400 x g durante 5 min) y los *pellets* celulares se lavaron en solución de citrato tamponada con

fosfato pH 7,8. Finalmente, las células se incubaron con RNasa (ribonucleasa A 0,7 mM; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 37°C durante 30 min, y se tiñeron con yoduro de propidio (75  $\mu$ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) durante 1 h. La intensidad de fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo utilizando BD FACS Canto II y el análisis del ciclo celular del contenido de ADN se realizó mediante el programa ModFit LT (Verity Software, Verity Software House, Topsham, ME, USA).

### **2.3.4 Caracterización morfológica y bioquímica de la muerte celular**

#### **2.3.4.1 Estudio de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia**

Con el objetivo de analizar y comparar la morfología nuclear de las células SCC-13 luego de los diferentes tratamientos se empleó la técnica de tinción nuclear con Hoechst 33258. Para ello 6, 12, 24 o 48 h posteriores a la finalización de los tratamientos las células adheridas a los cubreobjetos de vidrios de 12 mm fueron fijadas con formol/PBS (3,7% v/v) por 30 min. Luego de la fijación se añadió tritón al 0,1% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Posterior a sucesivos lavados con PBS se realizó la tinción nuclear con Hoechst 33258 durante 10 min y el montaje con fluoromount. La fluorescencia se visualizó utilizando un microscopio Zeiss Axiovert 135. Las células en las diferentes fases de mitosis fueron determinadas mediante la formación y distribución de los cromosomas mientras que las células apoptóticas fueron caracterizadas por la condensación de la cromatina, marginación en la membrana nuclear y la fragmentación formando en algunos casos cuerpos apoptóticos.

#### **2.3.4.2 Estudio morfológico ultraestructural**

##### **Microscopía óptica de alta resolución y electrónica de trasmisión**

En el presente trabajo de tesis, las muestras de células SCC-13 fueron fijadas en solución de Karnovsky (formaldehído 4% y glutaraldehído 2% en solución buffer de cacodilato pH 7,4) [147]. El glutaraldehído fue previamente purificado por destilación y el formaldehído preparado por despolimerización de paraformaldehído en solución acuosa a 80 °C con ligera alcalinización.

Posteriormente los *pellets* fueron lavados con buffer cacodilato y se post-fijaron con una solución de tetróxido de osmio al 1% en buffer cacodilato pH 7,4. A continuación las muestras fueron lavadas con buffer cacodilato y deshidratadas con soluciones de acetona

(Merck, Argentina) de concentraciones de graduación crecientes (50%, 70%, 90% y 100%) para ser incluidas en resinas epoxi hidrofóbicas con la siguiente composición:

- Araldita 506 (48,5%)
- Anhídrido dodecenilsuccínico (48,5%)
- Dibutilftalato (0,5%)
- Acelerador dimetilaminobenceno (2,5%)

La polimerización de la resina se llevó a cabo en estufa durante 24 h a 60°C. La morfología celular se evaluó en primera instancia mediante microscopía óptica de alta resolución (MOAR). Para ello, se obtuvieron cortes semifinos (500 nm de espesor) con ultramicrotomo Jeol JUM-7 provisto de cuchilla de diamante. Éstas secciones fueron coloreadas con azul de toluidina (ATO 1% en bórax al 1%) y observadas con microscopio fotónico.

Para los estudios por microscopía electrónica de trasmisión (MET) se realizaron cortes finos (100 nm de espesor), los cuales fueron montados en grillas de níquel, contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo y posteriormente observados y fotografiados en un microscopio electrónico Siemens 101 A o Zeiss LEO906E.

#### 2.3.4.3 Detección *in situ* de DNA fragmentado

La cuantificación de apoptosis se realizó por el método de detección *in situ* de DNA fragmentado o técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling), la cual se basa en la detección de cortes del ADN a nivel internucleosomal que ocurren en las etapas iniciales de la apoptosis, marcando los extremos 3'-OH libre terminal con nucleótidos modificados (biotina-dUTP, DIG-dUTP, fluoresceína dUTP) mediante una reacción enzimática [148]. La enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos en el extremo 3' del ADN.

Las células SCC-13 adheridas a los cubreobjetos se fijaron con formaldehído al 4%, se lavaron con PBS y se permeabilizaron tritón 0,05% en PBS. Posteriormente, se realizó el ensayo utilizando un kit comercial (*In Situ* Cell Death Kit de detección, POD; Roche) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, las células se incubaron con la "mezcla de reacción TUNEL" que contiene TdT y dUTP-fluoresceína. Después del lavado, el marcador incorporado en los sitios dañados del ADN, se reveló con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con la enzima peroxidasa. Después de lavar para eliminar el conjugado excedente, el complejo inmune se visualizó mediante una reacción con peróxido de

hidrógeno-diaminobenzidina. Se realizó una contracoloración con hematoxilina a fin de determinar con mayor certeza las células positivas. Los cubreobjetos se montaron con glicerol para su observación al microscopio fotónico y se realizó el recuento de un total de 3.000 células en campos elegidos al azar en 3 vidrios para cada grupo, a fin de establecer el porcentaje de células TUNEL positivas. Los experimentos se repitieron tres veces. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital compacta Axiocam ERc5s Zeiss.

#### 2.3.4.4 Detección de la externalización de fosfatidilserina

La detección de apoptosis se realizó por doble marcación con anexina V unido a ficoeritrina (anexina V/PE) y 7-aminoactinomicina D (7AAD) mediante citometría de flujo. La anexina V se une específicamente al fosfolípido: fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. La redistribución de la fosfatidilserina en la membrana plasmática es una característica muy estudiada en células apoptóticas [149]. 7AAD permite determinar la integridad de la membrana plasmática la cual se pierde en el proceso apoptótico tardío o en células necróticas. Desde un punto de vista metodológico células adheridas a placas de cultivos fueron recogidas empleando la solución TrypLE™ Express (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de realizar los diferentes tratamientos  $3 \times 10^5$  células fueron resuspendidas en 50  $\mu$ l de HEPES y luego incubadas con 3  $\mu$ l de Anexina V-PE por 30 min a temperatura ambiente. 7AAD fue añadido inmediatamente antes del análisis citométrico. La fracción de células apoptóticas fue cuantificada en un citómetro de flujo y se utilizó el software Lysis II para la adquisición de datos y el análisis de los mismos se realizó con el software FlowJo.

#### 2.3.4.5 Estudio de proteínas involucradas en apoptosis y vías de señalización mediante Western Blot

Para estudiar la expresión de diferentes proteínas se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior inmunodetección por Western Blot. Las células SCC-13 cultivadas en placas de 6 pozos fueron lisadas utilizando un *scraper* con la siguiente solución: SDS (4%), EDTA (2 mM) y Tris (50 mM) en agua miliQ, pH 6,8. Los lisados fueron calentados durante 5 min a 100°C y centrifugados (10000 x g a 4°C durante 10 min) para eliminar los desechos celulares. Posteriormente, se congelaron las muestras por 2 h a -20°C, y luego de descongelarlas a 60°C se procedió a centrifugarlas nuevamente a fin de descartar la posible

presencia de fragmentos de ADN. Se retiró una alícuota de sobrenadante de cada muestra y se le agregó buffer de muestra (40% de glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) en la proporción 25:100 (v/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol (concentración final 8%). El contenido de proteína se estimó por el método colorimétrico de Lowry [150], modificado por Peterson [151].

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS):

Para realizar la electroforesis se sembró la misma cantidad de proteínas (50ug por calle) para cada muestra en geles de SDS-PAGE al 10%. Para determinar el peso molecular de las diferentes proteínas de interés, en el mismo gel se corrió en paralelo una gama completa de proteínas de peso molecular conocido. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante de 150 mV y amperaje de 15 mA durante 2 h. Posteriormente se realizaron las transferencias a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare Life Science, NJ, USA) utilizando un aparato de transferencia semi-dry con amperaje constante de 1,2 mA/cm<sup>2</sup> durante 1,5 h. Para verificar la eficiencia de la transferencia, los geles se tiñeron con azul de Coomassie y las membranas con solución de Ponceau.

#### Inmunodetección:

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con 5% de albúmina bovina (BSA) en solución salina tamponada con Tris (TBS) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Las proteínas de interés se detectaron después de la incubación durante toda la noche con anticuerpos específicos diluidos en TBS con Tween (TBS-T) + 2% de BSA en las siguientes diluciones:

anti-Bax, anti-Bcl-2 (Biolegend, San Diego, CA, USA) y anti-caspasa-3 (Santa Cruz, Biotechnology, USA), 1: 1.000.

anti-fosfo p38<sup>MAPK</sup> (Millipore, Billerica, MA, USA) y total- p38<sup>MAPK</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1: 10.000.

anti-phospho-ERK 1/2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1: 2.000.

anti-Total-ERK 1/2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1: 40.000.

Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón (Millipore, Billerica, MA, USA) conjugados con peroxidasa (HRP) para la detección de la forma total o de los sitios fosforilados de las diferentes proteínas.

El revelado se realizó por sistema de quimioluminiscencia LumiGLO (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). La luz emitida fue capturada en placas fotográficas. Todas las etapas de bloqueo y de incubación fueron seguidas por tres lavados (5 min) con TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Tween-20, pH 7,5).

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo contra  $\beta$ -actina (Santa Cruz, CA, USA), en una dilución de 1: 2000 para verificar que se sembraron las mismas cantidades de proteínas para cada muestra en el gel. El nivel de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> y ERK 1/2 se determinó como una relación de la densidad óptica (DO) de la banda fosforilada/la DO de la banda total. El nivel de proteínas se determinó como una relación de la DO de la banda de proteína/DO de la banda de  $\beta$ -actina. Las bandas se cuantificaron utilizando el software Scion Image®, NIH Image (Frederick, MD, USA.). El anticuerpo contra ERK 1/2 detectó dos bandas, una de 44 kDa y otra de 42 kDa, que corresponden respectivamente a las dos isoformas de ERK, ERK1 y ERK2. Anti-p38MAPK detectó una sola banda de 38 kDa. Anti-Bax detectó una sola banda de 21 kDa. Anti-Bcl-2 detecta una sola banda de 28 kDa. Anti-caspasa-3 detecta una sola banda de 32 kDa. El anticuerpo anti- $\beta$ -actina detectó una sola banda de 45 kDa.

### **2.3.5 Estudio de producción de ERO y daño oxidativo generadas por la TFD**

#### **2.3.5.1 Detección de la generación de oxígeno singlete**

La capacidad de generar oxígeno singlete de RF y RFTA se analizó utilizando como sondas 3-hidroxipiridina (3-OHP) y 9, 10-dimetilantraceno (DMA), respectivamente. Posteriormente se irradiaron dos soluciones: (1) RF ( $3,4 \times 10^{-5}$  M)/3-OHP ( $3,7 \times 10^{-4}$  M) y (2) RFTA ( $1,7 \times 10^{-5}$  M)/DMA ( $7,75 \times 10^{-5}$  M). Mediante espectrofotometría se midió la disminución de la absorbancia de la reacción cada minuto para 3-OHP en un máximo de absorbancia de 313 nm y cada 2 seg para DMA, en un máximo de absorbancia de 379 nm.

#### **2.3.5.2 Detección de ERO intracelular**

La producción de ERO intracelular se detectó utilizando el compuesto fluorescente diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA). El mismo es hidrolizado por las esterasas intracelulares a una molécula no fluorescente, la cual puede oxidarse a diclorofluoresceína (DCF) por la acción de ERO. La intensidad de fluorescencia fue detectada por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo.

Para evaluar si la terapia fotodinámica genera ERO las células SCC-13 se cultivaron en placas de 6 pozos a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  células/pozo. Se adicionó al medio de cultivo  $50 \mu\text{M}$  de RF o RFTA, y luego de 2 h de incubación las células fueron expuestas al derivado clorometilo de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ,  $2,7 \mu\text{M}$ ) durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  en oscuridad. Posteriormente las células fueron irradiadas con diferentes dosis (4,5, 9 o  $18 \text{ J/cm}^2$ ). Después de la incubación por 0,5, 1 o 2 h, se evaluó la fluorescencia emitida por la sonda. La intensidad de fluorescencia fue detectada utilizando un microscopio de fluorescencia en células crecidas sobre cubreobjetos, o fue cuantificada en citómetro de flujo FaCScan (Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ). Para esto, células tratadas en placas de 6 pozos fueron levantadas con TrypLE Express™ (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) antes de su análisis. La intensidad de fluorescencia media (IFM) se utilizó como índice del nivel de ERO intracelular producido por los diferentes tratamientos.

#### 2.3.5.3 Detección de producción de anión superóxido

La producción de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) citoplasmático se determinó mediante el uso de colorante fluorescente dihidroetidio (DHE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Este ensayo se basa en la reducción de etidio por el anión superóxido a un compuesto fluorescente [152]. Después de 6 o 12 h de finalizado los diferentes tratamientos, las células se incubaron con  $10 \mu\text{M}$  de DHE en HBSS durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con HBSS por 5 min y la intensidad de fluorescencia de DHE en placas de 24 pozos se midió con una longitud de onda de excitación a 488 nm y de emisión a 585 nm, usando un lector fluorométrico de microplacas TECAN Genios Microplate Reader (Tecan Group Ltd., Grödig, Austria).

#### 2.3.5.4 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ )

La generación de ERO por parte de la mitocondria se encuentra íntimamente relacionada con el potencial de la membrana mitocondrial [153]. Al aumentar dicho potencial, se produce un enlentecimiento del flujo electrónico a través de la cadena de transporte de electrones, lo que favorece las reducciones incompletas del oxígeno y la formación de ERO. En este contexto, se propuso evaluar el  $\Delta\Psi\text{m}$  en células SCC-13 sometidas a la TFD mediante fluorimetría y microscopía de fluorescencia utilizando un colorante catiónico lipofílico de carbocianina: JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide). Dicho compuesto puede ingresar selectivamente en las mitocondrias y a bajo

potencial de membrana dentro de las mismas se presenta como un monómero que tiene emisión de fluorescencia a  $\sim 525$  nm, mientras que en mitocondrias polarizadas forma agregados sobre la membrana con un máximo de emisión de fluorescencia a  $\sim 590$  nm [154]. La proporción de ambas fluorescencias de JC-1 es dependiente sólo del potencial de membrana, y no está influenciada por el tamaño, forma o densidad mitocondrial. Estas características hacen de JC-1 un marcador sensible para el  $\Delta\Psi_m$ .

Para llevar a cabo este ensayo después de 6 o 12 h de finalizado los diferentes tratamientos, las células se incubaron con 5  $\mu$ M de JC-1 en HBSS durante 20 min a 37 °C en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con HBSS y la intensidad de fluorescencia de JC-1 en placas de 24 pozos se midió con excitación a 550 y 485 nm y emisión a 600 y 535 nm respectivamente, usando un lector fluorométrico de microplacas TECAN Genios Microplate Reader (Tecan Group Ltd., Grödig, Austria).

### 2.3.5.5 Detección de grupos SH no proteicos

El glutatión es un antioxidante endógeno que se encuentra en estado reducido (GSH) u oxidado en proporción 9:1 en células sanas [155]. En el estado reducido, el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un equivalente de reducción a otras moléculas inestables, como las ERO. En esta etapa el GSH se convierte en reactivo, y reacciona rápidamente con otro glutatión en el mismo estado para formar disulfuro de glutatión (GSSG), el cual se regenera por la enzima glutatión reductasa. Un aumento en la proporción entre GSSG/GSH se considera un indicativo de estrés oxidativo.

El contenido de GSH se midió como tioles no proteicos (NPSH) de acuerdo con un método previamente descrito [156], para lo cual, 3 o 14 h posteriores a los tratamientos correspondientes se realizó un lavado con PBS 37°C y luego se le adicionó a cada pozo PBS-Tritón 0,5% para la obtención de los homogenatos celulares totales. El contenido de cada pozo fue trasvasado a un ependorf con la adición al medio de ácido tricloroacético (TCA) al 10% en frío; posteriormente se centrifugaron las muestras (5000 x g) a 4°C durante 10 min, el sedimento de proteína se desechó y los grupos tioles libres se determinaron en el sobrenadante, para ello se tomaron 100  $\mu$ l de cada muestra y se sembraron en placas de 96 pozo por duplicado. Posteriormente se adicionaron 75  $\mu$ l de TFK 1 M pH 7 para neutralizar la reacción y 25  $\mu$ l de ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), el cual reacciona con los grupos SH convirtiéndose en TNB. El desarrollo del color resultante de la reacción entre el DTNB y los grupos tioles alcanza un máximo en 5 min y es estable durante 30 min. Por lo

cual en ese lapso de tiempo se leyó la absorbancia en 412 nm en un lector de microplacas TECAN Genios Microplate Reader (Tecan Group Ltd., Grödig, Austria), utilizando una curva de GSH como estándar. Los valores se expresan como porcentaje de control en ausencia de tratamiento de  $\mu\text{mol NPSH/mg proteína}$ .

### 2.3.5.6 Determinación de contenido de grupos carbonilos en proteínas

El daño oxidativo a proteínas fue evaluado por la determinación del contenido de grupos carbonilos (CCP), basada en la reacción con di-nitro-fenil-hidrazina (DNFH) [157]. Lisados de células SCC-13 fueron obtenidos de placas de 6 pozos luego de realizar los tratamientos. Las muestras fueron centrifugadas a  $22.000 \times g$  por 20 min y divididas en tres tubos previo a la toma de una alícuota para la cuantificación de proteínas totales, la cual fue realizada por el método mini-Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A cada tubo se le adicionaron  $200 \mu\text{l}$  de TCA (20%); luego de agitarlos se los dejó en reposo en hielo durante 5 min. Se centrifugaron las muestras durante 5 min a  $16.000 \times g$  y el precipitado fue resuspendido en  $100 \mu\text{l}$  de NaOH 0,2 M. Posteriormente a cada muestra se le adicionó DNFH ( $4 \mu\text{mol}$ ) en HCl (2 M) o HCl (2 M) en los tubos blanco, posteriormente fueron incubados en oscuridad por 1 h. Las muestras fueron precipitadas con un volumen de TCA (20%) y centrifugadas por 5 min a  $16.000 \times g$ . El precipitado de cada muestra fue lavado tres veces con etanol:etil acetato (1:1 v/v) y re-disuelto en 1 ml de urea (8 M). Posteriormente, los tubos fueron incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 5 min para asegurar la completa disolución del precipitado, la densidad óptica de las muestras fueron determinadas con un espectrofotómetro a 280 nm. La diferencia entre la DNFH y el HCl fue usada para calcular los CCP. Los resultados fueron calculados como nmol de grupos carbonilos/mg de proteína, usando en coeficiente de  $22.000 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para hidrazonas alifáticas.

### 2.3.5.7 Respirimetría de alta resolución

El análisis de la respiración mitocondrial en células SCC-13 fue realizado a  $37^\circ\text{C}$  en un oxígrafo de alta resolución (2k-Oxygraph Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). La calibración diaria del equipo se llevó a cabo con medio DMEM sin SFB. Las células se insertaron en la cámara a una concentración de  $250.000 \text{ células/ml}$  en DMEM sin FBS. En primer lugar, se procedió a la estabilización del consumo de oxígeno, para determinar la respiración basal, sin la adición de sustratos o inhibidores de la respiración, durante 25-30

min. Después de este período, se observaron los siguientes parámetros de la respiración mitocondrial:

**1) Respiración Basal:** Medido por el consumo de oxígeno, sin la adición de sustratos o inhibidores.

**2) Producción de ATP estado IV de la respiración mitocondrial:** Este estado representa el consumo de oxígeno causado por la transferencia de electrones a través de la CR. En este estado al no haber síntesis de ATP, se evaluó el consumo de oxígeno (aproximadamente durante 4 min) después de añadir 1  $\mu$ l de oligomicina (4 mg/ml) en el medio, ya que la oligomicina es un inhibidor de la subunidad FO de la ATP sintasa o complejo V de la CR. El efecto inducido por esta inhibición se caracteriza por una marcada reducción en el consumo de oxígeno [158].

**3) Respiración máxima:** Este parámetro representa el consumo de oxígeno observado después de la adición al medio de un desacoplador mitocondrial hidroxona carbonilcianeto-4-trifluorometoxi-fenil (FCCP; 0,15 mM). Este compuesto desacopla la transferencia de electrones de la fosforilación oxidativa por la disipación de protones que forman un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial. Este parámetro indica la capacidad mitocondrial máxima para transferir electrones [159].

**4) Capacidad de control respiratorio (respiración máxima/estado IV):** Índice utilizado para determinar la contribución de los diferentes estados respiratorios, calculado mediante la respiración máxima y la respiración estado IV [160].

**5) Producción extramitocondrial de ERO:** Indica el consumo de oxígeno en la respiración mitocondrial, representada por la reducción incompleta de ERO. La producción de estas se observa después de la adición de rotenona (1 mg/ml), que inhibe el complejo I de la CR y antimicina A (5 mM) inhibidor del complejo III. Por lo tanto, con la cadena de transporte de electrones inhibida, el oxígeno que se consume no se debe al paso de los electrones por CR [159].

Los datos fueron recolectados a través DatLab 4,3 software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria), evaluando la concentración y flujo de oxígeno después de la adición de inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria mitocondrial.

## 2.4 DISEÑOS EXPERIMENTALES *IN VIVO*

Para llevar a cabo los ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones alopecicos de la cepa Crl:SKH-1-hrBR (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) de 6 semanas de edad.

Los animales fueron criados en un bioterio con fotoperíodo (11 h de oscuridad y 13 h de luz) y temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) controlados, con libre acceso a agua corriente y alimento balanceado. Todos los procedimientos experimentales siguieron las especificaciones establecidas internacionalmente para el uso y cuidado de animales de laboratorio, basados en *Guide for the care and use of laboratory animals* (2011).

#### **2.4.1 Efecto del tratamiento fotodinámico con RFTA en un modelo de hiperplasia epidérmica murina inducida farmacológicamente**

En primera instancia, se realizó la puesta a punto del modelo de hiperplasia epidérmica en el lomo de ratones machos y hembras de la cepa BALB/c y en ratones hembras alopecicos de la cepa SKH-1-hrBR. Se determinó que la hiperplasia epidérmica óptima se logra con 3 aplicaciones tópicas de 100  $\mu\text{l}$  de una solución de laurilsulfato de sodio (SLS) 10% en agua destilada. Además, se planteó estudiar la regresión espontánea de tal lesión evaluando si la misma se revierte por si misma o si se mantiene y por cuánto tiempo una vez suspendido el estímulo. Se realizaron 3 aplicaciones tópicas de SLS cada 48 h y posteriormente tomas de biopsias a los 8, 11, 15 y 19 d de iniciado el tratamiento.

##### **Microscopía fotónica**

Las biopsias de tejido epidérmico fueron fijadas en formol/PBS (4% v/v), deshidratadas en una serie creciente de alcoholes e incluidas en parafina usando técnicas histológicas de rutina. Para el análisis morfológico se utilizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, obtenidos por medio de un micrótopo tipo Minot y coloreados con hematoxilina-eosina (H/E) siguiendo protocolos habituales. Para realizar los estudios histológicos comparando la respuesta al tratamiento de los distintos grupos experimentales, se tomaron microfotografías de cortes histológicos y se realizaron 10 mediciones del espesor de la epidermis de 10 fotografías de cada biopsia empleando el software ImageJ, con el posterior análisis estadístico correspondiente.

##### **2.4.1.1 Tratamiento preventivo**

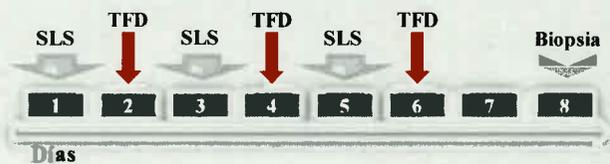
Se evaluó el efecto de la TFD con RFTA como tratamiento preventivo de la generación de hiperplasia epidérmica, para lo cual se intercaló la aplicación de la TFD con el estímulo de SLS para contrarrestar la disminución espontánea de tal lesión. La TFD fue realizada en la zona de piel tratada con SLS mediante la aplicación tópica de una solución de RFTA (0,03%)

en acetona/alcohol en gel (1:4). Los animales fueron mantenidos en oscuridad por 3 h e irradiados con densidad de energía de  $18 \text{ J/cm}^2$ . Pasadas las 48 h de la última aplicación de TFD, se tomaron biopsias de piel previa anestesia de los animales con  $100 \mu\text{l}$  de una solución de ketamina/xilazina (10:1 mg/ml) (Figura 13). Los controles empleados fueron piel normal, tratados con RFTA sin irradiación e irradiados sin RFTA.

#### Modelo de hiperplasia epidérmica



#### Tratamiento preventivo de hiperplasia epidérmica



**Figura 13.** Esquema del modelo experimental llevado a cabo para la inducción de hiperplasia epidérmica y del tratamiento preventivo de dicha lesión.

#### 2.4.1.2 Tratamiento terapéutico

En segunda instancia se evaluó el efecto de la TFD (3 aplicaciones) como tratamiento terapéutico para disminuir la hiperplasia epidérmica generada con SLS. Para este objetivo luego de 4 aplicaciones con SLS los animales fueron tratados de forma intercalada, empleando RFTA (0,03%) mantenidos en oscuridad durante 3 h e irradiados con  $18 \text{ J/cm}^2$  (Figura 14). La toma de biopsias y procesamiento del material fueron realizados como se describió anteriormente.

### Modelo de hiperplasia epidérmica



### Tratamiento terapéutico de hiperplasia epidérmica



**Figura 14.** Esquema del modelo experimental llevado a cabo para la inducción de hiperplasia epidérmica y del tratamiento terapéutico de dicha lesión.

#### 2.4.1.2.1. Efecto del tratamiento terapéutico sobre la proliferación de células epidérmicas

La localización e intensidad de la expresión proteica *in situ* de Ki-67 fueron examinadas mediante inmunocitoquímica debido a que esta proteína se expresa en células que se encuentran en las fases G1, S, G2 y M, y está ausente en la fase G0 del ciclo celular. Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron biopsias de piel de ratones incluidos en parafina y provenientes de los diferentes modelos experimentales. Las muestras fueron seccionadas con un espesor de 4  $\mu\text{m}$  y montadas en portaobjetos pre-tratados con silano y procesadas como se describe a continuación. Los cortes de tejido fueron desparafinados e hidratados con inmersiones de 3 min de los portaobjetos en una serie de soluciones: xilol 100%, xilol/alcohol 100%, alcohol 100%, alcohol 95%, alcohol 90%, alcohol 70% y PBS. La recuperación antigénica se realizó en buffer EDTA pH 8 durante 3 min en microondas al 100% de potencia (750 W) y 14 min en microondas al 20% de potencia; pasados los 20 min se realizaron lavados con PBS. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% en metanol por 15 min y el bloqueo posterior de uniones no específicas fueron realizadas con suero normal de cabra 1:20 diluido en PBS-leche por 20 min a TA en cámara húmeda.

La incubación con anticuerpo primario anti Ki-67 (Santa Cruz, Biotechnology, USA) 1:100, fue por 1 h a TA y posteriormente toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Luego se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min cada uno y la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (IgG *anti-mouse*, Amersham Pharmacia, USA) 1:130 durante 30 min a TA en cámara húmeda. Después de 3 lavados sucesivos las muestras se

incubaron con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC complex, Vector, USA) por 30 min a TA y se lavaron con PBS. A continuación se realizó la incubación con diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0,05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05% en PBS por 10 min en oscuridad a TA y luego de realizar lavados con agua destilada y deshidratación se realizó el montaje con entellán (Merck, USA). Para demostrar la especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas, las secciones fueron incubadas con PBS-BSA 1%, en reemplazo del anticuerpo primario. La cuantificación se realizó sobre al menos 30 fotografías de cortes de epidermis de cada animal a una magnificación de 40X, obteniendo una longitud de membrana basal de  $5,9 \pm 2,1$ mm.

#### 2.4.1.2.2. Efecto del tratamiento terapéutico sobre la muerte de células hiperplásicas

La apoptosis se detectó por inmunocitoquímica *in situ* mediante el método de TUNEL. En secciones parafinadas de 5 µm de epidermis de ratón montadas en portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Los cortes fueron desparafinizados con xilol e hidratados con una serie decreciente de alcoholes-PBS. La permeabilización del tejido se realizó efectuando la digestión enzimática con Proteinasa K libre de nucleasa (Roche, Mannheim, Alemania) a una dilución de 10 µg/ml en TRIS/HCl 10 mM, pH 7,4-8. Luego de dos lavados con PBS se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas con PBS-BSA 5% durante 30 min.

Posteriormente se procedió a la aplicación del Kit comercial siguiendo las instrucciones sugeridas por los fabricantes (*In Situ Cell Death Detection Kit, POD*. Roche, Mannheim, Alemania). Finalmente, los inmunocomplejos fueron revelados con diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0,05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05% en PBS. Se realizó una contratinción con hematoxilina y las secciones fueron deshidratadas y montadas para ser visualizadas al microscopio fotónico. Como control positivo se utilizaron cortes tratados con DNAsa Tipo I (Invitrogen, Carlsbad, CA) 5000 unidades/ml en Tris-Cl, durante 10 min a TA, ya que dicha enzima genera cortes en la cadena de ADN a nivel internucleosomal y permite que los extremos 3'-OH ADN queden libres. Los controles negativos se realizaron sobre cortes histológicos sometidos a las mismas condiciones de reacción pero reemplazando la enzima TdT por agua destilada.

Las secciones histológicas fueron analizadas en un microscopio fotónico Zeiss Axioskop a una magnificación de 40 X. El número de células apoptóticas en epidermis se calculó empleando la siguiente fórmula:



## 2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

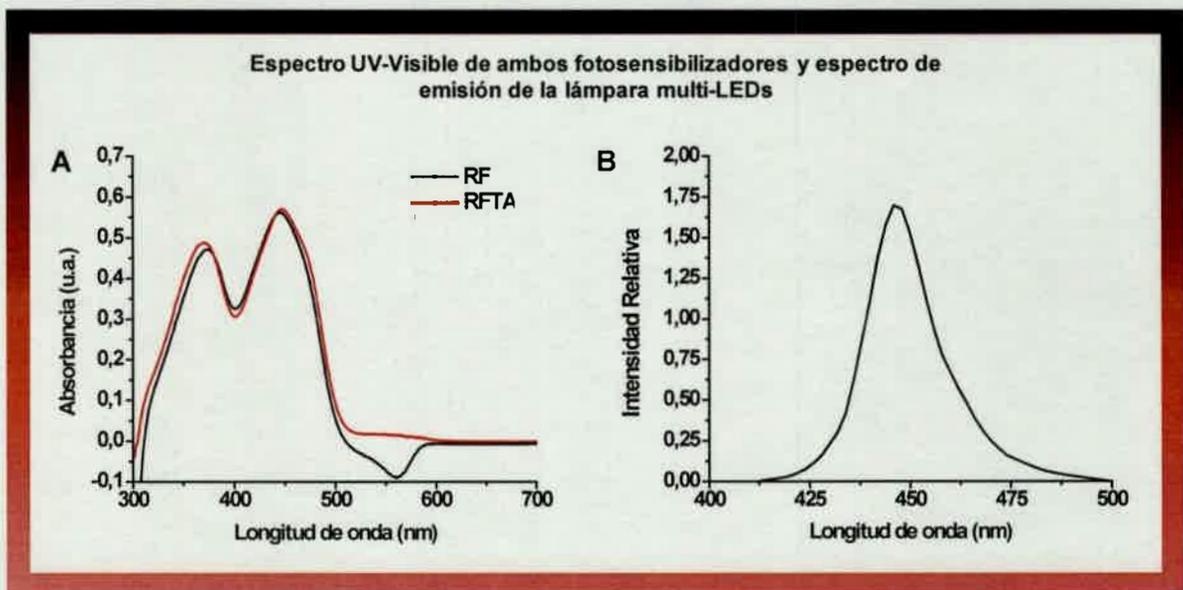
Para validar los resultados obtenidos en los diferentes estudios se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos obtenidos para cada grupo. Se estableció la media  $\pm$  error estándar para cada parámetro evaluado y los valores fueron procesados estadísticamente mediante *t* de Student o análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por el análisis *post-hoc* de Tukey o de dos y tres vías por *post-hoc* de Bonferroni, aplicando el programa informático InfoStat 1,5 (Grupo InfoStat. Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba). Los gráficos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 6. Las diferencias entre los grupos fueron comparadas aceptando como significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### 3.1 FOTSENSIBILIZADORES Y FUENTE DE LUZ

#### 3.1.1 Caracterización de los fotosensibilizadores e intensidad emitida por la lámpara a diferentes longitudes de onda

Para evaluar si la emisión de luz generada por la lámpara multi-LEDs es específica para activar dichos FS, se realizó el espectro de emisión el cual refleja la intensidad relativa emitida a diferentes longitudes de onda. Los resultados muestran que la lámpara emite en el rango azul del espectro visible con un pico de máxima intensidad a 446 nm (Figura 16A). Para determinar el pico máximo de absorbancia de RF y RFTA se realizaron los espectros UV-Visible de ambos FS en soluciones: RF ( $5 \times 10^{-5}$  M) y RFTA ( $5 \times 10^{-5}$  M) en DMEM, pH 7,4 (Figura 16B). Los resultados muestran que tanto RF como RFTA presentan un pico máximo de absorbancia a 446-447 nm.

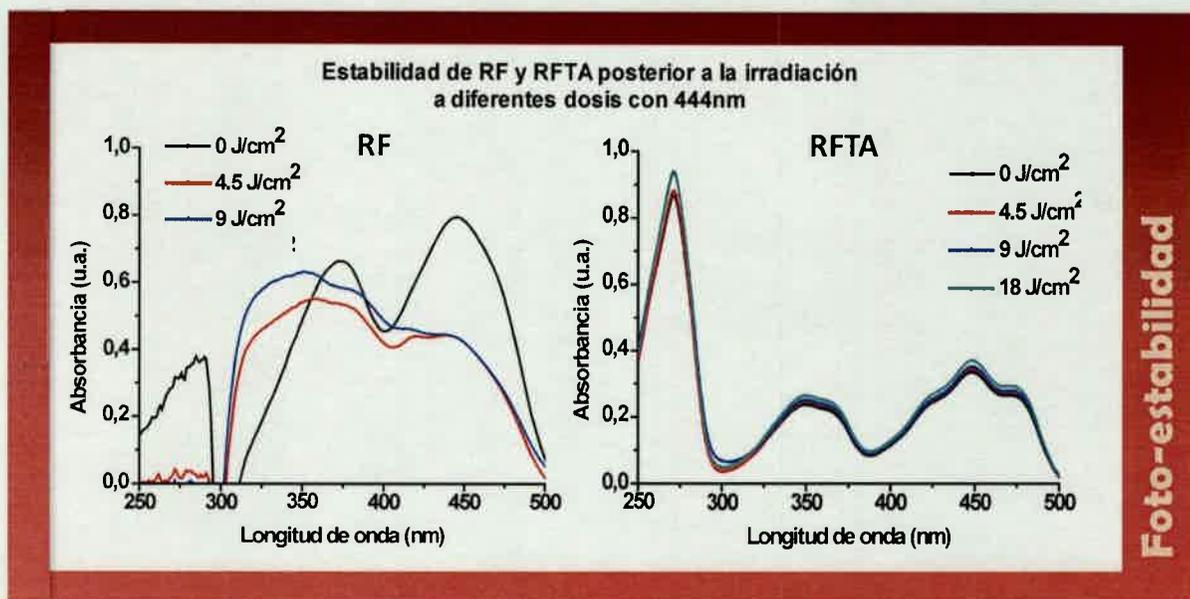


**Figura 16.** (A) Espectro de emisión de la lámpara multi-LEDs, en el cual se observa la intensidad relativa emitida a diferentes longitudes de onda. (B) Espectro UV-Visible de RF y RFTA ( $50\mu\text{M}$ ) en medio de cultivo DMEM a pH 7,4 de 300 nm a 700 nm.

#### 3.1.2 Fotoestabilidad de RFTA

La fotoestabilidad de RFTA luego de la irradiación, fue analizada mediante espectros UV-visible de RF ( $5 \times 10^{-5}$ ) y RFTA ( $1,7 \times 10^{-5}$  M). Los resultados permitieron demostrar que luego de la irradiación con diferentes densidades de energía ( $4,5$ ,  $9$  y  $18 \text{ J/cm}^2$ ), RFTA no disminuye su pico máximo de absorbancia y no presenta bandas de absorbancia diferentes a la

solución sin irradiar:  $0 \text{ J/cm}^2$ , lo que no ocurre con RF, ya que este FS pierde su estabilidad luego de la irradiación con las diferentes dosis de luz (Figura 17).

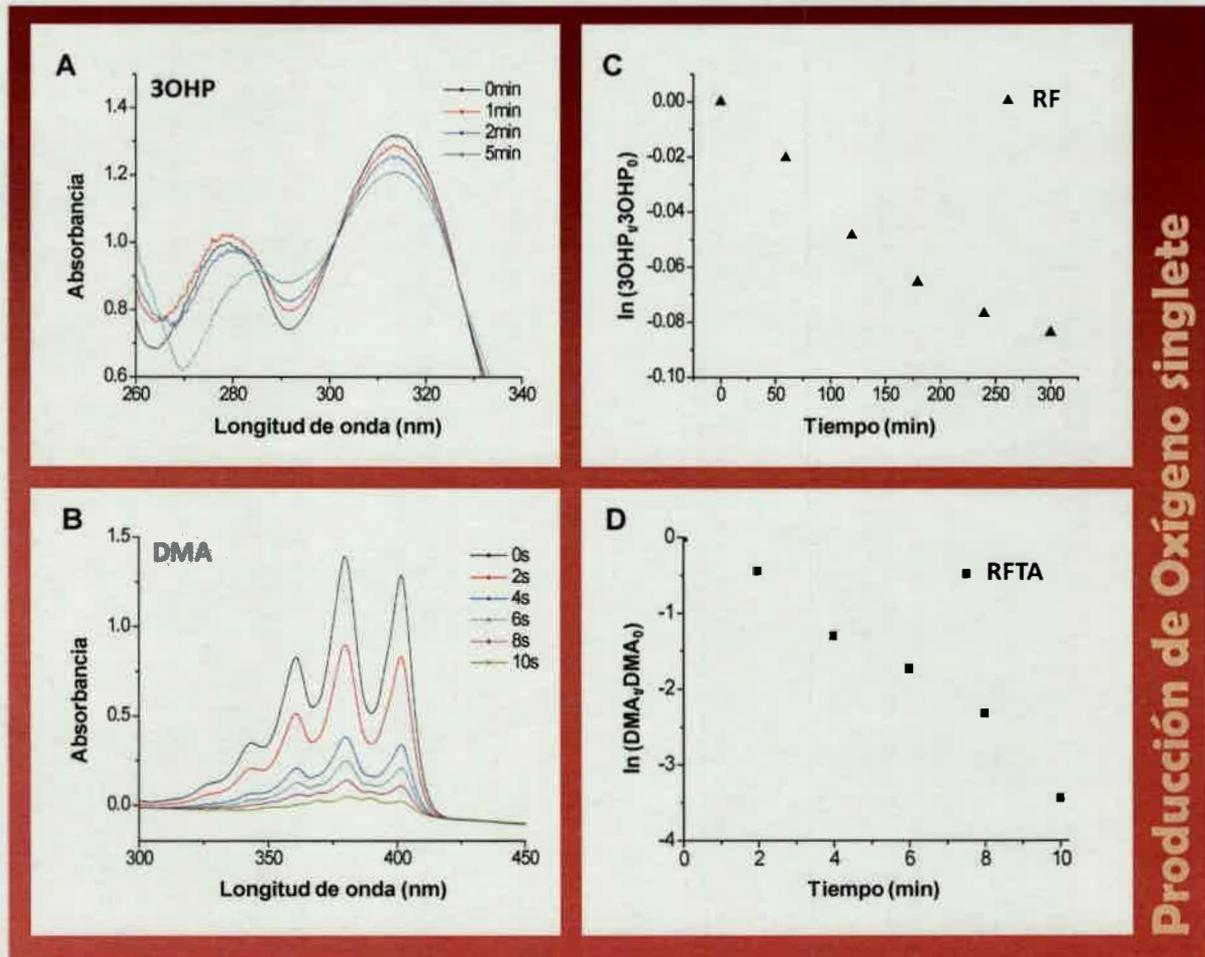


**Figura 17.** Espectro UV-Visible de RF y RFTA demostrando la fotoestabilidad de los compuestos irradiados con diferentes densidades de energía.

### 3.1.3 Determinación de la generación de oxígeno singlete por RF y RFTA

La capacidad de generar oxígeno singlete se empleó como indicador del potencial fotosensibilizador del compuesto, para lo cual RF y RFTA fueron fotoactivados con diferentes dosis de luz en una solución con 3-hidroxipiridina (3-OHP) y 9,10-dimetilantraceno (DMA) respectivamente. Mediante espectrofotometría UV-visible se midió la disminución de la absorbancia de 3-OHP y DMA, generada por la fotooxidación de ambos compuestos al ser irradiados con la lámpara en estudio. Esto permitió demostrar que ambos FS al ser irradiados con la lámpara en estudio generan oxígeno singlete al disminuir el pico de absorbancia a 313 nm en el caso de 3-OHP y a 379 nm en el caso de DMA (Figura 18 A-B).

La tasa de generación de oxígeno singlete se calculó por la ecuación:  $\ln(3\text{OHP}_t/3\text{OHP}_0)=-kt$  y  $\ln(\text{DMA}_t/\text{DMA}_0)=-kt$ , donde  $[3\text{OHP o DMA}]_0$  y  $[3\text{OHP o DMA}]_t$  son las concentraciones de los dos compuestos antes y después de la irradiación respectivamente, 3-OHP ( $3,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) y DMA ( $7,75 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), los valores de  $k$  son las tasas de generación de oxígeno singlete y  $t$  es el tiempo de la irradiación. Mediante estos cálculos se determinó que la tasa de generación de oxígeno singlete es mayor para RFTA respecto a RF (Figura 18 C-D).



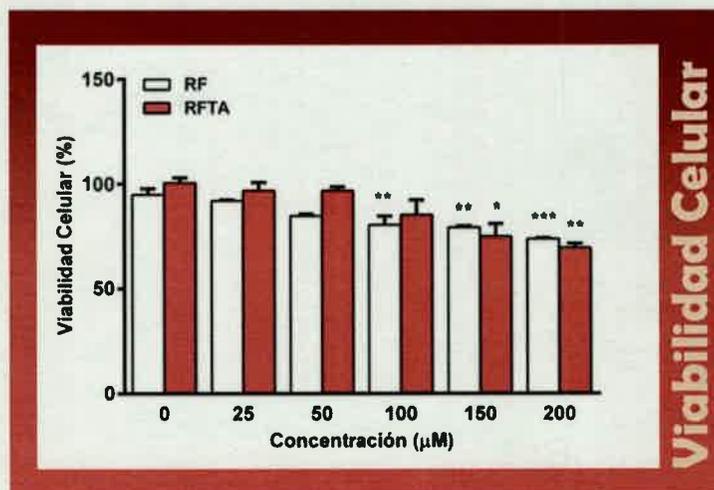
**Figura 18.** Espectro UV-visible para la determinación de los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete de RF con 3OHP (A) y de RFTA con DMA (B). Tasa de generación de oxígeno singlete en el tiempo por la irradiación de RF (C) y RFTA (D).

### 3.2 TERAPIA FOTODINÁMICA EN CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA ESCAMOSO

El daño fotodinámico y la citotoxicidad generada luego de la aplicación de la TFD está en estrecha relación con diversos factores como: tipo celular, FS utilizado, dosis de FS administrada, dosis de luz, tiempo entre la administración del FS y la irradiación y localización del FS en el momento de la fotoactivación [3, 64]. Debido a estos antecedentes se realizó la puesta a punto del tratamiento fotodinámico empleando células de la línea SCC-13, estableciendo las dosis óptimas de luz, concentración de FS: RF y RFTA y los tiempos de incubación adecuados para generar la muerte celular por un proceso programado. El tiempo de incubación post-tratamiento fue particular para cada metodología empleada.

### 3.2.1. El tratamiento fotodinámico genera disminución de la viabilidad celular de manera dosis de luz dependiente

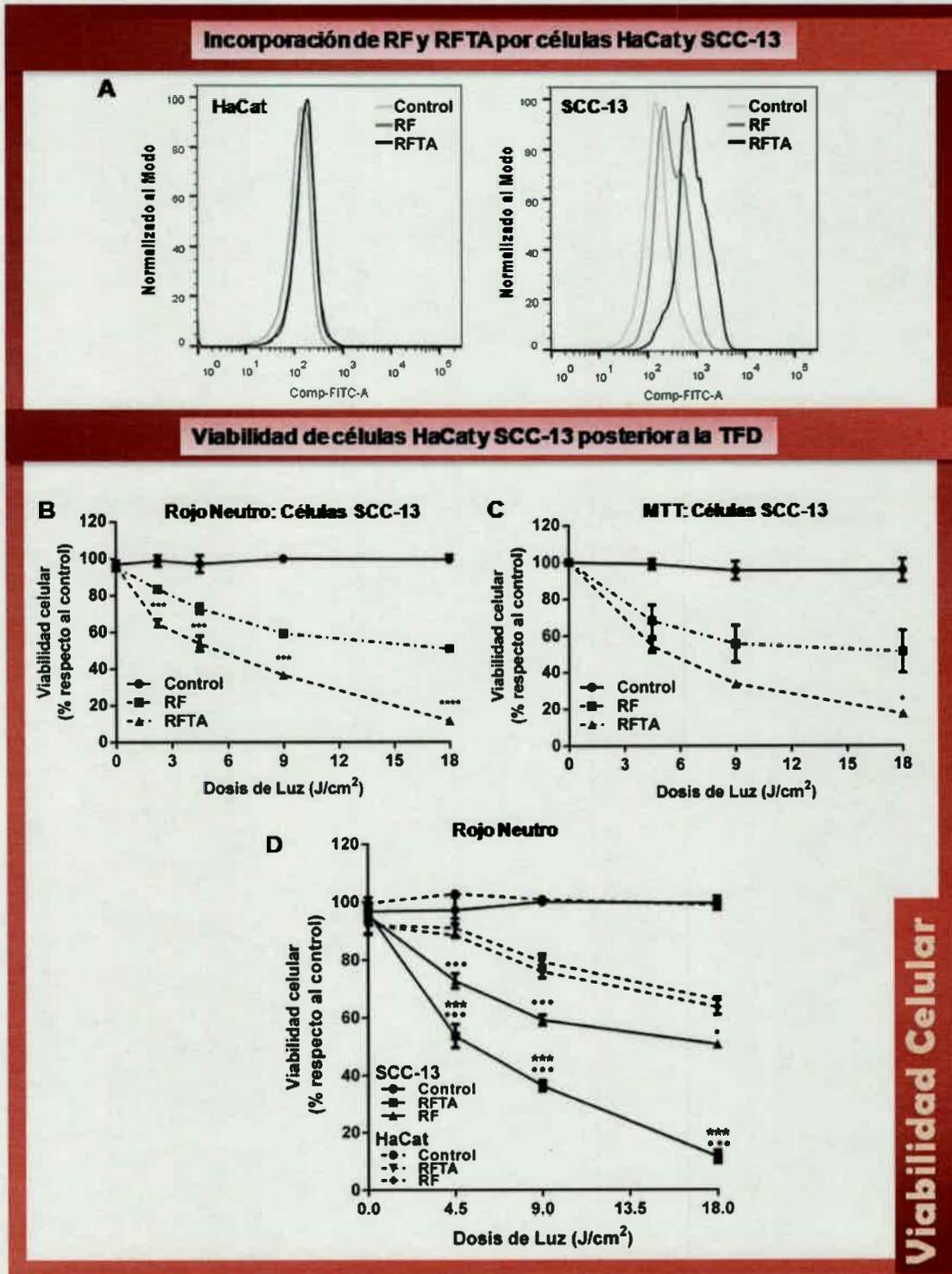
Para establecer la toxicidad de ambos FS en células SCC-13, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico de captación de rojo neutro a diferentes concentraciones de RF o RFTA por un lapso de 3 h en oscuridad. Los resultados obtenidos demuestran que RF y RFTA a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , no causan toxicidad en las células tumorales. Sin embargo, cuando las células fueron incubadas a concentraciones más elevadas (150  $\mu\text{M}$ ) con el RF o RFTA, el porcentaje de supervivencia celular disminuyó a  $20,7 \pm 0,75$  y  $25,02 \pm 6,03$ , respectivamente en relación al control (Figura 19). Por lo tanto, en base a las respuestas obtenidas, se seleccionó la dosis de 50  $\mu\text{M}$  para llevar a cabo los ensayos de TFD, ya que dicha concentración no afecta la viabilidad celular en oscuridad.



**Figura 19.** Viabilidad de las células SCC-13 luego de 3 h de incubación con diferentes dosis de RF y RFTA. El porcentaje de células viables se redujo de forma dosis dependiente con ambos FS. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , indican diferencias significativas con respecto al control, ANOVA de una vía seguido por el análisis *post-hoc test* de Tukey.

Tomando en cuenta los resultados previamente descritos las células fueron irradiadas con dosis crecientes de luz de 4,5 a 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de captación de rojo neutro y de MTT ya que ambas técnicas evalúan diferentes parámetros de la viabilidad. Los resultados obtenidos demostraron que el porcentaje de supervivencia de las células SCC-13 disminuye significativamente y de manera dependiente de la dosis de luz tanto para RF como para RFTA (Figura 20). La disminución de la viabilidad celular fue significativamente mayor con RFTA respecto a RF con todas las dosis lumínicas empleadas con el ensayo de rojo neutro y con la dosis lumínica mayor con el ensayo de MTT. En los

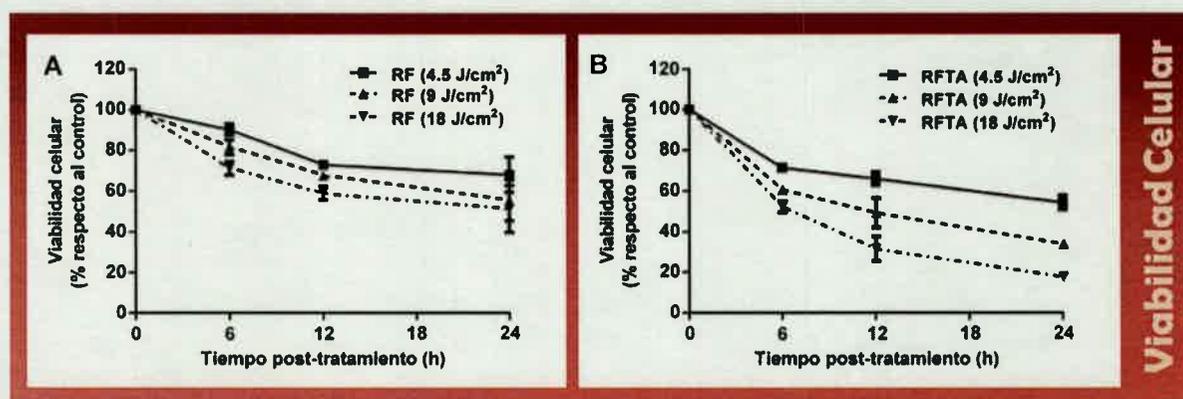
controles luz, con diferentes dosis (2,25-18 J/cm<sup>2</sup>), se observa que la viabilidad celular se mantiene con valores similares al control, es decir células sin FS y sin irradiación, concluyendo que la irradiación por sí sola no genera ningún efecto sobre la viabilidad celular.



**Figura 20.** Viabilidad de las células SCC-13 luego de 3 h de incubación con RF y RFTA con diferentes dosis de luz. (A) Estudio de la captación de RF y RFTA por queratinocitos normales (HaCat) y células tumorales (SCC-13) luego de 3 h de incubación con los FS. Histograma de la

emisión de fluorescencia de RF y RFTA detectada por citometría de flujo. La viabilidad celular fue evaluada con el ensayo de rojo neutro (B) y con MTT (C) 24 h post-irradiación. El porcentaje de células viables se redujo de forma dosis dependiente con ambos FS. ANOVA de una vía, seguido por *post-hoc test* de Tukey: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. control. (D) Viabilidad de células HaCat y SCC-13 luego de la incubación de RF y RFTA ( $50 \mu\text{M}$ ), seguido por irradiación con luz azul. Los datos se expresan como viabilidad celular % respecto al control y se expresaron como media  $\pm$  S.E.M. ANOVA de dos vías: interacción entre el tratamiento y la intensidad de la luz [ $F_{6,60}=52,37$ ;  $p < 0,001$ ]. ANOVA de tres vías: interacción entre el tipo de células, el tratamiento y la intensidad de la luz [ $F_{6,60}=16,34$ ;  $p < 0,001$ ]. *Post-hoc test* de Tukey  $\cdots p < 0,001$  RF o RFTA en células SCC-13 vs. células HaCat; \*\*\* $p < 0,001$  vs. RFTA vs. RF en las células SCC-13.

Posteriormente para poder determinar el momento en que la TFD comienza a causar los efectos de toxicidad sobre las células, se evaluó la viabilidad celular con las diferentes dosis de luz luego de 6, 12 y 24 h post-irradiación (Figura 21). Los resultados muestran que la TFD genera en células tratadas con RF una disminución de la viabilidad a las 6 h post-irradiación con las dosis de luz más altas (9 y  $18 \text{ J/cm}^2$ ). En cambio las células incubadas con RFTA exhiben pérdida de la viabilidad con todas las dosis de luz (4,5, 9 y  $18 \text{ J/cm}^2$ ). Cabe destacar que ambos FS generan una disminución de la viabilidad celular de manera tiempo dependiente.

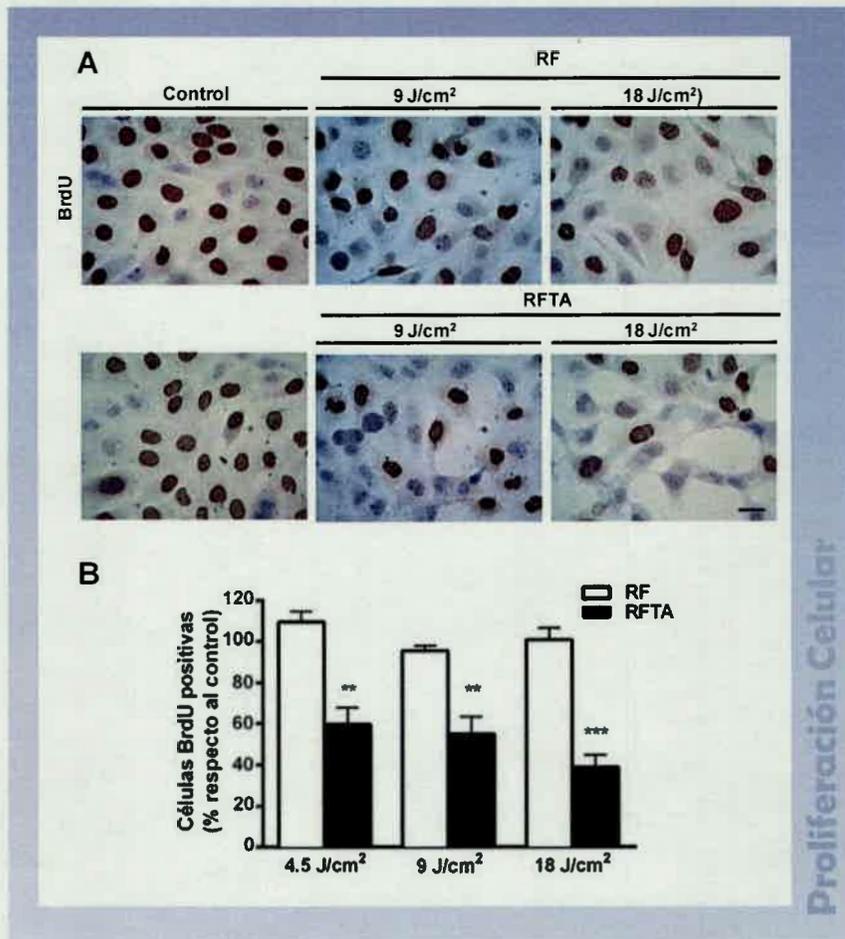


**Figura 21.** Efecto de la TFD sobre la viabilidad celular después de 6, 12 y 24 h post-irradiación evaluada con rojo neutro. (A) Células tratadas con RF. (B) Células tratadas con RFTA. Los datos se expresaron como media  $\pm$  S.E.M. de al menos tres experimentos diferentes.

### 3.2.2. El tratamiento fotodinámico genera disminución de la proliferación celular

Teniendo en cuenta que la TFD genera disminución de la viabilidad en células SCC-13, se evaluó la tasa de proliferación luego de los diferentes tratamientos. Para cumplir con este objetivo las células neoplásicas fueron incubadas con RF y RFTA durante 3 h e irradiadas con 4,5, 9 y  $18 \text{ J/cm}^2$ . Luego de 24 h de incubación post-irradiación se realizó la cuantificación de

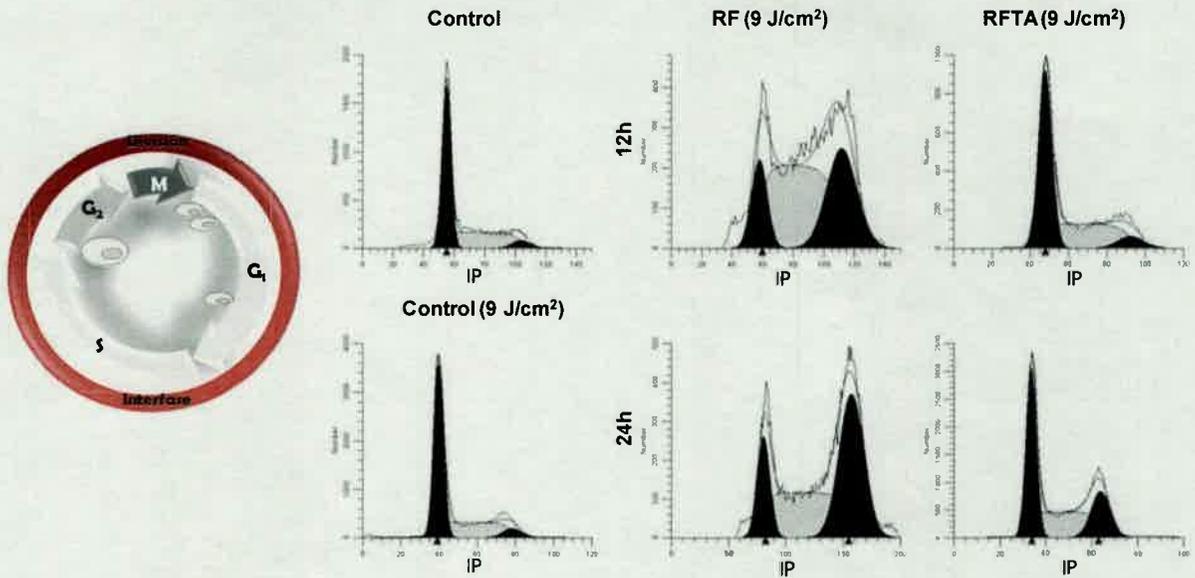
la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con RF no indujo modificaciones en la incorporación de BrdU, mientras que el tratamiento fotodinámico con RFTA generó una significativa disminución de la tasa mitótica en las células tratadas con las diferentes dosis de luz utilizadas respecto al grupo control (Figura 22).



**Figura 22.** Efecto del tratamiento fotodinámico sobre la proliferación de células SCC-13. (A) Micrografías representativas de la incorporación de BrdU. Barra: 10  $\mu$ m. (B) Los datos se expresan como el número de células BrdU marcadas (% con respecto al grupo control: ausencia de FS y luz). ANOVA de dos vías demostrando un efecto principal del FS (RF vs. RFTA) [ $F_{1,25}=57,88$ ;  $p<0,0001$ ]. *Post-hoc test* de Bonferroni: \*\* $p<0,01$  y \*\*\* $p<0,001$  RF vs. RFTA en la misma condición de intensidad de la luz.

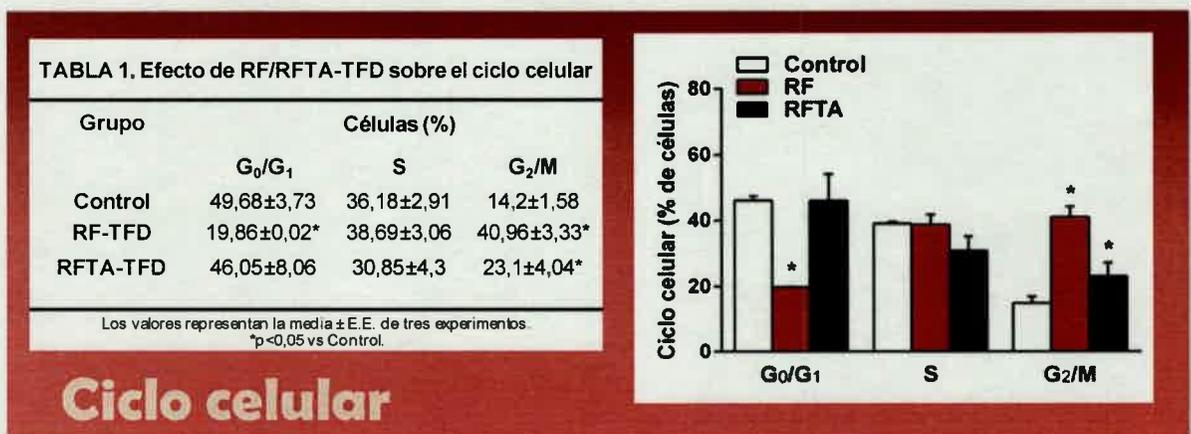
### 3.2.3. Ciclo celular

Para determinar si la citotoxicidad inducida por la TFD afecta la progresión del ciclo de las células SCC-13, se analizó el contenido de ADN con yoduro de propidio después de 12 y 24 h de la exposición al tratamiento (Figura 23).



**Figura 23.** Análisis del ciclo celular por cuantificación del contenido de ADN. La TFD induce arresto en la fase S y G2/M del ciclo en células SCC-13, 12 y 24 h posteriores a la irradiación con 9 J/cm<sup>2</sup>.

Posteriormente se cuantificó el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo 24 h post-irradiación. En el grupo control el porcentaje de células en fase G2/M fue de  $14,2 \pm 1,58$  aumentando significativamente a  $40,96 \pm 3,33$  en células sometidas a TFD-RF y a  $23,1 \pm 4,04$  en células tratadas con TFD-RFTA ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el análisis de la fase G0/G1 evidenció, en células controles un porcentaje de  $49,68 \pm 3,73$ , observándose una disminución significativa posterior al tratamiento con TFD-RF ( $19,86 \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** Distribución celular en las diferentes fases del ciclo en células control y tratadas con RF y RFTA irradiadas con 9 J/cm<sup>2</sup>. Los datos representan la media ± S.E.M. (n = 3). ANOVA de una vía seguido por *post-hoc test* de Tukey: \*p < 0,05 vs. control.

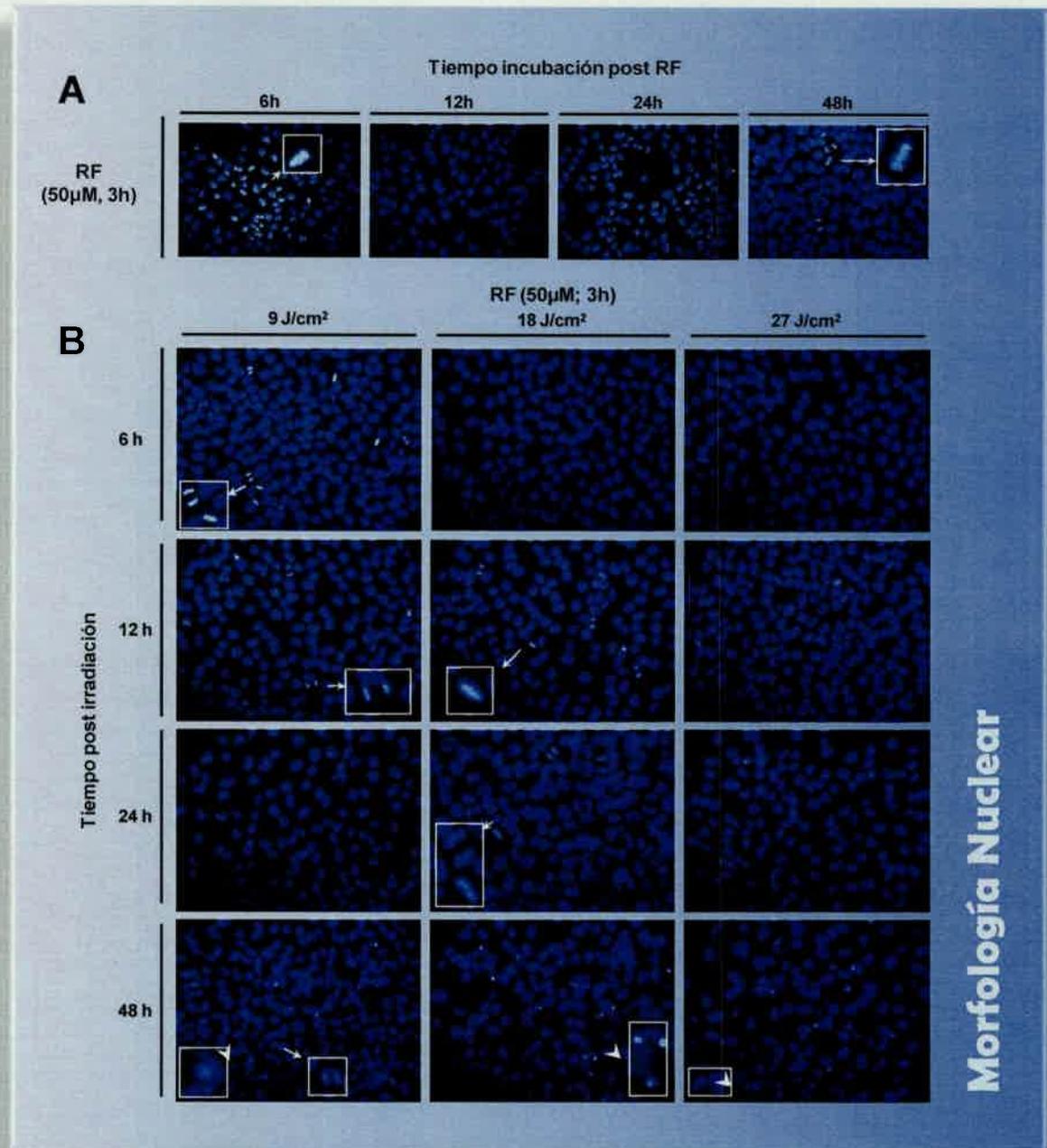
### 3.2.4 Caracterización morfológica y bioquímica de la muerte celular inducida por TFD

#### 3.2.4.1 La TFD genera cambios en la morfología nuclear

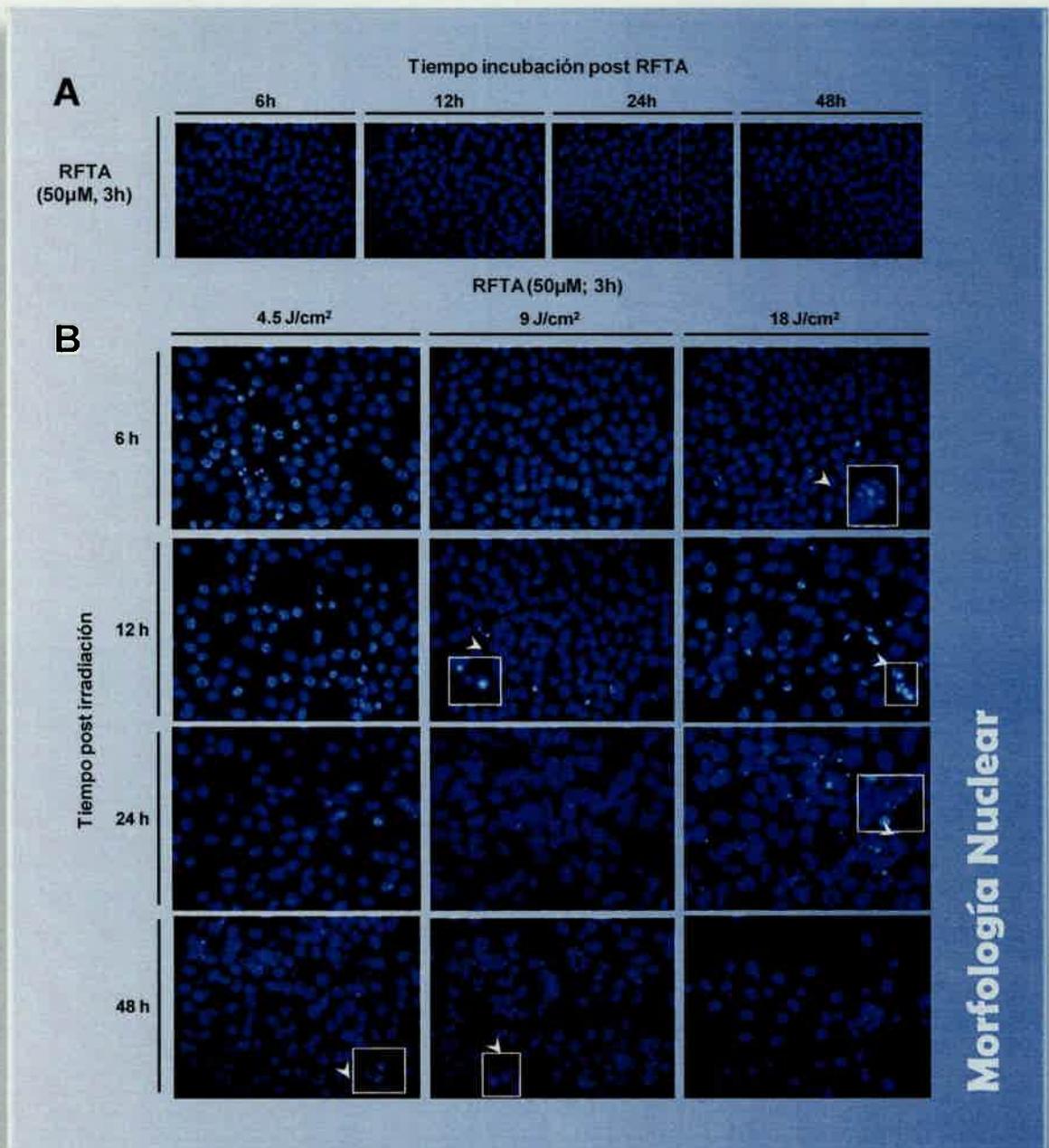
Con el fin de determinar si la disminución en la viabilidad celular por la TFD fue inducida por muerte celular, se analizaron las características morfológicas con tinción nuclear fluorescente del ADN mediante Hoechst 33258. Las células SCC-13 fueron incubadas con RF o RFTA (50  $\mu\text{M}$ ) durante 3 h, irradiadas con diferentes dosis de luz (9, 18 y 27  $\text{J}/\text{cm}^2$ , o 4,5, 9 y 18  $\text{J}/\text{cm}^2$  respectivamente) e incubadas durante 6, 12, 24 y 48 h adicionales.

Las células control y control FS exhibieron morfología normal y núcleos con características de diferentes fases de la mitosis: profase, metafase y anafase. Las células tumorales después de la exposición a RF e irradiadas presentaron morfología normal y se detectaron algunas células en diferentes fases de mitosis con las dosis lumínicas de 9 y 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Sin embargo, algunas células presentaron núcleos con características apoptóticas, al ser irradiadas con las dosis lumínicas más alta (27  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) tales como cromatina condensada y fragmentación de los núcleos a las 48 h de incubación (Figura 25).

En contraste, en los tratamientos fotodinámicos con RFTA (50  $\mu\text{M}$ , 3 h) e irradiadas con las dosis lumínicas de 4,5, 9 y 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ , no se detectaron células en proliferación, como con RF, pero si se observó que la mayoría de las células presentaron características apoptóticas, tales como condensación, marginación y fragmentación de la cromatina formando en algunos casos cuerpos apoptóticos a las 48 h con la dosis lumínica más baja (4,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), a las 12 h con la dosis media (9  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) y a las 6 h con la dosis más alta (18  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) (Figura 26). En estos modelos no se observaron células en mitosis con las dosis de luz empleadas. A partir de las 24 h en los tratamientos con 9 y 18  $\text{J}/\text{cm}^2$  se observó una disminución en la cantidad de células debido a la pérdida de adhesión de las mismas al sustrato cuando están en estadios avanzados de muerte.



**Figura 25.** Morfología nuclear de células SCC-13. (A) Control oscuridad: células incubadas con RF sin irradiación. (B) Células neoplásicas luego del tratamiento fotodinámico con RF e irradiadas durante 9, 18 y 27 J/cm<sup>2</sup>. Las flechas indican células en mitosis y las puntas de flecha indican células apoptóticas.

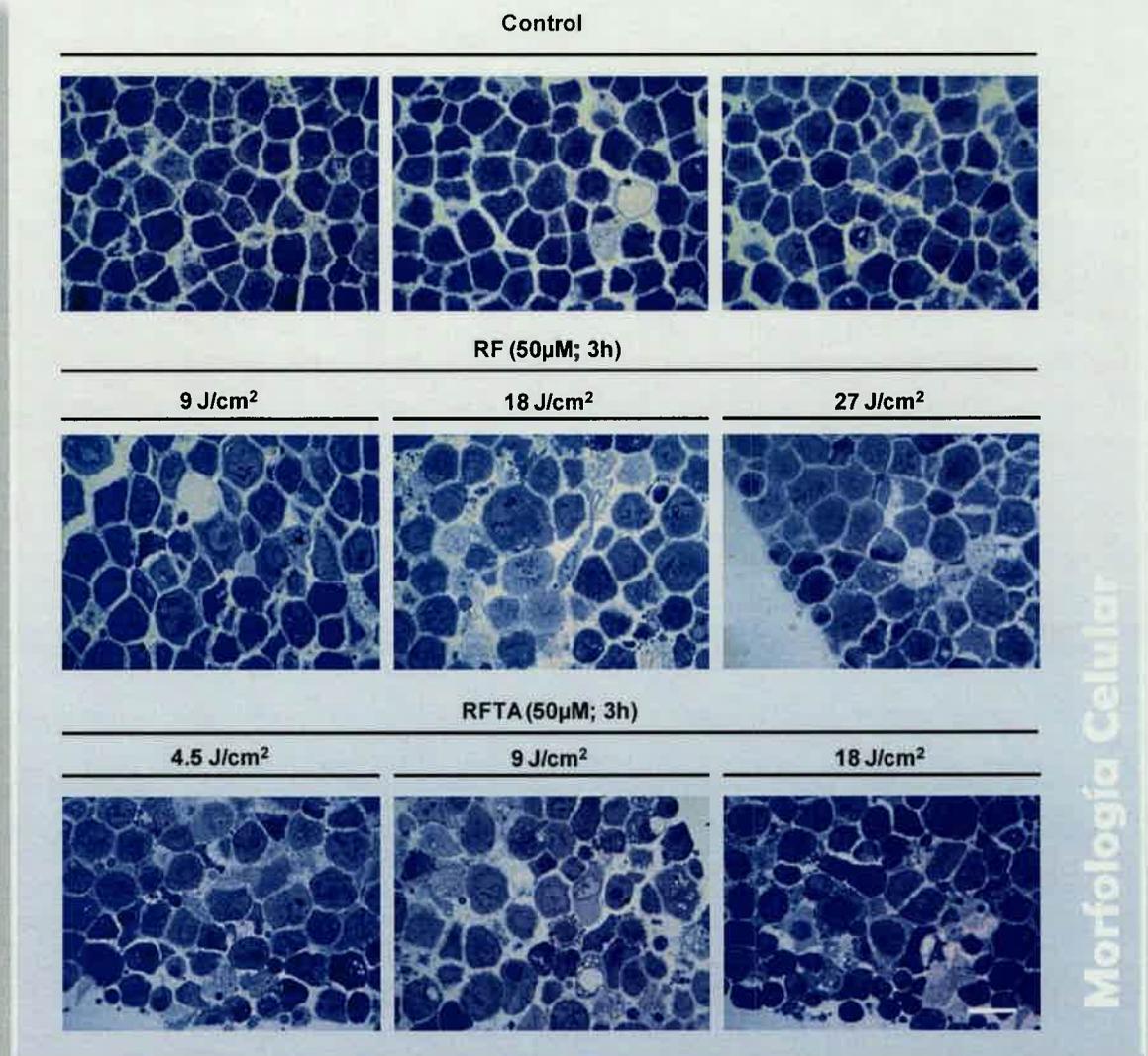


**Figura 26.** Morfología nuclear de células SCC-13. (A) Control oscuridad: células incubadas con RFTA sin irradiación. (B) Células tumorales luego del tratamiento fotodinámico con RFTA e irradiadas con 4,5, 9 y 18 J/cm<sup>2</sup>, tratamientos en los cuales no se observaron células en mitosis. Las puntas de flecha indican células en apoptosis.

### 3.2.4.2 La TFD genera cambios en la morfología celular

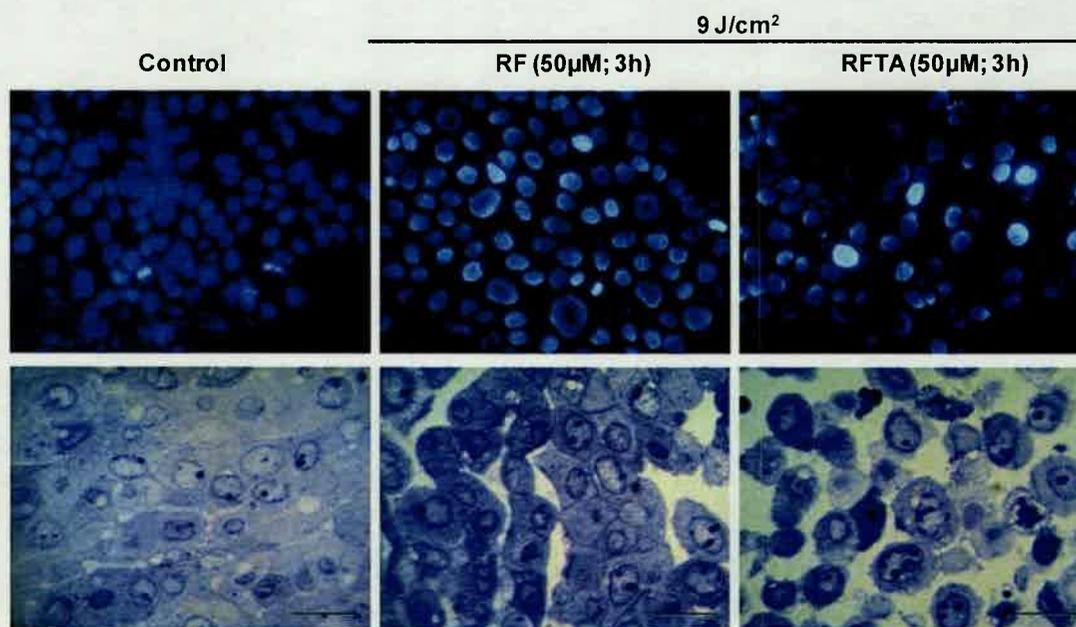
Con el objetivo de estudiar los cambios morfológicos celulares inducidos 24 h post-irradiación, las células SCC-13 fueron examinadas en primera instancia por MOAR (Figura 27).

El grupo control presentó células con núcleos y membranas conservadas y en diferentes fases de la mitosis. En las células tratadas con RF expuestas a dosis lumínica de  $9 \text{ J/cm}^2$  se observó que las mismas conservaban los núcleos eucromáticos con numerosos nucléolos, citoplasmas con características normales y algunas células en mitosis. Sin embargo, las dosis lumínicas mayores ( $18$  y  $27 \text{ J/cm}^2$ ) generaron células apoptóticas. Por otro lado, el grupo de células tratadas con RFTA y en todas las dosis de irradiación utilizadas exhibió cambios apoptóticos, destacándose que la dosis de  $18 \text{ J/cm}^2$ , originó además vacuolización celular.



**Figura 27.** Microfotografías ópticas representativas de los distintos tratamientos (40 X). Células controles sin FS ni luz, células sometidas a TFD con RF e irradiadas con  $9$ ,  $18$  y  $27 \text{ J/cm}^2$  y tratadas con RFTA irradiadas con  $4,5$ ,  $9$  y  $18 \text{ J/cm}^2$ , fijadas 24 h post-tratamiento. Barra:  $20 \mu\text{m}$ .

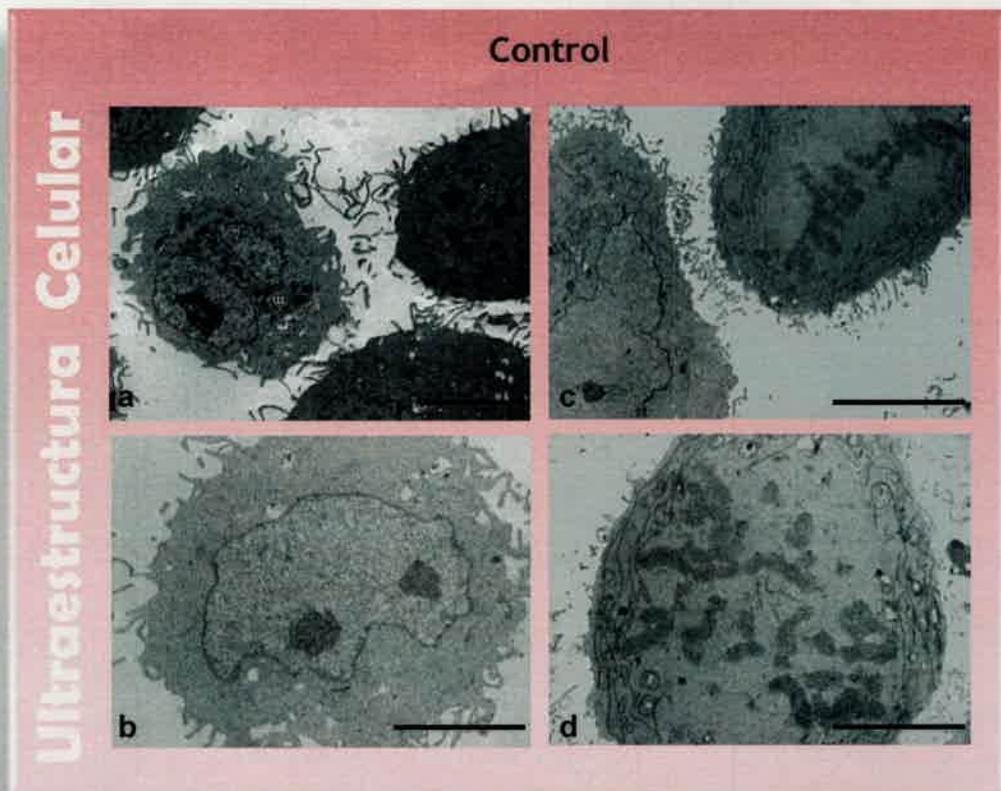
Para evaluar el efecto de la TFD sobre las células normales de la línea HaCat se evaluó la morfología nuclear y ultraestructural a nivel óptico. La figura 28 muestra que las células tratadas con RF o RFTA por 3h e irradiadas con  $9 \text{ J/cm}^2$ , no presentaron cambios en la morfología nuclear en comparación con las células controles 24 horas posterior al tratamiento. Sin embargo, en el estudio ultraestructural algunas células tratadas con RFTA-TFD, presentaron condensación de la cromatina, característico de la apoptosis.



### Morfología Células HaCat

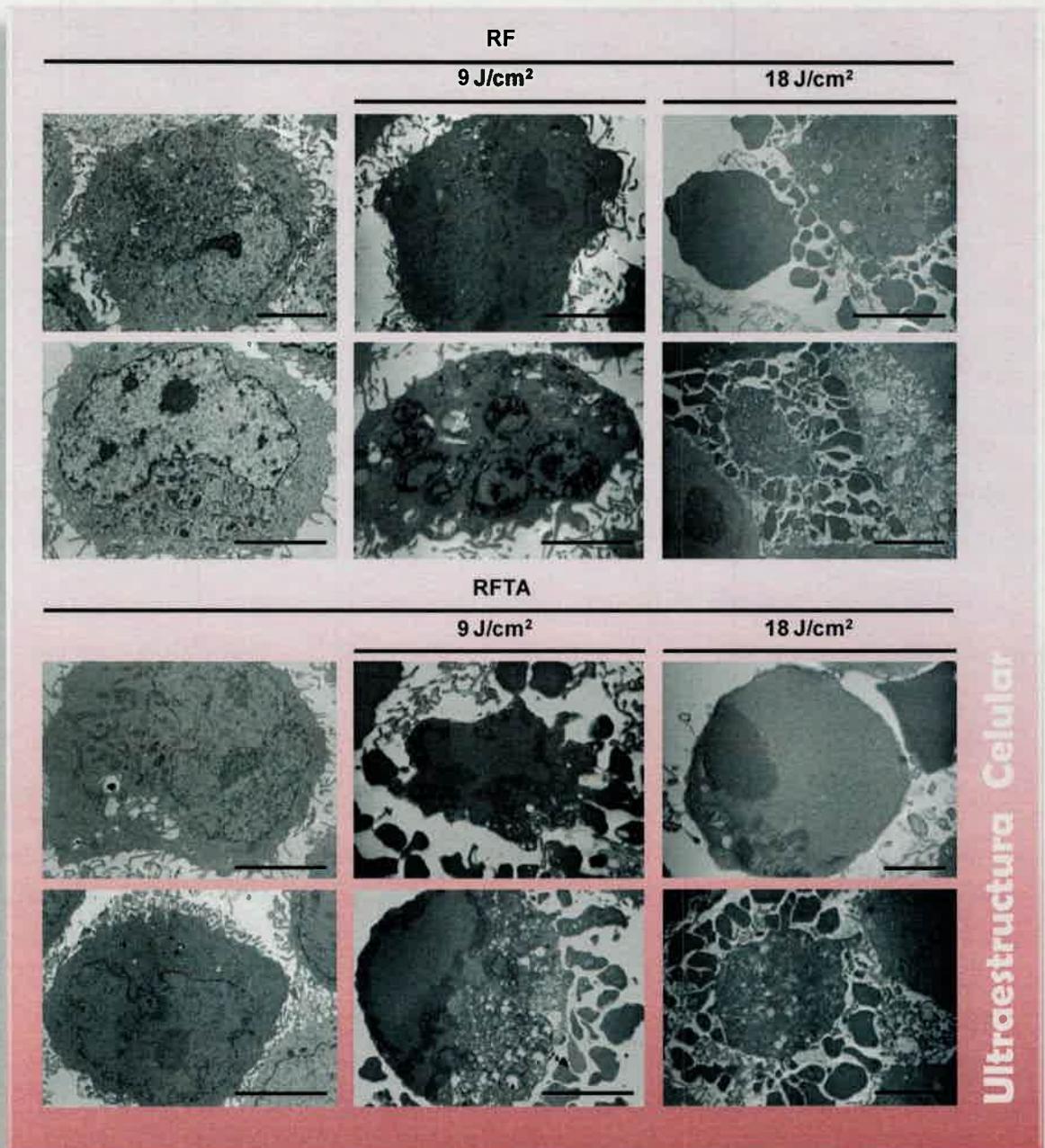
**Figura 28.** Microfotografías representativas de fluorescencia y óptica de alta resolución de células HaCat sometidas a los distintos tratamientos. Células controles sin FS ni luz, células sometidas a TFD con RF o RFTA e irradiadas con  $9 \text{ J/cm}^2$ , fijadas 24 h post-tratamiento. Barra:  $20 \mu\text{m}$ .

El análisis ultraestructural de las células del grupo control demostró la presencia de núcleos grandes activos, caracterizados por predominio de eucromatina de distribución homogénea y con diversa electrodensidad citoplasmática. Además, se aprecian claramente células en mitosis en metafase (c) y profase (d) (Figura 29).



**Figura 29.** Micrografías de células SCC-13 correspondientes al grupo control. Barra: 2  $\mu\text{m}$ .

Las células tratadas con RF o RFTA en oscuridad, presentaron morfologías similares a las del grupo control. Sin embargo, después de la TFD con RF (9 y 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) o RFTA (9  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), las células exhibieron claras alteraciones a nivel nuclear y citoplasmático, como disrupción de la membrana nuclear con condensación de la cromatina en la periferia y formación de cuerpos apoptóticos. Además, algunas células tratadas con RFTA y expuestas a la dosis más alta de luz (18  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) presentaron pequeñas vacuolas electrolúcidas en el citoplasma, organelas dilatadas y pérdida progresiva de la integridad de la membrana plasmática, todas ellas características de células necróticas (Figura 30). Debido a este último hallazgo, se seleccionó la dosis de 9  $\text{J}/\text{cm}^2$  en los siguientes ensayos para evaluar la muerte celular por apoptosis.

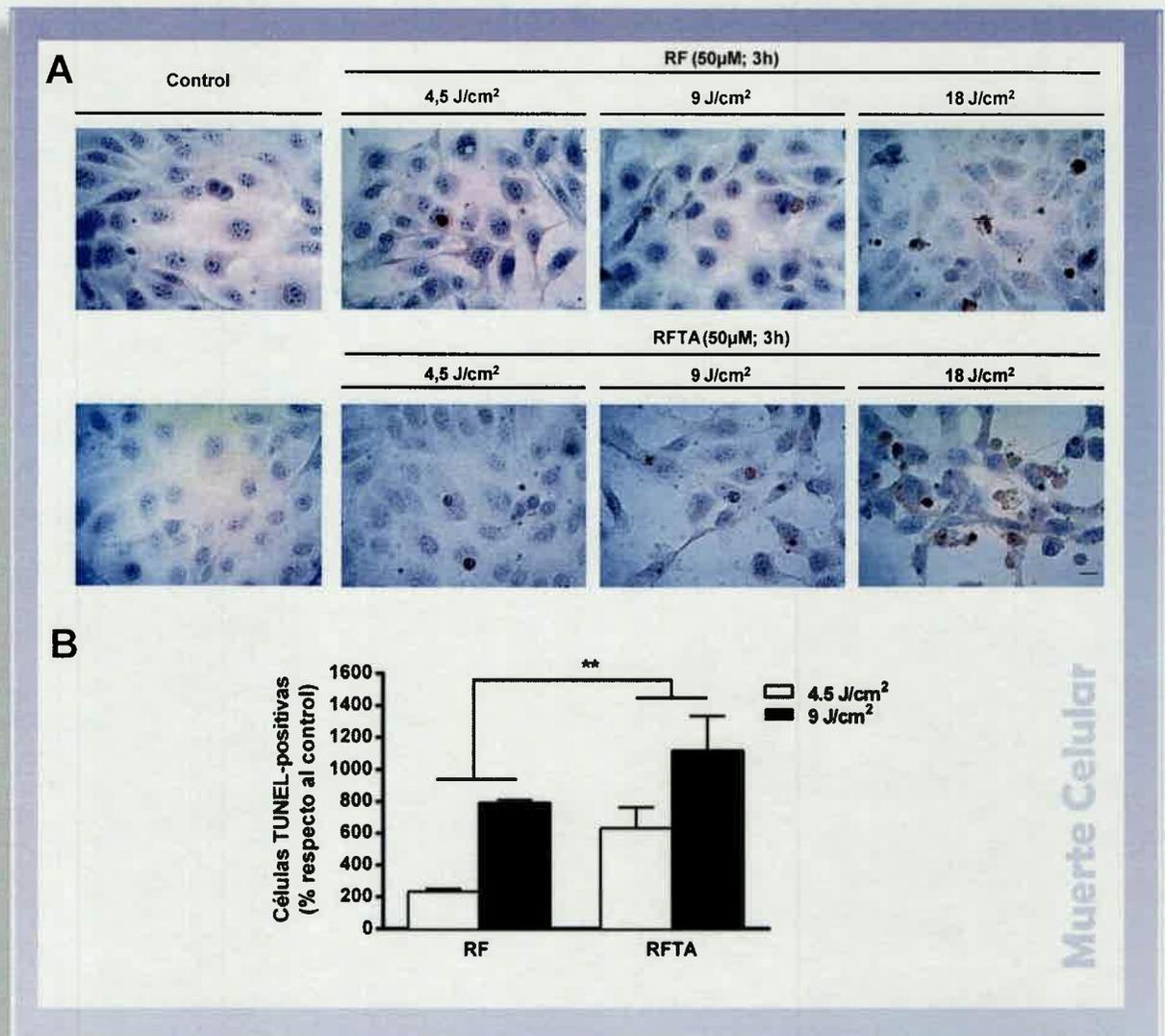


**Figura 30.** Micrografías de células SCC-13 correspondientes a los diferentes grupos experimentales, células incubadas con RF o RFTA (50  $\mu$ M) sin luz y células incubadas con RF y RFTA e irradiadas con 9 y 18 J/cm<sup>2</sup>. Barra: 2  $\mu$ m.

### 3.2.4.3 Detección de apoptosis *in situ* por método de TUNEL

Este método se utilizó para detectar la fragmentación de ADN causada por la muerte celular apoptótica. Los resultados obtenidos demostraron que en los controles no hubo presencia de células TUNEL positivas, mientras que sí se detectaron en los tratamientos fotodinámicos con ambos FS (Figura 31A); es de destacar que las células muertas se despegan del sustrato, por tal motivo la cantidad de células que se observan los tratamientos suele ser

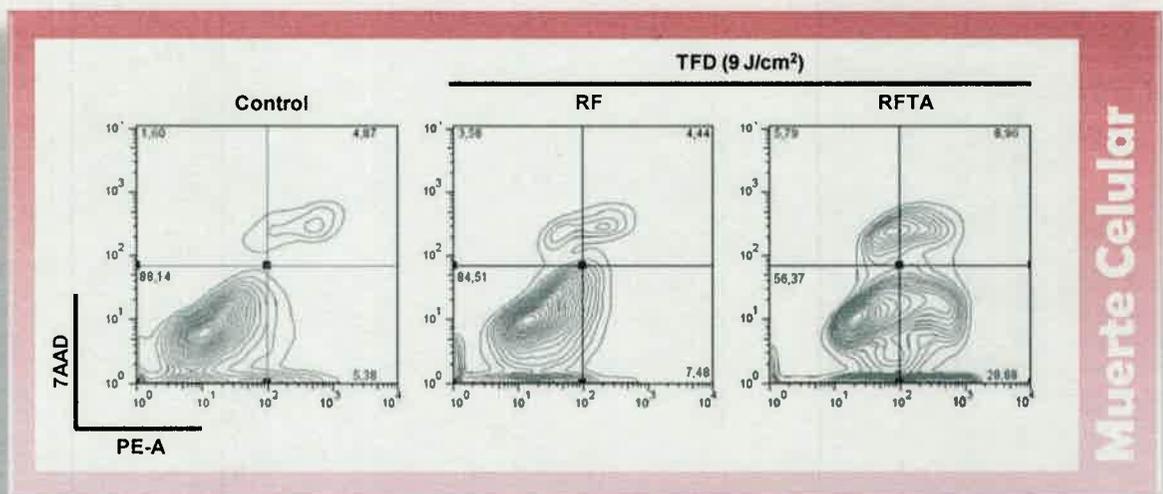
menor al control. El gráfico de la figura 31B representa un incremento de células TUNEL positivas de los diferentes tratamientos en forma dosis de luz dependiente. A su vez se aprecia que el tratamiento con RFTA generó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de las células positivas con respecto a RF en las tres dosis de irradiación evaluadas.



**Figura 31.** Células apoptóticas determinadas mediante el ensayo de TUNEL 24 h post-TFD. (A) Imágenes representativas de células TUNEL positivas (núcleos marrones) controles y sometidas a TFD con RF y RFTA e irradiadas con 9 J/cm<sup>2</sup>. Barra: 8 µm. Los datos se expresan como el número de células TUNEL positivas (% del control: ausencia de FS y la exposición a la luz) y se muestran como media ± S.E.M. ANOVA de dos vías demostrando un efecto principal del tratamiento: RF vs. RFTA [ $F_{1,11}=11,95$ ;  $p=0,0054$ ]; así como un efecto significativo de la intensidad de la luz [ $F_{1,11}=5,69$ ;  $p=0,036$ ]. *Post-hoc test* de Bonferroni: \*\* $p < 0,01$  4,5 vs. 9,0 J/cm<sup>2</sup>.

### 3.2.4.4 Externalización de fosfatidilserina en células sometidas a la TFD

Para detectar células que presentan externalización de fosfatidilserina en su membrana plasmática, indicador del proceso apoptótico, se realizó la marcación de dicho fosfolípido con anexina V unida a ficoeritrina. Los resultados obtenidos demuestran un aumento en la translocación de fosfatidilserina a las 24 h posteriores a la irradiación con dosis de  $9 \text{ J/cm}^2$  en células incubadas previamente con RFTA (28,88% células positivas para anexina V), respecto al grupo control (5,32% células positivas para anexina V. Además, conjuntamente con la marca de anexina V, hubo un aumento en la positividad para 7AAD en los tratamientos con RFTA y luz  $9 \text{ J/cm}^2$  (8,96% células positivas) en relación al grupo control donde se obtuvo un 4,79% de células positivas. El aumento de la marca simple de 7AAD en células tratadas con RFTA- $9 \text{ J/cm}^2$  indica un aumento en la cantidad de células necróticas, mientras que las células tratadas con RF- $9 \text{ J/cm}^2$  no exhibieron ninguna variación significativa en comparación con el control (Figura 32).



**Figura 32.** Cuantificación de células con externalización de la fosfatidilserina y permeabilización de la membrana plasmática posterior a la TFD. Las células se incubaron con  $50 \mu\text{M}$  de RF o RFTA y se expusieron a dosis de irradiación de  $9 \text{ J/cm}^2$ , 24 h después se realizó la cuantificación. Diagrama de contorno de células marcadas con anexina V-PE y 7AAD por citometría de flujo. El cuadrante inferior izquierdo (Anexina V-PE-/7AAD-) representa a las células viables, mientras que el cuadrante inferior derecho (Anexina V-PE+/7AAD-) y superior derecho (Anexina V-PE+/7AAD+) muestran células en apoptosis temprana y apoptosis tardía, respectivamente. El cuadrante superior izquierdo (Anexina V-PE-/7AAD+) indica células en necrosis.

### 3.2.4.5 Valoración de la participación de proteínas involucradas en el mecanismo de muerte celular

#### Clivaje de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP)

La apoptosis y la necrosis están asociadas con diferentes patrones de clivaje de distintas proteínas nucleares. Una de ellas es la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). En el proceso de apoptosis esta proteína se cliva en fragmentos de diferentes pesos moleculares, siendo el más abundante el correspondiente a los 89 kDa. Si bien durante la necrosis, la degradación de la PARP también origina productos de distintos pesos moleculares, la banda predominante corresponde a los 50 kDa [161]. Analizando el patrón de clivaje de PARP utilizando un anticuerpo específico que detecta los fragmentos de distintos pesos moleculares, se detectaron fragmentos de la holoenzima de 112 kDa, de la enzima clivada de 89 kDa y sólo débil expresión de fragmentos de 50 kDa. Como control positivo de clivaje de esta proteína, se empleó doxorubicina (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ; DL50), para lo cual las células fueron cultivadas con tal compuesto durante 24 h. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con RFTA genera clivaje de PARP, al presentar fragmentos de 89 kDa, mientras que el tratamiento con RF no genera clivaje (Figura 33).

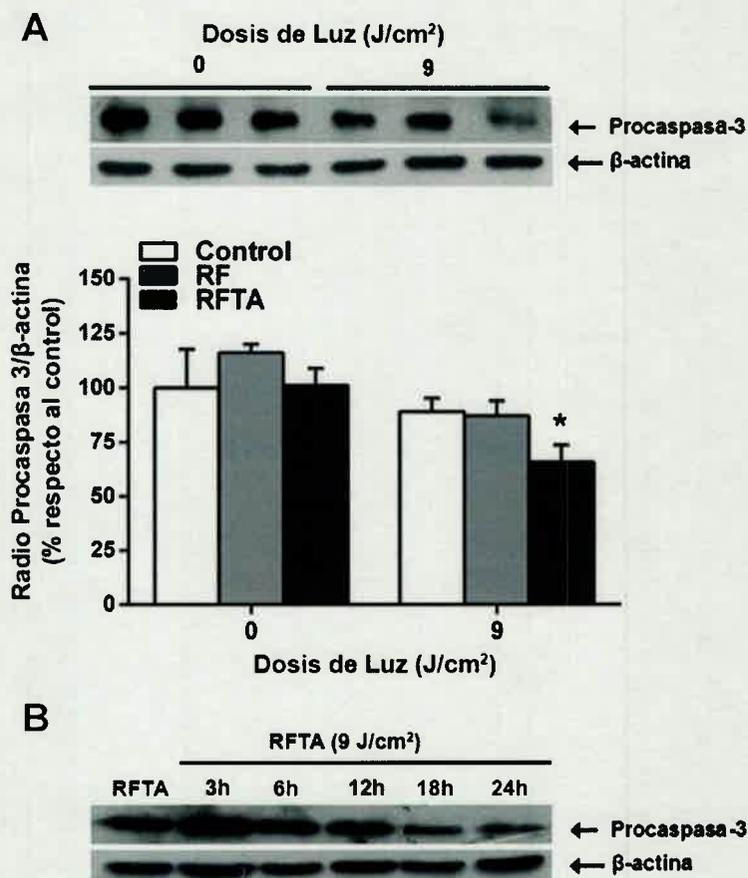


**Figura 33.** Efecto de TFD con RF y RFTA en el clivaje de PARP. Western Blot representativo de células controles, y tratadas con RF y RFTA con diferentes dosis de irradiación. Como control positivo de apoptosis las células fueron incubadas con doxorubicina (DOX) por 24 h a una concentración de 0,3  $\mu\text{g/ml}$  de medio de cultivo.  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga.

#### Activación de Caspasa-3

Con el objeto de estudiar si durante el proceso de muerte celular inducida por la TFD se produce la activación de caspasa 3, se analizó mediante la técnica de Western Blot la expresión de la forma inactiva o inmadura de caspasa-3 (procaspasa-3). Los resultados

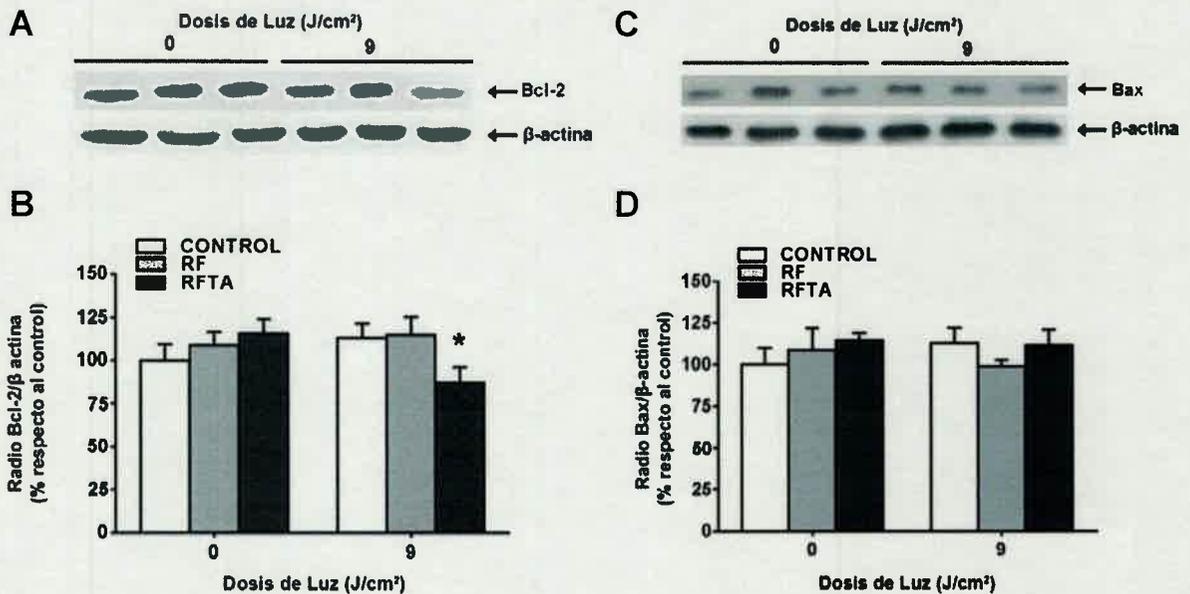
obtenidos demuestran una disminución significativa en la expresión de pro-caspasa-3 (32 kDa) en el grupo RFTA irradiados con  $9 \text{ J/cm}^2$  24 h posteriores al tratamiento, respecto a los grupos controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 34A). Este hallazgo condujo a la evaluación de la expresión de dicha proteína a las 3, 6, 12, 18 y 24 h posteriores a la irradiación para analizar en qué tiempo los niveles de pro-caspasa-3 comienzan a disminuir. Los resultados obtenidos demuestran una disminución a partir de las 12 h, la cual se torna más notoria a las 18 y 24 horas (Figura 34B).



**Figura 34.** Efecto de TFD con RF y RFTA en la activación de caspasa 3. (A) Western Blot representativo y análisis densitométrico de la expresión de procaspasa-3. Los niveles de expresión de la proteína fueron determinados por densitometría. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos independientes. ANOVA de dos vías seguido por el análisis *post-hoc test* de DGC: \* $p < 0,05$  vs. controles. (B) Western Blot representativo de la expresión de procaspasa-3, 3, 6, 12, 18 y 24 h posteriores a la irradiación.  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga.

## Expresión de Bcl-2 y Bax

La familia de proteínas Bcl-2 es considerada como uno de los principales reguladores en la ruta intrínseca del proceso apoptótico [77]. Este antecedente condujo a la evaluación de la expresión, mediante la técnica de Western Blot, de dos proteínas de esta familia: Bcl-2 y Bax. La primera con una clara función anti-apoptótica se localiza en la membrana mitocondrial externa manteniendo la integridad estas organelas e inhibe a proteínas pro-apoptóticas. De este último grupo de proteínas se analizó a Bax. Los resultados demuestran que la expresión de Bcl-2 disminuye en los tratamientos con RFTA con  $9 \text{ J/cm}^2$  comparado con los controles y con el tratamiento con RF ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se encontró alteración de la expresión de Bax en los diferentes grupos experimentales (Figura 35).

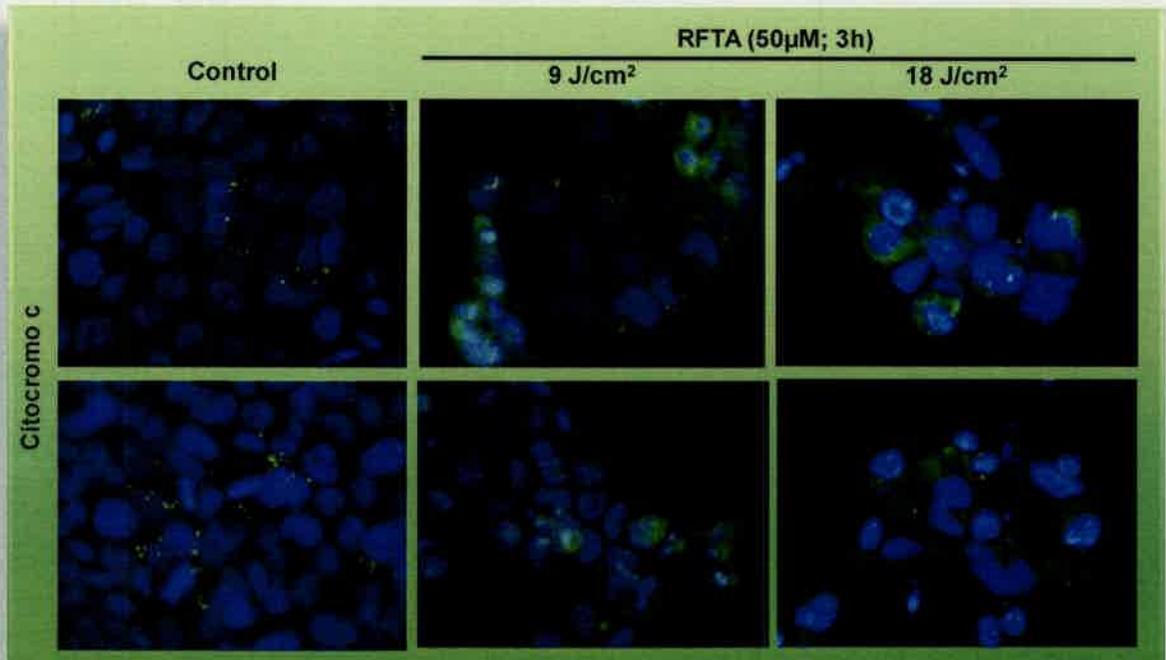


**Figura 35.** Determinación de la expresión de proteínas anti y pro-apoptóticas. (A) Western Blot representativo y (B) análisis densitométrico de la expresión de Bcl-2. (C) Western Blot representativo y (D) análisis densitométrico de la expresión de Bax en células tratadas con RF y RFTA con  $9 \text{ J/cm}^2$ , y sus respectivos controles.  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. Los niveles de expresión de las proteínas fueron determinados por densitometría. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. de 7 experimentos independientes. ANOVA de dos vías seguido por el análisis *post-hoc* de Tukey: \* $p < 0,05$  vs. control.

## Expresión de citocromo c en las células SCC-13

Las proteínas pro y anti-apoptóticas están involucradas en la regulación y formación de poros en las mitocondrias, y generan la liberación al citoplasma de diversas proteínas apoptogénicas como el citocromo c [162]. Nos propusimos evaluar la distribución de la

molécula previamente mencionada en las células tratadas con RFTA-9 y  $18 \text{ J/cm}^2$ . El tratamiento de las células neoplásicas con RFTA generó cambios en la distribución citoplasmática del citocromo c respecto al control. En este grupo la proteína de interés exhibió una localización focal, en tanto que el FS originó una distribución difusa, la que fue más notoria en células irradiadas con  $18 \text{ J/cm}^2$  (Figura 36).



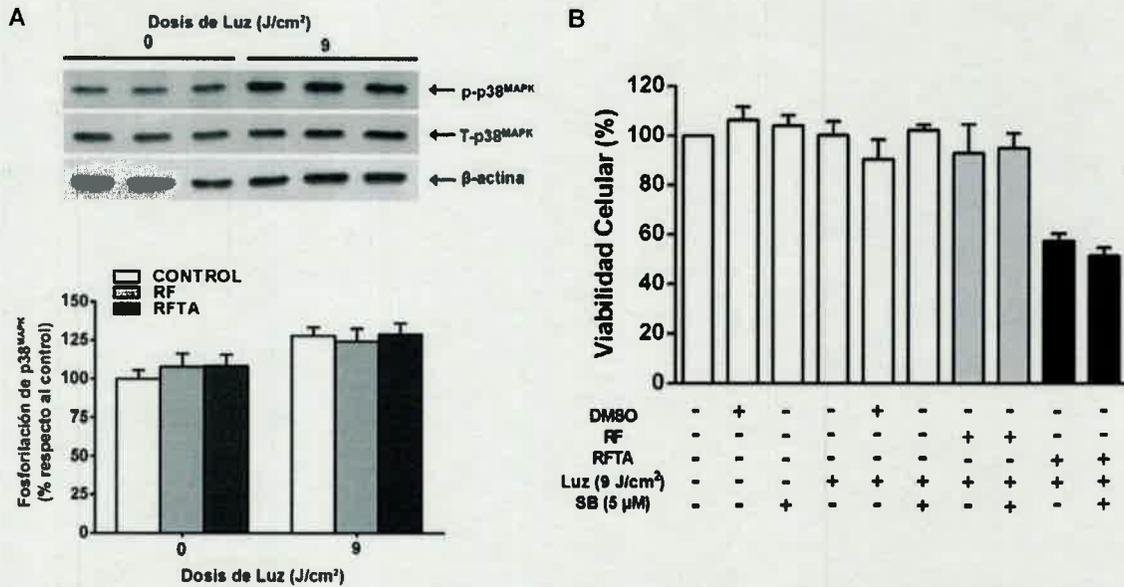
**Figura 36.** Micrografías de fluorescencia evidenciando la expresión de citocromo c en células control y tratadas con TFD-RFTA con 9 y  $18 \text{ J/cm}^2$ . Las células con fluorescencia verde difusa citoplasmática indican la liberación de citocromo c de las mitocondrias.

### Expresión de MAPKs: Participación de ERK 1/2 y $p38^{\text{MAPK}}$

Diversos sistemas de señalización celular están involucrados en los procesos de supervivencia y/o de muerte celular. En particular, se ha sugerido que las MAPKs juegan un rol fundamental en la apoptosis y en otras formas de muerte celular. Con el objetivo de analizar la posible participación de  $p38^{\text{MAPK}}$  y ERK 1/2 en el mecanismo de muerte celular que predominó en nuestros modelos experimentales, nos planteamos determinar la expresión de la forma fosforilada de estas proteínas ( $p\text{-}p38^{\text{MAPK}}$  y  $p\text{-ERK 1/2}$ ).

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de  $p\text{-}p38^{\text{MAPK}}$  no evidenció cambios significativos en cuanto a su expresión en células SCC-13 tratadas con FS e irradiadas con dosis de luz de  $9 \text{ J/cm}^2$  (Figura 37A). Para corroborar que esta proteína no está involucrada en la respuesta de las células a la TFD, empleamos un inhibidor de la actividad catalítica de

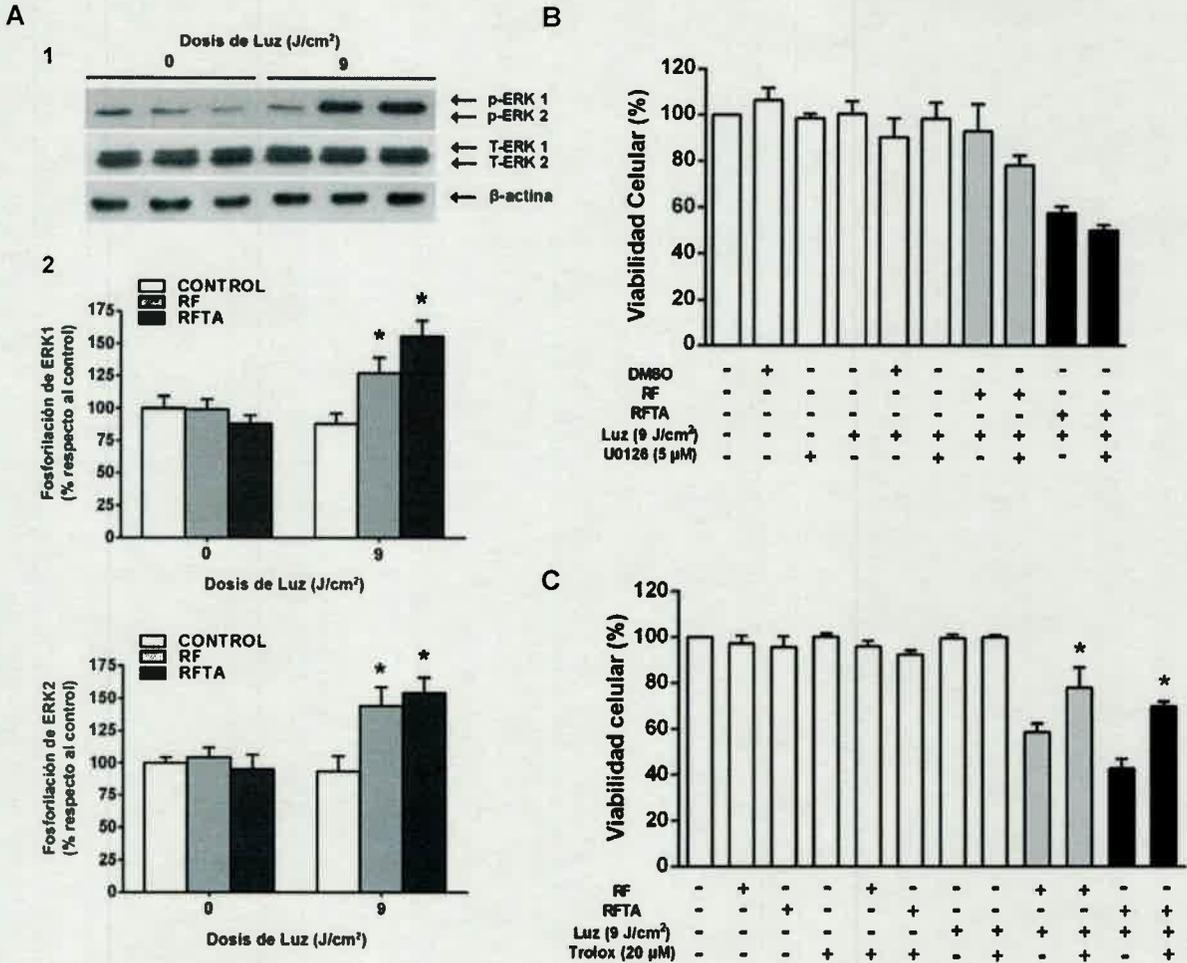
p38<sup>MAPK</sup> denominado SB203580 (5μM) durante 3h previo a la irradiación. La viabilidad celular fue evaluada 24h posterior al tratamiento, no observándose cambios en las células tratadas con TFD (RF o RFTA) con y sin inhibidor (Figura 37B).



**Figura 37.** Análisis por Western blotting de p38<sup>MAPK</sup> total y fosforiladas en células SCC-13 mediada por los FS con o sin irradiación. (A) Western Blot representativo y análisis densitométrico de la expresión de p-p38<sup>MAPK</sup> y total-p38<sup>MAPK</sup>. Los niveles de fosforilación fueron determinados por análisis densitométrico de la banda fosforilada sobre la banda total y los datos fueron expresados como porcentaje del control. β-actina fue utilizada como control de carga. Los datos representan la media ± S.E.M. de 7 experimentos independientes. (B) Viabilidad de las células SCC-13 luego de 3 h de incubación con RF y RFTA, incubadas con SB203580 (5μM) inhibidor de la actividad catalítica de p38<sup>MAPK</sup>.

Por otro lado se evaluó si las ERK 1/2 cambian sus niveles de expresión en la forma fosforilada luego del tratamiento, para evaluar su participación en el proceso de muerte observada. Los resultados indicaron un aumento significativo de p-ERK 1/2 en las células tratadas con TFD-RFTA y TFD-RF después de la irradiación con luz a 9 J/cm<sup>2</sup> respecto a los diferentes controles (p<0,05) (Figura 38A). Posteriormente se realizó el estudio de la viabilidad celular de los diferentes tratamientos incubando las células tumorales con un inhibidor de MEK 1/2, U0126 (5μM) (Figura 38B). Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de la vía ERK 1/2 no sería la responsable directa de la muerte celular observada, sino un sistema de defensa celular contra la toxicidad generada por la TFD. Por tal motivo, se planteó evaluar si las ERO generadas por la TFD serían las responsables de la muerte celular observada evaluando la viabilidad celular luego de la inhibición de la producción de ERO con

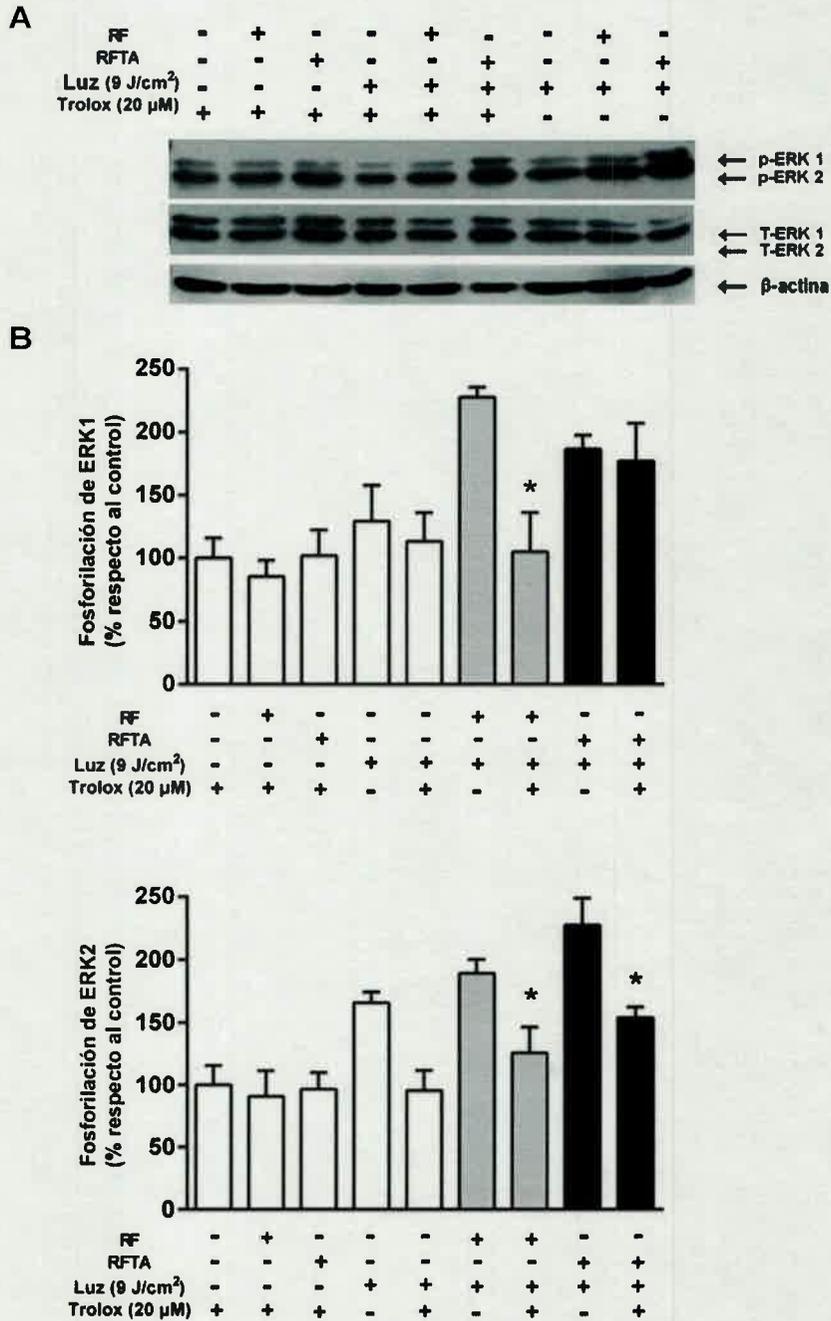
un antioxidante Trolox (20 $\mu$ M) (Figura 38C). Los resultados obtenidos demuestran que las células incubadas con el antioxidante presentan un porcentaje de células viables mayor a las células sometidas a la TFD sin el antioxidante. Lo que nos permite concluir que las ERO son las responsables de la toxicidad celular.



**Figura 38.** Análisis por Western blotting de ERK 1/2 total y fosforilada en células SCC-13 mediada por los FS con o sin irradiación. (A) (1) Western Blot representativo y (2) análisis densitométrico de la expresión de p-ERK 1, total-ERK 1, p-ERK 2, total-ERK 2. Los niveles de fosforilación fueron determinados por análisis densitométrico de la banda fosforilada sobre la banda total y los datos fueron expresados como porcentaje del control.  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de 7 experimentos independientes. (B) Estudio de la viabilidad celular de los diferentes tratamientos incubados con U0126 (5 $\mu$ M) inhibidor de MEK 1/2 y (C) con el compuesto antioxidante Trolox (20 $\mu$ M). \* $p$ <0,05 indica diferencia significativa del control, RF, RFTA e irradiación (9 J/cm<sup>2</sup>), por ANOVA de dos vías seguido por el análisis *post-hoc* de Tukey, \* $p$ <0,05 indica diferencia significativa de RF-Luz comparado con RF-Luz-Trolox, y RFTA-Luz comparado con RFTA-Luz-Trolox, por *T-test-t* de Student, inferencia basada en dos muestras.

Posteriormente se planteo evaluar si las ERO producidas por la TFD, participarían en la activación de las ERK 1/2 (Figura 39). Para ello, se incubaron las células con el antioxidante

Trolox y se evaluó la expresión de p-ERK 1/2. Los resultados obtenidos demuestran que las células con la pre-incubación del antioxidante y posterior a la TFD-RF expresan niveles menores de p-ERK 1 y p-ERK 2 en las células sometidas a la TFD sin el antioxidante. Mientras células tratadas con TFD-RFTA expresan sólo p-ERK 2 en niveles menores a las células sometidas a la TFD sin el antioxidante. Lo que nos indica que las ERO serian las responsables de la activación de la ERK 1/2 al menos en forma parcial.



**Figura 39.** Análisis por Western blotting de ERK 1/2 total y fosforilada en células SCC-13, luego del tratamiento con los FS con o sin irradiación en presencia de un agente antioxidante. (A) Western Blot

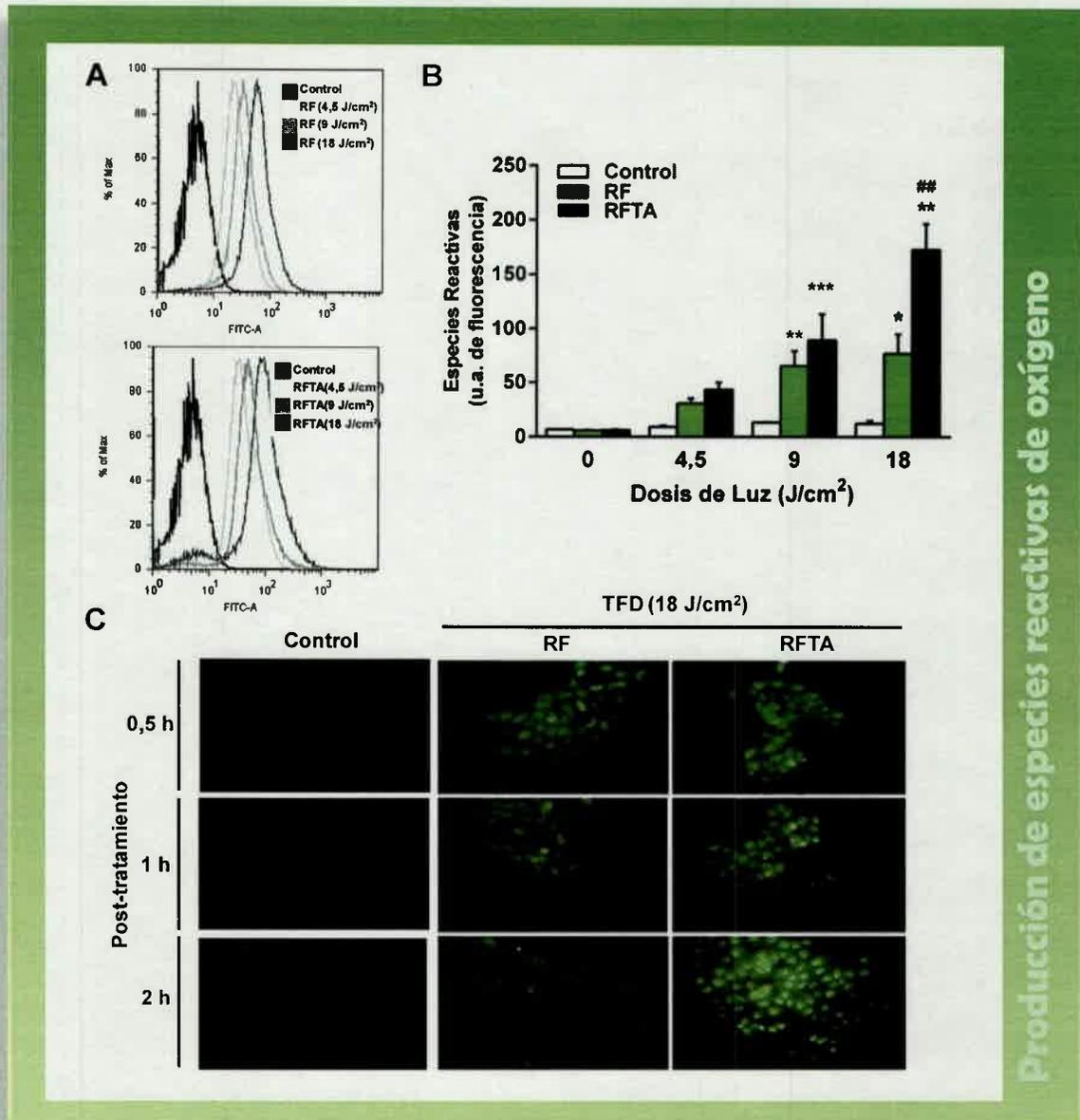
representativo y (B) análisis densitométrico de la expresión de p-ERK 1, total-ERK 1, p-ERK 2, total-ERK 2. Los niveles de fosforilación fueron determinados por análisis densitométrico de la banda fosforilada sobre la banda total y los datos fueron expresados como porcentaje del control.  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de 7 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  indica diferencia significativa del control, RF, RFTA e irradiación ( $9 \text{ J/cm}^2$ ), por ANOVA de dos vías seguido por el análisis *post-hoc* de Tukey, • $p < 0,05$  indica diferencia significativa de RF-Luz comparado con RF-Luz-Trolox, y RFTA-Luz comparado con RFTA-Luz-Trolox, por *Test- t* de Student, inferencia basada en dos muestras.

### 3.2.5 Terapia fotodinámica y la relación con las ERO

#### 3.2.5.1 Producción intracelular de ERO

Para determinar si la fotoactivación de los FS genera un aumento en la producción de ERO intracelular se empleó el colorante fluorescente DCF-DA. La intensidad de fluorescencia fue evaluada por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia. El análisis de citometría de flujo mostró que en las células tratadas con TFD el pico de la señal se desplaza hacia la derecha indicando un aumento de la intensidad de fluorescencia de DCF-DA en comparación con las células control; además el aumento en la producción de ERO esta en correlación con el incremento de las dosis de luz aplicada en presencia de los FS. Sin embargo, el aumento de la intensidad de fluorescencia es mayor en las células tratadas con RFTA en comparación con las células tratadas con RF (Figura 40A).

Las células control luz (células irradiadas con las diferentes dosis de luz  $4,5, 9$  y  $18 \text{ J/cm}^2$  sin FS), no presentaron incremento en la intensidad de fluorescencia, indicando que la luz por sí sola no estimula un aumento en la producción de ERO intracelular (Figura 40B). Estos resultados se correlacionaron con los observados por microscopía de fluorescencia. Las células tratadas con RF- $18 \text{ J/cm}^2$  presentaron fluorescencia de DCF-DA a los 30 min la cual disminuye a las 2 h. A diferencia de este resultado las células tratadas con RFTA- $18 \text{ J/cm}^2$  mostraron un notable aumento de fluorescencia a los 30 min, la cual va aumentando hacia las 2 h posteriores a la irradiación (Figura 40C).

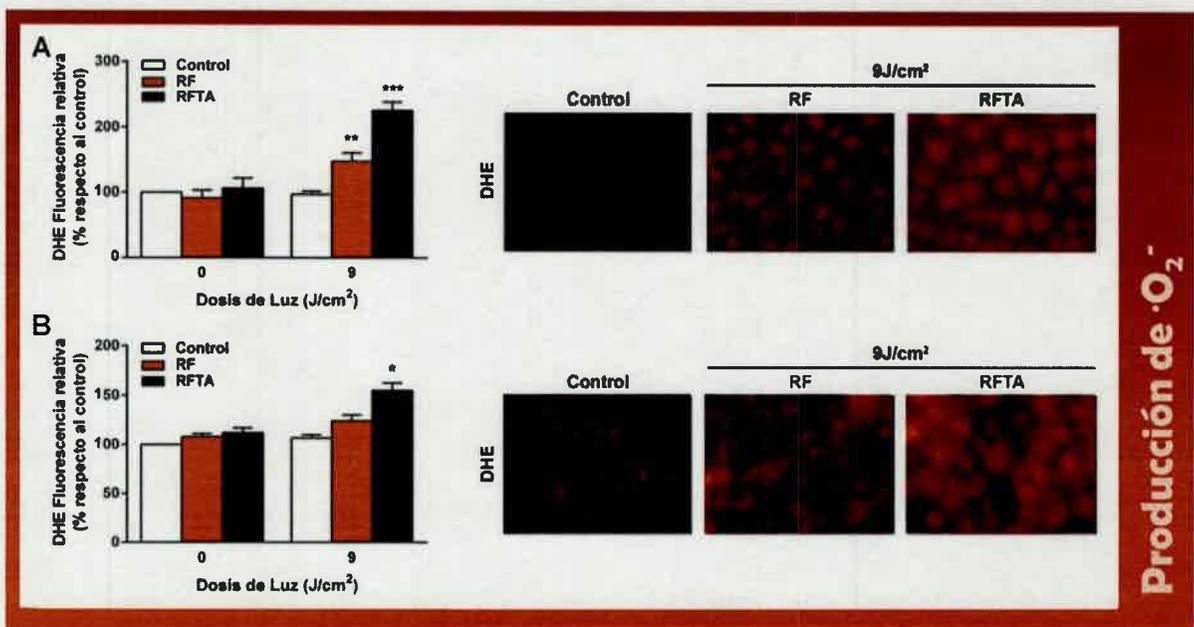


Producción de especies reactivas de oxígeno

**Figura 40.** Producción intracelular de especies reactivas de oxígeno en células SCC-13 posterior a la TFD. (A) Análisis por citometría de flujo de DCF-DA. (B) Intensidad de fluorescencia media de DCF-DA después de la TFD con RF o RFTA con diferentes dosis de luz (4,5, 9 o 18 J/cm<sup>2</sup>). ANOVA de dos vías, control vs. RF vs. RFTA [ $F_{2,18}=10,99$ ;  $p=0,0008$ ], y efecto de la intensidad de la luz: 0 vs. 4,5 vs. 9,0 J/cm<sup>2</sup>, [ $F_{2,18}=19,75$ ;  $p<0,0001$ ]. Además, hubo una interacción significativa entre el compuesto y la intensidad de la luz [ $F_{4,18}=4,07$ ;  $p=0,0159$ ], indicando que el efecto de los FS en la generación de ERO depende de la intensidad de la luz. *Post-hoc test* de Bonferroni: \*\* $p<0,01$  y \*\*\* $p<0,001$  vs. control en las mismas condiciones de intensidad de luz. (C) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia donde se evidencia la expresión de ERO luego de la aplicación de la TFD con RF o RFTA.

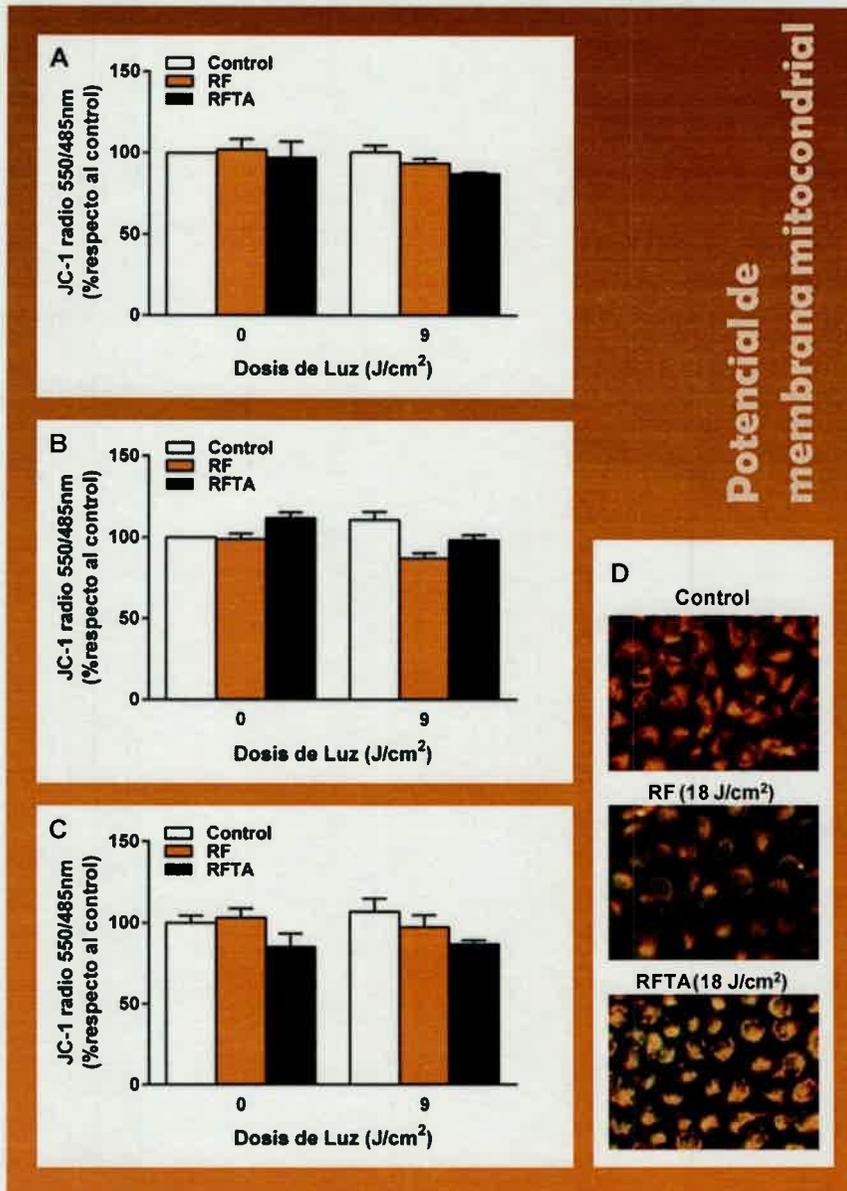
### 3.2.5.2 Producción de anión superóxido citoplasmático

La evaluación de la producción de anión superóxido citoplasmático, mostró un aumento significativo en la producción del mismo a las 6 h posteriores a los tratamientos con TFD con RF ( $p < 0,05$ ) y con RFTA ( $p < 0,01$ ) respecto a los controles (Figura 41), mientras que a las 12 h de finalizado el tratamiento, se observó un aumento significativo sólo en las células tratadas con RFTA-9  $J/cm^2$  ( $p < 0,05$ ).



### 3.2.5.3 Potencial de membrana mitocondrial

La generación de ERO por parte de las mitocondrias se encuentra íntimamente relacionada con el  $\Delta\Psi_m$  [153]. Al determinar que la TFD genera aumento en los niveles de ERO, se evaluó si el tratamiento provoca alguna modificación en el  $\Delta\Psi_m$ , empleando como indicador la sonda fluorescente JC-1, debido a su capacidad para detectar posibles cambios de dicho potencial en células vivas.



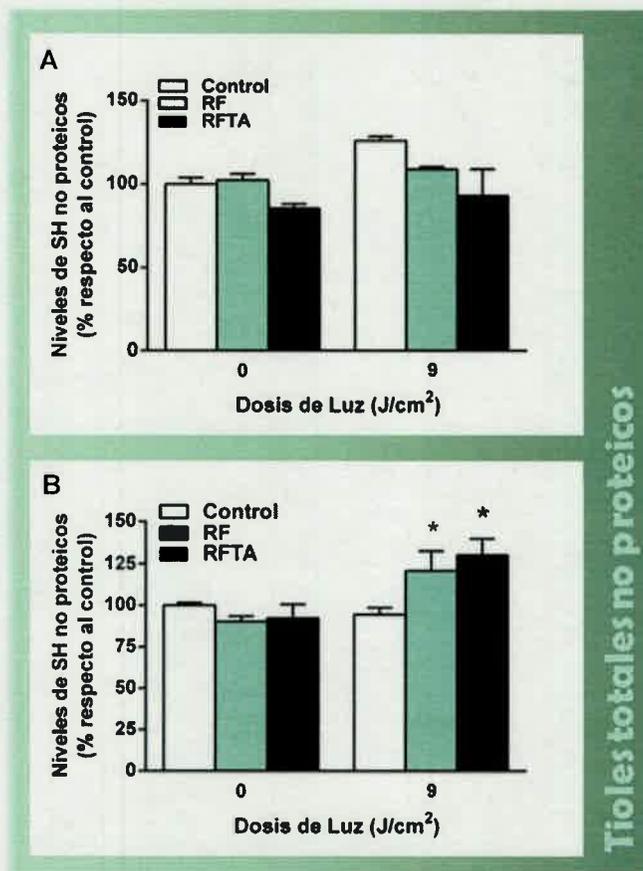
**Figura 42.** Efecto de la TFD en el  $\Delta\Psi_m$  mitocondrial de células SCC-13. La fluorescencia roja representa la forma agregada mitocondrial de JC-1, lo que indica intacto  $\Delta\Psi_m$  y fluorescencia verde representa la forma monomérica de JC-1, lo que indica la disipación de  $\Delta\Psi_m$ . Relación de la intensidad de fluorescencia rojo/verde, 3(A), 6 (B) y 12 (C) h posteriores a los tratamientos. (D) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia que muestran la colocalización de la fluorescencia roja y verde de JC-1 en células control, tratadas con RF-9 J/cm<sup>2</sup> y con RFTA-9 J/cm<sup>2</sup>, 12 h posteriores a los tratamientos. ANOVA de una vía seguido por el análisis *post-hoc* de Tukey.

El  $\Delta\Psi_m$  en las células neoplásicas fue similar en los controles y en los tratamientos, a las 3, 6 y 12 h posteriores a la irradiación (Figura 42). Es decir que los tratamientos con TFD, ya sean con RF como con RFTA, no indujeron un aumento en las regiones despolarizadas

indicadas por la desaparición de la fluorescencia roja, y por el aumento en la fluorescencia verde comparadas con los controles. Las imágenes observadas por microscopía de fluorescencia a las 12 h muestran una distribución homogénea y similar de la fluorescencia roja y verde en todos los tratamientos.

#### 3.2.5.4 Presencia de tioles totales no proteicos (NPSH)

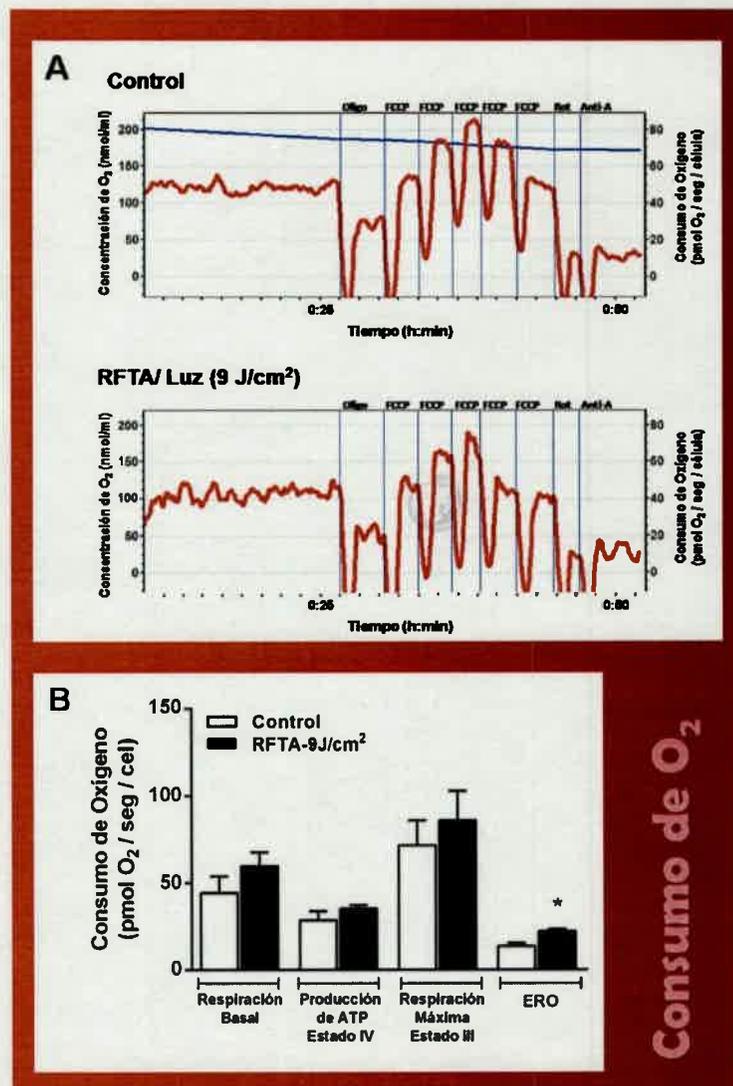
El glutatión es uno de los antioxidantes más importante en los sistemas biológicos, por lo cual se realizó la medición de grupos tioles no proteicos (NPSH), ya que la disminución en sus niveles es indicativo de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos demostraron que 3 h posteriores a la irradiación, las células tumorales no presentaron cambios en los niveles de NPSH en ningún tratamiento respecto a los controles. Este hallazgo condujo a evaluar nuevamente dicho parámetro a las 14 h, para analizar si dichos niveles podrían variar en el tiempo. De esta manera se demostró que tanto los tratamientos con RF-9 J/cm<sup>2</sup> como con RFTA-9 J/cm<sup>2</sup>, generan un aumento en los niveles de SH ( $p < 0,05$ ) (Figura 43), a pesar de haber observado previamente que dichos tratamientos estimulan la producción de ERO intracelulares.



**Figura 43.** Niveles de SH mitocondriales determinados como grupos tioles no proteicos (NPSH). El contenido de NPSH en la condición control, fue de  $15,77 \pm 1,07$  nmol/mg de proteína, 3 h posteriores al tratamiento y a las 14 h de  $25,53 \pm 0,68$  nmol/mg de proteína. Los datos se expresan en niveles de NPSH (% respecto al control) y se presentan como media  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ;  $n = 6$ ). \* $p < 0,05$  indica diferencia estadística con respecto a los controles, ANOVA de dos vías seguido por el análisis *post-hoc* de Tukey.

### 3.2.5.5 Efecto de la RFTA-9 J/cm<sup>2</sup> sobre la fisiología mitocondrial

A los fines de analizar la integridad mitocondrial se evaluó su respiración mediante respirometría de alta resolución. Los resultados obtenidos demuestran que la TFD con RFTA-9 J/cm<sup>2</sup> no generó efecto significativo sobre la respiración basal de las células SCC-13 controles y tratadas, ni causó cambios en el consumo de oxígeno en el estado IV de la respiración, el cual fue medido luego de la adición de oligomicina: inhibidor del complejo V (Figura 44A).



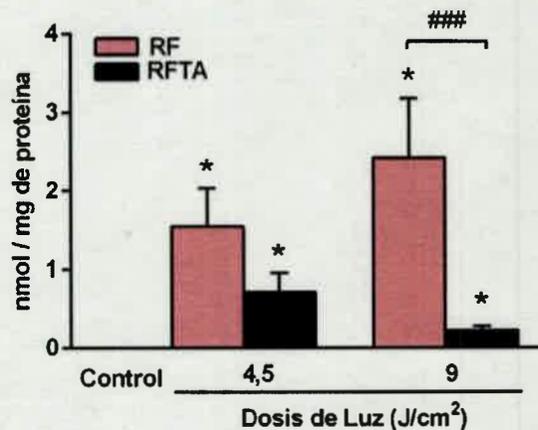
**Figura 44.** Efecto de la TFD con RFTA-9 J/cm<sup>2</sup> sobre el consumo de oxígeno mitocondrial en células SCC-13. (A) Gráfico representativo de la respiración mitocondrial de células control y tratadas con RFTA-9 J/cm<sup>2</sup>. La línea azul representa la concentración de oxígeno (nmol/ml), mientras que la línea roja representa la respiración mitocondrial (pmol O<sub>2</sub>/seg/célula). (B) Cuantificación del consumo de oxígeno de la respiración mitocondrial en estado basal, estado IV, estado III (respiración celular máxima) y en la generación de especies reactivas de oxígeno extra-mitocondrial. Los datos

representan la media  $\pm$  S.E.M. (n=3 experimentos independientes). ANOVA de una vía seguido por el análisis *post-hoc* de Tukey: \* $p < 0,05$  vs. control.

Además, luego del tratamiento con RFTA-9 J/cm<sup>2</sup> la respiración mitocondrial máxima (Estado III), inducida por la adición del desacoplante FCCP, no fue modificada. Mientras que el tratamiento si generó un aumento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno, comparado con el control ( $p < 0,05$ ) (Figura 44B).

### 3.2.5.6 Efecto de la Terapia fotodinámica sobre la oxidación de proteínas

Para evaluar si las ERO generan daño en macromoléculas, determinamos el efecto de la TFD sobre proteínas, en células controles y en células tratadas con RF y RFTA, con 4,5 y 9 J/cm<sup>2</sup>. Los datos obtenidos reflejan un aumento en el contenido de los grupos carbonilos de todos los tratamientos evaluados con respecto a los controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 45). Mientras que se observó una diferencia entre los tratamientos de RF y RFTA con la dosis de luz de 9 J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0,001$ ), destacándose el valor de grupos carbonilos mayor para RF.



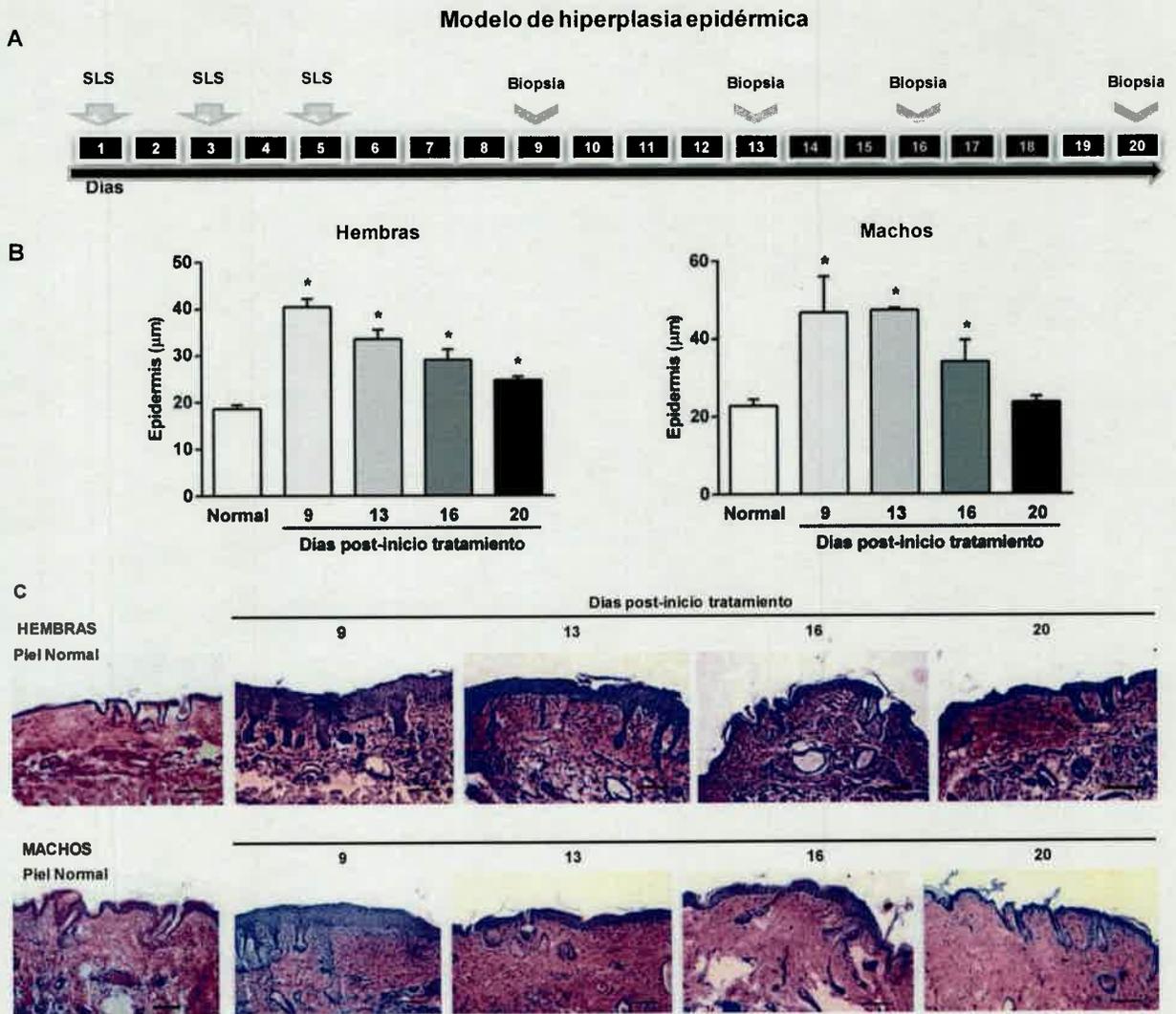
**Figura 45.** Efecto de la TFD sobre el contenido de proteínas carboniladas en células SCC-13. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. ANOVA de una vía seguido por el análisis *post-hoc* de Tukey: \* $p < 0,05$  vs. control; ### $p < 0,001$  vs. RFTA.

## 3.3. EFECTO DE LA TFD CON RFTA EN MODELOS *IN VIVO*

### 3.3.1 Generación de hiperplasia epidérmica por dermatitis de contacto química

En una primera etapa, se realizó la puesta a punto del modelo de hiperplasia epidérmica en ratones alopecicos machos y hembras de la cepa SKH-1-hrBR. Determinamos que el cambio epidérmico antes mencionado se logra con 3 aplicaciones tópicas de SLS al 10%, siendo máxima el 9 d.

Además, nos planteamos estudiar la regresión espontánea de la hiperplasia epidérmica una vez suspendido el estímulo. Los resultados demostraron que en ratones de ambos sexos, la epidermis ( $\mu\text{m}$ ), disminuye en forma espontánea en el tiempo. No obstante, la epidermis continua presentando diferencias respecto al control el día 20 en hembras y hasta el día 16 en machos ( $*p<0,05$ ) (Figura 46).

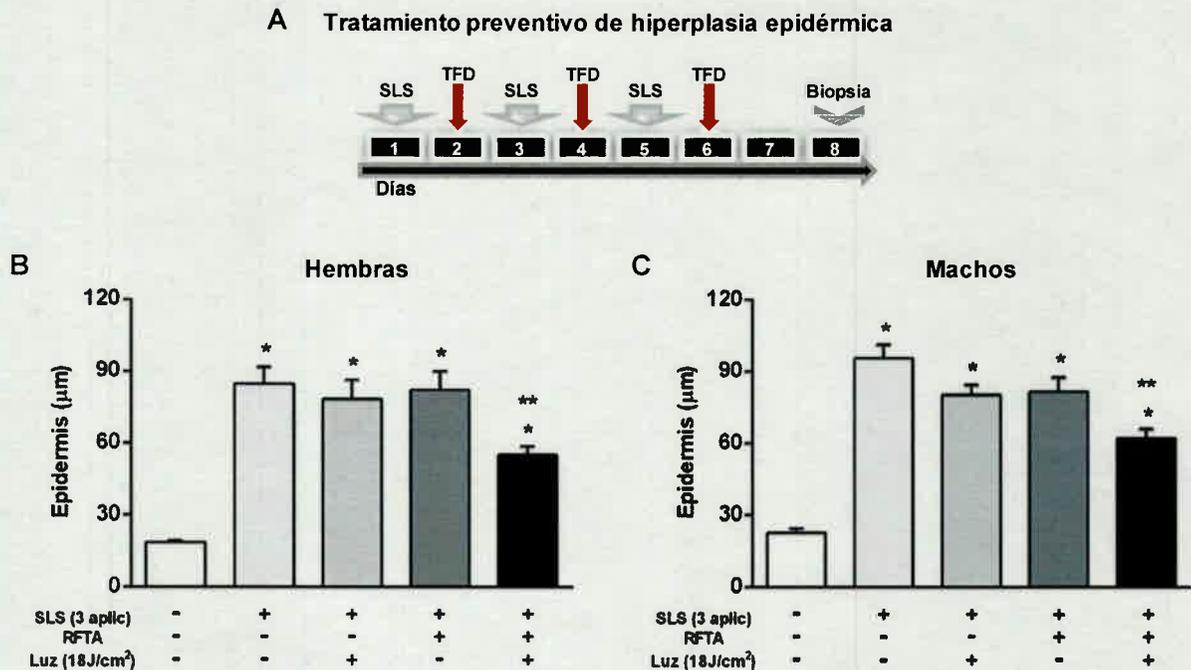


**Figura 46.** Modelo de hiperplasia epidérmica. Esquema representativo del modelo empleado para el estudio de la reversión hiperplásica generada por la ausencia del estímulo SLS. Medición del espesor en  $\mu\text{m}$  de la epidermis de ratones y microfotografías representativas de las diferentes condiciones en hembras (A) y en machos (B). 9, 13, 16, y 20 d posteriores al inicio del tratamiento con SLS. Barra:  $100 \mu\text{m}$ . Los datos representan la media  $\pm$  D.E. ANOVA de una vía seguido por el análisis *post-hoc test* DGC:  $*p<0,05$  vs. piel de ratones normales.

### 3.3.1.2 Efecto de la TFD-RFTA como tratamiento preventivo de la hiperplasia epidérmica

Una vez establecidas las condiciones óptimas que generan la hiperplasia epidérmica en los ratones de ambos sexos, nos planteamos evaluar el efecto de la TFD con RFTA como posible tratamiento preventivo de tal lesión, ya que los ensayos *in vitro* nos permitieron inferir que RFTA sería un FS más eficaz que RF, al generar apoptosis en las células tumorales al ser irradiados con dosis más bajas de luz. Para realizar este análisis se intercaló la aplicación de la TFD con el estímulo de SLS durante 6 d y posteriormente, se evaluó el espesor de la epidermis el octavo día (Figura 47A).

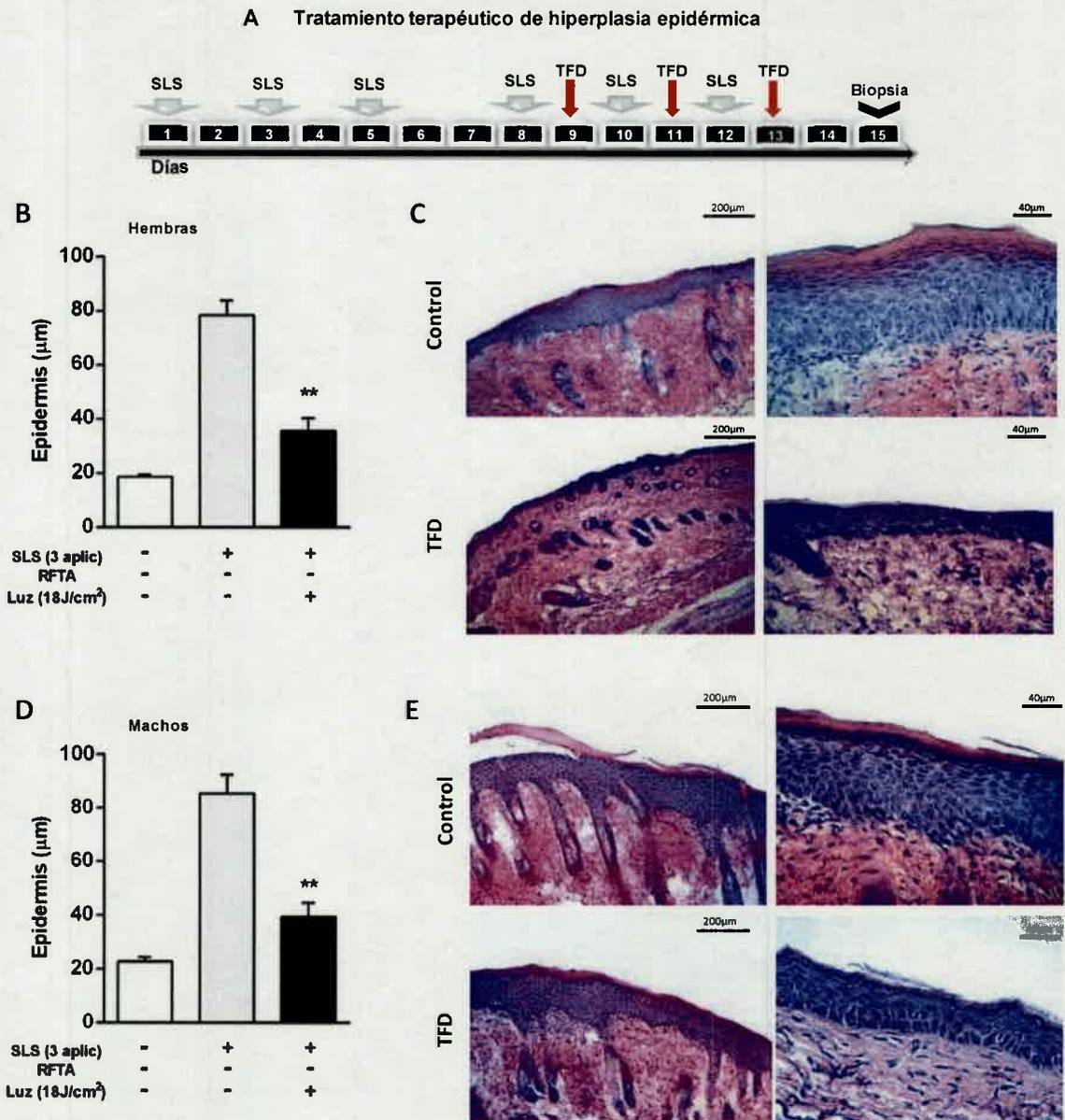
Se demostró que la sola aplicación de RFTA o de luz ( $18 \text{ J/cm}^2$ ) en animales estimulados con SLS, no generó cambios en el espesor de la epidermis, mientras que la TFD atenuó la proliferación inducida por SLS en ratones de ambos sexos, corroborando que es necesaria la combinación del FS y la luz para originar la reacción fotoquímica responsable de la disminución de la proliferación (Figura 47B-C).



**Figura 47.** Variación en el espesor de la epidermis en ratones tratados con la TFD-RFTA como tratamiento preventivo en un modelo de hiperplasia epidérmica. (A) Esquema del modelo empleado. Medición del espesor de la epidermis normal e hiperplásica ( $\mu\text{m}$ ) de ratones hembras (B) y machos (C) tratados con RFTA, luz ( $18 \text{ J/cm}^2$ ) y RFTA-luz. ANOVA de una vía seguido por el análisis *post-hoc* test de Tukey: \* $p < 0,01$  vs. SLS, SLS-Luz, SLS-RFTA.

### 3.3.1.3 Efecto de la TFD-RFTA como tratamiento terapéutico de hiperplasia epidérmica

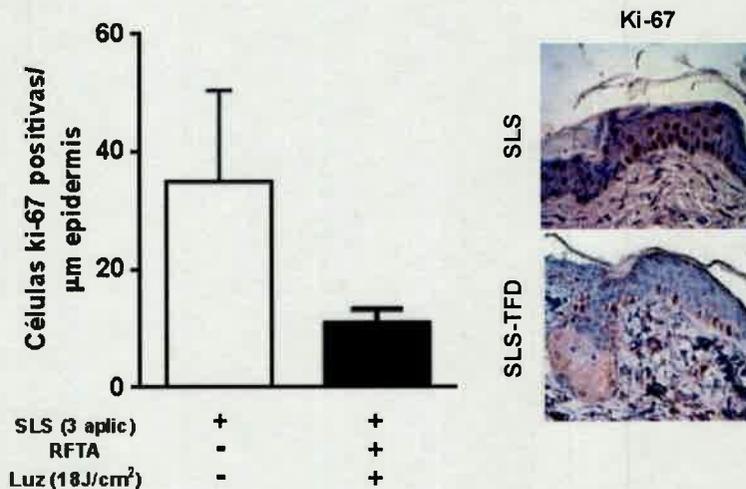
En segunda instancia, nos planteamos analizar el efecto de la TFD con RFTA como tratamiento terapéutico una vez establecida la hiperplasia epidérmica. En este modelo se mantuvo el estímulo para contrarrestar la regresión espontánea de la epidermis. Luego de realizar por tercera vez la TFD, el día 15 se evaluó el espesor de la epidermis de los diferentes tratamientos (Figura 48A). La aplicación tópica de RFTA y posterior irradiación (18 J/cm<sup>2</sup>) disminuyó el espesor de la epidermis en un 53,94% en los ratones machos y en 54,71% en hembras alcanzando valores cercanos a los de la piel de ratones controles (Figura 48B-D). La figura 48 y muestran imágenes representativas de la piel de los animales hembras (C) y machos (E) a diferentes aumentos en condición control y tratadas con la terapia.



**Figura 48.** Variación en el espesor de la epidermis en ratones tratados con la TFD. (A) Esquema de la generación de la hiperplasia epidérmica, con posterior mantenimiento y aplicación de la TFD. Análisis del espesor de la epidermis y microfotografías representativas de hembras (B-C) y machos (D-E). Se observa claramente que en los animales sometidos a la TFD la epidermis es más delgada que en los animales tratados sólo con SLS. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. ANOVA de una vía seguido por el análisis *post-hoc test* de Tukey: \*\* $p < 0,01$  vs. SLS.

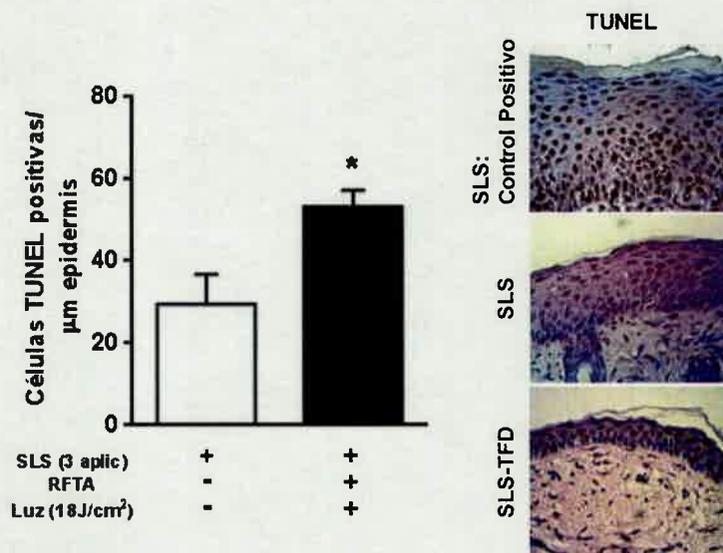
### 3.3.1.4 Efecto de la TFD sobre la proliferación y muerte celular en un modelo de hiperplasia epidérmica

Considerando que la TFD genera disminución de la hiperplasia epidérmica, se valoró la proliferación y la muerte de las células de esta capa de la piel luego del tratamiento terapéutico con RFTA-18 J/cm<sup>2</sup>. La evaluación de la proliferación fue realizada mediante la determinación inmunohistoquímica de Ki-67 en ratones hembras con hiperplasia epidérmica establecida y luego de la aplicación de la TFD. El análisis de la expresión de tal marcador, mostró que la TFD no generó cambios significativos en la tasa de proliferación respecto a la epidermis hiperplásica de ratones que no recibieron la TFD. No obstante, se observó una tendencia a la disminución del número de células Ki-67 positivas en los animales tratados con la TFD (Figura 49).



**Figura 49.** Efecto de la TFD sobre la proliferación celular en un modelo de hiperplasia epidérmica. Cuantificación de células Ki-67 positivas y microfografías representativas de epidermis de ratones tratados con SLS (Control de hiperplasia) y SLS-TFD. Se observan en marrón los núcleos positivos para Ki-67.

También, en estos mismos diseños experimentales se evaluó la muerte celular por inmunomarcación con la técnica de TUNEL. Los resultados revelaron un aumento significativo de las células TUNEL positivas luego de la aplicación de TFD en ratones hembras con hiperplasia epidérmica en comparación con los ratones afectados con la misma lesión cutánea y que no recibieron el tratamiento ( $p < 0,05$ ) (Figura 50). Estos hallazgos analizados en conjunto nos permiten inferir que la reversión del fenómeno hiperplásico luego de la aplicación de la TFD fue debido a una disminución de la proliferación celular con un aumento de la muerte celular provocados por el tratamiento.

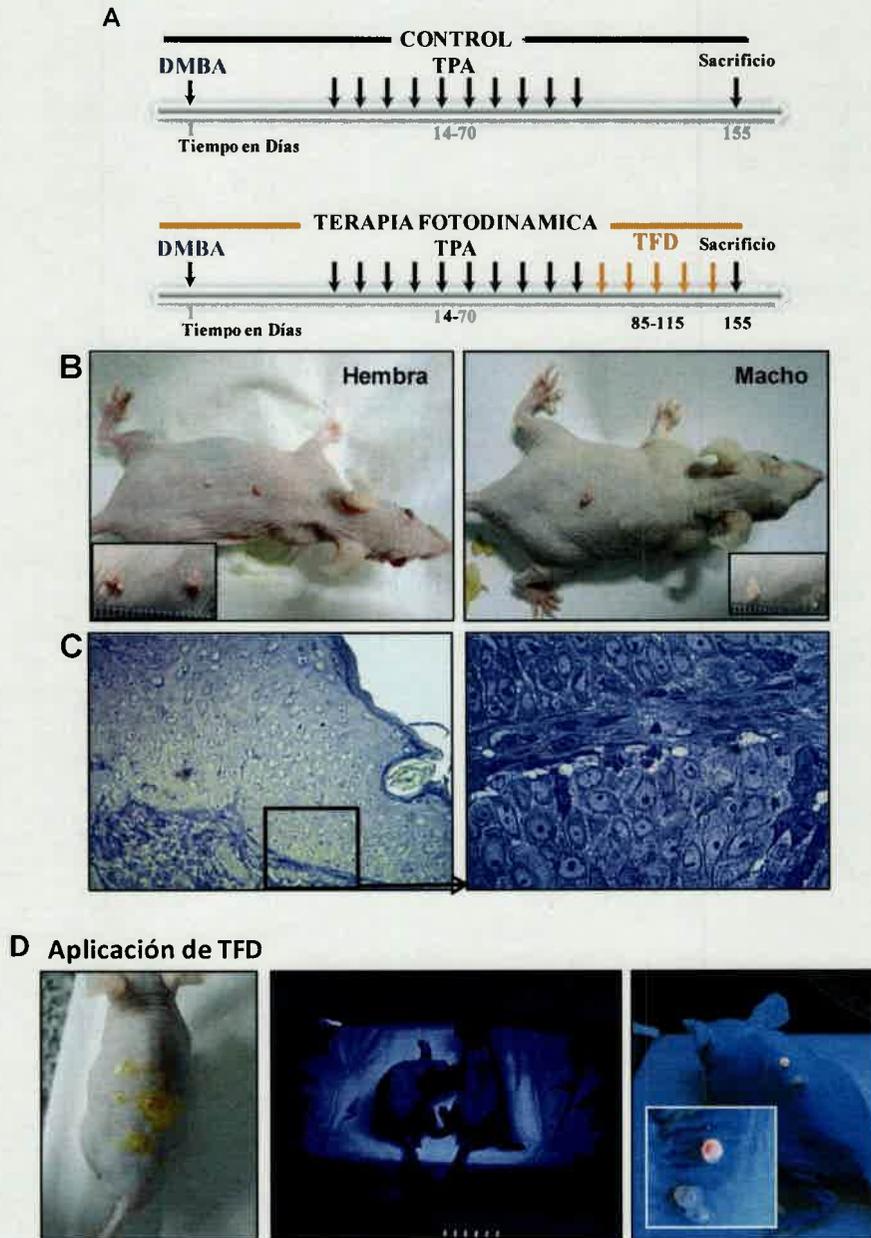


**Figura 50.** Efecto de la TFD sobre la muerte celular en un modelo de hiperplasia epidérmica. Cuantificación de células TUNEL positivas expresada en porcentaje por  $\mu\text{m}$  de epidermis de ratones tratados con SLS y tratados con SLS-TFD (RFTA-18  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Micrografías representativas de epidermis de ratones tratados con SLS y con SLS-TFD. Se observan en marrón los núcleos TUNEL positivos. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. Test- *t* de Student para muestras independientes: \* $p < 0,05$  vs. control.

### 3.3.2 Modelo experimental de papiloma cutáneo

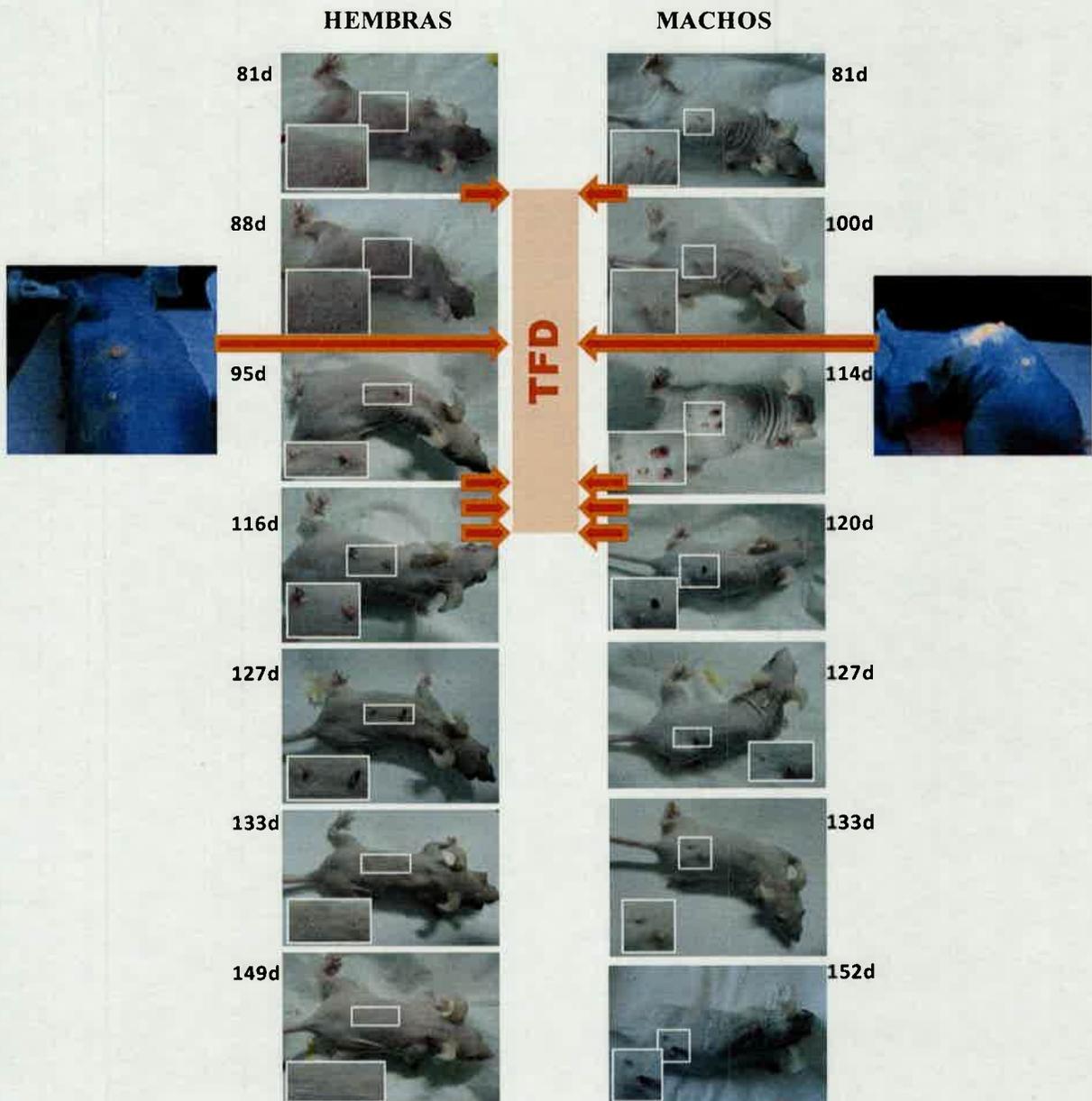
Con el objeto de evaluar el efecto de la TFD en otro modelo experimental de hiperplasia en ratones, se consideró llevar a cabo el modelo de papilomas cutáneo ya que la RFTA es un FS que podría ser efectivo en el tratamiento de lesiones superficiales de la piel. La generación de los mismos se realizó en ratones de la cepa SKH-1-hrBR mediante una aplicación tópica de 7,12-dimetilbenz(a) antraceno (DMBA, 25 nmoles) como iniciador de tumor y posteriormente 2 aplicaciones semanales del agente promotor 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) a una dosis de 3,4 nmoles durante 10 semanas. A la semana novena de iniciado el tratamiento

se observó la aparición de papilomas en ratones de ambos sexos. Para evaluar el efecto de la TFD sobre los papilomas, se realizó una aplicación semanal del tratamiento durante 5 semanas. Los animales del grupo Control y del grupo TFD-RFTA, fueron sacrificados la semana 22 y las biopsias fueron incluidas para su análisis morfológico. La figura 51 muestra los animales con papilomas y cortes histológicos de los mismos analizados por MOAR.



**Figura 51.** (A) Esquema de aplicación de DMBA/TPA para la generación de papilomas (grupo Control) y las sucesivas aplicaciones de TFD (grupo TFD). (B) Fotografías de ratones alopecicos SKH-1-hrBR machos y hembras con papilomas, los cuales se comienzan a observar en la semana N° 10. (C) Micrografías a nivel óptico de biopsias de un papiloma. (D) Fotografías representativas de los ratones con la aplicación de RFTA, y la sucesiva irradiación. En la última fotografía se observa claramente la fluorescencia de RFTA sólo en la zona del papiloma.

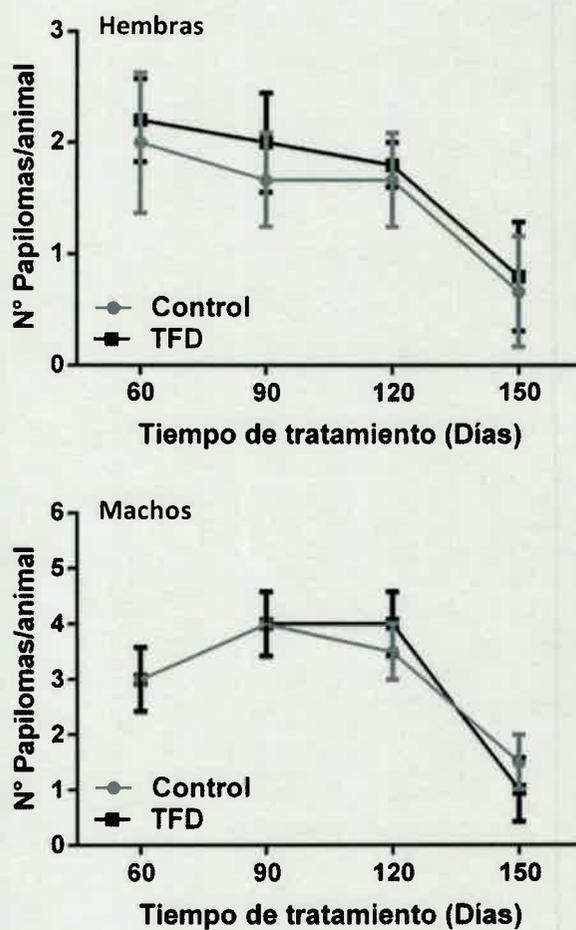
Los animales del grupo *Control* (DMBA/TPA), como así también los tratados del grupo *TFD* (DMBA-TPA/TFD-RFTA), fueron fotografiados semanalmente para registrar la inducción y la progresión de los papilomas, tanto en hembras (n=6) como en machos (n=3) (Figura 52).



**Figura 52.** Fotografías representativas de la inducción y evolución de los papilomas a lo largo del tratamiento en ratones alopecicos SKH-1-hrBR hembra y macho. Al lado de cada fotografía se indican el día posterior al inicio del tratamiento en el cual fueron fotografiados. Las flechas naranjas indican las sucesivas aplicaciones de la TFD.

Por último se realizó la cuantificación de estas lesiones proliferativas en grupo control y en el grupo TFD, a los 60, 90, 120 y 150 días de iniciado el tratamiento. Los resultados

mostraron un patrón similar sin diferencias significativas, tanto en hembras como en machos en los diferentes grupos experimentales (Figura 53).



**Figura 53.** Cuantificación del número de papilomas  $\pm$  S.E.M. en ratones hembras ( $n = 6$ ) y machos ( $n=3$ ) en los grupos: Control (DMBA/TPA) y TFD (DMBA/TPA/RFTA-18 J/cm<sup>2</sup>).

## **DISCUSIÓN**

Diversas líneas de investigación se han enfocado en la búsqueda de nuevos y eficientes FS para ser empleados en la TFD [163-165]. Sin embargo no se ha encontrado aún un FS ideal. Algunos de los puntos críticos para identificar una droga eficiente para esta terapéutica se refieren a que la misma debe poseer alta liposolubilidad, producir alto rendimiento en la generación de ERO, demostrar ausencia de toxicidad en la oscuridad y ser selectiva, es decir que debe tener la capacidad de acumularse en las células diana para causar allí su efecto [23, 166]. El presente trabajo de tesis doctoral estuvo centrado en la evaluación de la eficiencia de dos FS aplicados en TFD: la riboflavina (RF), vitamina esencial hidrosoluble y la riboflavina 2', 3', 4', 5'-tetraacetato (RFTA), un éster derivado de la misma. Dichos compuestos fueron fotoactivados con una fuente lumínica desarrollada en la Universidad Nacional de Córdoba, con las características óptimas para dichos FS.

La RF ha sido seleccionada en varios estudios, debido a sus propiedades fotosensibilizantes [132, 133, 167, 168]. Sin embargo son escasos los trabajos que relacionan este compuesto con la TFD para tratar el cáncer [136]. La mayoría de los FS empleados en esta terapia se degradan durante la irradiación por un proceso llamado fotoblanqueo, disminuyendo de intensidad a lo largo del procedimiento [169]. Por lo tanto, la fotoestabilidad de las RF para su uso en TFD es un punto importante a tener en cuenta. A pesar de que la RF es un sensibilizador bien caracterizado y biológicamente relevante [127, 170], su relativamente rápida degradación en presencia de la luz limita su uso en aplicaciones prácticas, además de su baja incorporación en las células debido a su hidrosolubilidad [138]. El lumicromo, producto principal de la fotodegradación de la RF, es casi 100 veces más fotoestable y es más eficaz en la producción de  $^1\text{O}_2$  que la RF [141]. Tomando en consideración estos antecedentes, se planteó obtener un producto con las características fotosensibilizantes que presenta la RF pero que además sea fotoestable y posea características lipofílicas. Este compuesto: RFTA se obtuvo a través de una reacción de acetilación a partir de RF, ácido acético glacial y anhídrido acético, según la metodología propuesta por Ogasawara *et. al.* [143]. Con el fin de estudiar la fotoestabilidad de la RFTA, se llevaron a cabo experimentos para evaluar su absorción y el proceso de fotoblanqueo luego de la irradiación con diferentes dosis lumínicas. Los resultados obtenidos demostraron que esta molécula se mantiene fotoestable luego de la irradiación con las diferentes dosis lumínicas empleadas, ya que no se degrada y no presenta bandas de absorbancia diferentes a la solución con RFTA sin irradiar. Es por ello que se puede concluir que la RFTA es un compuesto estable y no genera diferentes fotoproductos frente a la irradiación con la lámpara en estudio por lo que podría ser un compuesto apto para ser empleado en TFD.

En los últimos años se ha demostrado que los FS utilizados en la TFD varían ampliamente su actividad dependiendo de su estructura química. Dichas diferencias se encuentran incluso dentro de una serie de moléculas con características estructurales y fisicoquímicas básicas similares [171]. Por tal motivo, en el presente trabajo se optó por analizar los efectos fotodinámicos de ambos compuestos: RF y RFTA, en paralelo.

La capacidad de los FS de generar  $^1\text{O}_2$  es un indicador importante de su potencial en TFD [172]. El  $^1\text{O}_2$  puede ser detectado utilizando un método químico de fotooxidación de diferentes compuestos. Estudios preliminares muestran que la RF sensibiliza la fotooxidación de 3-OHP por un mecanismo que implica la generación de  $^1\text{O}_2$ , así como otras reacciones competitivas que incluyen la 3-OHP y el fotoconsumo de RF [173]. Estos datos nos condujeron a analizar si la activación de la RF con la lámpara en estudio sería capaz de generar  $^1\text{O}_2$  evaluando la caída del pico máximo de absorbancia de 3-OHP. Para analizar dicho parámetro con RFTA fue necesario emplear un compuesto lipofílico a fin de generar una solución orgánica con RFTA. En este caso se determinó la concentración estacionaria de  $^1\text{O}_2$  por actinometría, empleando como sustrato aceptor de  $^1\text{O}_2$  el DMA, como ha sido empleado en diferentes trabajos en los que evalúan la generación de esta ERO con diferentes FS, tales como, rosa de bengala, acetazolamida, derivados de hematoporfirina, tetrahidroxitfalocianina, entre otros [174, 175]. El seguimiento del consumo de la 3-OHP y del DMA se realizó por espectrofotometría UV-visible de la máxima absorción de ambos compuestos. Para ambos FS, la intensidad de absorción de 3-OHP y del DMA disminuyó a medida que aumentaba el tiempo de irradiación. La tasa de generación de  $^1\text{O}_2$  se calculó teniendo en cuenta la concentración de ambos FS previa y posterior a la irradiación [176]. Los datos obtenidos con RF y RFTA fueron similares a compuestos fotosensibles del grupo de las ftalocianinas, en los cuales evalúan la generación de  $^1\text{O}_2$  por los diferentes FS [177, 178]. Wang *et. al.* concluyeron que los compuestos con mayor tasa de generación de  $^1\text{O}_2$  son FS más eficaces en ensayos de TFD *in vitro*, principalmente las ftalocianinas cuaternizadas que tienen un gran potencial para ser utilizadas en la clínica [177]. Acorde a estos antecedentes, y debido a que la RFTA presenta una mayor tasa de generación de  $^1\text{O}_2$  podríamos sugerir que este compuesto podría ser un FS más efectivo que RF al ser utilizada en TFD.

Las fuentes de luz para excitar los FS juegan un papel importante en la eficacia de la TFD. Si bien existen diferentes fuentes disponibles que podrían ser empleadas en esta terapia, fue necesario el desarrollo de una fuente de luz específica para los FS en estudio, ya que el efecto óptimo de la luz depende de los picos de excitación del fármaco FS utilizado, y del

tejido diana donde se encuentre [179]. En el presente trabajo se utilizó una fuente de luz desarrollada en el Departamento de Bioingeniería del Centro de Microscopia Electrónica, (Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba). La misma cuenta con emisores LEDs que emiten en una longitud de onda de 446 nm, determinada al realizar su espectro de emisión. Previamente, por espectrofotometría detectamos que el pico máximo de absorbancia de ambos compuestos en el espectro visible oscila entre 446 y 447 nm, acorde al estudio realizado por Remucal *et. al.* [141], quienes expresan que RF y RFTA presentan dos picos máximos de absorbancia, uno en el rango UV de 373 nm y en el espectro visible de 446 nm. Al complementar el estudio de espectrometría de emisión de la lámpara con la determinación del pico máximo de absorbancia de la RF y de la RFTA, se puede inferir que la lámpara emite en una longitud de onda óptima para la activación de ambos compuestos.

Los estudios *in vitro* representan una herramienta valiosa para el análisis de múltiples procesos biológicos y de mecanismos moleculares específicos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Tomando esta aseveración se realizaron estudios de la eficacia de la TFD en cultivos de células de carcinoma escamoso humano empleándose la línea SCC-13. El CCE es uno de los CPNM con mayor morbimortalidad. Es por ello que el diagnóstico y el tratamiento oportuno son de suma importancia para los pacientes, ya que estas lesiones pueden progresar de CCE *in situ* a lesiones invasivas [180]. Los CCE pueden originarse a partir de lesiones precancerosas como QA, habiéndose estimado que entre un 0,25% a un 20% de estas lesiones pueden convertirse en CCE [181]. Clínicamente, 72-97% de los CCE cutáneo surgen de QA pre-existentes [182]. La TFD es un tratamiento que ha demostrado ser eficaz principalmente para lesiones cutáneas neoplásicas y pre-neoplásicas como: CCE, CCB, QA y enfermedad de Bowen [183]. Teniendo en cuenta estos antecedentes y que ambos FS estudiados en el presente trabajo de tesis doctoral fueron efectivamente fotoactivados con una baja  $\lambda$  del espectro visible, nos planteamos evaluar la eficiencia de la RF y de la RFTA en la línea SCC-13. Además, esta terapia podría ser muy efectiva para tratar CCE *in situ*, lesión superficial de la piel.

Una de las características principales que debe cumplir un FS ideal es la de no generar efectos citotóxicos de la droga en oscuridad, por lo cual se evaluaron dichos efectos en cultivos celulares. Las concentraciones de los FS empleadas fueron de 25 a 200  $\mu\text{M}$ , tal como las utilizadas en células endoteliales [184], de leucemia promielocítica humana [133], y de carcinoma cervical humano [138], experimentos en los que la RF fue el FS aplicado. En base a los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales, se optó por emplear concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  para ambos compuestos, ya que dicha dosis en la oscuridad no

generó efectos tóxicos en las células. Además, una característica importante de los FS en TFD es su acumulación preferencial en el tejido diana y la rápida eliminación de los tejidos normales maximizando la selectividad de la terapia [4, 185]. La captación de los FS por las células tumorales de la línea SCC-13 fue superior en comparación con las células normales de la línea HaCat, lo que indica que la TFD con RF y RFTA podría ser eficaz para tratar las células tumorales. Posteriormente, la toxicidad de la irradiación de RF y RFTA sobre las células se evaluó dicho efecto sobre las células normales y tumorales. Además, la curva dosis-respuesta a la luz mostró que el efecto fototóxico en las células aumentó en forma dosis de luz dependiente con diferentes densidades de energía entre 2,25 y 18 J/cm<sup>2</sup>, siendo mayor en SCC-13 que las células HaCat, lo que sugiere que las células tumorales son más sensibles a la TFD. Posteriormente, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Las mismas dosis de luz se lograron con tiempos cortos de irradiación, ya que los LEDs de la lámpara empleada son de alta potencia, variando este tiempo sólo entre 1 y 8 min. Esta característica brindó una ventaja importante en cuanto al tiempo empleado para llevar a cabo la TFD en estas condiciones, en contraste a otras lámparas utilizadas en otros trabajos en los que irradiaron durante 2 h, células de leucemia promielocítica y de carcinoma cervical humanas, incubadas con RF y un éster derivado, la RF tetrabutirato, para lograr efectos tóxicos [138]. La viabilidad celular no se afectó con la sola irradiación o incubación de las células neoplásicas con los FS. Sin embargo, cuando las células fueron expuestas a la combinación de RF o RFTA con la irradiación en diferentes dosis, se observó una marcada disminución de la viabilidad celular de manera dosis de luz dependiente. Es de importancia destacar que al emplear RFTA el efecto fototóxico fue mayor, con las diferentes dosis de luz, en comparación con RF.

Considerando que la disminución en la viabilidad celular por los efectos de la TFD puede generar alteraciones en la proliferación de las células, se planteó evaluar la tasa proliferativa de las células SCC-13 24 h posteriores a la irradiación, mediante la incorporación de BrdU. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con TFD-RFTA con todas las dosis lumínicas empleadas, generó una disminución de las células BrdU positivas. Por el contrario, el tratamiento con TFD-RF mantuvo la tasa mitótica en valores similares al control, lo que demuestra que la RFTA es más efectiva que la RF, en afectar la proliferación celular disminuyendo la tasa proliferativa, conjuntamente con la disminución de la viabilidad observada luego del tratamiento.

Tomando como base los resultados previos se consideró que el efecto de la TFD sobre la proliferación, podría deberse a la alteración en el **ciclo celular**. Numerosos estudios han

descripto que la TFD puede generar disturbios en la progresión del ciclo celular en la transición de la fase G1 a fase S, lo que conlleva al arresto en el crecimiento y a la muerte celular [186-189]. Además, de acuerdo estudios llevados a cabo por Wang *et. al.*, la fase S es un período sensible para agentes quimioterapéuticos, y las drogas podrían inhibir la síntesis del ADN y el crecimiento de células de carcinoma nasofaríngeo mediante la detención en esta fase del ciclo [190]. Sin embargo, no se han reportado en la literatura estudios del ciclo celular empleando la TFD con RF o RFTA, es por ello que el estudio del ciclo tras la aplicación de esta terapéutica resultó relevante. Para ello se analizó el contenido de ADN en los diferentes grupos experimentales. Los resultados obtenidos en este estudio con ambos FS, demostraron una acumulación de células en las fases G2/M, detectando en estas etapas mayor número de células, generando inhibición en la proliferación celular. A diferencia de lo aquí reportado, trabajos en los que se utiliza ALA y HPPH como FS, en células de carcinoma humano cervical de las líneas Mel80 (HTB-33), C-33A (HTB-31), HeLa (CCL-13), Caski (CRL-1550), C4I (CRL-1594), HT3 (HTB-32) y SiHa (HTB-35) han concluido que la TFD genera una disminución de las células en las fases G2/M [191]. Además, se ha descripto que empleando ALA y HPPH como FS en TFD también generan una disminución de las células en las fases G2/M [191, 192]. Cabe remarcar que la fase G2 desempeña un papel crucial en la progresión del ciclo celular, asociándose con la síntesis de ARN y proteínas y es el período de preparación para la mitosis. En este sentido nuestras observaciones concuerdan con resultados obtenidos con el FS Hipericina sobre células de carcinoma nasofaríngeo humano de la línea CNE-2, revelando que Hipericina-TFD podría inhibir el crecimiento de células CNE-2, generar arresto en las fases G2/M e inducir apoptosis [190]. Es por esto que sugerimos que tanto RF como TFD-RFTA probablemente estarían afectando la síntesis y la replicación del ADN, ARN y de diferentes proteínas involucradas en la división celular, como así también la finalización de la división celular, por que las células que comienzan con la división no pueden concretarla.

Por otro lado, numerosos estudios han documentado que la respuesta y el **tipo de muerte celular** por la TFD varía debido a las propiedades físicas del FS empleado, de la dosis de la TFD y del linaje celular, además la localización subcelular del FS en el momento de la irradiación [45, 193]. Resulta importante el hecho de que un mismo FS podría dar lugar a diferentes respuestas en cada tipo celular [194]. Con el fin de dilucidar los cambios celulares y moleculares relacionados a la muerte celular inducida por la irradiación de RF y de RFTA, se investigaron los posibles mecanismos implicados en este proceso, empleando diferentes técnicas. Entre los diversos tipos de muerte celular la TFD puede inducir principalmente

apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica y autofagia [24, 68, 195]. La apoptosis es un proceso de muerte programada que puede estar implicada en la involución y atrofia de diversos tejidos y órganos [196]. Bajo condiciones fisiológicas, la misma juega un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de la salud del cuerpo mediante la eliminación de células envejecidas, innecesarias y enfermas. Sin embargo, la apoptosis en la TFD es una de las formas predominante de muerte celular porque la mayoría de los FS se acumulan en las membranas mitocondriales [197]. Este tipo específico de muerte celular es reconocida por características morfológicas, bioquímicas, y moleculares [3, 193]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral revelan que las células SCC-13 sometidas a TFD-RF/RFTA presentan cambios morfológicos acordes a las características descritas para la apoptosis, tales como condensación de la cromatina, formación de burbujas citoplasmáticas, fragmentación nuclear y citoplasmática, y formación de cuerpos apoptóticos. Sin embargo, el tratamiento con RFTA fotoactivada con la dosis de luz más alta, generó en algunas células un efecto letal asociado a necrosis, tales como, alta vacuolización, ruptura de la membrana plasmática y tumefacción citoplasmática general, características descritas en la literatura para tal proceso [142]. Dicha dosis de luz ( $18 \text{ J/cm}^2$ ), fue descartada para los ensayos posteriores, porque la existencia de ese proceso en un sistema *in vivo* generaría inflamación en el tejido.

Para detectar el ADN fragmentado en células apoptóticas, el ensayo de TUNEL es uno de los métodos más utilizado [198, 199]. Los resultados obtenidos al analizar este parámetro demostraron que la TFD con ambos FS en estudio, induce un aumento en el número de células TUNEL positivas, sugiriendo que la muerte celular predominante por el tratamiento es la apoptosis. Con el objetivo de corroborar este tipo de muerte, se evaluó la redistribución del fosfolípido de membrana fosfatidilserina al ser un marcador temprano de la apoptosis [200]. La fosfatidilserina en condiciones fisiológicas se localiza en la cara interna de la membrana plasmática y se trasloca hacia la cara externa de la misma cuando comienza a desencadenarse la apoptosis [201]. La incubación de las células con anexina V-PE/7AAD se lleva a cabo para identificar en que estadio de este tipo de muerte se encuentra la célula. Un aumento en la positividad para Annexina V como consecuencia de la externalización de la fosfatidilserina es un marcador de apoptosis temprana o lo que fue observado sólo en las células tumorales sometidas a la TFD-RFTA pero no en el grupo control o TFD-RF. Además, en el grupo TFD-RFTA, se detectó un aumento en las células con marca positiva para annexina V y 7AAD, como consecuencia de externalización de la fosfatidilserina en conjunción con la pérdida de integridad de la membrana plasmática respectivamente indicando que dichas células se

encuentran en estadio tardío de apoptosis. En este grupo también se detectó un número menor de células con aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, detectada por la simple marca de 7AAD. Estos resultados nos permiten corroborar que el tratamiento induce principalmente apoptosis. Sin embargo, a pesar de que algunas células tratadas con TFD-RF presentaron morfología apoptótica, no se registraron cambios con respecto al control en células con marca de anexina V o 7AAD.

La apoptosis puede ser inducida por diferentes señales, como las dependientes de las mitocondrias o de las relacionadas con receptores de la membrana plasmática los cuales activan diferentes vías intracelulares de señalización [202]. A su vez tales señales pueden activar una serie de proteínas denominadas caspasas, siendo un mecanismo dependiente de las mismas. Por otro lado, la apoptosis puede llevarse a cabo por un mecanismo independiente de caspasas el cual involucra la activación de diferentes proteínas mitocondriales denominadas AIF o Endo G. Algunos estudios empleando ALA o ftalocianinas revelan que la TFD genera la liberación de AIF como un mediador de la apoptosis independiente de caspasa [203, 204], sin embargo, con RF o RFTA este mecanismo no ha sido descrito.

En general, la activación de las vías de caspasas es esencial para producir los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de apoptosis [205]. Por lo tanto, para investigar en profundidad los mecanismos implicados en la inducción de la apoptosis por la TFD en las células SCC-13, se analizó la expresión de diferentes moléculas involucradas en la vía dependiente de caspasas. La activación de estas enzimas generan muchos de los cambios moleculares y estructurales en la apoptosis, incluyendo la degradación del ADN, la escisión de la cromatina en los sitios inter-nucleosomales y de la polimerasa PARP. La detección de los diferentes fragmentos de esta proteína, fue utilizada en nuestro trabajo para concluir que el fenotipo de muerte celular observado es distinto de necrosis luego de la TFD-RFTA, ya que no detectamos fragmentos de 50 kDa. En los tratamientos con RFTA e irradiación al detectarse clivaje de PARP en fragmentos de 89 kDa, se infiere que esta terapia genera un perfil de muerte apoptótico en las células tumorales, lo que nos llevo a profundizar aún más el estudio de este tipo de muerte celular programada. La caspasa 3 se sintetiza como pro-caspasa y es activada al clivarse desencadenando y ejecutando la apoptosis. Al analizar la expresión de esta pro-caspasa se observó una clara disminución de la misma, lo que nos permite inferir que dicha proteína podría ser clivada a fragmentos activos más pequeños luego de la TFD con RFTA, lo que indicaría su participación en el mecanismo de muerte, acorde a trabajos presentados por otros autores empleando glico-ftalocianinas como FS [163].

La proteína anti-apoptótica **Bcl-2** es una diana molecular para varios FS localizados principalmente en mitocondrias y en RE, y su fotodaño conduce a la liberación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma [70, 206]. La TFD puede llevar consigo la liberación de calcio del RE, la inhibición de Bcl-2 y la activación de miembros pro-apotóticos de la familia Bcl-2 ubicados en las membranas mitocondriales [207]. Además, las caspasas activadas pueden clivar Bcl-2, generando una forma inactiva de esta proteína [208]. Es por ello, que nos resultó de interés evaluar si la TFD-RFTA genera algún cambio en la expresión de esta proteína, ya que previamente se observaron indicios de activación de la caspasa 3. Los resultados obtenidos demostraron que la TFD-RFTA disminuye la expresión de Bcl-2, sugiriendo su clivaje por la activación de esta enzima. La disminución de la expresión de procaspasa-3 y Bcl-2 en las células tratadas con RFTA-PDT, nos ha llevado a especular que la *down*-regulación de estas moléculas podría ser la responsable de la aparición de la apoptosis observada.

En este tipo de muerte celular por vía intrínseca, la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c son eventos claves en la activación de caspasas. El desencadenante inicial de permeabilización mitocondrial es la activación conformacional de proteínas pro-apoptóticas como Bax [209]. Para evaluar la posible participación de **Bax** en este mecanismo se determinó su expresión en los distintos tratamientos. Sin embargo, los resultados obtenidos en las células tumorales no demostraron cambios en la expresión de esta proteína pro-apoptótica respecto a los controles, como se ha reportado en otros trabajos, junto con la disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 [210, 211]. Si bien nos centramos en analizar la participación de la proteína, no es posible descartar que otras moléculas pro-apoptóticas estén involucradas en este proceso [212, 213]. Por otro lado, los estudios de la distribución de **citocromo c** por microscopia de fluorescencia en el tratamiento de TFD-RFTA ( $9 \text{ J/cm}^2$ ), demostraron liberación del mismo, desde las mitocondrias hacia el citoplasma. Esa liberación se observa por la distribución puntual de la marca fluorescente en las células controles y difusa por todo el citoplasma en las células tratadas con TFD, sugiriendo que el citocromo c participaría en la muerte celular observada.

Basado en estos resultados es posible postular que una inducción eficiente de la apoptosis *in vivo* por la irradiación del tejido después de la administración RFTA debe llevarse a cabo con dosis bajas de luz, impidiendo así la estimulación del sistema inmune o el desencadenamiento de reacciones inmunes anti-tumorales que se produce durante la muerte celular por necrosis [214].

Hasta aquí podemos decir que el tratamiento con TFD indujo en las células SCC-13, una marcada disminución de la viabilidad de forma dosis de luz dependiente, disminución de la proliferación celular con arresto en las fases G2/M del ciclo y desencadenó la muerte celular por un proceso apoptótico vía caspasa dependiente. Tomando en consideración que la apoptosis inducida por la TFD podría estar relacionada con la **activación de MAPKs** [215], nos propusimos abordar este actual aspecto de interés en la biología molecular. De hecho, se sabe que las MAPKs desempeñan papeles importantes en una variedad de procesos celulares, tales como la proliferación celular y apoptosis [57]. Por otra parte, se ha informado que la vía de la MAPK-ERK, es una de las cascadas de señalización celular más ubicua, ya que puede estar implicada en la inducción de la apoptosis en respuesta a estímulos de estrés [216], incluyendo el estrés oxidativo resultante de un aumento en los niveles de ERO [96, 217, 218]. Además, se ha postulado que las ERK podrían actuar en la vía intrínseca de la apoptosis favoreciendo la liberación de citocromo c con la consiguiente activación de la caspasa 3 culminando con la apoptosis [98], resultados observados con los tratamientos de TFD-RFTA activando la RFTA con la dosis lumínica de 9 J/cm<sup>2</sup>. También, se sabe que las ERK 1/2 podrían inhibir la acción de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 en la mitocondria [99]. Con estos antecedentes se planteó evaluar la expresión de las ERK 1/2 en células sometidas a TFD con RF y con RFTA.

Nuestros resultados indican que la activación de las ERK 1/2 observada después de la TFD, podría estar relacionada con el aumento de los niveles de **ERO** intracelulares. Es por ello que se empleó el antioxidante Trolox para disminuir la generación de estas especies reactivas por la TFD. Se ha descrito que la fotoactivación de los FS deriva en la formación de ERO, que actúan como mensajeros primarios desencadenar múltiples vías de señalización que conducen a la muerte celular [171]. Por este motivo, el análisis de la viabilidad celular con el agente antioxidante reveló un aumento en el número de células viables con respecto al grupo de TFD-RFTA y el estudio de la expresión de las proteínas ERK 1/2 fosforiladas en células pre-incubadas con el antioxidante sugieren que las ERO serían los activadores de estas MAPK. Sin embargo, el uso de un inhibidor de ERK 1/2 no generó un cambio en los niveles de viabilidad celular comparado con las células tratadas sometidas a la TFD sin el inhibidor, Lo que nos permite inferir que la activación de las ERK 1/2 sería un mecanismo de defensa celular contra la toxicidad generada por la TFD.

Por otro lado, aunque las ERO pueden inducir la activación de la vía p38<sup>MAPK</sup> en diferentes tipos de células causando su muerte [218-220], sin embargo en las células tratadas con RF y RFTA no se observaron cambios en los niveles de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> luego de

la irradiación, sugiriendo que no habría una relación directa entre la exposición al compuesto y la irradiación referido a la modulación de la actividad de  $p38^{MAPK}$  en células SCC-13, a pesar de que se ha descrito que la activación de la vía  $p38^{MAPK}$  por diferentes estímulos se relaciona con la apoptosis [89]. Por otro lado, se ha visto que la administración de inhibidores de caspasas disminuyen la activación de  $p38^{MAPK}$ , por lo que esta vía tendría un rol ejecutor de la activación de las caspasas [105]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que esta vía no sería la responsable de la activación de estas proteínas en la ejecución de la apoptosis, corroborado por el empleo del inhibidor de la unidad catalítica de  $p38^{MAPK}$ , el cual no modificó la viabilidad celular posterior a la TFD.

Se ha informado que la sobreproducción de ERO causa daños severos en las células y promueve diversos tipos de muerte celular, como necrosis, pero además puede activar vías de señalización que regulan la apoptosis [221-223]. Algunos estudios revelan que los altos niveles de ERO generados por la TFD inducen daño celular, y culminan en la muerte por apoptosis a través de la activación de caspasa [224, 225]. Se ha indicado que la exposición a la luz de la RF en la presencia de oxígeno molecular puede generar suficientes ERO como para provocar injurias o lesiones tóxicas, dando lugar a incluso la muerte celular [129, 167]. En consecuencia, para evaluar si los FS al ser fotoactivados generan ERO dentro de las células SCC-13 y si la generación intracelular de ERO podría estar involucrado en el mecanismo de muerte celular, se empleó la sonda fluorescente DCF-DA. Los resultados obtenidos demostraron que la TFD genera un aumento significativo de los niveles intracelulares de ERO en las células SCC-13, siendo dicho aumento más notorio con las dosis lumínicas más altas. Aunque los niveles de ERO se incrementaron con ambos FS en TFD, esta respuesta fue mayor en las células tratadas con RFTA lo que sugiere que este FS podría utilizarse potencialmente como un generador eficiente de ERO intracelulares.

Las especies reactivas producidas por la fotoactivación de los FS en TFD pueden generar diferentes tipos de ERO de acuerdo al mecanismo que se lleva a cabo: tipo I o tipo II, a su vez numerosos FS pueden efectuar ambos mecanismos en simultáneo. En particular se ha descrito que la RF fotoactivada puede transferir energía al oxígeno molecular, generando así oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y otras ERO [127-129]. Por lo tanto, para evaluar si la RF y la RFTA fotoactivados con una densidad de energía de  $9 \text{ J/cm}^2$  generan anión superóxido, se empleó la sonda DHE. Este compuesto tiene la característica de poder reducirse por el anión superóxido a un compuesto fluorescente, el cual puede ser detectado por espectrofluorimetría. Con esta técnica la detección de anión superóxido en las células es a nivel citoplasmático. Nuestros resultados indicaron que tanto RF como RFTA 6 h posteriores a la irradiación, generan

aumento en los niveles de anión superóxido, mientras que a las 14 h se detectaron niveles superiores de esta especie reactiva solo en células tratadas con RFTA. Esto nos permite sugerir que esta ERO en el tratamiento con RFTA se genera tempranamente luego de la irradiación y mantiene sus niveles elevados con respecto al control en el tiempo, lo que seguiría generando toxicidad en la célula durante todo ese período. En cambio, el tratamiento con RF genera un aumento en los niveles de esta especie reactiva, pero disminuye rápidamente en el tiempo. La señal detectada de DHE representa niveles de superóxido [226], pero la posible producción de otros metabolitos en este proceso no debería ser descartada. Estos resultados nos permiten concluir que RFTA es más efectivo como FS que RF, en la producción de ERO en general y de anión superóxido en particular.

En cuanto a la inducción del estrés oxidativo por la TFD, generada por el aumento de ERO en nuestras condiciones experimentales, se evaluaron los niveles de grupos tioles no proteicos. Se considera al glutatión reducido -SH como un marcador sensible al estrés oxidativo, ya que ayuda a mantener la integridad de las mitocondrias y de la membrana celular. En condiciones de estrés oxidativo, los niveles de GSH y grupos -SH en sistemas vivos disminuyen ya que todas las enzimas antioxidantes utilizan al glutatión (GSH) en las reacciones que catalizan. En el estado reducido, el grupo tiol puede donar un equivalente de reducción a ERO, convirtiéndose en un compuesto reactivo y un aumento en la proporción entre glutatión oxidado o reducido es un indicador de estrés oxidativo [156]. Los resultados obtenidos mostraron sorprendentemente un aumento en los niveles de los grupos tioles no proteicos en los tratamientos con RF y TFD-RFTA con respecto al control, expresado como  $\mu\text{mol}$  de NPSH/mg de proteína, a las 14 h posteriores a la irradiación no encontrándose variaciones a las 6 h. Sin embargo se esperaba que los niveles de NPSH disminuyan luego del tratamiento, ya que el glutatión es un antioxidante endógeno que se puede encontrar en estado reducido en mayor proporción que en estado oxidado [155]. En contraste, estudios realizados por Hassan *et. al.*, postulan que los niveles de GSH y SH fueron mayores con respecto a los controles en células tratadas con RF irradiada en combinación con cisplatino, respondiendo de esa manera al estrés oxidativo generado por el FS [168]. Quizás en este modelo, las células SCC-13 utilicen este sistema como protector del daño oxidativo generado por el tratamiento fotodinámico como mecanismo de defensa antioxidante ante la situación de estrés.

Por otro lado, se ha visto la estrecha relación entre el estrés oxidativo y la alteración en el  $\Delta\Psi_m$  posterior a la TFD [227]. El  $\Delta\Psi_m$  es generado por un gradiente de protones, los cuales son transferidos de la membrana interna mitocondrial al espacio intermembranal en la cadena respiratoria mitocondrial, por lo tanto la inhibición de los complejos de la cadena

respiratoria mitocondrial darían lugar a disminución del  $\Delta\Psi_m$ , que a su vez altera la síntesis de ATP [158]. Es por esto que la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  es un indicador de la disfunción mitocondrial [228]. En el presente estudio, evaluamos el  $\Delta\Psi_m$  empleando la sonda fluorescente JC-1, a las 3, 6 y 12 h posteriores a la irradiación. Los resultados no se vieron alterados por los diferentes tratamientos con respecto a los controles lo que nos lleva a sugerir que si bien se observa un daño citotóxico en las células, se mantiene la integridad de las mitocondrias y de la membrana celular luego del tratamiento, lo que se correlaciona con los niveles elevados de SH.

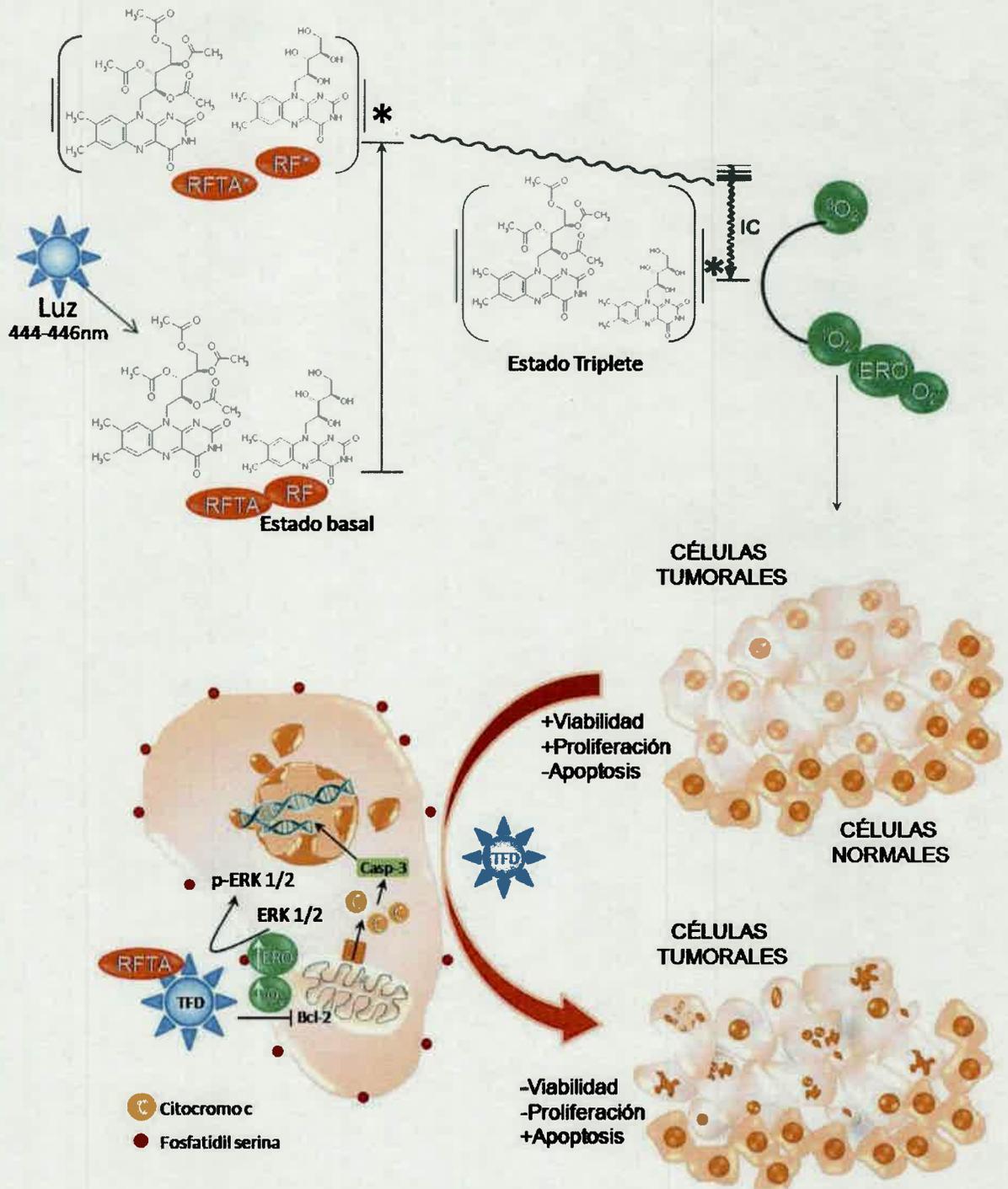
Además, los experimentos relacionados con respirometría mostraron que las mitocondrias de la células SCC-13, respondieron bien a los diferentes estímulos, tanto en las células controles como en las tratadas con RFTA con irradiación de  $9 \text{ J/cm}^2$ . Cuando se adicionó oligomicina al medio de cultivo las células disminuyeron su respiración en el medio, ya que inhibe la subunidad FO de la ATP sintasa o complejo V de la CR generando reducción en el consumo de oxígeno [158]. Al adicionar un desacoplante mitocondrial, se despolariza la membrana de estas organelas, ya que interrumpe la síntesis del ATP mediante el transporte de protones a través de las membranas mitocondriales internas. Por este motivo, el desacoplamiento mitocondrial se evidenció por el aumento en el consumo de oxígeno al adicionar concentraciones crecientes de dicho compuesto, lo que indica la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ . El desacoplamiento de la MM, la alteración del  $\Delta\Psi_m$  y de la transferencia de electrones en la CR, se estimula para restaurar este potencial, aunque la síntesis de ATP este bloqueada, lo que resulta en un aumento de consumo de oxígeno. En cambio, si se observó una diferencia significativa entre las células controles y las tratadas con TFD-RFTA en los niveles de ERO, indicado por el consumo de oxígeno en la respiración mitocondrial por la reducción incompleta de ERO luego de la adición de rotenona y antimicina A, compuestos que inhiben el complejo I y el complejo III de la CR, respectivamente. Por lo tanto, con la cadena de transporte de electrones inhibida, el oxígeno que se consume no se debe al paso de los electrones por CR [159].

Las ERO pueden reaccionar potencialmente con cualquier molécula dentro de la célula, ya sea ácidos nucleicos, lípidos o proteínas, y oxidarlas. Cada ERO presenta un potencial de oxidación diferente de acuerdo a su reactividad. La oxidación irreversible de proteínas se da por medio de cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la formación de enlaces proteína-proteína. Estas oxidaciones son ocasionadas por la reacción de las proteínas con las ERO [229]. La oxidación de proteínas provocada por daño directo en lisinas, argininas, prolinas o treoninas, puede generar derivados carbonilos como

aldehídos y cetonas [230]. La carbonilación de proteínas es una oxidación que indica un estrés oxidativo más severo y representa un marcador de oxidación proteica estable. Por lo cual, nos propusimos evaluar si el aumento en ERO generado por la TFD genera oxidación en proteínas. Los resultados obtenidos demostraron que ambos FS generaron aumento en los niveles de oxidación de proteínas, evaluado por la cuantificación de los niveles de grupos carbonilos empleando dinitrofenilhidrazina. Sin embargo, los niveles de oxidación fueron mayores para el tratamiento con RF que para RFTA, lo que nos podría indicar que RF al ser un compuesto hidrofílico podría interactuar más con proteínas que RFTA. En base a los resultados obtenidos, no se puede descartar que la TFD genere la oxidación sobre otras macromoléculas como lípidos, principalmente con RFTA ya que al ser un compuesto lipofílico podría interactuar con mayor afinidad con estos. Nuestros hallazgos podrían ser un punto de partida para futuros estudios en esta temática.

En resumen, los estudios realizados en las células SCC-13, demuestran que la RF y la RFTA no afectan la viabilidad en concentraciones menores a  $50\mu\text{M}$  en oscuridad. Por el contrario, cuando las células son incubadas con RF o RFTA e irradiadas con la lámpara en estudio, se genera disminución de la viabilidad dosis de luz dependiente. Además, la TFD-RFTA genera disminución de la proliferación y alteración en el ciclo celular, observada por el arresto y acumulación de células en la fase G2/M. Asimismo, el efecto citotóxico del tratamiento genera muerte celular por apoptosis vía caspasa dependiente luego de la irradiación ( $9\text{ J/cm}^2$ ), llevada a cabo por el incremento de las ERO intracelulares en particular  $\cdot\text{O}_2^-$ . Además, se puede concluir que la activación de la vía ERK 1/2 es dada por las ERO, lo que podría ser un mecanismo de defensa de las células a la toxicidad generada por la TFD. Estos hallazgos son representados en la figura 51.

Este mecanismo postulado podría proporcionar importantes conocimientos sobre la TFD-RFTA y dar lugar a nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades de la piel superficiales proliferativas *in vivo*; ya que no se asoció muerte por necrosis, lo que evitaría inflamación y daño al tejido sano circundante.



**Figura 51.** Efecto de la TFD empleando RF y RFTA como fotosensibilizadores sobre células de carcinoma escamoso de la línea SCC-13, y su implicancia sobre la proliferación y muerte celular.

Los estudios *in vivo*, son otra forma de abordar temáticas en forma integral, siempre considerando lo complejo que puede ser hacer inferencias, dado que es una situación más real con interacciones epiteliales-estromales directas o a través de factores solubles, participación del sistema inmune y sus mediadores, entre otros. Por ello, nos planteamos emplear modelos murinos de hiperplasia epidérmica para evaluar el efecto de la TFD con RFTA.

Existen numerosos modelos murinos empleados para generar patologías epidérmicas y dérmicas, tales como CCE con irradiación UV [231], dermatitis de contacto irritativa con aplicaciones de oxazolona [232], SLS [233, 234] o ketoprofeno en combinación con irradiación UV-A [235]. Asimismo, se han descrito modelos animales de psoriasis [236], modelos tumorales a través de la inyección de células tumorales [237] o por irradiación UV-B [238]. Además, se ha utilizado éster de forbol (TPA) para la generación de hiperproliferación epidérmica [238], de tumores epidérmicos [239] y en combinación con DMBA para generar papilomas [240, 241].

La mayoría de estos modelos excepto la inyección cutánea de células tumorales implican la aplicación tópica de los diferentes compuestos, pero debido a la presencia del pelo en los animales, no se logra una óptima penetración del compuesto en la piel. Considerando este punto, en nuestros modelos se utilizaron ratones alopécicos de la cepa Crl:SKH-1-hrBR (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA). El grupo fundador de animales fue donado por el Departamento de Inmunología de la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

La dermatitis de contacto química fue causada por el contacto de la piel con un agente que actúa como sensibilizante alérgico específico o como irritante primario. Esta patología puede ser provocada por la exposición frecuente a un agente generando una dermatitis de contacto irritativa o acumulativa, caracterizada principalmente por persistencia de sequedad, agrietamiento e hiperqueratosis [233, 242]. En la forma aguda, los agentes químicos producen cambios patológicos, que se reflejan en diferencias en la producción de citoquinas y en la respuesta proliferativa [243, 244]. Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos en relación a esta temática, nos propusimos generar un modelo murino de hiperplasia epidérmica empleando aplicaciones acumulativas de SLS. Así se demostró que este fármaco genera hiperplasia, que va aumentando progresivamente desde la primera aplicación. El máximo espesor de la epidermis, se alcanzó luego de 3 aplicaciones de SLS, el cual se mantuvo durante 6 más sin causar necrosis en el tejido. Considerando estos parámetros se realizaron de 3 a 6 estimulaciones con dicho compuesto en los diferentes protocolos. Asimismo, la hiperplasia se mantuvo en presencia del estímulo con SLS, pero revirtió a una morfología

normal en ausencia del mismo en ratones de ambos sexos. En este modelo, se observó que el compuesto produce patrones patológicos específicos, como leve inflamación con hiperqueratosis, acantosis y paraqueratosis en forma similar a lo reportado por Moon *et. al.* [233].

Posteriormente, se evaluó la eficacia de la TFD en la epidermis hiperplásica de los animales con la aplicación tópica de RFTA e irradiación con luz azul. Estudios realizados por Szeimies *et al.*, demostraron que la penetración de FS hidrofílicos como ALA o ATX-S10 (Na) en CCB es muy baja [245]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, con el fin de utilizar un FS que penetre con mayor facilidad en la epidermis de los animales, en el presente trabajo de tesis doctoral, utilizamos el FS lipofílico RFTA. La capa celular córnea, desempeña un papel importante actuando como una barrera contra diversos estímulos y protegiendo a la piel de la penetración de estos FS [246]. Numerosos estudios proponen que el Metil 5-ALA sería más efectivo que el ALA al presentar mayor penetración en el tejido [7]. Otro aspecto interesante, a tener en cuenta, es la leve penetración de los FS en la piel normal, lo cual sugiere que su aplicación tópica tendría un efecto selectivo sobre enfermedades de la piel que presenten la barrera dañada [247]. Esta selectividad resulta ser una ventaja importante de esta terapia frente a otras alternativas terapéuticas.

La TFD-RFTA se llevó a cabo en primera instancia como tratamiento preventivo de la hiperplasia intercalando el estímulo con SLS con la aplicación del tratamiento fotodinámico. La concentración de RFTA y la dosis lumínica ( $18 \text{ J/cm}^2$ ) utilizadas se seleccionaron de acuerdo a estudios previos en nuestro laboratorio, en los cuales se determinó que dosis mayores de luz generan una necrosis severa en el tejido. A partir de este diseño experimental se demostró que la aplicación de la TFD-RFTA como tratamiento preventivo evitó parcialmente el aumento de la epidermis, aunque la disminución no alcanzó a los valores de la piel control. A continuación, se analizó la TFD-RFTA como tratamiento terapéutico, es decir evaluando su efecto sobre la hiperplasia ya establecida luego de 4 aplicaciones de SLS. Los resultados indicaron que la TFD genera una disminución de la hiperplasia en los animales, alcanzando valores similares a los de la piel normal

En vista de estos hallazgos se evaluó si la disminución de la hiperplasia se genera por una disminución en la **tasa de proliferación epitelial**. Moon *et. al.* ha descrito que SLS induce proliferación de células epidérmicas, tanto en modelos de irritación aguda como crónica [233]. Resultados similares han sido reportados con el compuesto promotor de tumor TPA, en la inducción de la proliferación [248]. Otro marcador muy empleado para la evaluación de la proliferación es la proteína Ki-67, la cual fue detectada por

inmunohistoquímica en estudios de desarrollo de cáncer de piel empleando TPA [240]. En nuestros modelos evidenciamos la expresión de esta proteína en células epidérmicas de ratones tratados con SLS o con SLS/TFD-RFTA por inmunocitoquímica. Si bien, se observó una clara disminución de la expresión de Ki-67 en la epidermis de los animales tratados con la TFD, no fue estadísticamente significativa, lo cual puede deberse a que se encontraron respuestas muy dispares en los distintos individuos con un  $n$  de 4 animales por tratamiento, resultando en una desviación estándar muy alta.

Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluó la **muerte celular** a fin de analizar si la disminución de la hiperplasia epidérmica se correlacionaba con el aumento de tal proceso. El tratamiento de TFD-RFTA incrementó significativamente el número de células TUNEL positivas en comparación con la epidermis de los animales que sólo fueron tratados con SLS. Los valores obtenidos sugieren que la TFD disminuye la hiperplasia principalmente por el incremento en la muerte celular y no por la disminución de la proliferación.

Diferentes estudios han empleado **modelos de papilomas** escamosos de la piel en animales, llevados a cabo a través de la aplicación tópica de un compuesto iniciador de tumor como metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina [249] o DMBA con sucesivas aplicaciones de un promotor de tumor TPA [240, 250-252]. Numerosos autores han evaluado el efecto de la TFD empleando diferentes compuestos fotosensibilizantes [241, 250, 253]. Por tal motivo, surgió la inquietud de estudiar el efecto de la TFD empleando RFTA como FS en este modelo de papilomas. La puesta a punto de la generación de los papilomas se llevó a cabo empleando diferentes dosis tanto del compuesto iniciador como promotor de tumor: DMBA como de TPA. Por lo cual, se llegó a establecer el protocolo de papilomas en la cepa de ratones alopecicos con una aplicación de DMBA y posteriormente 2 aplicaciones semanales de TPA, durante 10 semanas.

Los ratones con papilomas que fueron sometidos al tratamiento fotodinámico recibieron una aplicación semanal de TFD durante 5 semanas, empleando RFTA (0,03%) en acetona/alcohol en gel (1:4 v/v), luego los animales fueron mantenidos en oscuridad durante 3 h y posteriormente se los irradió con una densidad de energía de  $18 \text{ J/cm}^2$ . Sin embargo, no se detectaron cambios entre el número de papilomas de ratones controles y sometidos al tratamiento fotodinámico. Estos resultados nos permiten inferir que quizás la penetración de la RFTA no fue la óptima, a pesar de que se observó la localización selectiva del FS a través de la fluorescencia de la misma sólo en los papilomas. Otro punto de interés a tener en cuenta es que los papilomas al ser lesiones más grandes que la hiperplasia epidérmica obtenida en los modelos con SLS, quizás requieren más tiempo de irradiación para penetrar bien en el interior

de la lesión. En la parte superficial de las lesiones se observó en numerosos animales, luego de 2 a 3 días posteriores a la TFD, la presencia leve de tejido necrótico, lo que nos demuestra que el tratamiento generó cambios al menos en las capas superficiales de las lesiones.

La importancia de este trabajo de tesis doctoral estuvo centrada en el estudio de la eficacia de la riboflavina y su éster derivado en el tratamiento fotodinámico en células humanas de carcinoma escamoso y células epidérmicas hiperproliferativas de modelos murinos. La caracterización morfológica y bioquímica del efecto de la TFD en los modelos analizados, podrían proporcionar nuevos avances en el conocimiento sobre la aplicación RFTA en la TFD como una nueva alternativa de fotosensibilizador. Como así también dar lugar a estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades superficiales de la piel, induciendo principalmente la muerte celular apoptótica, evitando inflamación y daño al tejido sano circundante.

## **CONCLUSIONES**

Los fotosensibilizadores, RF y RFTA, al ser irradiados con la lámpara de 446 nm son activados y generan, desde ese estado, especies reactivas de oxígeno como  $^1\text{O}_2$  y  $\cdot\text{O}_2^-$ . Además, RFTA demostró ser una molécula más fotoestable que RF al ser irradiada con diferentes densidades de energía.

RF y RFTA requieren de la activación lumínica para llevar a cabo un efecto citotóxico en células de carcinoma escamoso, siendo más leve la toxicidad en queratinocitos normales, demostrando la selectividad de esta terapia al afectar sólo células cancerosas.

La citotoxicidad se evidenció por la disminución de la viabilidad celular de manera dosis de luz dependiente para ambos FS, siendo RFTA más efectiva que RF. Además, la TFD-RFTA en células SCC-13 indujo una marcada disminución de la proliferación, alterando el ciclo celular al generar un arresto en las fases G2/M.

El tratamiento con RF y RFTA indujo la muerte celular por el mecanismo apoptótico por vía caspasa dependiente.

La fotoactivación de RF y RFTA genera un aumento significativo en los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno, no evidenciando cambios en el potencial de membrana mitocondrial post-tratamiento.

Las ERO generadas por la TFD, inducen la activación de las ERK 1/2 como mecanismo de protección a la muerte celular inducida.

La hiperplasia epidérmica generada en ratones alopecicos puede ser prevenida de manera parcial con la aplicación de TFD-RFTA tanto en hembras como en machos, mientras que TFD-RFTA como tratamiento terapéutico para tratar lesiones de hiperplasia, revierte totalmente la hiperproliferación de células epidérmicas en hembras y parcialmente en machos.

El tratamiento terapéutico de TFD-RFTA genera disminución de la proliferación epidérmica en el modelo murino de hiperplasia epidérmica al aumentar el número de células que sufren muerte celular por apoptosis.

Este mecanismo postulado podría proporcionar importantes conocimientos sobre la TFD-RFTA y dar lugar a nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades superficiales de la piel, ya que se asoció a la apoptosis como mecanismo de muerte llevado a cabo y no a la necrosis, lo que evitaría la inflamación y el daño al tejido sano circundante.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	ácido dexocirbonucleico
AIF	factor inductor de apoptosis
ALA	ácido $\alpha$ aminolevulínico
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i> = análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
BrDU	Bromodeoxiuridina
<b>caspasas</b>	<i>cysteine-dependent aspartate-directed proteases</i>
CBC	carcinoma basocelular
CCE	carcinoma de células escamosas
CCP	contenido de grupos carbonilos
CPNM	cánceres de piel del tipo no melanoma
CR	cadena respiratoria
d	día
DAB	diaminobencidina
DCFDA	diclorofluoresceína
DHE	dihidroetidio
DMA	9, 10-dimetilantraceno
DMBA	7,12-dimetilbenz(a) antraceno
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNFH	di-nitro-fenil-hidrazina
DNTB	5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
DO	densidad óptica
DOXO	doxorubicina
DTNB	<i>5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid</i>
EndoG	endonucleasa G
ER	especies reactivas
ERK 1/2	<i>extracellular-signal-regulated kinases 1/2= quinasa regulada por señales extracelulares</i>
ERO	especies reactivas de oxígeno
FAD	flavinadenina dinucleotido
FCCP	<i>Trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazone</i>
FMN	flavina Mononucleotide

<b>FS</b>	fotosensibilizador
<b>g</b>	gramo
<b>g</b>	gravedad
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrógeno
<b>HBSS</b>	solución salina equilibrada de Hank
<b>HE</b>	hematoxilina-eosina
<b>IAP</b>	inhibidores endógenos de las caspasas
<b>IFM</b>	intensidad de fluorescencia media
<b>Ig</b>	inmunoglobulina
<b>J/cm<sup>2</sup></b>	joule/centímetro cuadrado
<b>JC-1</b>	<i>5, 5', 6, 6' - tetrachloro - 1, 1', 3, 3' - tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>LEDs</b>	diodos emisores de luz
<b>M</b>	molar
<b>MME</b>	membrana mitocondrial externa
<b>MMI</b>	membrana mitocondrial interna
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> =Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>mg/l</b>	miligramo/litro
<b>min</b>	minuto/s
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>MOAR</b>	microscopía óptica de alta resolución
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>ng/ml</b>	nanogramos/mililitro
<b>nM</b>	nanomolar
<b>nm</b>	nanómetros
<b>NPSH</b>	tioles no proteicos
<b>PARP</b>	poli (ADP-ribosa) polimerasa
<b>PBS</b>	solución salina tamponada con fosfato
<b>PBS-BSA</b>	solución salina tamponada con fosfato- albúmina bovina
<b>PBS-SNCa</b>	solución salina tamponada con fosfato- suero normal de cabra
<b>PBS-Tween</b>	solución salina tamponada con fosfato-Monooleato de Polioxietileno Sorbitan
<b>PE</b>	phicoeritrin 105 = ficoeritrina 105

<b>p-ERK 1/2</b>	<i>Phosphorylated extracellular signal regulated kinases 1/2</i>
<b>PMA</b>	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
<b>PMM</b>	permeabilización de las membranas mitocondriales
<b>pmol</b>	picomoles
<b>QA</b>	queratosis actínica
<b>RE</b>	retículo endoplásmico
<b>RF</b>	riboflavina
<b>RFTA</b>	riboflavina 2', 3', 4', 5'- tetraacetato
<b>RN</b>	Rojo neutro
<b>s</b>	segundo/s
<b>SAPKs</b>	proteínas quinasas activadas por el estrés
<b>SCC</b>	carcinoma de células escamosas
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>SLS</b>	laurilsulfato de sodio
<b>SH</b>	glutación reducido
<b>TBS</b>	solución salina tamponada con sal de tri-etil-amonio
<b>TdT</b>	transferasa terminal de desoxinucleotidos
<b>TFD</b>	terapia fotodinámica
<b>TRIS</b>	<i>triethylammonium salt</i>
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
<b>U/ml</b>	unidades/mililitro
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	potencial de membrana mitocondrial interna
<b><math>\cdot\text{O}_2^-</math></b>	radical anión superóxido
<b><math>\cdot\text{OH}</math></b>	radical hidroxilo
<b>°C</b>	grados centígrados
<b><math>\mu\text{g/ml}</math></b>	microgramos/mililitro
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	micrómetros
<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	oxígeno singlete
<b>3-OHP</b>	3-hidroxipiridina
<b>7-AAD</b>	7-amino-actinomicina D
<b><math>\lambda</math></b>	longitud de onda

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y. Gilaberte, C. Serra-Guillen, M.E. de las Heras, R. Ruiz-Rodriguez, M. Fernandez-Lorente, C. Benvenuto-Andrade, S. Gonzalez-Rodriguez, C. Guillen-Barona, [Photodynamic therapy in dermatology], *Actas Dermosifiliogr* 97 (2006) 83-102.
- [2] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J Natl Cancer Inst* 90 (1998) 889-905.
- [3] D.E. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 380-387.
- [4] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J Clin* 61 (2011) 250-281.
- [5] J. Garcia-Zuazaga, K.D. Cooper, E.D. Baron, Photodynamic therapy in dermatology: current concepts in the treatment of skin cancer, *Expert Rev Anticancer Ther* 5 (2005) 791-800.
- [6] M. Stapleton, L.E. Rhodes, Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease, *J Dermatolog Treat* 14 (2003) 107-112.
- [7] A.E. O'Connor, W.M. Gallagher, A.T. Byrne, Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 85 (2009) 1053-1074.
- [8] A. Orenstein, G. Kostenich, L. Roitman, Y. Shechtman, Y. Kopolovic, B. Ehrenberg, Z. Malik, A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model, *Br J Cancer* 73 (1996) 937-944.
- [9] B.E.P. Braathen L.R., and O. Saksela, , An open explanatory (fase I-II) study of Metvix cream 80 mg-gram and 160 mg-gr in patients with primary actinic queratoses. , *J Eur Acad Dermatol. Venereol.* (2000) 14-18.
- [10] G. Dragieva, L. Scharer, R. Dummer, W. Kempf, Photodynamic therapy--a new treatment option for epithelial malignancies of the skin, *Onkologie* 27 (2004) 407-411.
- [11] C. Fritsch, G. Goerz, T. Ruzicka, Photodynamic therapy in dermatology, *Arch Dermatol* 134 (1998) 207-214.
- [12] J.C. Kennedy, R.H. Pottier, D.C. Pross, Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, *J Photochem Photobiol B* 6 (1990) 143-148.
- [13] K.Y. Kobayashi M, Satoh K, Sawada K., Solvent effect on the aggregation of amphiphilic phthalocyanines substituted by polyethyleneoxide., *J Porphyr Phthalocyanines*. 2 (2012) 183-191.
- [14] W.S. Chan, J.F. Marshall, R. Svensen, J. Bedwell, I.R. Hart, Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminum phthalocyanine, *Cancer Res* 50 (1990) 4533-4538.
- [15] X. Zheng, R.K. Pandey, Porphyrin-carbohydrate conjugates: impact of carbohydrate moieties in photodynamic therapy (PDT), *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 8 (2008) 241-268.
- [16] M. Shadidi, M. Sioud, Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides, *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 6 (2003) 363-371.

- [17] L. Polo, G. Valduga, G. Jori, E. Reddi, Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts, *Int J Biochem Cell Biol* 34 (2002) 10-23.
- [18] M.B. Vrouenraets, G.W. Visser, C. Loup, B. Meunier, M. Stigter, H. Oppelaar, F.A. Stewart, G.B. Snow, G.A. van Dongen, Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy, *Int J Cancer* 88 (2000) 108-114.
- [19] D.K. Chatterjee, L.S. Fong, Y. Zhang, Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm, *Advanced drug delivery reviews* 60 (2008) 1627-1637.
- [20] F. Greco, M.J. Vicent, Polymer-drug conjugates: current status and future trends, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13 (2008) 2744-2756.
- [21] F.H. Figge, G.S. Weiland, L.O. Manganiello, Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 68 (1948) 640.
- [22] M.R. Hamblin, E.L. Newman, On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy, *J Photochem Photobiol B* 23 (1994) 3-8.
- [23] I. Yoon, J.Z. Li, Y.K. Shim, Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy, *Clin Endosc* 46 (2013) 7-23.
- [24] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2 (2005) 91-106.
- [25] F. Yuan, M. Leunig, D.A. Berk, R.K. Jain, Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice, *Microvascular research* 45 (1993) 269-289.
- [26] R. Pottier, J.C. Kennedy, The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue, *J Photochem Photobiol B* 8 (1990) 1-16.
- [27] B.A. Allison, P.H. Pritchard, J.G. Levy, Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative, *Br J Cancer* 69 (1994) 833-839.
- [28] W.G. Roberts, T. Hasan, Role of neovasculature and vascular permeability on the tumor retention of photodynamic agents, *Cancer Res* 52 (1992) 924-930.
- [29] D. Fresnadillo, Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones. , in: U.C.B.L. 1 (Ed.), Solas Safe Water, Francia, 2005.
- [30] Y. Gilaberte, D. Pereboom, F.J. Carapeto, J.O. Alda, Flow cytometry study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX, *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 13 (1997) 43-49.
- [31] J. Moan, On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissue, *J Photochem Photobiol Biol.* (1990) 343-344.
- [32] M.B. Vrouenraets, G.W. Visser, G.B. Snow, G.A. van Dongen, Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy, *Anticancer Res* 23 (2003) 505-522.
- [33] N.C. Zeitouni, A.R. Oseroff, S. Shieh, Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update, *Mol Immunol* 39 (2003) 1133-1136.
- [34] C.A. Morton, Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer--and more?, *Arch Dermatol* 140 (2004) 116-120.

- [35] R.M. Szeimies, T. Lorenzen, S. Karrer, C. Abels, A. Plettenberg, [Photochemotherapy of cutaneous AIDS-associated Kaposi sarcoma with indocyanine green and laser light], *Hautarzt* 52 (2001) 322-326.
- [36] D.V. Sakharov, A. Bunschoten, H. van Weelden, K.W. Wirtz, Photodynamic treatment and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress result in different patterns of cellular protein oxidation, *Eur J Biochem* 270 (2003) 4859-4865.
- [37] J.P. Celli, B.Q. Spring, I. Rizvi, C.L. Evans, K.S. Samkoe, S. Verma, B.W. Pogue, T. Hasan, Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization, *Chemical reviews* 110 (2010) 2795-2838.
- [38] B. Kruijt, E.M. van der Snoek, H.J. Sterenborg, A. Amelink, D.J. Robinson, A dedicated applicator for light delivery and monitoring of PDT of intra-anal intraepithelial neoplasia, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 7 (2010) 3-9.
- [39] T.S. YoonMang, Lasers and light sources for PDT: past, present and future, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 1 (2004) 43-48.
- [40] R.R. Anderson, Optics of the skin., in: S. Lim H. W. and N. A. (Ed.), *Clinical Photomedicine*, Macel Dekker, New York, 1992, pp. 19-30.
- [41] A. Juzeniene, K.P. Nielsen, J. Moan, Biophysical aspects of photodynamic therapy, *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 25 (2006) 7-28.
- [42] B.J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J.C. Vera, T.S. Mang, A.B. Foy, S.M. Lew, A.W. Girotti, S. Jogal, P.S. LaViolette, J.M. Connelly, H.T. Whelan, Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors - where do we stand?, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* (2015).
- [43] T.S. Mang, Dosimetric concepts for PDT, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 5 (2008) 217-223.
- [44] T. Kriska, W. Korytowski, A.W. Girotti, Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinat-treated tumor cells, *Arch Biochem Biophys* 433 (2005) 435-446.
- [45] R.D. Almeida, B.J. Manadas, A.P. Carvalho, C.B. Duarte, Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy, *Biochim Biophys Acta* 1704 (2004) 59-86.
- [46] A. Juarranz, P. Jaen, F. Sanz-Rodriguez, J. Cuevas, S. Gonzalez, Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications, *Clin Transl Oncol* 10 (2008) 148-154.
- [47] M.T. Wan, J.Y. Lin, Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology, *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* 7 (2014) 145-163.
- [48] S. Pervaiz, M. Olivo, Art and science of photodynamic therapy, *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 33 (2006) 551-556.
- [49] S. Mills, *Histology for pathologist*, AMOLCA, 2007.
- [50] V. Kumar, N. Fausto, A. Abbas, The Skin, in: J. Saunders (Ed.), *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, Saunders, 2005.
- [51] C. Ricotti, N. Bouzari, A. Agadi, C.J. Cockerell, Malignant skin neoplasms, *Med Clin North Am* 93 (2009) 1241-1264.
- [52] T.L. Diepgen, V. Mahler, The epidemiology of skin cancer, *Br J Dermatol* 146 Suppl 61 (2002) 1-6.
- [53] Q.A. MacKie RM, Non-melanoma skin cancer and other epidermal tumours., in: B.S. BurnsT, Cox N, Griffiths C. (Ed.), *Rook's Textbook of Dermatology*, 2004, pp. 1-36.
- [54] K.J. Busam, *Dermatopathology*, 2015.
- [55] M. Truchuelo, M. Fernandez-Guarino, B. Fleta, J. Alcantara, P. Jaen, Effectiveness of photodynamic therapy in Bowen's disease: an observational and descriptive study in 51 lesions, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26 (2012) 868-874.

- [56] C.A. Morton, R.M. Szeimies, A. Sidoroff, L.R. Braathen, European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: treatment delivery and current indications - actinic keratoses, Bowen's disease, basal cell carcinoma, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27 (2013) 536-544.
- [57] F.J. Bath-Hextall, R.N. Matin, D. Wilkinson, J. Leonardi-Bee, Interventions for cutaneous Bowen's disease, *Cochrane Database Syst Rev* 6 (2013) CD007281.
- [58] C.A. Frost, A.C. Green, G.M. Williams, The prevalence and determinants of solar keratoses at a subtropical latitude (Queensland, Australia), *Br J Dermatol* 139 (1998) 1033-1039.
- [59] D. Weedon, *Patologia de Piel Marban Libros* 2010.
- [60] C.J. Gomer, N. Rucker, A.L. Murphree, Transformation and mutagenic potential of porphyrin photodynamic therapy in mammalian cells, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 53 (1988) 651-659.
- [61] R.F. Pittau, P. Pons, N. Boeto, A. Aoki, An inexpensive light source for oncologic photodynamic therapy, *IEEE Eng Med Biol Mag* 17 (1998) 105-106.
- [62] P. Pons, R.F. Pittau, N.A. Boetto, R. Garzon, A. Aoki, [Prototype of light source for photodynamic therapy in Centre of Electron Microscopy], *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 57 (2000) 31-36.
- [63] B.W. Henderson, T.J. Dougherty, How does photodynamic therapy work?, *Photochem Photobiol* 55 (1992) 145-157.
- [64] N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko, The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem Photobiol Sci* 1 (2002) 1-21.
- [65] C. Abels, Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT), *Photochem Photobiol Sci* 3 (2004) 765-771.
- [66] A.P. Castano, P. Mroz, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 535-545.
- [67] J. Moan, K. Berg, The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem Photobiol* 53 (1991) 549-553.
- [68] E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis, Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, *Biochim Biophys Acta* 1776 (2007) 86-107.
- [69] D. Kessel, Y. Luo, Y. Deng, C.K. Chang, The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 65 (1997) 422-426.
- [70] E. Buytaert, G. Callewaert, N. Hendrickx, L. Scorrano, D. Hartmann, L. Missiaen, J.R. Vandenheede, I. Heirman, J. Grooten, P. Agostinis, Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy, *FASEB J* 20 (2006) 756-758.
- [71] E. Buytaert, G. Callewaert, J.R. Vandenheede, P. Agostinis, Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum, *Autophagy* 2 (2006) 238-240.
- [72] D. Kessel, J.J. Reiners, Jr., Initiation of apoptosis and autophagy by the Bcl-2 antagonist HA14-1, *Cancer Lett* 249 (2007) 294-299.
- [73] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ* 16 (2009) 3-11.

- [74] B. Levine, G. Kroemer, Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor, *Cell Death Differ* 16 (2009) 1-2.
- [75] E. Tasdemir, L. Galluzzi, M.C. Maiuri, A. Criollo, I. Vitale, E. Hangen, N. Modjtahedi, G. Kroemer, Methods for assessing autophagy and autophagic cell death, *Methods Mol Biol* 445 (2008) 29-76.
- [76] N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker, *Mol Biol Cell* 15 (2004) 1101-1111.
- [77] N.N. Danial, S.J. Korsmeyer, Cell death: critical control points, *Cell* 116 (2004) 205-219.
- [78] K.F. Ferri, G. Kroemer, Organelle-specific initiation of cell death pathways, *Nature cell biology* 3 (2001) E255-263.
- [79] M.O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407 (2000) 770-776.
- [80] Y. Tomioka, T. Kushibiki, K. Awazu, Evaluation of oxygen consumption of culture medium and in vitro photodynamic effect of talaporfin sodium in lung tumor cells, *Photomedicine and laser surgery* 28 (2010) 385-390.
- [81] K.M. Boatright, G.S. Salvesen, Mechanisms of caspase activation, *Current opinion in cell biology* 15 (2003) 725-731.
- [82] M. Deshmukh, K. Kuida, E.M. Johnson, Jr., Caspase inhibition extends the commitment to neuronal death beyond cytochrome c release to the point of mitochondrial depolarization, *J Cell Biol* 150 (2000) 131-143.
- [83] I. Martinou, S. Desagher, R. Eskes, B. Antonsson, E. Andre, S. Fakan, J.C. Martinou, The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event, *J Cell Biol* 144 (1999) 883-889.
- [84] G. van Loo, X. Saelens, M. van Gurp, M. MacFarlane, S.J. Martin, P. Vandenabeele, The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet, *Cell Death Differ* 9 (2002) 1031-1042.
- [85] M. Crompton, E. Barksby, N. Johnson, M. Capano, Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death, *Biochimie* 84 (2002) 143-152.
- [86] D.R. Green, G. Kroemer, The pathophysiology of mitochondrial cell death, *Science* 305 (2004) 626-629.
- [87] M. Srivastava, N. Ahmad, S. Gupta, H. Mukhtar, Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis, *J Biol Chem* 276 (2001) 15481-15488.
- [88] P.N. Kelly, A. Strasser, The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy, *Cell Death Differ* 18 (2011) 1414-1424.
- [89] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin, Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer, *Cancers* 3 (2011) 2516-2539.
- [90] E.F. Wagner, A.R. Nebreda, Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development, *Nat Rev Cancer* 9 (2009) 537-549.
- [91] H.T. Ji, L.T. Chien, Y.H. Lin, H.F. Chien, C.T. Chen, 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase, *Molecular cancer* 9 (2010) 91.
- [92] R. Bhowmick, A.W. Girotti, Signaling events in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells: inhibitory effects of nitric oxide, *Free Radic Biol Med* 47 (2009) 731-740.
- [93] X. Wang, J.L. Martindale, N.J. Holbrook, Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis, *J Biol Chem* 275 (2000) 39435-39443.

- [94] C. Lesuisse, L.J. Martin, Immature and mature cortical neurons engage different apoptotic mechanisms involving caspase-3 and the mitogen-activated protein kinase pathway, *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22 (2002) 935-950.
- [95] D. Pavlovic, N.A. Andersen, T. Mandrup-Poulsen, D.L. Eizirik, Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells, *European cytokine network* 11 (2000) 267-274.
- [96] L. Conde de la Rosa, M.H. Schoemaker, T.E. Vrenken, M. Buist-Homan, R. Havinga, P.L. Jansen, H. Moshage, Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases, *Journal of hepatology* 44 (2006) 918-929.
- [97] M. Krishna, H. Narang, The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (2008) 3525-3544.
- [98] G. Nowak, Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na<sup>+</sup> transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells, *J Biol Chem* 277 (2002) 43377-43388.
- [99] B.G. Park, C.I. Yoo, H.T. Kim, C.H. Kwon, Y.K. Kim, Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells, *Toxicology* 215 (2005) 115-125.
- [100] Z. Wu, L.J. Wu, S. Tashiro, S. Onodera, T. Ikejima, Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase up-regulated p53 expression in shikonin-induced HeLa cell apoptosis, *Chin Med J (Engl)* 118 (2005) 671-677.
- [101] S. Cagnol, E. Van Obberghen-Schilling, J.C. Chambard, Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death, *Apoptosis* 11 (2006) 337-346.
- [102] A. Behrens, W. Jochum, M. Sibilia, E.F. Wagner, Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation, *Oncogene* 19 (2000) 2657-2663.
- [103] C. Widmann, S. Gibson, G.L. Johnson, Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals, *J Biol Chem* 273 (1998) 7141-7147.
- [104] P. Juo, C.J. Kuo, S.E. Reynolds, R.F. Konz, J. Raingeaud, R.J. Davis, H.P. Biemann, J. Blenis, Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases, *Mol Cell Biol* 17 (1997) 24-35.
- [105] M.H. Cardone, G.S. Salvesen, C. Widmann, G. Johnson, S.M. Frisch, The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases, *Cell* 90 (1997) 315-323.
- [106] C. Bradham, D.R. McClay, p38 MAPK in development and cancer, *Cell Cycle* 5 (2006) 824-828.
- [107] T. Kaneko, N. Baba, M. Matsuo, Structure-activity relationship of antioxidants for inhibitors of linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity in cultured human umbilical vein endothelial cells, *Cytotechnology* 35 (2001) 43-55.
- [108] J.S. Beckman, W.H. Koppenol, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly, *Am J Physiol* 271 (1996) C1424-1437.
- [109] S.S. Korshunov, V.P. Skulachev, A.A. Starkov, High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett* 416 (1997) 15-18.

- [110] E. Cadenas, K.J. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radic Biol Med* 29 (2000) 222-230.
- [111] M.L. Urso, P.M. Clarkson, Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology* 189 (2003) 41-54.
- [112] L.A. Macmillan-Crow, D.L. Cruthirds, Invited review: manganese superoxide dismutase in disease, *Free Radic Res* 34 (2001) 325-336.
- [113] V.L. Kinnula, J.D. Crapo, Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors, *Free Radic Biol Med* 36 (2004) 718-744.
- [114] L. Goth, P. Rass, A. Pay, Catalase enzyme mutations and their association with diseases, *Mol Diagn* 8 (2004) 141-149.
- [115] H. Imai, Y. Nakagawa, Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radic Biol Med* 34 (2003) 145-169.
- [116] Z.A. Wood, E. Schroder, J. Robin Harris, L.B. Poole, Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem Sci* 28 (2003) 32-40.
- [117] E.S. Arner, A. Holmgren, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur J Biochem* 267 (2000) 6102-6109.
- [118] R.A. Jacob, F.S. Pianalto, S.M. Henning, J.Z. Zhang, M.E. Swendseid, In vivo methylation capacity is not impaired in healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction, *J Nutr* 125 (1995) 1495-1502.
- [119] M. Saraste, Structural features of cytochrome oxidase, *Quarterly reviews of biophysics* 23 (1990) 331-366.
- [120] A. Barrientos, M.H. Barros, I. Valnot, A. Rotig, P. Rustin, A. Tzagoloff, Cytochrome oxidase in health and disease, *Gene* 286 (2002) 53-63.
- [121] R.O. Poyton, J.E. McEwen, Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes, *Annual review of biochemistry* 65 (1996) 563-607.
- [122] D.C. Wallace, Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science* 283 (1999) 1482-1488.
- [123] P.A. Parone, D. James, J.C. Martinou, Mitochondria: regulating the inevitable, *Biochimie* 84 (2002) 105-111.
- [124] C. Fleury, B. Mignotte, J.L. Vayssiere, Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling, *Biochimie* 84 (2002) 131-141.
- [125] Z. Huang, An update on the regulatory status of PDT photosensitizers in China, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 5 (2008) 285-287.
- [126] V. Massey, The chemical and biological versatility of riboflavin, *Biochem Soc Trans* 28 (2000) 283-296.
- [127] A.M. Edwards, E. Silva, Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids, *J Photochem Photobiol B* 63 (2001) 126-131.
- [128] A.V. Juarez, N. Boetto, E. Haggi, P. Pons, Respuesta de células hipofisarias al estrés oxidativo producido por riboflavina en terapia fotodinámica *Acta Microsc.* 22 (2013) 10.
- [129] M.M. Jazzar, I. Naseem, Genotoxicity of photoilluminated riboflavin in the presence of Cu(II), *Free Radic Biol Med* 21 (1996) 7-14.
- [130] J. Jakus, O. Farkas, Photosensitizers and antioxidants: a way to new drugs?, *Photochem Photobiol Sci* 4 (2005) 694-698.
- [131] A.M. Edwards, E. Silva, B. Jofre, M.I. Becker, A.E. De Ioannes, Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin, *J Photochem Photobiol B* 24 (1994) 179-186.

- [132] E. Husain, I. Naseem, Riboflavin-mediated cellular photoinhibition of cisplatin-induced oxidative DNA breakage in mice epidermal keratinocytes, *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24 (2008) 301-307.
- [133] A.C. de Souza, L. Kodach, F.R. Gadelha, C.L. Bos, A.D. Cavagis, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death, *Apoptosis* 11 (2006) 1761-1771.
- [134] M.A. Munoz, A. Pacheco, M.I. Becker, E. Silva, R. Ebensperger, A.M. Garcia, A.E. De Ioannes, A.M. Edwards, Different cell death mechanisms are induced by a hydrophobic flavin in human tumor cells after visible light irradiation, *J Photochem Photobiol B* 103 57-67.
- [135] A.M. Edwards, F. Barredo, E. Silva, A.E. De Ioannes, M.I. Becker, Apoptosis induction in nonirradiated human HL-60 and murine NSO/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin, *Photochem Photobiol* 70 (1999) 645-649.
- [136] I. Hassan, S. Chibber, I. Naseem, Vitamin B(2): a promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management, *Food Chem Toxicol* 59 (2013) 715-723.
- [137] A.M. Edwards, A. Saldaño, C. Bueno, E. Silva, S. Alegría, Spectroscopic properties of hydrophobic flavin esters. A one and two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR study., *Bol. Soc. Chil. Quím* 45 (2000) 423-431.
- [138] M.A. Munoz, A. Pacheco, M.I. Becker, E. Silva, R. Ebensperger, A.M. Garcia, A.E. De Ioannes, A.M. Edwards, Different cell death mechanisms are induced by a hydrophobic flavin in human tumor cells after visible light irradiation, *J Photochem Photobiol B* 103 (2011) 57-67.
- [139] A.M. Edwards, C. Bueno, A. Saldano, E. Silva, K. Kassab, L. Polo, G. Jori, Photochemical and pharmacokinetic properties of selected flavins, *J Photochem Photobiol B* 48 (1999) 36-41.
- [140] B.J.K. Fritz, S.; Matsui, K., Photochemical properties of flavin derivatives, *Photochem. Photobiol* 45 (1987) 539-541.
- [141] C.K. Remucal, K. McNeill, Photosensitized amino acid degradation in the presence of riboflavin and its derivatives, *Environ Sci Technol* 45 (2011) 5230-5237.
- [142] S.Y. Proskuryakov, A.G. Konoplyannikov, V.L. Gabai, Necrosis: a specific form of programmed cell death?, *Exp Cell Res* 283 (2003) 1-16.
- [143] F.K. Ogasawara, Y. Wang, D.R. Bobbitt, Dynamically modified, biospecific optical fiber sensor for riboflavin binding protein based on hydrophobically associated 3-octylriboflavin, *Anal Chem* 64 (1992) 1637-1642.
- [144] A. Felgentrager, T. Maisch, D. Dobler, A. Spath, Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: photophysics and antimicrobial efficiency, *Biomed Res Int* 2013 482167.
- [145] M.B. Ericson, S. Grapengiesser, F. Gudmundson, A.M. Wennberg, O. Larko, J. Moan, A. Rosen, A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution, *Lasers Med Sci* 18 (2003) 56-62.
- [146] G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nat Protoc* 3 (2008) 1125-1131.
- [147] M.J. Karnovsky, R.C. Graham, A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy, *Cell Biol* 24 (1965) 137-138.
- [148] Y. Gavrieli, Y. Sherman, S.A. Ben-Sasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol* 119 (1992) 493-501.

- [149] E.M. Bevers, P. Comfurius, D.W. Dekkers, R.F. Zwaal, Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells, *Biochim Biophys Acta* 1439 (1999) 317-330.
- [150] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193 (1951) 265-275.
- [151] G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal Biochem* 83 (1977) 346-356.
- [152] V.P. Bindokas, J. Jordan, C.C. Lee, R.J. Miller, Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine, *J Neurosci* 16 (1996) 1324-1336.
- [153] S. Papa, V.P. Skulachev, Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging, *Mol Cell Biochem* 174 (1997) 305-319.
- [154] M. Reers, T.W. Smith, L.B. Chen, J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential, *Biochemistry* 30 (1991) 4480-4486.
- [155] A.J. Cooper, B.S. Kristal, Multiple roles of glutathione in the central nervous system, *Biological chemistry* 378 (1997) 793-802.
- [156] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys* 82 (1959) 70-77.
- [157] A.Z. Reznick, L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol* 233 (1994) 357-363.
- [158] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*, kindle, 2004.
- [159] E. Gnaiger, Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply, *Respiration physiology* 128 (2001) 277-297.
- [160] F. Sjoval, S. Morota, M.J. Hansson, H. Friberg, E. Gnaiger, E. Elmer, Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis, *Crit Care* 14 (2010) R214.
- [161] C.A. Casiano, R.L. Ochs, E.M. Tan, Distinct cleavage products of nuclear proteins in apoptosis and necrosis revealed by autoantibody probes, *Cell Death Differ* 5 (1998) 183-190.
- [162] R.J. Youle, A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 47-59.
- [163] A.R. Soares, M.G. Neves, A.C. Tome, M.C. Iglesias-de la Cruz, A. Zamarron, E. Carrasco, S. Gonzalez, J.A. Cavaleiro, T. Torres, D.M. Guldi, A. Juarranz, Glycophthalocyanines as photosensitizers for triggering mitotic catastrophe and apoptosis in cancer cells, *Chemical research in toxicology* 25 (2012) 940-951.
- [164] M. Wainwright, Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers, *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 8 (2008) 280-291.
- [165] P.C. Lo, W.P. Fong, D.K. Ng, Effects of peripheral chloro substitution on the photophysical properties and in vitro photodynamic activities of galactose-conjugated silicon(IV) phthalocyanines, *ChemMedChem* 3 (2008) 1110-1117.
- [166] J.J. Chen, G. Hong, L.J. Gao, T.J. Liu, W.J. Cao, In vitro and in vivo antitumor activity of a novel porphyrin-based photosensitizer for photodynamic therapy, *Journal of cancer research and clinical oncology* (2015).
- [167] E. Husain, R.A. Fatima, I.A. Ali, I. Naseem, Photoilluminated riboflavin/riboflavin-Cu(II) inactivates trypsin: Cu(II) tilts the balance, *Indian J Biochem Biophys* 43 (2006) 312-318.
- [168] I. Hassan, S. Chibber, I. Naseem, Ameliorative effect of riboflavin on the cisplatin induced nephrotoxicity and hepatotoxicity under photoillumination, *Food Chem Toxicol* 48 (2010) 2052-2058.

- [169] J. Ferreira, P.F.C. Menezes, C. Kurachi, C. Sibata, R.R. Allison, V.S. Bagnato, Photostability of different chlorine photosensitizers, *J Agric Food Chem* 52 (2008) 156-161.
- [170] D.R. Cardoso, D.W. Franco, K. Olsen, M.L. Andersen, L.H. Skibsted, Reactivity of bovine whey proteins, peptides, and amino acids toward triplet riboflavin as studied by laser flash photolysis, *J Agric Food Chem* 52 (2004) 6602-6606.
- [171] I. Moserova, J. Kralova, Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways, *PLoS One* 7 (2012) e32972.
- [172] M. Durmus, V. Ahsen, Water-soluble cationic gallium(III) and indium(III) phthalocyanines for photodynamic therapy, *Journal of inorganic biochemistry* 104 (2010) 297-309.
- [173] A. Pajares, J. Gianotti, E. Haggi, F. Amat-Guerri, S. Bertolotti, N. Garcia, Visible light-promoted interactions between riboflavin and 3-hydroxypyridine in aqueous solution, *Dyes Pigm* 41 (1999) 233-239.
- [174] E.A.T. Vargas, Fototoxicidad de acetazolamida. carácter fotosensibilizador de  $^1O_2$  y reactividad frente al oxígeno excitado., FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUIMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, Colombia, 2010, Vol. Maestría en Ciencias-Química, p. 83.
- [175] E. Gross, B. Ehrenberg, F.M. Johnson, Singlet oxygen generation by porphyrins and the kinetics of 9,10-dimethylanthracene photosensitization in liposomes, *Photochem Photobiol* 57 (1993) 808-813.
- [176] W. Tang, H. Xu, R. Kopelman, M.A. Philbert, Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms, *Photochem Photobiol* 81 (2005) 242-249.
- [177] A. Wang, L. Zhou, K. Fang, L. Zhou, Y. Lin, J. Zhou, S. Wei, Synthesis of novel octa-cationic and non-ionic 1,2-ethanediamine substituted zinc (II) phthalocyanines and their in vitro anti-cancer activity comparison, *European journal of medicinal chemistry* 58 (2012) 12-21.
- [178] M. Kostka, P. Zimcik, M. Miletin, P. Klemnera, K. Kopecky, Z. Musil, Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2006) 16-25.
- [179] L.R. Braathen, R.M. Szeimies, N. Basset-Seguin, R. Bissonnette, P. Foley, D. Pariser, R. Roelandts, A.M. Wennberg, C.A. Morton, D. International Society for Photodynamic Therapy in, Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology*, 2005, *J Am Acad Dermatol* 56 (2007) 125-143.
- [180] L.E. Dubas, A. Ingraffea, Nonmelanoma skin cancer, *Facial Plast Surg Clin North Am* 21 (2013) 43-53.
- [181] P. Boukamp, Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression?, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1657-1667.
- [182] V. de Lima Vazquez, T. Sachetto, N.M. Perpetuo, A.L. Carvalho, Prognostic factors for lymph node metastasis from advanced squamous cell carcinoma of the skin of the trunk and extremities, *World journal of surgical oncology* 6 (2008) 73.
- [183] R.M. Szeimies, C.A. Morton, A. Sidoroff, L.R. Braathen, Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer, *Acta Derm Venereol* 85 (2005) 483-490.
- [184] K.S. Cho, E.H. Lee, J.S. Choi, C.K. Joo, Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (1999) 911-919.

- [185] R.R. Allison, C.H. Sibata, Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 7 (2010) 61-75.
- [186] E. Crescenzi, L. Varriale, M. Iovino, A. Chiaviello, B.M. Veneziani, G. Palumbo, Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells, *Mol Cancer Ther* 3 (2004) 537-544.
- [187] S.L. Haywood-Small, D.I. Vernon, J. Griffiths, J. Schofield, S.B. Brown, Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 339 (2006) 569-576.
- [188] Z. Zhang, K. Teruya, H. Eto, S. Shirahata, Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways, *PLoS One* 6 (2011) e27441.
- [189] N. Ahmad, D.K. Feyes, R. Agarwal, H. Mukhtar, Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 6977-6982.
- [190] L. Wang, A. Alcon, H. Yuan, J. Ho, Q.J. Li, M. Martins-Green, Cellular and molecular mechanisms of pomegranate juice-induced anti-metastatic effect on prostate cancer cells, *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3 (2011) 742-754.
- [191] G.F. He, M.L. Bian, Y.W. Zhao, Q. Xiang, H.Y. Li, C. Xiao, [Apoptosis-inducing effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy (5-ALA-PDT) on cervical cancer cell lines], *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer* 27 (2008) 897-904.
- [192] L.H. Wei, H. Baumann, E. Tracy, Y. Wang, A. Hutson, S. Rose-John, B.W. Henderson, Interleukin-6 trans signalling enhances photodynamic therapy by modulating cell cycling, *Br J Cancer* 97 (2007) 1513-1522.
- [193] L. Wyld, M.W. Reed, N.J. Brown, Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type, *Br J Cancer* 84 (2001) 1384-1386.
- [194] G. Kessel, H.G. Bocher-Schwarz, K. Ringel, A. Perneczky, The role of endoscopy in the treatment of acute traumatic anterior epidural hematoma of the cervical spine: case report, *Neurosurgery* 41 (1997) 688-690.
- [195] M. Dewaele, T. Verfaillie, W. Martinet, P. Agostinis, Death and survival signals in photodynamic therapy, *Methods Mol Biol* 635 (2010) 7-33.
- [196] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 26 (1972) 239-257.
- [197] M. Lam, N.L. Oleinick, A.L. Nieminen, Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization, *J Biol Chem* 276 (2001) 47379-47386.
- [198] G. Whiteside, N. Cougnon, S.P. Hunt, R. Munglani, An improved method for detection of apoptosis in tissue sections and cell culture, using the TUNEL technique combined with Hoechst stain, *Brain research. Brain research protocols* 2 (1998) 160-164.
- [199] D. Denton, S. Kumar, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) for Detection of Apoptotic Cells in *Drosophila*, *Cold Spring Harbor protocols* 2015 (2015) pdb prot086199.
- [200] Di Stefano A, Ettorre A, Sbrana S, Giovani C, N. P., Purpurin-18 in combination with light leads to apoptosis or necrosis in HL60 leukemia cells, *Photochem Photobiol* 3 (2001) 290-296.

- [201] A.U. Luthi, S.J. Martin, The CASBAH: a searchable database of caspase substrates, *Cell Death Differ* 14 (2007) 641-650.
- [202] D. Nowis, M. Makowski, T. Stoklosa, M. Legat, T. Issat, J. Golab, Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy, *Acta Biochim Pol* 52 (2005) 339-352.
- [203] I.E. Furre, M.T. Moller, S. Shahzidi, J.M. Nesland, Q. Peng, Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells, *Apoptosis* 11 (2006) 2031-2042.
- [204] N.B. Vittar, J. Awruch, K. Azizuddin, V. Rivarola, Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine, *Int J Biochem Cell Biol* 42 (2010) 1123-1131.
- [205] N.A. Thornberry, Y. Lazebnik, Caspases: enemies within, *Science* 281 (1998) 1312-1316.
- [206] D. Kessel, M. Castelli, J.J. Reiners, Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species, *Cell Death Differ* 12 (2005) 502-511.
- [207] D. Kessel, Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy, *Photochem Photobiol Sci* 1 (2002) 837-840.
- [208] B. Fadeel, Z. Hassan, E. Hellstrom-Lindberg, J.I. Henter, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, Cleavage of Bcl-2 is an early event in chemotherapy-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells, *Leukemia* 13 (1999) 719-728.
- [209] J.I. Fletcher, D.C. Huang, Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums, *Cell Cycle* 7 (2008) 39-44.
- [210] T. Liu, B. Hannafon, L. Gill, W. Kelly, D. Benbrook, Flex-Hets differentially induce apoptosis in cancer over normal cells by directly targeting mitochondria, *Mol Cancer Ther* 6 (2007) 1814-1822.
- [211] A.M. Saleh, M.M. El-Abadelah, M.A. Aziz, M.O. Taha, A. Nasr, S.A. Rizvi, Antiproliferative activity of the isoindigo 5'-Br in HL-60 cells is mediated by apoptosis, dysregulation of mitochondrial functions and arresting cell cycle at G0/G1 phase, *Cancer Lett* 361 (2015) 251-261.
- [212] J.C. Sharpe, D. Arnoult, R.J. Youle, Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members, *Biochim Biophys Acta* 1644 (2004) 107-113.
- [213] M. Forte, P. Bernardi, The permeability transition and BCL-2 family proteins in apoptosis: co-conspirators or independent agents?, *Cell Death Differ* 13 (2006) 1287-1290.
- [214] N. Vanlangenakker, T. Vanden Berghe, D.V. Krysko, N. Festjens, P. Vandenabeele, Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death, *Curr Mol Med* 8 (2008) 207-220.
- [215] A. Casas, G. Di Venosa, T. Hasan, B. Al, Mechanisms of resistance to photodynamic therapy, *Current medicinal chemistry* 18 (2011) 2486-2515.
- [216] S. Schweyer, A. Soruri, A. Heintze, H.J. Radzun, A. Fayyazi, The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines, *Int J Oncol* 25 (2004) 1671-1676.
- [217] O.G. Rodriguez-Mora, M.M. Lahair, M.J. Evans, C.J. Kovacs, R.R. Allison, C.H. Sibata, K.S. White, J.A. McCubrey, R.A. Franklin, Inhibition of the CaM-kinases augments cell death in response to oxygen radicals and oxygen radical inducing cancer therapies in MCF-7 human breast cancer cells, *Cancer Biol Ther* 5 (2006) 1022-1030.
- [218] J.A. McCubrey, L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, E.W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D.M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A.M. Martelli, R.A. Franklin, Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell

- growth, malignant transformation and drug resistance, *Biochim Biophys Acta* 1773 (2007) 1263-1284.
- [219] B.S. Pan, Y.K. Wang, M.S. Lai, Y.F. Mu, B.M. Huang, Cordycepin induced MA-10 mouse Leydig tumor cell apoptosis by regulating p38 MAPKs and PI3K/AKT signaling pathways, *Scientific reports* 5 (2015) 13372.
- [220] T.H. Ho-Boulidoires, A. Claperon, M. Mergey, D. Wendum, C. Desbois-Mouthon, S. Tahraoui, L. Fartoux, H. Chettouh, F. Merabtene, O. Scatton, M. Gaestel, F. Praz, C. Housset, L. Fouassier, Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 mediates resistance to Hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Human hepatobiliary Cancer cells, *Free Radic Biol Med* (2015).
- [221] S.B. Wallach-Dayana, G. Izbicki, P.Y. Cohen, R. Gerstl-Golan, A. Fine, R. Breuer, Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290 (2006) L790-L796.
- [222] H. Kolarova, R. Bajgar, K. Tomankova, E. Krestyn, L. Dolezal, J. Halek, In vitro study of reactive oxygen species production during photodynamic therapy in ultrasound-pretreated cancer cells, *Physiol Res* 56 Suppl 1 (2007) S27-32.
- [223] M.L. Circu, T.Y. Aw, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic Biol Med* 48 (2010) 749-762.
- [224] S. Ichinose, J. Usuda, T. Hirata, T. Inoue, K. Ohtani, S. Maehara, M. Kubota, K. Imai, Y. Tsunoda, Y. Kuroiwa, K. Yamada, H. Tsutsui, K. Furukawa, T. Okunaka, N.L. Oleinick, H. Kato, Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na), *Int J Oncol* 29 (2006) 349-355.
- [225] C.Y. Wang, X. Wang, Y. Wang, T. Zhou, Y. Bai, Y.C. Li, B. Huang, Photosensitization of phycocyanin extracted from *Microcystis* in human hepatocellular carcinoma cells: implication of mitochondria-dependent apoptosis, *J Photochem Photobiol B* 117 (2012) 70-79.
- [226] H. Zhao, J. Joseph, H.M. Fales, E.A. Sokoloski, R.L. Levine, J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 5727-5732.
- [227] X.F. Han, F.Y. Chen, J.H. Zhong, R.R. Ouyang, [Mitochondria-mediated apoptosis induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL-60 cells], *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* 20 (2012) 73-77.
- [228] D. Zou, P. Liu, K. Chen, Q. Xie, X. Liang, Q. Bai, Q. Zhou, K. Liu, T. Zhang, J. Zhu, M. Mi, Protective effects of myricetin on acute hypoxia-induced exercise intolerance and mitochondrial impairments in rats, *PLoS One* 10 (2015) e0124727.
- [229] A.E. Díaz-Acosta, J. Membrillo-Hernández, Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos, *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 1 (2006) 34-44.
- [230] B.S. Berlett, E.R. Stadtman, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J Biol Chem* 272 (1997) 20313-20316.
- [231] K. Togsverd-Bo, C.M. Lerche, T. Poulsen, H.C. Wulf, M. Haedersdal, Photodynamic therapy with topical methyl- and hexylaminolevulinate for prophylaxis and treatment of UV-induced SCC in hairless mice, *Experimental dermatology* 19 (2010) e166-172.
- [232] S.S. Wee, Y.W. Shin, E.A. Bae, D.H. Kim, Effect of chunghyuldan in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis, *Biol Pharm Bull* 28 (2005) 1079-1082.

- [233] S.H. Moon, K.I. Seo, W.S. Han, D.H. Suh, K.H. Cho, J.J. Kim, H.C. Eun, Pathological findings in cumulative irritation induced by SLS and croton oil in hairless mice, *Contact Dermatitis* 44 (2001) 240-245.
- [234] J.R. Heylings, H.M. Clowes, L. Hughes, Comparison of tissue sources for the skin integrity function test (SIFT), *Toxicol In Vitro* 15 (2001) 597-600.
- [235] T. Kimura, K. Doi, An Experimental Animal Model for Photoallergic Contact Dermatitis, *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 2 (2007) 79-87.
- [236] Hak-Ling Ma, Spencer Liang, Jing Li, Lee Napierata, Tom Brown, Stephen Benoit, Mayra Senices, Davinder Gill, Kyriaki Dunussi-Joannopoulos, Mary Collins, Cheryl Nickerson-Nutter, Lynette A. Fouser, D.A. Young, IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation, *The Journal of clinical investigation* 118 (2008) 597-607.
- [237] L.B. Li, R.C. Luo, Effect of drug-light interval on the mode of action of Photofrin photodynamic therapy in a mouse tumor model, *Lasers Med Sci* 24 (2009) 597-603.
- [238] H. Takahashi, S. Nakajima, I. Sakata, A. Ishida-Yamamoto, H. Iizuka, Photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10(Na): comparative effect with 5-aminolevulinic acid on squamous cell carcinoma cell line, SCC15, ultraviolet B-induced skin tumor, and phorbol ester-induced hyperproliferative skin, *Arch Dermatol Res* 296 (2005) 496-502.
- [239] M. Ohara, Y. Kawashima, O. Katoh, H. Watanabe, Blue light inhibits the growth of B16 melanoma cells, *Jpn J Cancer Res* 93 (2002) 551-558.
- [240] A. Chandramouli, J. Shi, Y. Feng, H. Holubec, R.M. Shanas, A.K. Bhattacharyya, W. Zheng, M.A. Nelson, Haploinsufficiency of the *cdc2l* gene contributes to skin cancer development in mice, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2028-2035.
- [241] H. Takahashi, S. Nakajima, R. Asano, Y. Nakae, I. Sakata, H. Iizuka, Photodynamic therapy using a novel photosensitizer, TONS501, is similarly effective to ALA and EC036 photodynamic therapy on DMBA-and TPA-induced mouse skin papilloma, *J Dermatol Sci* 66 (2012) 221-224.
- [242] K.E. Malten, Thoughts on irritant contact dermatitis, *Contact Dermatitis* 7 (1981) 238-247.
- [243] C.M. Willis, C.J. Stephens, J.D. Wilkinson, Epidermal damage induced by irritants in man: a light and electron microscopic study, *J Invest Dermatol* 93 (1989) 695-699.
- [244] C.M. Willis, C.J. Stephens, J.D. Wilkinson, Differential effects of structurally unrelated chemical irritants on the density of proliferating keratinocytes in 48 h patch test reactions, *J Invest Dermatol* 99 (1992) 449-453.
- [245] R.M. Szeimies, T. Sassy, M. Landthaler, Penetration potency of topical applied delta-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma, *Photochem Photobiol* 59 (1994) 73-76.
- [246] A. Martin, W.D. Tope, J.M. Grevelink, J.C. Starr, J.L. Fewkes, T.J. Flotte, T.F. Deutsch, R.R. Anderson, Lack of selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for basal cell carcinoma after topical application of 5-aminolevulinic acid: implications for photodynamic treatment, *Arch Dermatol Res* 287 (1995) 665-674.
- [247] H. Takahashi, Y. Itoh, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka, A novel ATX-S10(Na) photodynamic therapy for human skin tumors and benign hyperproliferative skin, *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 20 (2004) 257-265.
- [248] B. Kirkhus, W.M. Olsen, O.P. Clausen, A comparison between the epidermal regenerative responses provoked by a skin irritant and a tumor promoter using anti-BrdUrd/DNA flow cytometry, *Carcinogenesis* 12 (1991) 833-837.
- [249] D. Yin, W.G. Yang, J. Weissberg, C.B. Goff, W. Chen, Y. Kuwayama, A. Leiter, H. Xing, A. Meixel, D. Gaut, F. Kirkbir, D. Sawcer, P.T. Vernier, J.W. Said, M.A.

- Gundersen, H.P. Koeffler, Cutaneous papilloma and squamous cell carcinoma therapy utilizing nanosecond pulsed electric fields (nsPEF), *PLoS One* 7 (2012) e43891.
- [250] D.M. Owens, S. Wei, R.C. Smart, A multihit, multistage model of chemical carcinogenesis, *Carcinogenesis* 20 (1999) 1837-1844.
- [251] M. Kwitniewski, D. Jankowski, K. Jaskiewicz, H. Dziadziuszko, A. Juzeniene, J. Moan, L.W. Ma, R. Peksa, D. Kunikowska, A. Graczyk, M. Kwasny, M. Kaliszewski, R. Glosnicka, Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and diamino acid derivatives of protoporphyrin IX reduces papillomas in mice without eliminating transformation into squamous cell carcinoma of the skin, *Int J Cancer* 125 (2009) 1721-1727.
- [252] Z. Gong, Y. Shi, Z. Zhu, X. Li, Y. Ye, J. Zhang, A. Li, G. Li, J. Zhou, JWA deficiency suppresses dimethylbenz[a]anthracene-phorbol ester induced skin papillomas via inactivation of MAPK pathway in mice, *PLoS One* 7 (2012) e34154.
- [253] H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka, ATX-S10(Na)-photodynamic therapy inhibits cytokine secretion and proliferation of lymphocytes, *J Dermatol Sci* 49 (2008) 174-177.